



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**TESIS DOCTORAL**

**PAPEL PRONÓSTICO DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 EN  
LA CÉLULA DE REED-STERBERG DEL LINFOMA DE  
HODGKIN**

**Autor: Francisco Jesús Mestre Mestre**

**Tutor: Dr. Adolfo Díez Pérez**

**Directores:**

- **Dr. Antonio Manuel Gutiérrez García**
  
- **Dr. Andrés López Hernández**

**PROGRAMA DE DOCTORAT EN MEDICINA  
DEPARTAMENT DE MEDICINA  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**AÑO 2016**



**“La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante”**

**Ernest Rutherford (1871-1937). Físico y químico neozelandés**

**A mis padres, Ramón y Carmen, por su enorme esfuerzo y apoyo.**

**A mi mujer Eva y a mis hijos, Marc y Aina, por su cariño y comprensión. ¡Sois mi equipo!.**



## **AGRADECIMIENTOS**

Hoy en día, en múltiples ámbitos y sobre todo en medicina, se habla de la palabra “multidisciplinar” como el eje sobre el que idealmente deberían girar las decisiones que se toman sobre determinados aspectos relevantes (en el caso de los hospitales se referirá a la toma de decisiones sobre aspectos de importancia para el paciente donde participan diferentes especialistas).

Yo extrapolo la “multidisciplinaridad” también a los aspectos que tienen que ver no sólo con la ayuda en la toma de decisiones, si no también con los aspectos que tienen que ver con el desarrollo profesional y personal de cada uno. Me explico. Esta tesis doctoral, su embrión, nació como lo hacen muchas otras cosas en la vida, por amistad. Amistad entre diferentes médicos que tuvo como fruto el desarrollo de ideas a partir de las cuáles empezar un proyecto de investigación. Una amistad “multidisciplinar” que evolucionó hacia un proyecto aún más “multidisciplinar” que me ha llevado hasta aquí (y a partir de aquí espero que hacia otros proyectos). Dicho esto, quiero agradecer enormemente a todos y cada uno de los integrantes de este equipo multidisciplinar toda la ayuda y el interés que han puesto para que este trabajo llegue a buen puerto. Quiero destacar de forma especial a: José Rodríguez, por tener una mente privilegiada capaz de generar inquietud al investigador y ser un pozo de ideas en el mundo de la investigación; Rafa Ramos, un buen patólogo con múltiples inquietudes intelectuales al que uno nunca se cansaría de escuchar y, por último y muy importante para mí y para este proyecto, es Antonio Gutiérrez. Antonio es la persona que ha hecho de “pegamento” del grupo. Un hematólogo que literalmente ha puesto “patas arriba” la sección de linfomas de mi hospital. Un enorme profesional dedicado e implicado como nunca he conocido a nadie con sus pacientes y con la investigación. Esta tesis y numerosos trabajos que han visto la luz en nuestro centro son debidos a su gran tenacidad, horas de trabajo y estudio. Sé que suena a tópico en un apartado de agradecimientos, pero en mi caso le debo a Antonio no sólo este trabajo, si no el haberme ayudado a asomarme al complejo y duro campo de la investigación. Gracias a todos.



<b>ÍNDICE</b>	<b>Páginas</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10 - 72</b>
<b>1.1. Conceptos de vasculogénesis y angiogénesis.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2. Recuerdo histórico.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3. Angiogénesis.....</b>	<b>12 - 24</b>
<b>1.3.1. Reguladores</b>	
<b>1.3.2. El proceso angiogénico.</b>	
<b>1.3.3. Angiogénesis en los tumores hematológicos</b>	
<b>1.4. Microambiente peritumoral.....</b>	<b>25 - 27</b>
<b>1.5. La ciclooxigenasa-2 (COX-2) .....</b>	<b>28 - 32</b>
<b>1.6. Linfoma de Hodgkin.....</b>	<b>32 - 72</b>
<b>1.6.1. Generalidades</b>	
<b>1.6.2. Presentación clínica</b>	
<b>1.6.3. Subtipos histológicos</b>	
<b>1.6.4. Diagnóstico</b>	
<b>1.6.5. Estadiaje</b>	
<b>1.6.6. Factores pronósticos</b>	
<b>1.6.7. Tratamiento</b>	
<b>2. TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>72 - 102</b>
<b>2.1. Hipótesis de trabajo.....</b>	<b>72</b>
<b>2.2. Objetivo.....</b>	<b>73</b>
<b>2.3. Material y métodos.....</b>	<b>73 - 76</b>
<b>2.4. Resultados.....</b>	<b>77 - 86</b>
<b>2.5. Discusión.....</b>	<b>86 - 106</b>
<b>2.6. Conclusiones.....</b>	<b>107</b>
<b>3. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>108 - 134</b>
<b>4. ANEXOS .....</b>	<b>135 - 185</b>
<b>4.1. Publicación: Mestre F, Gutierrez A, Ramos R, Martinez-Serra J, Sánchez L, Matheu G, et al. Expression of COX-2 on reed-sternberg cells is an</b>	



independent unfavorable prognostic factor in Hodgkin lymphoma treated with ABVD. *Blood*. 2012;119(25):6072–9.

**4.2. Publicación:** Mestre F, Gutiérrez A, Rodríguez J, Ramos R, García JF, Martínez-Serra J, et al. Radiation therapy overcomes adverse prognostic role of cyclooxygenase-2 expression on Reed-Sternberg cells in early Hodgkin lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* . 2015 May 1;92(1):84–90.

## **ABREVIATURAS**

- **ABVD**: adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina
- **AVT** : área vascular total
- **COX-2**: ciclooxigenasa-2
- **CRS**: célula de Reed-Sternberg
- **HR**: hazard ratio
- **IL**: interleucina
- **LH**: linfoma de Hodgkin
- **LLA**: leucemia linfática aguda
- **LLC**: leucemia linfática crónica
- **LMA**: leucemia mieloide aguda
- **LMC**: leucemia mieloide crónica
- **LNH**: linfoma no Hodgkin
- **DMV**: densidad microvascular
- **MEC**: matriz extracelular
- **MM**: mieloma múltiple
- **MMPs**: metaloproteinasas de matriz
- **PdEGF** : factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas
- **RTKs**: receptores tirosín-quinasa de alta afinidad
- **SG**: supervivencia global
- **SLE**: supervivencia libre de evento (progresión o muerte)
- **SLP**: supervivencia libre de progresión
- **SLR**: supervivencia libre de recaída
- **SMD**: síndromes mielodisplásicos
- **TH1**: T helper 1
- **TH2**: T helper 2
- **TNF**: factor de necrosis tumoral
- **Treg**: linfocito regulador T
- **VEGF**: factor estimulante del crecimiento del endotelio vascular
- **VEGFR**: receptor del factor estimulante del crecimiento del endotelio vascular

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Conceptos de vasculogénesis y angiogénesis.

A lo largo de los últimos 20 años hemos vivido un interés creciente en el estudio del fenómeno angiogénico, desarrollándose toda una serie de fármacos que tienen como diana terapéutica algunos de los diferentes elementos que participan en el proceso angiogénico<sup>(1)</sup>. En lo que respecta a la formación de nuevos vasos sanguíneos, debemos diferenciar dos procesos<sup>(2,3)</sup> (Tabla 1):

- a. *La vasculogénesis*: definida como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los hemangioblastos (precursores de las células endoteliales y hematopoyéticas). Este fenómeno se produce durante el desarrollo embrionario, dando lugar a la formación de la primitiva red vascular.
- b. *La angiogénesis*: que hace referencia a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, fenómeno que puede verse tanto en el periodo embrionario como en la edad adulta y que interviene también en numerosos procesos fisiológicos.

Tabla 1. Diferencias entre vasculogénesis y angiogénesis.

ANGIOGÉNESIS	VASCULOGÉNESIS
Formación de nuevos vasos a partir de otros ya existentes	Las nuevas células endoteliales se diferencian a partir de "stem cells"
Puede darse tanto en la época embrionaria como en adultos	Proceso que ocurre durante el desarrollo embrionario formando la red vascular primitiva
Puede activarse tras determinados estímulos a lo largo del ciclo menstrual, cicatrización de heridas...	La vasculogénesis es un proceso ausente incluso en presencia de estímulos fisiológicos

## 1.2. Recuerdo histórico.

La observación de que el crecimiento tumoral se puede ver acompañado de un aumento de la red vascular fue planteado hace más de cien años por diferentes autores, incluido el célebre patólogo alemán Rudolf Virchow<sup>(4,5)</sup>. A partir de entonces y ya en el siglo XX, se suceden distintas publicaciones que abordan la importancia de la angiogénesis en el desarrollo tumoral; entre estas primeras publicaciones destaca la de Ide y colaboradores, que en 1939 son los primeros en afirmar la existencia de factores estimulantes del desarrollo vascular producidos por el propio tumor que proveerían a éste de un soporte vascular que favorecería su crecimiento. Es en 1960, tras los trabajos de Greenblatt y Shubik y de Ehrmann y Knoth, cuando se tiene ya evidencia sólida de que la angiogénesis tumoral se encuentra mediada por factores producidos por la célula tumoral que difunden al medio.

En 1971, el grupo de Judah Folkman<sup>(6)</sup> propuso que el crecimiento tumoral y la metástasis son dependientes de la angiogénesis y, por tanto, que bloquear la angiogénesis podría ser una estrategia para frenar la progresión tumoral. Es durante los años setenta y ochenta del siglo XIX cuando se aíslan e identifican numerosos factores tanto estimulantes como inhibidores de la angiogénesis.

En 1990 Juda Folkman publica una editorial definitiva donde muestra la evidencia experimental que a finales de 1989 apoyaba la hipótesis de que el crecimiento tumoral es, en efecto, dependiente de la angiogénesis<sup>(7)</sup>. A partir de la publicación de este artículo, la investigación, desarrollo y publicaciones en el campo de la angiogénesis no ha dejado de progresar, aumentando enormemente nuestro grado de conocimiento a todos los niveles (molecular, celular, farmacológico, etc...) de todos los aspectos que regulan la angiogénesis tanto en el campo del cáncer como en el de otros ámbitos médicos (oftalmología, ginecología, etc...)<sup>(8,9)</sup>. Han sido ya utilizados con éxito distintos fármacos antiangiogénicos en varios tumores sólidos aportando mejoras incluso de supervivencia<sup>(5,10)</sup>.

## **1.3. Angiogénesis**

### **1.3.1. Reguladores**

Hoy en día no podemos entender el crecimiento de una neoplasia sin tener en cuenta los componentes del microambiente tumoral (entre los que se encuentra el componente vascular). A parte de los cambios genéticos y epigenéticos que ocurren durante la transformación de una célula normal en otra tumoral, hay otro paso necesario que permite la propagación y progresión tumoral: la activación del proceso angiogénico (fenómeno descrito como “angiogenic switch”)<sup>(3,11,12)</sup>.

De igual forma que ocurre en el tejido sano, los tumores requieren de un adecuado aporte de oxígeno, metabolitos y de una red de deshecho de residuos. Estos requerimientos van a ser variables en función del tumor primario en cuestión y cambiarán además durante el curso de la progresión tumoral. Un factor angiogénico es un factor que selectivamente altera las características de las células endoteliales y estructuras perivasculares asociadas (pericitos, células musculares lisas de las paredes vasculares, etc.), pero no afecta la función de otros tipos celulares.

Clásicamente, el modelo de regulación de la angiogénesis tumoral se ilustra como un equilibrio entre factores pro y antiangiogénicos, de modo que la activación va a depender del “peso” de los factores estimulantes frente a los inhibidores<sup>(13)</sup> (Tabla 2).

La sobreexpresión génica que estimula la angiogénesis se verá inducida por estímulos fisiológicos como son la hipoxia, la activación de oncogenes y mutaciones a nivel de genes supresores tumorales.

Pero, ¿cómo se regula la activación angiogénica?, ¿cuáles son las diferencias entre la angiogénesis tumoral y la fisiológica?<sup>(14,15)</sup>. Durante la vasculogénesis embriológica los vasos sanguíneos se forman “de novo” a partir de precursores de células endoteliales (angioblastos) que forman un plexo capilar primario. Esta red primitiva posteriormente se diferenciará y los nuevos vasos sanguíneos crecerán y se dividirán a partir de los capilares preexistentes.

**Tabla 2. Principales factores activadores e inhibidores de la angiogénesis.**

ACTIVADORES	FUNCIÓN
VEGF	Estimula la proliferación y migración de células endoteliales aumentando la permeabilidad vascular y la adhesión leucocitaria
VEGFR, NRP-1	Integración de señales angiogénicas y de supervivencia celular
Angiopoyetina-1, Tie-2	Estabilización de vasos e inhibición de la permeabilidad
PDGF-BB y receptores	Reclutan células musculares lisas
TGF $\beta$ 1, endogлина, receptores de TGF $\beta$	Estimulan la producción de matriz extracelular
MCP-1, IL8, otras citoquinas, FGF, HGF	Estimulan la proliferación y migración de células endoteliales
Integrinas	Receptor de proteínas de matriz extracelular y proteasas
VE-Cadherina, CD31	Proteínas de uniones intercelulares
Efrinas	Regulan la diferenciación arterio-venosa
UPA, tPA, MMPS	Remodelación de la matriz, liberación y activación de factores de crecimiento
PAI-1	Estabilización de neovasos
NOS, COX-2, PGE2, PGI2	Vasodilatación, inducción de factores de crecimiento y proliferación endotelial

INHIBIDORES	FUNCIÓN
sVEGFR, sNRP-1	Secuestro de VEGF y PlGF
Angiopoyetina-2	Antagonista de la angiopoyetina-1
TSP-1, 2	Inhibe la proliferación y migración endotelial; induce la apoptosis de estas células
Angiostatina, endostatina y vasostatina	Inhiben la proliferación, supervivencia y migración endotelial.
Tumstatina	Inhibe la síntesis proteica a nivel del endotelio.
Fragment d'antitrombina III	Inhibe la proliferación endotelial
Prolactina 16 Kda	Inhibe VEGF/bFGF
PEDF	Induce la apoptosis endotelial
Fragmento de SPARC	Inhibe la actividad de VEGF
Fragmento de osteopontina	Interfiere la señalización vía integrinas
VEGI	Inhibe el crecimiento endotelial
TIMPS, inhibidores de MMPs	Inhiben la remodelación de la matriz extracelular y la migración endotelial
15-d-PGJ2, PPARγ, TxA2	Inducen apoptosis, inhiben proliferación y migración del endotelio, inhiben la expresión de uPA, VEGFR e incrementan la de PAI-1
PF-4, IP-10, IL-4, IL-12, IL-18, IFN	Inhiben la migración endotelial y la expresión de bFGF.

En el adulto el medio vascular se encuentra normalmente en un estado quiescente, de modo que las células endoteliales son, junto a las neuronas, las células más longevas de nuestro organismo. Los pocos órganos que en el adulto necesitan continuar con el desarrollo angiogénico incluyen los órganos reproductores femeninos, órganos que tienen un crecimiento fisiológico o tejidos lesionados (formando parte del proceso de cicatrización normal de los tejidos). El punto en el cual estos procesos normales difieren de la angiogénesis patológica está en el correcto balance entre señales pro y antiangiogénicas.

En contra de este correcto equilibrio encontramos a los tumores. En ellos se pierde el correcto balance entre el estímulo y la inhibición del proceso angiogénico. Una característica distintiva de los vasos tumorales es que pierden la capacidad de quiescencia, permitiendo el crecimiento constante de nuevos vasos sanguíneos. Consecuentemente esta red vascular desarrollará características únicas que le harán ser bastante diferente del sistema vascular normal. La arquitectura de esta nueva red tendrá los siguientes rasgos propios: los vasos serán irregulares, dilatados, tortuosos y pueden ser ciegos. No se encuentran organizados en vénulas, arteriolas y capilares sino que englobarán características caóticas de todos ellos. La red vascular será débil y se formarán fácilmente hemorragias. El endotelio en ocasiones incluso integrará en sus paredes a células tumorales. El flujo sanguíneo que discurra por esta red aberrante será irregular, moviéndose la sangre de forma más lenta u oscilante; ello da lugar a capilares disfuncionales y a patrones vasculares heterogéneos e irregulares dentro del tumor.

El factor estimulante del crecimiento del endotelio vascular (VEGF) juega un papel esencial en la vasculogénesis durante la embriogénesis, la angiogénesis fisiológica y la neovascularización tumoral<sup>(4,5,9,16)</sup>. La familia del VEGF incluye el VEGF-A, el factor de crecimiento de placentas (PlGF), VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D. El principal miembro de esta familia es el VEGF-A (de hecho, cuando se habla genéricamente de VEGF en realidad hablamos de VEGF-A). VEGF-A es un homodímero de 40-45 kDa liberado por una gran variedad de tipos celulares tanto benignos como malignos. En función de la existencia de diferentes tipos de mRNA, se producen cinco monómeros diferentes de VEGF, de longitud de aminoácidos variables

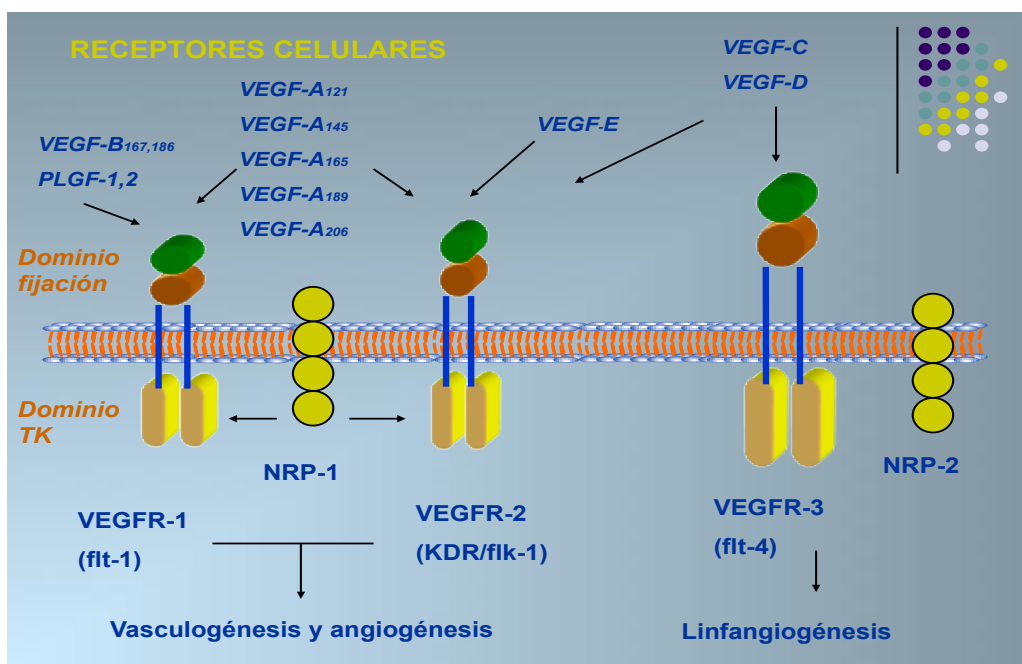


(denominadas por números de subíndice): VEGF<sup>121</sup>, VEGF<sup>145</sup>, VEGF<sup>165</sup>, VEGF<sup>189</sup>, y VEGF<sup>206</sup>(17).

La transcripción de mRNA del VEGF se provoca por la hipoxia y por una gran variedad de señales de crecimiento y de citoquinas. Las células endoteliales estimuladas por VEGF migran y proliferan, aumentan la permeabilidad vascular, elaboran metaloproteinasas de matriz (MMPs), se dividen y reclutan elementos de soporte como pericitos. La vasculogénesis inducida por VEGF también ocurre indirectamente. Siguiendo la exposición de la célula endotelial al VEGF, se regula la expresión de L-, M-, y  $\beta$ -2 integrinas. Esto facilita la adherencia y migración de monocitos a la célula endotelial. Estos monocitos podrían así contribuir a la angiogénesis mediante la secreción de factores de crecimiento y citoquinas.

La actividad de VEGF-A, se encuentra mediada por la interacción con receptores tirosín-quinasa de alta afinidad (RTKs) expresados en la mayoría de las células endoteliales. Se han identificado tres tipos principales de RTKs del VEGF: receptor de VEGF 1 (VEGFR-1) (Flt-1), VEGFR-2 (KDR), y VEGFR-3 (Flt-4). Estos receptores traducen señales que afectaran la proliferación endotelial normal, la diferenciación, migración y el metabolismo celular (Figura 1).

Figura 1. Receptores de la familia VEGF.



- **VEGFR-1, o Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)**: es un miembro de tipo III de la familia de receptores tirosín-quinasa. A pesar de que se expresa principalmente en la célula endotelial, VEGFR-1 se encuentra también presente en las fibras musculares lisas y en monocitos. La activación de este receptor para VEGF estimula la migración celular y contribuye indirectamente a la migración de los nuevos brotes a través de la matriz extracelular realzando la producción de MMPs asociadas a las fibras musculares lisas endoteliales. La unión con VEGFR-1 también consigue el reclutamiento de monocitos y la expresión de factores tisulares tanto por parte de los monocitos como por las células endoteliales.

- **VEGFR-2, o fetal kinase-1 (Flk-1)**: es esencial para la vasculogénesis embrionaria y la hematopoyesis definitiva. Los ratones deficientes en VEGFR-2 mueren intraútero a causa de un deficiente desarrollo vascular y hematopoyético. Fuera de la época embrionaria, este receptor se expresa exclusivamente en células endoteliales y células indiferenciadas hematopoyéticas primitivas, jugando un papel en la proliferación, diferenciación y vasculogénesis de la célula endotelial. En tumores malignos, el VEGF que se liga a VEGFR-2 provoca el proceso de neovascularización que conduce al crecimiento y metástasis de los tumores.

La unión con VEGFR-2 promueve la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis a través de fosfatidilinositol 3'-kinasa/Akt. La inactivación de tetranitrato de pentaeritritol (PTEN) y la estimulación del fosfatidilinositol 3' -kinasa/Akt proporciona un mecanismo para conectar la unión con VEGFR-2 y la activación de integrinas. La incubación de células endoteliales con VEGF ocasiona una estimulación en la producción de integrinas y conduce a una mayor adhesión celular, migración y unión con ligandos solubles.

- **VEGFR-3, (Flt-4)**: es el miembro más recientemente descrito de la familia de VEGFR. Este receptor se restringe predominantemente a células endoteliales que están cerca de los canales linfáticos. Así pues, su papel sería predominantemente de estimulador de la linfangiogénesis<sup>(14)</sup>.

Por lo que respecta a otros tipos de VEGF que se han comentado antes, su unión a los diferentes receptores se da de la siguiente forma:

- **VEGF-B:** tiene un papel importante probablemente en la vasculogénesis, pero puede también ejercer funciones tales como la activación de enzimas invasivas en las células endoteliales.
- **VEGF-C:** se asocia frecuentemente con la angiogénesis linfática. De todos modos, más recientemente se ha asociado su expresión con la angiogénesis tumoral a diversos niveles. Se une preferentemente al receptor VEGFR-3. Incluso existen estudios que relacionan su expresión con las metástasis linfáticas<sup>(18)</sup>.
- **VEGF-D:** esta proteína puede ligarse a receptores VEGFR-2 y VEGFR-3, y parece que puede inducir angiogénesis in vivo.
- **VEGF-E:** se conoce muy poco en el momento actual, excepto que se une al receptor VEGFR-2 y que puede inducir mitosis de células endoteliales y, por tanto, el fenómeno de la angiogénesis.

### **1.3.2. El proceso angiogénico**

El inicio del proceso angiogénico se encuentra reflejado en una serie de hechos, que básicamente son<sup>(3,19)</sup>:

1. Liberación de proteasas por parte de las células endoteliales activadas.
2. Degradación de la membrana basal vascular preexistente.
3. Migración de células endoteliales intratumorales.
4. Proliferación de células endoteliales.
5. Formación de una nueva membrana basal y adherencia de los pericitos (estabilización del nuevo tejido vascular).
6. Fusión de los nuevos vasos formados.
7. Establecimiento del flujo sanguíneo de los neovasos.

El proceso metastásico es un fenómeno que comparte propiedades fisiológicas y moleculares con la angiogénesis, y necesita de su colaboración. Ambos son

procesos invasores en los cuáles las células (endoteliales en la angiogénesis y tumorales en la metástasis), atraviesan barreras biológicas (membrana basal, matriz extracelular y estroma con células y macromoléculas) para alcanzar su tejido diana<sup>(18)</sup>. A semejanza de la angiogénesis, la diseminación metastásica también constaría de una serie de etapas:

1. Salida de las células neoplásicas del tumor primario.
2. Superación de la membrana basal epitelial y del estroma.
3. Penetración en el sistema vascular y circulación por el torrente sanguíneo.
4. Salida del torrente sanguíneo atravesando la membrana basal endotelial y el estroma perivascular.
5. Penetración en el tejido diana.
6. Angiogénesis, proliferación celular y crecimiento tumoral.

### **1.3.3. Angiogénesis en los tumores hematológicos**

Aunque la importancia de la angiogénesis en los tumores sólidos se ha reconocido hace ya una serie de años, su importancia en las neoplasias hematológicas es menos clara. La evidencia sugiere que VEGF tiene un papel esencial en el desarrollo y progresión de diferentes tumores hematológicos como las leucemias agudas, síndromes mieloproliferativos, la mielodisplasia, los linfomas no Hodgkin y el mieloma múltiple<sup>(20)</sup>.

Estas neoplasias pueden mostrar una respuesta trófica a una gran variedad de moléculas autocrinas y paracrinas y los diferentes marcadores de angiogénesis podrán tener importancia pronóstica en algunas de ellas. Este apartado explora la evidencia experimental y clínica a favor de la importancia del fenómeno angiogénico en diferentes tumores del sistema hematopoyético.

- **Leucemia mieloide aguda (LMA)**: de forma genérica podemos decir que los tres mecanismos fundamentales mediante los cuáles en la LMA se produce una estimulación de la angiogénesis sería mediante su inducción directa, mediante una regulación paracrina y tras estimulación autocrina<sup>(21)</sup>.

Las biopsias de medula ósea de pacientes con LMA muestran un aumento de la neovascularización que es reversible después de la curación de la enfermedad. En un

estudio de 20 pacientes con LMA<sup>(22)</sup>, la densidad microvascular (DMV) era significativamente más grande en las muestras de biopsia de médula ósea de pacientes no tratados que en aquellos de controles normales ( $p < 0.001$ ). Además, los blastos de estos pacientes expresaban mRNA de VEGF. Un análisis de blastos de 28 pacientes con LMA de novo y cinco pacientes con LMA secundaria demostró transcripciones de VEGF en 20 y 3 pacientes, respectivamente<sup>(23)</sup>. En pacientes nuevamente diagnosticados con los diferentes tipos de LMA, hay una relación directa entre el contenido celular creciente de VEGF y una supervivencia más corta ( $p=0.01$ )<sup>(24)</sup>. También se ha observado que la falta de una relación entre los niveles de VEGF y la edad, citogenética, estado general o historia previa de patología hematológica sugiere que esta medida de potencial angiogénico de los mieloblastos es un predictor independiente del resultado. En otro estudio llevado a cabo por el MD Anderson (Texas) con 133 pacientes con LMA y 80 con síndrome mielodisplásico, la concentración plasmática de la forma soluble de VEGFR1 resultó ser un factor pronóstico independiente en ambas patologías<sup>(25)</sup>.

- **Leucemia linfática aguda (LLA):** en una serie en la que se evaluaba la médula ósea de 40 niños diagnosticados de LLA<sup>(26)</sup>, se mostraba que la densidad microvascular era significativamente más grande cuando se comparaba con controles ( $p < 0.0001$ ). En pacientes adultos con LLA, la mediana del número de vasos sanguíneos en la médula ósea fue también significativamente más alto que en la médula normal ( $p=0.005$ )<sup>(27)</sup>. Interesantemente, el bFGF, otra molécula pro-angiogénica potente, pero no el VEGF, se encontraba elevado en el suero de estos pacientes. Así mismo, en el trabajo de Bellamy et al.<sup>(28)</sup> se demostró que algunas líneas celulares de pacientes con LLA tienen sobreexpresión de VEGF así como también de VEGFR-1.

- **Leucemia linfática crónica (LLC):** las células B de la LLC producen VEGF biológicamente activo, tanto in vitro como in vivo<sup>(29)</sup>. Aunque en el trabajo de Aguayo et al. no se demostró un aumento en la DMV en la médula ósea de pacientes con LLC, los ganglios linfáticos infiltrados por células de LLC mostraban un aumento significativo de la DMV<sup>(27,28,30)</sup>. En pacientes con LLC la expresión de

VEGFR-2 y los niveles aumentados de VEGF en suero se asocian a progresión de la enfermedad y a una menor supervivencia<sup>(31,32)</sup>.

- **Leucemia mieloide crónica (LMC):** la DMV de la médula ósea de pacientes con LMC se encuentra aproximadamente dos veces por encima de los controles ( $p=0.003$ )<sup>(27)</sup>. Esto se relaciona con la producción de VEGF en estos pacientes. Los niveles medios de VEGF en muestras de plasma de estos pacientes son aproximadamente tres veces mayores que las muestras de control<sup>(33)</sup>. La importancia a nivel pronóstico de estos hallazgos permanece sin aclarar.

- **Linfomas no Hodgkin (LNH):** dentro de los diferentes tipos de LNH de células B, la angiogénesis puede ser un fenómeno prominente sobre todo en los subtipos agresivos más que en los indolentes<sup>(34)</sup>. Los ganglios linfáticos de estos pacientes presentan una mayor DMV con células inflamatorias que secretan citoquinas angiogénicas aumentando así los niveles de factores angiogénicos solubles en suero<sup>(35)</sup>. VEGF se ha relacionado con el curso de pacientes con este tipo de tumores. Los niveles de VEGF son significativamente más bajos en pacientes en remisión completa después de un seguimiento medio de 21 meses, comparados con aquellos con enfermedad en progresión ( $p=0.016$ )<sup>(36)</sup>. Además, la SLP era significativamente más alta cuando los pacientes tenían niveles de VEGF que estaban por debajo de la mediana de 147 pg/ml ( $p=0.018$ ). Aunque la expresión celular de VEGF es común en LNH, la co-expresión de receptores parece limitada a los de grado intermedio o alto<sup>(37)</sup>.

- **Mieloma Múltiple (MM):** los datos actuales sugieren que el aumento de la angiogénesis de la médula ósea en el MM se debe a la expresión aberrante de factores angiogénicos por las células de mieloma, el consiguiente aumento en la actividad pro-angiogénica de las células plasmáticas normales como resultado de la actividad angiogénica de células de mieloma, y el aumento del número de células plasmáticas<sup>(38)</sup>. IL-6 es un factor de crecimiento de células plasmáticas. En el MM los niveles plasmáticos de IL-6 se relacionan directamente con la carga tumoral, destrucción ósea y otras medidas de actividad de la enfermedad<sup>(39)</sup>.

Se considera que la fuente de las citoquinas es tanto autocrina como paracrina. Sin tener en cuenta el lugar de origen, los niveles elevados de IL-6 provocan expresión de VEGF en la célula endotelial. Como resultado de ello, los niveles de VEGF se elevan en la médula ósea de pacientes con mieloma múltiple y se relacionan con la etapa de la enfermedad<sup>(40)</sup>. VEGF también puede servir como factor de crecimiento de las células plasmáticas malignas<sup>(41)</sup>. Esto establece un bucle de respuesta que puede contribuir a la progresión de la enfermedad. En el laboratorio, los anticuerpos anti- IL-6 redujeron el número de células plasmáticas en el cultivo celular de médula ósea así como el número de células endoteliales<sup>(42)</sup>.

Diferentes estudios experimentales y clínicos sugieren que el crecimiento celular de mielomas es dependiente de la proliferación de las células endoteliales dentro de la médula ósea<sup>(42)</sup>. Esto se puede relacionar con la estimulación paracrina de IL-6 así como de otras citoquinas como pueden ser bFGF y MMPs. En pacientes con mieloma múltiple, hay una fuerte correlación entre un aumento de la angiogénesis, la DMV y la supervivencia. En la experiencia de la Clínica Mayo, pacientes con menos de 50 microvasos/campo sobreviven 5.1 años, mientras que aquellos con más de 50 sobreviven sólo 2.6 años ( $p=0.004$ ). También, el grado de angiogénesis evaluado por examen visual semicuantitativo de muestras de médula ósea, se correlacionó con un alto marcaje de células plasmáticas, otro indicador de la gravedad de la enfermedad<sup>(43)</sup>.

- **Mielodisplasia:** los síndromes mielodisplásicos (SMD) son desórdenes pre-leucémicos, especialmente en pacientes que presentan una carga de leucemia perceptible o un cariotipo adverso. Entre los diferentes subtipos de la FAB, la DMV fue significativamente más alta en la anemia refractaria con exceso de blastos en transformación, en la leucemia mielomonocítica crónica, o en los distintos subtipos de fibrosis, comparados con la anemia refractaria con exceso de blastos, la anemia refractaria, o la anemia refractaria con sideroblastos en anillo<sup>(44)</sup>. Los niveles plasmáticos de VEGF se elevan en las mielodisplasias en una medida comparable a aquellos pacientes con LMA, pero menos que la comunicada en LLC y LMC <sup>(27)</sup>. El VEGF es expresado por elementos mieloides inmaduros, especialmente precursores de leucemia monocítica pero no en elementos eritroides o linfoides<sup>(45)</sup>.

- **Mielofibrosis Idiopática:** la angiogénesis se encuentra aumentada en la médula ósea de pacientes con mielofibrosis idiopática. El aumento de la neovascularización de medula ósea se observó en un 70% de 114 pacientes con esta enfermedad<sup>(46)</sup>. El grado de DMV fue más alto que en pacientes con policitemia vera, trombocitemia esencial, o en casos control. Este aumento se relacionó con el tamaño del bazo y fue un factor de riesgo significativo e independiente para la supervivencia global (SG)<sup>(46)</sup>. La neoangiogénesis fue independiente del grado de fibrosis, sugiriendo todo ello que la neovascularización es un componente integrante de esta enfermedad pudiendo ser una diana para una intervención terapéutica.

- **Linfoma de Hodgkin (LH):** hay diversos estudios donde se ha realizado una aproximación al posible papel que puede tener la angiogénesis en este tipo de neoplasias<sup>(35,47-53)</sup>. El estudio de Doussis-Anagnostopoulou y cols.<sup>(48)</sup> examinó la expresión inmunohistoquímica de VEGF utilizando el anticuerpo monoclonal VG1 en una serie de 61 casos de pacientes con LH, incluyendo tanto las variantes de LH clásico como la variante de predominio linfocítico nodular, y relacionó estos resultados con la DMV, utilizando un anticuerpo monoclonal antiCD31. En 41 casos (un 70.6%) de la variante clásica y uno de los tres casos de predominio linfocítico nodular, las CRS y las células estromales expresaron VEGF. La tinción observada fue citoplasmática, o de tipo difuso o con una distribución paranuclear focal. Los macrófagos fueron siempre positivos, mientras que los linfocitos reactivos mostraron positividad ocasional. También se vio una cantidad de tinción extracelular fuerte y variable, así como también se observó una tinción intravascular prominente. No hubo ninguna relación estadísticamente significativa entre la expresión de VEGF y los subtipos de la enfermedad o la DMV.

Otro estudio importante es el de Korkolopoulou et al.<sup>(54)</sup>. El propósito de su estudio fue evaluar diversas características morfométricas de los microvasos en secciones de ganglios linfáticos de 286 pacientes con LH e investigar su relación con parámetros clínico-patológicos y pronósticos. La DMV, el área vascular total (AVT) y otros parámetros microvasculares fueron cuantificados después de la tinción con



anti-CD34 de la región de vascularización más intensa. En el análisis univariante, la SG específica de enfermedad se encontró afectada de forma negativa por la DMV y el AVT, mientras que la supervivencia libre de recaída (SLR) estuvo asociada con la presencia de más secciones de vasos. El análisis multivariante reveló que la extensión angiogénica (DMV/AVT), la edad y el número de lugares afectados afectaban de forma independiente a la SG.

Otro estudio a tener en cuenta es el llevado a cabo por Mainou-Fowler et al.<sup>(47)</sup>. En su trabajo, examinó la DMV, la expresión de VEGF y del factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PdEGF) en biopsias de ganglios linfáticos de pacientes con LH tanto en la fase diagnóstica como en recaída. La DMV y el PdEGF aumentaron durante la progresión de la enfermedad en siete de 11 casos para la DMV y en 5 de 11 para el PdEGF.

Un estudio donde se valoró el papel de otro estimulante de la angiogénesis diferente del VEGF es el de Kadin et al.<sup>(55)</sup>. El TGF-beta es un factor de crecimiento multifuncional que promueve el crecimiento de fibroblastos, la síntesis de colágeno, la angiogénesis, y que estimula la migración y activación de los monocitos, pero suprime el crecimiento y diferenciación de linfocitos inmunes y células "killer". Este trabajo evaluó a 14 pacientes con LH, incluyendo: 8 esclerosis nodular, 4 celularidad mixta, 1 predominio linfocítico y 1 tipo depleción linfoide. La actividad de TGF-beta se demostró en seis casos de esclerosis nodular pero no en los otros subtipos histológicos. La tinción de este factor se encontró en el citoplasma de la CRS en un caso y en la superficie de las CRS y sus variantes lacunares en cinco casos. La actividad de TGF-beta asociada con la matriz extracelular se localizó principalmente alrededor de los vasos sanguíneos, zonas de necrosis, en los márgenes de bandas de esclerosis de colágeno y en áreas sincitiales de las CRS. En dos casos, TGF-beta estuvo asociado a histiocitos epiteliales o granulomas. Los linfocitos pequeños, los granulocitos, y las células centrales germinales fueron negativas. Estos resultados sugieren que TGF-beta es un factor de crecimiento de importancia biológica en LH y puede ser responsable de muchas de las características histológicas, como la esclerosis nodular y los granulomas, que pueden tener importancia pronóstica.

#### **4. Microambiente peritumoral**

El microambiente peritumoral está constituido por la matriz extracelular (MEC), las células del estroma y las relaciones autocrinas y paracrinas existentes entre ellas mediadas por citoquinas y quimoquinas. Todas ellas serán determinantes de la morfología y clasificación tumoral, agresividad clínica, pronóstico y respuesta al tratamiento.

La MEC constituye una red tridimensional que engloba de una vez a todos los órganos, tejidos y células del organismo<sup>(56)</sup>. La MEC forma además un filtro biofísico, a través del cual las células se protegen, se nutren y se inervan. Estructurada sobre la base de un colágeno firme y una elastina flexible, incluye entre sus múltiples funciones la de servir de reservorio para diferentes moléculas de la información, como neurotransmisores, hormonas o citoquinas. Constituye el lugar de encuentro para las diversas subpoblaciones celulares que dan lugar a la respuesta inmune, el proceso de angiogénesis, la fibrosis y la regeneración tisular. La propia progresión tumoral supone una interacción continuada entre las células del parénquima y del estroma, del que se derivarán las características histológicas y el comportamiento clínico del tumor. La remodelación del microambiente tumoral supone la liberación de factores de crecimiento asociados a la MEC con capacidad de estimular tanto a las células endoteliales como a la línea celular del tumor. Finalmente el microambiente celular determinará tanto la respuesta al tratamiento citotóxico como el pronóstico del tumor.

Las citoquinas y quimoquinas son proteínas de bajo peso molecular con una amplia variedad de funciones que trabajan ya sea de una manera paracrina para modular la actividad de las células que rodean a la CRS o de una forma autocrina afectando directamente a las células que las producen. Ambas interacciones, autocrina y paracrina, modularán la celularidad peritumoral que se encuentra en el LH influyendo en la proliferación y en el fenotipo antiapoptótico de las CRS<sup>(57,58)</sup>.

Los diferentes tipos celulares y los mediadores que regulan las relaciones entre ellos, son los siguientes<sup>(58)</sup> :

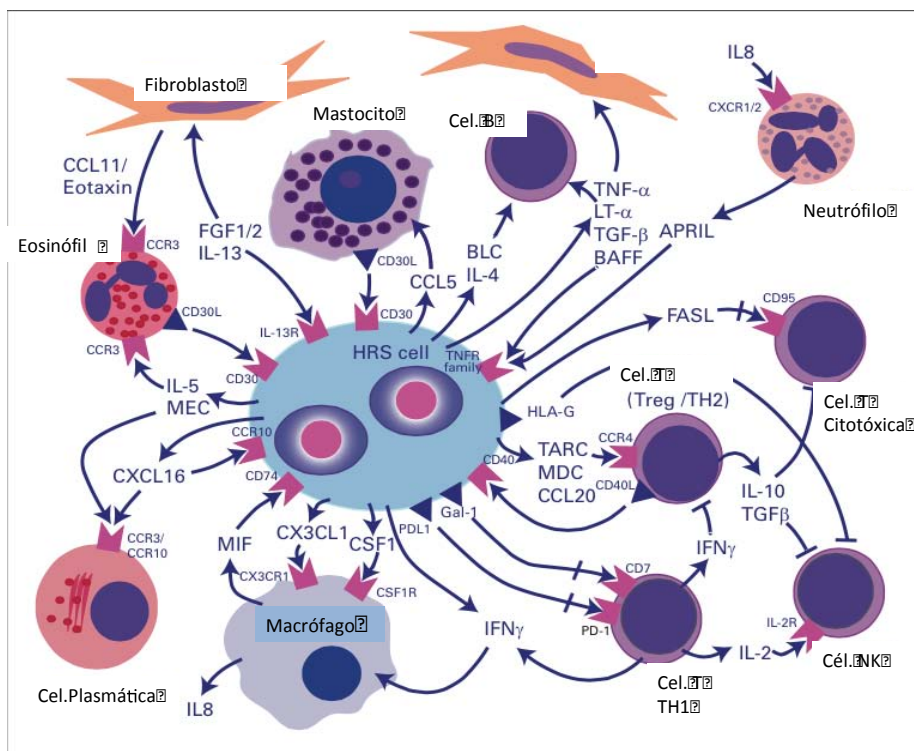
- Fibroblastos: la CRS es capaz de estimular la expresión de interleucina (IL) 13, factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$  y factores de activación de fibroblastos, que darán lugar a la proliferación de éstos sobre todo en la variante de LH tipo esclerosis nodular. Además, los fibroblastos serán capaces de atraer a eosinófilos y células th2 a través de la secreción de eotaxina (CCI11).
- Eosinófilos: aparte de la relación antes descrita con los fibroblastos, su proliferación se verá estimulada por la CRS mediante la producción de IL-5, así como de quimoquinas asociadas a mucosas (CCL28). Por otro lado, son capaces de estimular a la CRS vía CD30, al producir el ligando de CD-30 (CD30-L).
- Macrófagos: un incremento en el número de macrófagos se asocia a una peor evolución de la enfermedad. En algunos estudios la expresión por parte de los macrófagos de varios genes como STAT1 y ALDH1A1 se han correlacionado con una peor supervivencia específica de enfermedad; sin embargo otros estudios han tenido un resultado contradictorio, sugiriendo una evolución más favorable cuando se producía una activación de los genes LYZ y STAT1. Más recientemente, se ha demostrado que el aumento en el número de macrófagos CD68+ se asocia con una peor evolución tras tratamientos de segunda línea como puede ser el trasplante autólogo en estos pacientes. En pacientes tratados con esquemas de quimioterapia tipo ABVD o ABV el impacto negativo en cuanto al pronóstico que provoca el aumento del número de macrófagos asociados al tumor (sobre todo en la variante clásica del LH) ha sido bien establecido<sup>(59)</sup>. Por otra parte, la liberación de IL 8 por parte de los macrófagos estimulará el reclutamiento de neutrófilos.
- Neutrófilos: la activación de los neutrófilos dará lugar a la producción por parte de éstos de un ligando inductor de la proliferación (APRIL) que a su vez interactuará con toda una familia de receptores de factores de necrosis tumoral (TNFR) que serán capaces de interferir en las señales de transcripción influyendo en los fenómenos de inflamación, supervivencia, proliferación y diferenciación celulares.
- Células plasmáticas: la producción por parte de la célula de RS de CCL28 (también conocida como MEC) y CXCL16 se ha correlacionado con la infiltración por células plasmáticas sobre todo en la variante clásica del LH.
- Mastocitos: junto con los eosinófilos, constituyen el grupo predominante de células CD30L positivas que rodean a la CRS, favoreciendo la estimulación de

éstas vía interacción CD30-CD30L. A su vez, la CRS estimulará al mastocito vía producción de CCL5.

- Células B: forman parte de la composición celular habitual en un ganglio linfático normal. Se mantiene abierta la pregunta de si este tipo de células se ve atraído hacia el microambiente del LH o bien si representan remanentes celulares no estimulados por la CRS. De todos modos, varias citoquinas como TNF- $\alpha$  y linfoxina  $\alpha$  (las cuáles tienen efecto sobre la diferenciación, proliferación y quimiotaxis de las células B) se sobreexpresan en el LH, pudiendo jugar un papel en el inicio de las reacciones que se llevan a cabo en el centro germinal.

- Células T: las células más abundantes en el LH son los linfocitos T CD4+. Varios estudios han corroborado que el subtipo principal de estas células muestra un fenotipo T helper 2 (TH2) y otro regulador T (Treg), particularmente aquellos que se encuentran en la inmediata vecindad de la CRS. Ésta, vía secreción de potentes quimocinas como CCL5, CCL17 y CCL22 atraerá TH2 y Treg que expresen el receptor CCR4. Así mismo, la CRS, junto con los linfocitos T helper 1 (TH1) serán capaces de producir interferón  $\gamma$ , que constituirá un potente estimulante de la función de los macrófagos.

**Figura 2. Esquema de la interacción entre las células de RS y el microambiente tumoral en el LH.**



## **1.5. La ciclooxigenasa-2 (COX-2)**

La ciclooxigenasa (COX) es la enzima principal que interviene en la síntesis de las prostaglandinas, mediante la oxidación del ácido araquidónico y su posterior conversión a prostaglandina H<sub>2</sub>, precursor a su vez de los prostanoides (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>). Las prostaglandinas realizan funciones relacionadas con la homeostasis de diversos órganos y participan en procesos como el dolor, la inflamación y el desarrollo de neoplasias<sup>(60)</sup>.

En los últimos años se han descrito dos isoformas de la ciclooxigenasa: COX-1 y COX-2. Presentan una homología del 60% y una afinidad y capacidad similares en la conversión del ácido araquidónico a PGH<sub>2</sub>. Entre las características diferenciales de ambas isoformas, destaca por un lado el mecanismo de regulación y por otro el patrón de expresión. La isoforma COX-1 se expresa en prácticamente todos los tejidos del organismo y se le atribuye un papel regulador en la homeostasis fisiológica de los diferentes órganos o tejidos, que incluyen la citoprotección gástrica, la vasodilatación renal y la producción de prostanoides, proagregantes y tromboxano en las plaquetas. Por el contrario, la isoforma COX-2 es inducible, lo que comporta que sea prácticamente indetectable en la mayoría de tejidos en condiciones basales, mientras que su expresión aumenta en respuesta a citoquinas, factores de crecimiento y mitógenos, entre otros.

### **Ciclooxigenasa-1 (COX-1)**

La COX-1 desempeña un papel importante en la síntesis de los prostanoides para propósitos fisiológicos y regula funciones como la protección gastrointestinal, la homeostasis vascular, la hemodinámica renal y la función plaquetaria. El gen de la COX-1 mide aproximadamente 22 kb, tiene 11 exones y procede de una duplicación de un gen común muy ancestro. Se encuentra en el cromosoma 9 y su región promotora no tiene caja TATA pero sí que contiene muchos lugares de transcripción, lo que sugiere que su gen es del tipo de «genes de mantenimiento». En la célula, generalmente la COX-1 se encuentra en el citoplasma o cerca del retículo endoplásmico. Aunque la COX-1 se expresa constitutivamente en muchos tejidos, sus valores cambian durante el desarrollo. La estructura proteica de ambas

enzimas es similar, con una homología superior al 90%. El peso molecular de la COX-1 es aproximadamente de 69,05 kD, y los exámenes cristalográficos han demostrado diferencias estructurales derivadas de la secuencia de aminoácidos. Su estructura presenta dos dominios, el que se une a las membranas está constituido por cuatro hélices que forman un canal que permite la entrada del ácido araquidónico de la membrana al lugar con actividad enzimática. En esta región hay dos lugares activos, uno que cataliza la cicloxigenación y otro la peroxidación.

### **Ciclooxigenasa-2 (COX-2)**

Aunque la existencia de varias isoformas de la COX había sido postulada a mediados de los años setenta, no fue hasta comienzo de los noventa cuando se obtuvieron evidencias concretas de una segunda isoforma de la COX, que no se encuentra presente normalmente en la célula pero aparece rápidamente tras la exposición de la célula a agentes como lipopolisacáridos o citoquinas proinflamatorias, y regula la producción de los prostanoïdes que participan en la inflamación y en otros procesos no inflamatorios, tanto fisiológicos como patológicos<sup>(61)</sup>. Por este motivo se denominó a la COX-2 forma inducible, y a la COX-1 forma constitutiva. La COX-2 tiene un gen de menor tamaño, localizado en el cromosoma 1, mide aproximadamente 8,3 kb y contiene 10 exones. Su región promotora tiene lugares de unión que se sabe que reconocen a los glucocorticoides, a la IL-6 y a otras citoquinas.

En la célula, la COX-2 se encuentra fundamentalmente en la región perinuclear y en la membrana nuclear. Su aparición en las células puede ser estimulada o inducida en muchos tipos de ellas<sup>(4)</sup>, incluidas las relacionadas con la respuesta inflamatoria, aunque estudios recientes han demostrado que se expresa constitutivamente en diferentes puntos del aparato genital masculino y femenino y durante los procesos relacionados con la ovulación, la implantación ovular, la inducción del parto y la reproducción. También se expresa en diferentes tipos de neuronas y participa en la transformación neoplásica, en este caso a través de mecanismos de resistencia a la muerte programada (apoptosis). El mecanismo de acción en estos casos no es simplemente el de la inhibición de las prostaglandinas sino también el acoplamiento o la interferencia con las funciones de otras

proteínas. Su peso molecular es de 69,09 kD.

Estructuralmente la COX-1 y la COX-2 son parecidas, pero el sitio de unión para el ácido araquidónico es diferente. La COX-2 presenta un canal más amplio, que le permite el acceso a AINE de gran tamaño que no penetrarían en el canal de la COX-1. Su estructura tridimensional consta de tres unidades independientes: una similar al factor de crecimiento epidérmico 2, otra en la membrana y otra en la que contiene los dominios enzimáticos. Además de las diferencias génicas comentadas, de distribución, regulación, expresión y estructura, ambas enzimas se activan por diferente estímulo, usan diferentes “*pools*” de sustrato y se acoplan a diferentes fosfolipasas A2. En células murinas, cuando la actividad de la COX-2 se bloquea, el ácido araquidónico liberado por ciertos estímulos no se puede convertir en prostaglandinas, aunque exista actividad de COX-1 en la célula.

Respecto a la implicación de COX-2 en el cáncer, diferentes estudios de expresión génica, tanto en el ARN como en la proteína, han demostrado que existe sobreexpresión de COX-2 en más del 85% de muestras de CCR humano, así como en aproximadamente el 50% de los adenomas colorrectales. De manera similar, también se ha observado una sobreexpresión de esta isoenzima en adenomas desarrollados en modelos experimentales de poliposis adenomatosa (ratones *Apc*) o de carcinoma de colon inducido por carcinógenos químicos. Además, en ambos modelos experimentales se ha demostrado que la administración de celecoxib induce una disminución de la incidencia (número de animales con lesión) y la multiplicidad (número de lesiones por animal) de las neoplasias colorrectales<sup>(62)</sup>.

En la actualidad, existe una cierta controversia en relación con el origen celular de la sobreexpresión de COX-2 en el seno del tumor. Diversos grupos sugieren que esta isoforma se expresa fundamentalmente en las células epiteliales. Sin embargo, otros grupos han documentado expresión de COX-2 en células estromales, ya sean células endoteliales, macrófagos o fibroblastos. Esta aparente contradicción podría deberse al hecho de que existe más de un tipo celular que sobreexpresa esta isoenzima, como sugieren algunos estudios inmunohistoquímicos.

La sobreexpresión de COX-2, tanto en las células epiteliales como en las de la estroma adyacente, justifica que las prostaglandinas derivadas puedan ejercer su efecto favorecedor del desarrollo tumoral en ambas. En la propia célula epitelial, las prostaglandinas modifican la expresión de genes reguladores clave, lo que comporta un aumento de su resistencia a la apoptosis y de su capacidad migratoria. Paralelamente, la sobreexpresión de COX-2 en el estroma favorece la neovascularización, un hecho fundamental para el crecimiento tumoral, ya sea a través de su efecto en los fibroblastos o en las propias células endoteliales. De hecho, la hipoxia que frecuentemente se observa en las neoplasias actúa como estimulante de la producción de COX-2, que a su vez estimulará la angiogénesis tumoral.

La implicación de COX-2 en el CCR también se ha demostrado en estudios clínicos. En este sentido, existe una correlación entre la sobreexpresión de esta enzima en el tumor y el estadio de la lesión, su tamaño y la presencia de metástasis ganglionares. La participación de COX-2 en el CCR no se halla limitada a esta observación, sino que ha sido posible correlacionar la sobreexpresión de COX-2 en muestras tumorales de pacientes afectados de esta neoplasia con una menor probabilidad de supervivencia.

Las evidencias epidemiológicas descritas anteriormente referentes al efecto protector del consumo de AINE en el CCR también se han observado en relación con otras neoplasias. En este sentido, un reciente metaanálisis demuestra una correlación negativa entre el uso de aspirina u otros AINE y el desarrollo de cáncer de esófago, ya sea escamoso o adenocarcinoma. Por último, también existen evidencias que sugieren una asociación parecida en los tumores originados en el estómago, el páncreas y la vesícula biliar.

De manera similar a lo descrito en el CCR, diversas neoplasias, entre las que se encuentran las de piel, pulmón, mama, próstata, vejiga y páncreas, presentan sobreexpresión de COX-2. Es importante señalar, no obstante, que esta información no necesariamente significa que la utilización de inhibidores COX-2 pueda ser útil en el tratamiento o prevención de estos tumores. En este sentido, es



bien conocido que la COX-2 es un gen de respuesta temprana inducida por múltiples estímulos, por lo que existe la posibilidad de que la sobreexpresión de COX-2 sea una consecuencia y no un factor causal en el proceso de carcinogénesis específico.

En cuanto a la utilidad clínica de los inhibidores selectivos de la COX-2, de acuerdo con las evidencias epidemiológicas, experimentales y clínicas mencionadas en los apartados anteriores, los coxib pueden tener una gran utilidad, tanto en la prevención como en el tratamiento de múltiples neoplasias<sup>(63)</sup>. Este potencial clínico se ve reforzado por el bajo índice de efectos indeseables como consecuencia de su efecto selectivo sobre la isoforma inducible. En este sentido, la preservación de la actividad de la COX-1 que se consigue con estos fármacos permite reducir muy notablemente los efectos secundarios de los AINE no selectivos atribuibles a la disminución de las prostaglandinas gástricas o renales. Cabe destacar que algunas de las indicaciones de los coxib que se comentan a continuación están perfectamente establecidas en la actualidad, mientras otras se hallan aún en fase de evaluación.

## **1.6. Linfoma de Hodgkin**

### **1.6.1. Generalidades**

#### **Epidemiología**

El LH representa aproximadamente el 10 por ciento de todos los linfomas y aproximadamente el 0,6 por ciento de todos los cánceres diagnosticados en el mundo desarrollado cada año. Esto equivale a aproximadamente 8500 nuevos casos y unas 1.120 muertes debido al LH en los Estados Unidos cada año. La incidencia en Europa es de aproximadamente 2,4 casos por cada 100.000 personas y ha permanecido casi sin cambios durante las últimas dos décadas. La enfermedad es más frecuente en hombres que en mujeres, con dos picos de incidencia: adultos jóvenes y en personas mayores de 60 años<sup>(64)</sup>.

#### **Factores de riesgo:**

1. El estatus socioeconómico y el medio ambiente: en los países económicamente favorecidos, el riesgo de desarrollar HL para un adulto joven se asocia constantemente con factores indicativos de un alto nivel de vida en la primera infancia, incluida la vivienda unifamiliar y un tamaño de familia pequeña. Estas asociaciones parecen ser específicos para el subtipo de LH tipo esclerosis nodular y de la enfermedad que ocurre desde la primera infancia hasta la edad adulta media<sup>(65,66)</sup>. En comparación, el patrón de riesgo para el subtipo LH celularidad mixta (LHCM) está inversamente relacionada con el estatus socioeconómico<sup>(67)</sup>. Entre los grupos socioeconómicos más bajos en poblaciones económicamente favorecidas, los casos de LH son predominantemente de LH celularidad mixta y LH de depleción linfóide, y son más frecuentemente virus de Epstein-Barr (VEB) positivos<sup>(68)</sup>.

Estos datos que asocian el estado socioeconómico con el riesgo de LH se utilizan generalmente para sugerir que el desarrollo de LH está relacionado con la exposición retardada (exposición a una edad mayor) a un agente ambiental o infeccioso común. Las siguientes son observaciones sobre la exposición potencial a estos factores<sup>(69)</sup>:

- Parece que hay un mayor riesgo de LH en pacientes con antecedentes de mononucleosis infecciosa causada por el VEB<sup>(70)</sup>.
- Otras enfermedades infecciosas infantiles, incluyendo la varicela, el sarampión, las paperas, la rubéola y la tos ferina, se asocian negativamente con el riesgo de LH.
- No hay evidencia de que el citomegalovirus, herpesvirus humano 6, 7 y 8, poliovirus JC, los tipos de adenovirus 5 y 12, T virus humano linfotrópico de células 1 y 2, y retrovirus humano 5 estén presentes en las células tumorales de LH.
- Un efecto protector de la lactancia materna se ha demostrado en varios estudios, pero no se sabe si esto se debe a la presencia de anticuerpos maternos transmitidos.

- Los datos de estudios de casos y controles basados en la población han planteado la posibilidad de que el uso de aspirina puede proteger contra el desarrollo de LH y que el fumar puede aumentar el riesgo de LH.

2. Inmunosupresión: la incidencia de LH se incrementa en situaciones asociadas a inmunodeficiencia, como pueden ser el trasplante de órganos sólidos o de células hematopoyéticas, la terapia con fármacos inmunosupresores (por ejemplo, en pacientes con enfermedades autoinmunes), y la infección por VIH (para estos pacientes el riesgo relativo de LH se incrementa en diversos estudios entre 5 y 25 veces)<sup>(71)</sup>.

3. Los trastornos autoinmunes: los pacientes con antecedentes de trastornos autoinmunes tienen un mayor riesgo para el desarrollo de LH. Se ha observado un aumento de riesgo significativo para el desarrollo de LH en pacientes con antecedentes de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico o sarcoidosis y en pacientes con historial familiar de sarcoidosis o colitis ulcerosa<sup>(72)</sup>.

4. Riesgo familiar: el riesgo de desarrollar LH es mayor entre los familiares de pacientes con LH, posiblemente debido a la susceptibilidad genética y la exposición ambiental común en los miembros de la familia. En general, el aumento del riesgo de LH en parientes cercanos de los pacientes con LH es de tres a cinco veces la tasa esperada<sup>(73)</sup>. Parece haber un mayor riesgo entre los hermanos y el riesgo en gemelos idénticos parece estar aumentado alrededor de 50 a 100 veces. Hay también una asociación entre ciertos haplotipos HLA y el riesgo de LH, especialmente HLA-A1, y en menor medida, HLA-B5, HLA-B8 y HLA-B18<sup>(74)</sup>.

### **1.6.2. Presentación clínica**

La mayoría de los pacientes con LH clásico suelen debutar con el crecimiento de un ganglio linfático o una masa asintomática en la radiografía de tórax. Sin embargo, los síntomas y signos de presentación pueden ser relativamente inespecíficos y más compatibles con una infección que con una enfermedad maligna<sup>(75)</sup>.

Dentro de la variabilidad clínica de presentación nos encontramos con los siguientes síntomas y signos:

1. Adenopatía asintomática: el LH se presenta como una masa indolora en aproximadamente el 70 por ciento de los casos. El ganglio linfático afectado es por lo general no doloroso y de consistencia gomosa. El territorio ganglionar más comúnmente implicado es el cuello, de modo que entre un 60 y un 80 por ciento de los pacientes tendrán afectación ganglionar cervical o supraclavicular. La afectación ganglionar axilar se da en un 10 a 20 por ciento de los pacientes, y la afectación inguinal en aproximadamente un 6 a 12 por ciento de los casos.

Aunque no es detectable en el examen físico, los ganglios linfáticos mediastínicos presentan enfermedad en un 60 a 70 por ciento de los casos, los ganglios retroperitoneales en un 25 por ciento y la afectación infradiafragmática exclusiva ocurrirá en menos del 10 por ciento de los pacientes.

2. Masa mediastínica: la segunda forma de presentación más común es el descubrimiento de una masa mediastínica en una radiografía de tórax de rutina. La masa, aunque puede llegar a ser bastante grande, puede no producir síntomas locales. Con menos frecuencia, la masa produce síntomas inespecíficos como dolor torácico retroesternal, tos o dificultad respiratoria. Son raros los derrames pericárdicos o pleurales pequeños, excepto en pacientes con enfermedad mediastínica voluminosa. El síndrome de vena cava superior también es una forma de debut atípica. Entre los pacientes con enfermedad en estadio inicial, la presencia de una gran masa mediastínica (definida como más de un tercio del diámetro máximo intratorácico o 10 cm de dimensión transversal) se considera un factor pronóstico adverso.

- Síntomas B: están presentes en menos del 20 por ciento de los pacientes con estadios I / II y hasta el 50 por ciento de los pacientes con enfermedad avanzada. Entre estos últimos, los grupos de pacientes que tienen síntomas B tienen una modesta reducción en la supervivencia.

Los síntomas B sistémicos se han definido formalmente como sigue:

- Fiebre: temperatura persistente superior a 38°C. La fiebre es similar a la asociada con la infección; es más notable en la noche y se vuelve más severa y continua con el tiempo. La fiebre característica asociada al LH (aunque infrecuente) se denomina fiebre de Pel-Ebstein; se repite a intervalos variables de varios días o semanas, y tiene una duración de una a dos semanas antes de ir disminuyendo para volver a reaparecer.

- Pérdida de peso: pérdida inexplicable de más del 10 por ciento del peso corporal en los últimos seis meses.

- Sudor: hace referencia a la presencia de la sudoración nocturna.

- El prurito: puede ser un importante síntoma temprano, anterior al diagnóstico de LH durante meses o incluso un año o más. El prurito se produce de forma temprana en aproximadamente del 10 al 15 por ciento de los pacientes, pero la gran mayoría de los pacientes experimentan prurito en algún momento durante el curso de la enfermedad. Por lo general es generalizado y en ocasiones lo suficientemente grave como para causar rascado intenso y excoiaciones. Cuando es severo, pero no leve, el prurito es un signo de mal pronóstico.

- Otros síntomas no específicos y síndromes paraneoplásicos que podemos encontrar, son: dolor abdominal, hepato-esplenomegalia, ascitis, compresión de estructuras abdomino-pélvicas (uréter, vena renal), colestasis, dolor tras el consumo de alcohol (incluso en pequeñas cantidades) en áreas afectas por LH, lesiones cutáneas, síndromes neurológicos, síndrome nefrótico, hipercalcemia, anemia, leucocitosis, trombocitosis, eosinofilia, linfopenia, hipoalbuminemia, síndrome de compresión medular y otros aún menos frecuentes<sup>(76)</sup>.

En cuanto al patrón de presentación de la enfermedad, de forma general podemos considerar que<sup>(77)</sup>:

- Es raro tener LH en el cuello y la parte inferior del abdomen sin enfermedad en el abdomen superior.

- Es inusual tener afectación bilateral axilar sin enfermedad en las zonas más bajas del cuello.

- Es extremadamente inusual tener infiltración hepática o la médula ósea sin enfermedad en el bazo.
- Es raro tener enfermedad pulmonar en el diagnóstico sin afectación de los ganglios linfáticos hiliares, generalmente en el lado ipsilateral.

Si tenemos en cuenta los diferentes subtipos histológicos, podemos establecer las siguientes diferencias en cuanto a su forma de presentación:

- La mayoría de los pacientes con LH nodular con predominio de linfocitos se presenta con enfermedad periférica localizada a menudo en la parte superior del cuello, mientras que los pacientes con el subtipo depleción de linfocitos, por lo general se presentan con afectación ganglionar abdominal y con frecuencia tienen enfermedad extranodal.
- La mayoría de los pacientes con histología de esclerosis nodular tienen la enfermedad por encima del diafragma con afectación ganglionar mediastínica.
- La enfermedad hepática se observa con mayor frecuencia en pacientes con las histologías celularidad mixta o depleción linfoide y con síntomas sistémicos.
- El LH clásico con depleción linfoide es el subtipo menos común de LH clásico y representa menos del 1 por ciento de los casos. Este subtipo parece tener un patrón diferente de presentación que los otros subtipos histológicos. Tienen más probabilidades de debutar en estadios avanzados y con síntomas B en comparación con los pacientes con otras histologías

### **1.6.3. Subtipos histológicos**

Los distintos tipos de LH se diferencian en la morfología de las CRS, en la composición del infiltrado reactivo y en sus características epidemiológicas, clínicas y en la historia natural de la enfermedad. Hay cinco subtipos de LH que se denominan: esclerosis nodular (EN), celularidad mixta (CM), LH rico en linfocitos (LHRL), depleción linfocitaria (DL) y LH de predominio linfocítico (LHPL).

La diferencia más importante entre las antiguas clasificaciones del LH y la más recientemente propuesta por la OMS, es que en ésta se reconocen dos formas diferentes de LH : el LH clásico y el LH predominio linfocítico nodular (LHPLN) conocido también como paragranuloma nodular. El LH clásico engloba a los tipos

EN, CM, LHRL y DL. El predominio de linfocitos en el componente no neoplásico no es suficiente para clasificar un caso como LHPLN. Existen casos con morfología e inmunofenotipo de LH clásico que contienen un predominio de linfocitos T en el infiltrado acompañante. Estos casos en la actualidad son clasificados como LH clásico rico en linfocitos.

## **LINFOMA DE HODGKIN CLÁSICO**

### **a) Características clínicas y morfológicas**

El LH clásico incluye la esclerosis nodular, la celularidad mixta, la enfermedad de Hodgkin clásica rica en linfocitos y la depleción linfocitaria. La EN es el subtipo más frecuente de LH (60-80% de los casos). Incide en adolescentes y adultos jóvenes aunque puede aparecer a cualquier edad. La afectación mediastínica y supradiaphragmática son las localizaciones más frecuentes<sup>(78)</sup>.

En la esclerosis nodular se observa un patrón parcialmente nodular debido a la presencia de bandas fibrosas junto a áreas difusas. La célula característica es la variante lacunar de la CRS. Estas células tienen un núcleo multilobulado, con nucléolos pequeños y abundante citoplasma pálido que se retrae en el tejido fijado en formol y produce un espacio vacío "una laguna". Las células lacunares suelen ser abundantes, se observan también CRS, pero éstas suelen ser escasas. El componente no neoplásico contiene linfocitos mayoritariamente de estirpe T, histiocitos, plasmáticas, eosinófilos y neutrófilos. Es frecuente la presencia de necrosis siendo más numerosas las células neoplásicas alrededor de los focos necróticos<sup>(79)</sup>.

Una variante de EN es la forma sincitial de la EN<sup>(80)</sup>. Se caracteriza porque de forma focal, se observan grandes agregados de células lacunares. No parece que el pronóstico de esta variante sea diferente al de la forma típica, aunque hay trabajos que apoyan que estos tipos de EN ricos en células neoplásicas y con depleción del componente no neoplásico, se asocian a masas mediastínicas grandes y estadios avanzados. La EN se ha graduado (grado I y grado II) basándose en el número y atipia de las células neoplásicas en los nódulos. Los grados II se superponen a la EN sincitial y a las variantes deplecionadas de

linfocitos. No parece que la EN tipo II tenga impacto en la SG, pero sí parece que se asocia con la supervivencia en los pacientes que recaen, lo que sugiere que estas formas se podrían beneficiar de tratamientos más agresivos.

La celularidad mixta constituye el 15-30% de los casos de LH y aparece a cualquier edad. La afectación del mediastino es poco frecuente y sin embargo la afectación del bazo y de los ganglios abdominales es más común. En el LH celularidad mixta el infiltrado es difuso y las células neoplásicas son del tipo RS clásico. Estas células son bi o multinucleadas con nucléolos grandes, eosinófilos que semejan inclusiones virales. El infiltrado contiene linfocitos T, histiocitos, eosinófilos, neutrófilos y plasmáticas. Tanto la EN como la CM pueden afectar focalmente a las áreas interfoliculares de los ganglios linfáticos y se pueden acompañar de hiperplasia folicular con cambios involutivos que simulan enfermedad de Castleman.

En el LH rico en linfocitos las células neoplásicas son de tipo clásico o lacunar y el componente no neoplásico está constituido mayoritariamente por linfocitos. Un porcentaje pequeño de estos casos puede tener un patrón de crecimiento vagamente nodular, con centros germinales en los nódulos y células neoplásicas en el manto de los folículos y en las áreas ínter foliculares . Estos casos, deben diferenciarse del LHPLN para lo cual es necesario el estudio inmunofenotípico. Este tipo constituye aproximadamente el 6% de los casos de LH con una mayor incidencia en varones de edad media.

El LH tipo depleción linfocitaria es la forma menos frecuente de LH, siendo una enfermedad de ancianos y pacientes VIH seropositivos. Se presenta con linfadenopatía abdominal, hepatoesplenomegalia y afectación de la médula ósea. Tiene patrón difuso y las células neoplásicas son numerosas y de aspecto sarcomatoso siendo el infiltrado no neoplásico muy escaso

#### **b) Características inmunofenotípicas**

Los marcadores inmunofenotípicos estándar en el LH clásico, comprenden: CD20, CD3, CD30, CD15, CD45, Pax5 y ARN VEB codificado (Eber)<sup>(81)</sup>. Adicionalmente será útil la determinación de factores de transcripción de células B como OCT2 y



BOB-1, para aclarar los casos límite, como linfomas de la zona gris o linfomas B primarios mediastínicos. La evaluación de marcadores pronósticos, como CD68+ en macrófagos asociados a tumor (TAM), se lleva a cabo en centros especializados.

Las células neoplásicas del LH clásico en la mayoría de los casos expresan CD15+ y CD30+, siendo negativas para CD45. La frecuencia con la que se detecta la expresión de CD15 es diferente en las distintas series probablemente debido a variaciones técnicas.

Sólo en un pequeño número de casos se detecta en las CRS la expresión débil de diferentes antígenos de linaje B como CD20 y CD79a. Otro antígeno asociado a linaje B que se expresa en el 90% de los casos es PAX-5. Otros de los hallazgos inmunofenotípicos característicos de LH clásico es la ausencia de expresión de los factores de transcripción OCT-2 y BOB-1<sup>(82)</sup>. El diagnóstico de LH se realiza mediante el estudio morfológico rutinario no siendo absolutamente necesarios los estudios inmunofenotípicos en los casos típicos aunque forman parte de la práctica diagnóstica habitual. La ausencia de expresión conjunta de CD30 y CD15 o la expresión de CD20 intensa en las células neoplásicas obliga a reconsiderar el diagnóstico debiéndose descartar un LHPLN o un linfoma de células grandes tipo B rico en células T. La expresión genuina de antígenos de estirpe T en la CRS es absolutamente inusual. Cuando se detecta es necesario un estudio molecular del gen TCR para descartar un linfoma T. Entre el 40-% y el 50% de los casos expresan la proteína latente de membrana (LMP-1) codificada por el VEB.

## **LINFOMA HODGKIN PREDOMINIO LINFOCITICO NODULAR**

### **a) Características clínicas y morfológicas**

Aunque el LHPLN se parece a los otros tipos de LH en la especial composición celular, con una minoría de células neoplásicas sobre un fondo constituido por células inflamatorias benignas, difiere del LH clásico por su morfología, sus características inmunofenotípicas y por su manifestaciones clínicas<sup>(83)</sup>.

El LHPLN en la actualidad se define por tener un patrón de crecimiento nodular que ocupa al menos el 30% del ganglio afecto con o sin áreas difusas. La variante de

célula RS que lo define, se caracteriza por poseer un núcleo vesicular polilobulado con nucléolos pequeños generalmente periféricos sin halo perinucleolar. Estas células se denominan células L-H o células en «palomita de maíz» . El fondo inflamatorio está constituido predominantemente por linfocitos acompañados de acúmulos de histiocitos mientras que las plasmáticas, los eosinófilos y neutrófilos generalmente no están presentes en el infiltrado, así como tampoco las células CRS de tipo clásico. Ocasionalmente se observa esclerosis similar a la de la EN.

El LHPLN constituye el 5% de los casos de LH. Típicamente afecta a pacientes generalmente varones, entre los 25-45 años de edad y suele presentarse en ganglios periféricos respetando el mediastino. El 80% de los pacientes están en estadios iniciales en el momento del diagnóstico y el 90% de los pacientes hacen remisiones completas después del tratamiento. Las recaídas aparecen con igual frecuencia que en el LH clásico, pero las recaídas tardías y múltiples son más frecuentes que en los otros tipos de LH aunque suelen ser recaídas ganglionares aisladas que no se asocian con menor supervivencia. Los pacientes con LHPLN tienen un riesgo mayor de desarrollar LNH que los pacientes con otros tipos de LH. En las diferentes series se describe que entre un 2% y un 2,5% de pacientes con LHPLN desarrollan un LNH de células B.

### **b) Características inmunofenotípicas**

El LHPLN se define por el inmunofenotipo. A diferencia de las células CRS del LH clásico las células L-H expresan CD45 y antígenos de estirpe B de forma que son CD20+ y CD79a+. Frecuentemente expresan EMA y son C15- y expresan BCL-6. La expresión débil de CD30 se observa en un porcentaje pequeño de casos. La expresión de OCT-2 y de BOB-1 fuerte en las células L-H es útil para diferenciar LHPLN de LH clásico<sup>(84)</sup>.

Los nódulos están constituidos mayoritariamente por linfocitos B con frecuentes células T CD57+. Estas células típicamente rodean a las células L-H conformando rosetas. No se detecta expresión de LMP-1. En los nódulos se observan mallas de células dendríticas. Las áreas internodulares están predominantemente constituidas por células T.

El estudio inmunohistoquímico ayuda a reconocer el patrón de crecimiento nodular y en particular las tinciones con CD20 y CD21; esta última descubre la malla de dendríticas y muestra que los nódulos en el LHPLN son folículos o centros germinales alterados.

**Tabla 3. Características morfológicas e inmunofenotípicas del LH clásico (LHc) y el LH con predominio de linfocitos nodular (LHPLN)**

	<b>cLH</b>	<b>LHPLN</b>
<b>PATRÓN</b>	Difuso, interfolicular, nodular	Nodular (por lo menos en parte)
<b>TIPO CELULAR</b>	CRS, mononucleares o lacunares	Cels PL o en “palomita de maíz”
<b>MICROAMBIENTE</b>	Linfocitos, histiocitos, eosinófilos y cels.plasmáticas	Linfocitos, histiocitos
<b>FIBROSIS</b>	Frecuente	Rara
<b>CD15</b>	+	-
<b>CD30</b>	+	-
<b>CD20</b>	+ / -	+
<b>CD45</b>	-	+
<b>EMA</b>	-	+
<b>VEB (en cels. RS)</b>	+ (50% aprox.)	-
<b>Oct2</b>	- / +	+
<b>BOB.1</b>	- / +	+
<b>LINF.DEL MICROAMB.</b>	Cels T > cels.B	Cels B > cels T
<b>Céls.T CD57+</b>	-	+

#### 1.6.4. Diagnóstico:

- Ante la sospecha de LH, se recomienda seguir la siguiente secuencia diagnóstica<sup>(85)</sup>:

1. Historia clínica y examen físico: la historia debe determinar la presencia o ausencia, la duración y la gravedad de los síntomas sistémicos que pueden estar asociados con LH, tales como fiebre inexplicable, sudoración (especialmente por la noche), la pérdida de peso, el prurito y el dolor ganglionar inducido tras el consumo de alcohol.

Otros factores que se han de valorar incluyen el estado funcional, los antecedentes de tumores malignos (incluyendo otros linfomas), el tratamiento previo con quimioterapia o radioterapia la inmunodeficiencia concurrente (por ejemplo, VIH), y los antecedentes familiares de LH u otras neoplasias.

El estado general del paciente debe ser registrado tanto inicialmente como después de cada visita sucesiva. Las dos herramientas más utilizadas para su valoración son el estado funcional de Karnofsky (Tabla 4) y el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (Tabla 5).

**Tabla 4. Escala de Karnofsky**

KARNOFSKY	DESCRIPCIÓN
90-100	Asintomático y actividad normal
70-80	Sintomático pero ambulatorio
50-60	Sintomático, levantado durante más del 50% de las horas de vigilia
30-40	Sintomático, sentado o en cama más del 50% del día
10-20	Encamado o confinado a una silla
0	Muerte

Debe realizarse un cuidadoso examen físico del paciente, prestando especial interés en el tamaño y número de los ganglios linfáticos periféricos y la presencia de esplenomegalia. El anillo de Waldeyer (amígdalas, base de la lengua, la nasofaringe) debe ser examinado, especialmente en pacientes con enfermedad a nivel cervical.

**Tabla 5. Escala ECOG**

<b>ECOG</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
<b>0</b>	El paciente se encuentra totalmente asintomático y es capaz de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria.
<b>1</b>	El paciente presenta síntomas que le impiden realizar trabajos arduos, aunque se desempeña normalmente en sus actividades cotidianas y en trabajos ligeros. El paciente sólo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno.
<b>2</b>	El paciente no es capaz de desempeñar ningún trabajo, se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, además de las de la noche, pero que no superan el 50% del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades personales solo.
<b>3</b>	El paciente necesita estar encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria como por ejemplo el vestirse.
<b>4</b>	El paciente permanece encamado el 100% del día y necesita ayuda para todas las actividades de la vida diaria, como por ejemplo la higiene corporal, la movilización en la cama e incluso la alimentación.
<b>5</b>	Paciente fallecido.

2. Biopsia diagnóstica<sup>(86)</sup>: se realiza mediante el estudio del tejido afectado tras la biopsia de un ganglio linfático. La biopsia excisional es la técnica preferida, pudiendo también ser adecuada la biopsia con aguja gruesa en casos seleccionados, pero no así la punción-aspiración con aguja fina sola, la cual no proporciona suficiente tejido o información sobre la composición estructural del ganglio linfático que nos permita llegar a un diagnóstico preciso. La evaluación del material de biopsia debe incluir de forma rutinaria el análisis microscópico de la muestra y análisis inmunofenotípico con inmunohistoquímica.

Si bien los casos típicos se pueden diagnosticar en base a los hallazgos de la microscopía óptica de rutina, se ha convertido en una práctica estándar la realización del inmunofenotipo de confirmación. El análisis del inmunofenotipo

tanto de las células neoplásicas como del infiltrado asociado a ellas, ha ayudado a definir mejor el LH y sus diferentes subtipos.

3. Biopsia de médula ósea: se puede omitir de la evaluación inicial para la clasificación de la mayoría de los pacientes con LH sin que ello afecte a las decisiones de tratamiento o evolución de los pacientes. La infiltración ósea se produce en un 6,5 % de los pacientes con diagnóstico reciente de LH. Su afectación está estrechamente asociada a la enfermedad avanzada, ocurriendo en menos del 1 % de los pacientes con enfermedad en estadio temprano (es decir, el estadio IA o IIA) valorados inicialmente mediante tomografía computarizada (TC) y prácticamente ningún paciente con enfermedad en estadio temprano valorado mediante estudios PET/CT.

4. Analítica: una vez que se ha establecido el diagnóstico de LH, se deben realizar las siguientes determinaciones:

- Hemograma con fórmula.
- Velocidad de sedimentación globular (VSG)
- Pruebas bioquímicas de hígado, huesos y función renal, incluyendo la fosfatasa alcalina en suero, la aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), lactato deshidrogenasa (LDH) y el calcio
- Proteinograma
- Inmunoglobulinas
- Serologías: virus de Epstein-Barr (en algunos centros se considera la determinación de la carga viral), hepatitis B y C y virus de la inmunodeficiencia humana.
- Prueba de embarazo en mujeres con potencial de procrear.

5. Estudios de imagen: hoy en día se considera fundamental la realización de un estudio PET/TC en la fase de diagnóstico, como respuesta al tratamiento (tanto inicial como final), así como durante el seguimiento de la enfermedad<sup>(87)</sup>. El PET es una técnica de imagen no invasiva que permite estudiar el comportamiento metabólico de distintos procesos biológicos benignos y/o malignos mediante la utilización de moléculas unidas a radionúclidos emisores de positrones. La

molécula más empleada es la 2 deoxy-2-fluoro-D-glucosa (FDG). La FDG no puede continuar la ruta metabólica del piruvato o del glucógeno, (a diferencia de la glucosa) quedando atrapado en el interior del citoplasma celular. Su administración endovenosa unida a un emisor de positrones (<sup>18</sup>Fluor) permite la obtención de imágenes de su distribución en el organismo. En las células tumorales la gran concentración intracelular de FDG es debida al elevado consumo de glucosa y los cambios enzimáticos favorecidos por las condiciones de hipoxia y producción de ácido láctico, circunstancias que son características de la proliferación celular neoplásica.

El carácter funcional de la PET permite conocer la existencia de cambios metabólicos previos a la aparición de alteraciones morfológicas, habiendo demostrado esta técnica una gran utilidad en la estadificación de los linfomas, en la valoración de respuesta al tratamiento y en la obtención de información pronóstica. La exploración utilizando equipos híbridos PET-CT permite la integración en una sola exploración de información anatómica y metabólica.

La información metabólica puede valorarse de forma visual o cuantitativamente: visualmente se compara la captación de FDG de las lesiones respecto a tejidos sanos u órganos de referencia, para la valoración semicuantitativa se utiliza el denominado índice SUV (Standardized Uptake Value), que relaciona la actividad de FDG administrada con el peso del paciente teniendo en cuenta además el tiempo de decaimiento del isótopo. En la interpretación de las imágenes PET en pacientes con LH se recomienda además la utilización de los criterios de Deuille-5 PS (Tabla 6)<sup>(88)</sup>, que clasifican las intensidades de captación respecto a lugares de referencia.

La información morfológica de la TAC ayuda a localizar con precisión los focos patológicos de FDG y medir correctamente las lesiones anatómicas. En el LH aproximadamente el 1% del componente celular total son CRS y la captación de la glucosa es fundamentalmente debida al microambiente reactivo que existe en torno a estas células, lo que explica la elevada captación de estos tumores. Diferentes técnicas modernas de radioterapia utilizarán el PET/TC como herramienta de

adquisición de imágenes sobre las que planificar el tratamiento radioterápico a realizar.

**Tabla 6. Criterios de Deauville.**

- 
- 1. Ausencia de captación.**
  - 2. Captación menor o igual que en mediastino.**
  - 3. Captación mayor que en mediastino pero menor o igual que en h.gado.**
  - 4. Captación moderadamente superior al hígado en cualquier localización**
  - 5. Captación muy superior al hígado y/o nuevas lesiones**
- 

#### **1.6.5. Estadiaje**

El sistema de clasificación para la enfermedad de Hodgkin se conoce como el sistema Cotswold, el cual es una modificación del antiguo sistema Ann Arbor<sup>(89,90)</sup>. Tiene cuatro etapas, identificadas con los números romanos I, II, III, y IV.

Si la enfermedad de Hodgkin afecta a un órgano que está fuera del sistema linfático, se agrega la letra “E” a la etapa (por ejemplo, etapa IE o IIE). Si afecta al bazo, se añade la letra S.

**Estadio I:** cualquiera de los siguientes significa que la enfermedad se encuentra en etapa I:

- La enfermedad de Hodgkin se encuentra solamente en un área de ganglio linfático o un órgano linfático, tal como el timo (I).
- El cáncer se encuentra solamente en un área de un solo órgano que está fuera del sistema linfático (IE).

**Estadio II:** cualquiera de los siguientes significa que la enfermedad se encuentra en etapa II:

- La enfermedad de Hodgkin se encuentra en dos o más áreas de ganglios linfáticos del mismo lado (superior o inferior) del diafragma



- El cáncer se propaga localmente desde un área de ganglio linfático a un órgano adyacente (IIE).

**Estadio III:** cualquiera de los siguientes significa que la enfermedad se encuentra en etapa III:

- La enfermedad de Hodgkin se encuentra en áreas de ganglios linfáticos a ambos lados (superior e inferior) del diafragma.

- La enfermedad de Hodgkin se presenta en los ganglios linfáticos sobre y debajo del diafragma, y también se ha propagado a un órgano cercano (IIIE), al bazo (IIIS) o a ambos (IIIES).

**Estadio IV:** cualquiera de los siguientes significa que la enfermedad se encuentra en etapa IV:

- La enfermedad de Hodgkin se ha propagado ampliamente a uno o más órganos fuera del sistema linfático.

- Se detecta enfermedad de Hodgkin en órganos de dos partes distintas del cuerpo (y no en ganglios linfáticos adyacentes).

- La enfermedad de Hodgkin se encuentra en el hígado, la médula ósea, los pulmones (aparte de estar creciendo allí directamente desde otra localización), o en el líquido cefalorraquídeo.

También se pueden usar otros modificadores para describir la etapa de la enfermedad de Hodgkin:

### **Enfermedad voluminosa**

Este término se usa para describir los tumores en el tórax que son al menos del ancho de 1/3 del tórax o los tumores en otras áreas que son al menos 10 centímetros de ancho<sup>(91,92)</sup>. Por lo general, es designada de esta manera al añadir la letra X a la etapa.

### **A vs. B**

A cada etapa también se le puede asignar una letra (A o B). La letra B se añade si una persona tiene cualquiera de estos “síntomas B”:

- Pérdida de peso de más del 10% en los 6 meses previos al diagnóstico (sin hacer dieta).

- Fiebre inexplicable de al menos 38°C.

- Sudoración profusa durante la noche.

Si una persona tiene cualquier síntoma B, esto usualmente significa que la enfermedad está más avanzada, y a menudo se recomienda un tratamiento más intensivo. Si ninguno de los síntomas B está presente, se le añade a la etapa la letra A.

#### **1.6.6. Factores pronósticos:**

##### **1.6.6.1. Factores pronósticos clínicos**

Los pacientes recién diagnosticados de LH se clasifican en diferentes grupos de riesgo según las características clínicas y los parámetros de laboratorio presentes en el momento del diagnóstico.

Las tres definiciones más comunes son las propuestas por la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC), el Grupo de Estudio de Hodgkin Alemán (GHSG) y el grupo americano National Comprehensive Cancer Network (NCCN)<sup>(85,93)</sup> (Tabla 7):

- La EORTC define el estadio temprano de pronóstico favorable a los pacientes de edad menor o igual a 50 años, sin masa mediastínica voluminosa; con una VSG menor de 50 mm/h y sin síntomas B (o con una VSG de menos de 30 mm/h en los que si tienen síntomas B); y la enfermedad se limita a la afectación de tres o menos regiones.
- El GHSG define el grupo de pronóstico favorable en estadio temprano a pacientes con no más de dos sitios con enfermedad; sin extensión extranodal; sin masa mediastínica voluminosa; y una VSG de menos de 50 mm / h (menos de 30 mm / h si los síntomas B están presentes).
- Los pacientes favorables para NCCN en la enfermedad en estadio I-II son aquellos con ausencia de enfermedad voluminosa mediastínica (MMR [anchura máxima de la masa intratorácica / diámetro máximo torácico] inferior a 0,33) o enfermedad voluminosa menor de 10 cm, ausencia de síntomas B, VSG menor que 50, y afectación de 3 o menos localizaciones ganglionares.

- Los factores pronósticos a tener en cuenta en estadios avanzados, son los determinados por el International Prognostic Score (IPS)<sup>(94)</sup>. Este índice fue desarrollado a partir de un análisis multivariante de la supervivencia de 4695 pacientes con reciente diagnóstico de LH avanzado, tratados con poliquimioterapia entre 1983 y 1992 (el 75% de los pacientes recibieron un régimen con antraciclinas y un 20 % recibió MOPP o un régimen similar).

Así, conserva relevancia pronóstica en los pacientes tratados de manera uniforme con ABVD / COPP o con el régimen BEACOPP más intensivo. También ayuda a determinar el pronóstico de los pacientes con LH en recaída o refractarios sometidos a un trasplante autólogo de células madre.

Cada uno de los siete factores pronósticos adversos identificados supone un impacto similar: cada factor reduce la supervivencia libre de progresión (SLP) a 5 años del orden de un 8%. Estos factores son los siguientes:

- Albúmina en sangre < 4 gr/dl.
- Hemoglobina < 10,5 gr/dl.
- Sexo varón.
- Estadio IV.
- Edad  $\geq$  45 años.
- Recuento de leucocitos  $\geq$  15.000/mm<sup>3</sup>.
- Recuento de linfocitos < 600/mm<sup>3</sup> o menos del 8% del recuento total de leucocitos.

La supervivencia relativa de los pacientes afectados por el LH ha mejorado de manera constante en las últimas décadas. Esto ha sido posible gracias a una quimioterapia más eficaz y menos tóxica, a los avances en las técnicas de radioterapia y a la disponibilidad de factores pronósticos que han permitido adaptar los diferentes tratamientos a cada paciente. Con los tratamientos disponibles actualmente, el LH es curable en más de un 75 por ciento de los casos. La SLR y las tasas de SG dependerán del estadio inicial y del tratamiento recibido. Los

siguientes resultados son estimaciones de SLR y de SG a los cinco años después del tratamiento inicial con quimioterapia o de su combinación con radioterapia:

**Estadios iniciales de pronóstico favorable:** pertenecen a este grupo todos los pacientes con estadios I y II que no presentan ninguno de los factores pronósticos desfavorables referidos en el grupo 2. Representan un 20% de los casos. Presentan una SLR superior al 90 por ciento y SG superior al 95 por ciento en cinco años.

**Estadios iniciales de pronóstico desfavorable:** pertenecen a este grupo los pacientes con estadios I y II que presentan uno o más de los siguientes factores pronósticos:

- Edad mayor de 50 años.
- Presencia de enfermedad en el mediastino mayor de 10 cm.
- Afectación de 4 o más áreas ganglionares.
- Afectación de órganos no linfáticos.
- Velocidad de sedimentación de más de 50 mm.
- Presencia de síntomas B.

Este grupo representa la mitad de todos los casos de LH. Presentan una SLR superior al 85 por ciento y SG mayor del 90 por ciento en cinco años.

**Estadios avanzados:** pertenecen a este grupo todos los pacientes con estadio III o IV. Suponen un 30% de todos los casos. Presentan una SLR del 60-85 por ciento y SG del 85-90 por ciento en cinco años (Tabla 8).

#### **1.6.6.2. Factores pronósticos inmunohistoquímicos**

En este apartado, por su importancia de cara a nuevos tratamientos y como factor pronóstico, considero oportuno ampliar varios conceptos referentes a CD30 y CD68<sup>(95)</sup>.

**Tabla 7. Grupos de riesgo**

	EORTC		GHSG		NCIC/ECOG		NCCN2010	
<b>Favorable</b>	Estadíos supradiafragmáticos sin factores de riesgo	I-II sin	Estadíos I-II sin factores de riesgo		Estadíos I-II sin factores de riesgo		Estadíos I-II sin factores de riesgo	
<b>Desfavorable</b>	Estadíos supradiafragmáticos con $\geq 1$ factor de riesgo	I-II	Estadíos I o IIA con $\geq 1$ factor de riesgo Estadío IIB con c) o d) pero sin a) y b)		Estadíos I-II con $\geq 1$ factor de riesgo	I-II con $\geq 1$ factor de riesgo	Estadíos I-II con $\geq 1$ factor de riesgo (diferenciando entre enfermedad voluminosa y otros factores de riesgo)	

**Tabla 8. Factores de riesgo para el IPS**

Factores de riesgo (n)	% de pacientes	SLP 5 años(%)	SG 5 años (%)
0	7	84	89
1	22	77	90
2	29	67	81
3	23	60	78
4	12	51	61
$\geq 5$	7	42	56

1. CD30: es miembro de los receptores de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) . Las CRS presentan una fuerte expresión del antígeno, que resulta en una activación, mediada por CD30, del factor nuclear NF- $\kappa$ B . Desde la perspectiva terapéutica, debido a su expresión restringida a tejidos normales, la molécula CD30 es un objetivo óptimo para eliminar selectivamente las células neoplásicas que expresan CD30 utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Recientemente, se han producido resultados muy prometedores en ensayos de fase 1 y fase 2 utilizando Brentuximab vedotina, un anticuerpo dirigido contra

CD30. Una vez el fármaco ha entrado en la célula conducirá a la citólisis de CRS mediante la inhibición de la maquinaria de microtúbulos del huso celular.

2. CD68: Hay una creciente evidencia acerca de la importancia de los macrófagos asociados a tumores (TAM) en diversos tumores malignos. También se sabe que las células tumorales no sólo pueden inhibir el efecto antitumoral de los macrófagos, sino también serán capaces de utilizar a estos macrófagos para alterar la respuesta antitumoral de los linfocitos acompañantes. Por lo tanto, parece razonable decir que la matriz celular acompañante en el LH (linfocitos y macrófagos de forma predominante) puede tener relevancia biológica y pronóstica. Tratando de arrojar luz sobre esta cuestión, Steidl et al.<sup>(96)</sup> mostró que el aumento de TAM CD68+ en cLH afecta adversamente al pronóstico de los pacientes. Más recientemente, estos resultados fueron confirmados en una cohorte de pacientes con LH en estadio avanzado evaluados en el ensayo clínico multicéntrico fase 3 de Tan et al.<sup>(97)</sup> (E2496). Estos resultados son similares a los datos de otros estudios<sup>(98,99)</sup> apoyando firmemente la inclusión de CD68 como parte de las determinaciones inmunohistoquímicas a realizar de forma rutinaria en el LH.

### **1.6.6.3. Factores pronósticos serológicos**

Varios grupos han llevado a cabo estudios séricos en LH clásico porque ofrecen un medio de análisis no invasivo del pronóstico de la enfermedad. Durante la última década se han llevado a cabo varios trabajos de marcadores que van desde parámetros muy simples (incluyendo recuento de glóbulos blancos, ratio linfocitos/monocitos) a otros más complejos (polimorfismos y citoquinas derivadas del microambiente que rodea a la CRS)<sup>(95)</sup>. Dos marcadores recientes que han cobrado mayor importancia son la galectina-1 y el timo y la quimoquina regulada por activación (TARC / CCL17). La proliferación de las células Treg en LH clásico depende de las acciones combinadas de galectina-1, una proteína de unión a carbohidratos sobreexpresados por las CRS. La galectina-1 favorecerá la supervivencia de los Treg y al mismo tiempo inducirá la apoptosis de las células T helper y citotóxicas.

Numerosos estudios han examinado el papel de la galectina-1 como un biomarcador potencial en LH. Kamper et al.<sup>(100)</sup> analizaron 143 casos de LH clásico en fase avanzada y confirmaron a través de inmunohistoquímica que la galectina-1 se encuentra presente dentro del microambiente del LH. Este estudio también demostró una alta expresión de galectina-1, y se asoció con una pobre supervivencia libre de eventos (SLE). Más recientemente, utilizando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, Ouyang et al.<sup>(101)</sup> encontraron niveles significativamente más bajos de Galectina-1 en pacientes con estadio temprano o enfermedad de bajo riesgo, en comparación con los pacientes con enfermedad más avanzada o aquellos pacientes con factores de riesgo adicionales. Además, este estudio demostró que el aumento de los niveles de galectina-1 se asocia con estadios de Ann Arbor más avanzados, con la presencia de síntomas B y una cifra significativamente mayor de IPS, lo que refleja la utilidad potencial de la galectina-1 como una herramienta de estratificación de riesgo.

Por otro lado, TARC (CCL17) se encuentra sobreexpresado por las CRS y se encuentra en el suero de pacientes con LH clásico<sup>(102)</sup>. La relevancia biológica de TARC, un ligando conocido para las células Th2 CCR4+<sup>(103)</sup>, se deriva de estudios anteriores en líneas celulares que demostraron la expresión de TARC en las CRS. De manera similar a la galectina-1, los niveles séricos de TARC se asocian con la enfermedad más avanzada, mayor carga tumoral antes del tratamiento y / o peor respuesta al tratamiento<sup>(104,105)</sup>.

### **1.6.7. Tratamiento**

El tratamiento de los pacientes con LH, se establece principalmente por el estadio clínico de la enfermedad según lo determinado por el sistema de estadiaje de Ann Arbor con la modificación de Cotswolds. Este sistema de estadificación es importante para determinar no sólo el pronóstico y el tratamiento, sino que también es importante para la comparación de los resultados obtenidos con diferentes tipos de tratamiento en diferentes ensayos clínicos.

Durante el siglo pasado, el LH ha pasado de ser una enfermedad casi siempre mortal a una que es curable en aproximadamente el 75 por ciento de los pacientes

en todo el mundo. A medida que hemos visto que la mayoría de los pacientes se han curado de su enfermedad, las toxicidades relacionadas con el tratamiento se han convertido en una de las causas de mortalidad tardía en estos pacientes. Por todo ello, la selección de la terapia debe equilibrar el deseo de mantener un alto índice de curación con la necesidad de minimizar las complicaciones a largo plazo.

#### **1.6.7.1. Tratamiento de los estadios iniciales:**

Teniendo en cuenta las diferencias entre los diferentes estadios de la enfermedad y en base a lo ya comentado en el apartado de factores pronósticos, consideramos como estadios iniciales a los estadios I y II:

- Estadio I: afectación de una sola región de ganglios linfáticos (I) o de un solo órgano o sitio extralinfático (IE)
- Estadio II: afectación de dos o más regiones de ganglios linfáticos en el mismo lado del diafragma solo (II) o con la participación de órganos contiguos extralinfáticos o tejidos (IIE).

La subdivisión de los estadios I-II en grupos de pronóstico favorable y desfavorable se hará en base a la presencia o ausencia de ciertas características clínicas, presentes tanto en las recomendaciones de la EORTC como del GHSG.

#### **Estadios I-II de pronóstico favorable:**

El manejo de este grupo de pacientes requiere de un cuidadoso equilibrio entre la administración de un tratamiento suficiente para erradicar el tumor, pero no demasiado tóxico como para producir efectos secundarios graves a largo plazo.

#### **Radioterapia en monoterapia:**

El tratamiento con radioterapia en monoterapia, ha sido el tratamiento estándar para pacientes con LH en estadio temprano durante muchas décadas. Sin embargo, la toxicidad crónica en forma de enfermedad cardíaca, la disfunción pulmonar y la inducción de segundas neoplasias hizo que los regímenes de quimioterapia utilizados rutinariamente en la enfermedad avanzada (ABVD y



Stanford V) se usaran también en el tratamiento de los pacientes con enfermedad en estadio temprano, combinándolo con la radioterapia. Hoy día se reserva esta modalidad de tratamiento en los siguientes casos:

1. Pacientes no tributarios de quimioterapia.
2. Pacientes que rechazan el tratamiento con quimioterapia.
3. Histología de predominio linfocítico nodular (no englobado en el grupo de LH clásico)<sup>(106)</sup>.

En lo referente al volumen de irradiación, tanto si se utiliza en monoterapia o en combinación con quimioterapia, en los últimos años hemos asistido a una disminución del tamaño del mismo con el fin de limitar la toxicidad aguda y crónica, pero mantenimiento las tasas de supervivencia. Las siguientes definiciones son las más utilizadas en lo que a volumen de irradiación se refiere:

- Radioterapia de campo extendido (EFRT): el campo de irradiación incluye no sólo los ganglios clínicamente afectados, sino también las áreas adyacentes (sitios no afectados) (por ejemplo, la irradiación tipo Mantle o en Y invertida).
- Radioterapia de campo afecto (IFRT): aquí el campo de irradiación se limita a las regiones clínicamente afectas. (por ejemplo, el área supraclavicular baja en caso de afectación mediastínica)<sup>(107)</sup>.
- Radioterapia de sitio afecto (ISRT): incluye sólo los volúmenes tumorales pre- y post-quimioterapia más un margen de tejido sano para dar cabida a las incertidumbres en la determinación del volumen del tumor antes de la quimioterapia<sup>(108)</sup>.
- Radioterapia de ganglio afecto (INRT): incluye volúmenes ganglionares pre y post-quimioterapia más un margen muy limitado de tejido sano (0,5 a 1 cm)]. INRT requiere de imágenes PET/CT pre-quimioterapia adquiridas con el paciente en la posición de tratamiento<sup>(109)</sup>.

#### **Tratamiento combinado:**

Consiste en la administración de quimioterapia más radioterapia. Con esta modalidad de tratamiento se obtienen los mejores resultados en cuanto al control inicial de la enfermedad. Mientras que la radioterapia actúa en los lugares con

carga tumoral conocida, la quimioterapia está dirigida a la enfermedad oculta fuera del campo de radiación. La combinación de las dos modalidades permite una disminución en el número de ciclos de quimioterapia administrada.

En la mayoría de los ensayos modernos, en comparación con la quimioterapia sola, el tratamiento de modalidad combinada se ha traducido en mayores tasas de ausencia de recurrencia pero no se han visto diferencias en la SG. Esta falta de un beneficio de SG en la mayoría de los ensayos puede estar relacionada con la eficacia de la terapia de rescate tras el fracaso del tratamiento con quimioterapia sola. Teniendo en cuenta la eficacia de estos tratamientos de rescate, los ensayos en LH han requerido históricamente un seguimiento muy largo para ver diferencias en la SG tras la terapia inicial.

### **Características de los tratamientos.**

#### *1. Esquemas de quimioterapia*

ABVD (doxorubicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina): es el régimen de quimioterapia estándar para el tratamiento en este subgrupo de pacientes. El régimen Stanford V combinado con radioterapia sigue siendo una alternativa aceptable.

- ABVD: se administra cada 14 días en ciclos de 28 días (dos administraciones se consideran un ciclo). Los pacientes que siguen un tratamiento combinado generalmente reciben entre dos y cuatro ciclos de ABVD (tiempo total de quimioterapia de 8 a 16 semanas) seguido de radioterapia a las 3-4 semanas después de la finalización de la quimioterapia.

#### *Toxicidad aguda*

La principal toxicidad aguda severa (grados 3/4) del ABVD es: neutropenia (34%), náuseas / vómitos (13%) y alopecia (31%)<sup>(110)</sup>. La mielosupresión grave es rara cuando el ABVD se administra solo, y la dosis intensidad de ABVD a menudo se puede mantener en más del 99 % de los casos sin requerir del uso de factores

estimulantes de colonias (G-CSF)<sup>(111)</sup>. Las infecciones graves, anemia y trombocitopenia ocurren en el 2, 5 y 3 % de los pacientes, respectivamente<sup>(112)</sup>. La tasa de náuseas y vómitos anticipatorios ha disminuido sustancialmente con el desarrollo y el uso rutinario de agentes antieméticos potentes.

La toxicidad pulmonar inducida por bleomicina puede ocurrir con bastante frecuencia (aproximadamente 20 a 30% de los pacientes) y por lo general se desarrolla de forma subaguda durante el tratamiento o hasta seis meses después de haberlo finalizado. Esta toxicidad afecta negativamente a la supervivencia en los pacientes que reciben tratamiento para el LH. En un estudio<sup>(113)</sup>, se asoció con una tasa de mortalidad del 4,2 % y con una disminución estadísticamente significativa 5 años de la SG a 5 años (63% en los pacientes que desarrollaron toxicidad pulmonar inducida por bleomicina en comparación con 90% en los que no se vieron afectados). La omisión de la bleomicina en pacientes que desarrollaron toxicidad pulmonar inducida por bleomicina (ya fuera sintomática o asintomática) no tuvo ningún impacto en las tasas de respuesta o la supervivencia. Las reacciones agudas a la bleomicina, incluyen: fiebre, el síndrome de hipertermia y las reacciones anafilácticas.

#### *Toxicidad crónica*

Las complicaciones a largo plazo del ABVD incluyen la toxicidad pulmonar relacionada con la bleomicina y la cardiotoxicidad asociada a la doxorubicina como las más destacables. El riesgo de infarto de miocardio después del tratamiento con ABVD (sin radioterapia) es 7,8 veces mayor que el ajustado por edad de la población normal. Los niños parecen ser más susceptibles a la cardiotoxicidad por doxorubicina.

En cuanto a la fertilidad de los pacientes tras haber recibido tratamiento con ABVD, vemos que la azoospermia y la oligospermia se observan en un 36 y 20 por ciento de los pacientes, respectivamente, con recuperación a los valores normales en todos los casos.

El riesgo acumulado a 15 años de LMA después de ABVD ha sido estimada en menos del 1 %.

- Stanford V: es un tratamiento de quimioterapia semanal (los agentes varían semanalmente, pero incluyen mecloretamina, doxorubicina, vinblastina, prednisona, vincristina, bleomicina y VP-16) . Se administra durante ocho semanas, seguido de radioterapia entre una y tres semanas tras finalizar el tratamiento. Existen pocos ensayos aleatorizados que hayan comparado los diferentes regímenes de quimioterapia en combinación con radioterapia en este grupo de pacientes. Muchos de los primeros ensayos aleatorizados que compararon los regímenes combinados incluían un agente alquilante, por lo general MOPP (mecloretamina, vincristina, procarbazona, prednisona) o un equivalente.

Bonadonna y cols. establecieron inicialmente la seguridad y eficacia de ABVD (4 ciclos) seguido de 36 Gy IFRT como el tratamiento estándar para los pacientes en estadios iniciales<sup>(114)</sup>. En el ensayo clínico HD10 del GHSG se investigó la reducción del número de ciclos de ABVD, así como la dosis de radioterapia en campo afecto en pacientes en estadios iniciales de buen pronóstico<sup>(115)</sup>. En este ensayo, 1370 pacientes fueron asignados al azar a uno de los siguientes grupos de tratamiento : 4 ciclos de ABVD seguido de 30 Gy o 20 Gy con radioterapia IFRT o 2 ciclos de ABVD seguido de 30 Gy o 20 Gy de radioterapia IFRT. El análisis final de este ensayo mostró que (con una mediana de seguimiento de 91 meses): no hubo diferencias significativas entre los 4 y 2 ciclos de ABVD en términos de SG a 5 años (97,1% y 96,6%), ni en cuanto a SLP (93,5% vs. 91,2%). Con respecto a la dosis de radioterapia IFRT, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre dosis 30 y 20 Gy: SG 97,7% vs. 97,5%, y una SLP de 93,7% vs. 93,2% respectivamente. Lo que aún es más importante, es que tampoco hubieron diferencias significativas en la SG y SLP entre los cuatro grupos de tratamiento. Los resultados del estudio HD10 confirmaron que 2 ciclos de ABVD más una dosis total de radioterapia de 20 Gy IFRT es un tratamiento de primera línea efectivo para este grupo de pacientes, minimizando así el riesgo de los efectos secundarios tardíos.

El estudio G4, llevado a cabo por los hospitales de Stanford y Kaiser<sup>(116)</sup>, evaluó la eficacia de la quimioterapia Stanford V abreviada (8 semanas o 2 ciclos) seguido de IFRT (30 Gy) en pacientes con estadios IA o IIA sin enfermedad voluminosa. Entre los 87 pacientes incluidos en el estudio, 42 pacientes (48%) presentaban factores de riesgo desfavorables según los criterios GHSG (> 2 áreas ganglionares, VSG  $\geq$  50, o afectación extranodal) y 33 pacientes (38%) tenían caracteres desfavorables definidos por los criterios de la EORTC (> 3 áreas ganglionares, VSG  $\geq$ 50, celularidad mixta, y edad de 50 años o más). Con una mediana de seguimiento de 10,6 años, la SLP, la supervivencia específica de la enfermedad y la SG fueron del 94%, 99% y 94% respectivamente.

Entre los pacientes con criterios de riesgo del GHSG, la SLP fue del 100% para los pacientes con enfermedad favorable y del 88% para los pacientes con la enfermedad no voluminosa desfavorable. Para los pacientes con enfermedad favorable y desfavorable de acuerdo con los criterios de la EORTC, la SLP fue del 98% y 88%, respectivamente. Ningún paciente desarrolló LMA secundaria o síndrome mielodisplásico. Tampoco se ha observado toxicidad cardíaca o pulmonar crónica.

#### **Quimioterapia en monoterapia:**

La quimioterapia sola con ABVD también se ha investigado como una opción de tratamiento para los pacientes con enfermedad en estadio temprano no voluminoso (estadio I-II o IIIA). En un estudio llevado a cabo por el Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC)<sup>(117)</sup>, 152 pacientes con estadios I, II y IIIA no voluminoso fueron aleatorizados de forma prospectiva a ABVD (6 ciclos) seguido de radioterapia a una dosis total de 36 Gy bien IFRT o EFRT o ABVD (6 ciclos) exclusivo. A los 60 meses de seguimiento, no hubo diferencias significativas en la duración de la SLE (91% vs. 87%, respectivamente;  $p=0.61$ ), SLP (86% vs. 81%, respectivamente;  $p=0.61$ ), y SG (97% vs. 90%, respectivamente,  $p=0.08$ ) entre los pacientes tratados con ABVD más radiación y los tratados con ABVD exclusiva.

En el estudio multicéntrico realizado por el NCIC Clinical Trials Group (HD.6), 405 pacientes con estadio IA o IIA fueron aleatorizados a recibir ABVD (4-6 ciclos) o

irradiación subtotal nodal con o sin ABVD<sup>(118)</sup>. De los pacientes asignados al brazo de radioterapia, los que tenían un perfil de riesgo favorable recibieron radioterapia subtotal ganglionar exclusiva, y aquellos con cualquiera de los factores pronósticos adversos (VSG elevada, la edad > 39 años, celularidad mixta o depleción linfocítica o afectación de 4º más áreas ganglionares) fueron tratados con 2 ciclos de ABVD seguido de radioterapia ganglionar subtotal. Con una mediana de seguimiento de 12 años, la tasa de SG fue superior en los pacientes tratados con ABVD exclusiva comparado con los que se trataron con radioterapia subtotal nodal con o sin ABVD (94% vs. 87%,  $p=0.04$ )<sup>(119)</sup>. Sin embargo, la rama de ABVD sola se asoció con una menor tasa de SLP que la irradiación subtotal nodal con o sin ABVD (87% vs. 92%,  $p=0.05$ ), no habiendo diferencias significativas en las tasas de SLE entre los dos grupos (85% y 80%, respectivamente;  $p=0.60$ ). En el análisis del subgrupo de pacientes con pronósticos enfermedad favorable, no hubo diferencias significativas en ningún resultado entre los pacientes asignados a radioterapia subtotal nodal exclusiva y los asignados a ABVD sola. Entre los pacientes con factores de riesgo desfavorables, la tasa de supervivencia general estimada a 12 años fue mayor entre los pacientes en el grupo de sólo ABVD que entre los pacientes que recibieron radioterapia subtotal nodal más ABVD (92% vs. 81%, respectivamente;  $p=0.04$ ), mientras que la tasa de SLP fue menor en el grupo de sólo ABVD (86% vs. 94%,  $p=0.006$ ) y no hubo una diferencia significativa en la tasa de SLE a 12 años (83% vs. 78%,  $p=0.74$ ) entre los grupos. Entre los pacientes asignados al azar a ABVD sola, la SLP fue significativamente mayor entre los que alcanzaron una RC o RC no confirmada después de 2 ciclos de ABVD que entre los que no lograron RC (tasa estimada de SLP a 12 años del 94% y 81%, respectivamente,  $p=0.02$ )<sup>(119)</sup>. Este estudio, sin embargo, se cerró prematuramente ya que los resultados del estudio EORTC H8-F demostraron excelentes resultados para los pacientes con estadio I-II favorable de la enfermedad tratados con quimioterapia y radioterapia IFRT<sup>(120)</sup>.

Los resultados de un análisis que incluía pacientes tratados en los ensayos HD10 y HD 6 mostraron que la terapia de modalidad combinada proporciona un mejor control de la enfermedad que ABVD solo en pacientes con enfermedad en estadio IA-IIA que no alcanzan RC después de 2 ciclos de ABVD<sup>(121)</sup>.

Como conclusión general de los apartados previos, podemos decir que el tratamiento combinado (ABVD o Stanford V más IFRT) es el tratamiento preferido para los pacientes en estadios I-II de pronóstico favorable. La quimioterapia exclusiva con ABVD podría ser una opción razonable de tratamiento, especialmente para los pacientes más jóvenes que están en RC después de 2 ciclos de quimioterapia (tras la valoración por tomografía computarizada) o para aquellos con una puntuación de Deauville 1 a 3 en PET después de 2 a 4 ciclos de ABVD, a fin de evitar los riesgos a largo plazo de la radioterapia.

### **Estadios I-II de pronóstico desfavorable:**

En el ensayo clínico HD8 GHSG, se investigó la eficacia de la radioterapia IFRT contra la EFRT en el contexto de tratamiento de modalidad combinada para los pacientes con LH estadio temprano desfavorable con uno o más factores de riesgo (gran masa mediastínica, enfermedad extranodal; afectación esplénica; VSG elevada con o sin síntomas B; y afectación de > 2 áreas ganglionares)<sup>(122)</sup>. Este ensayo asignó al azar a 1204 pacientes a recibir 4 ciclos de quimioterapia COPP (ciclofosfamida, vincristina, procarbazona y prednisona) más ABVD, seguido de EFRT o IFRT: 30 Gy más 10 Gy a áreas voluminosas en ambos brazos. El tratamiento radioterápico se inició después de la quimioterapia en todos los pacientes sin progresión de la enfermedad. A los 5 años de seguimiento, la SLP (85,8% para EFRT y 84,2% para IFRT) y la SG (90,8% vs. 92,4%) fueron similares en los dos grupos.

Y al contrario, los efectos secundarios agudos incluyendo trombocitopenia, leucopenias, y la toxicidad gastrointestinal, fueron más frecuentes en el grupo de EFRT. Los resultados del seguimiento a 10 años confirmaron la no inferioridad de IFRT en términos de SLP (79,8% vs. 80,0%) y SG (86,4% vs. 87,3%)<sup>(123)</sup>. IFRT también se asoció con menos toxicidad aguda y un menor número de segundas neoplasias secundarias.

El ensayo clínico HD11 del GHSG demostró que 4 ciclos de ABVD seguido de 30 Gy IFRT es una opción de tratamiento eficaz para los pacientes con estadio inicial desfavorable<sup>(124)</sup>. En este estudio, 1395 pacientes con enfermedad desfavorable en

estadio I-II (estadios IA, IB , o IIA con al menos uno de los siguientes factores de riesgo: masa mediastínica bulky; compromiso extranodal; VSG  $\geq$  50 o VSG  $\geq$  30 con síntomas B, o 3 o más ganglios linfáticos y el estadio IIB sin masa bulky mediastínica o afección extraganglionar ) fueron asignados al azar a uno de los siguientes brazos: ABVD (4 ciclos, seguido de 30 Gy o 20 Gy IFRT) o BEACOPP en dosis estándar (4 ciclos, seguido de 30 Gy o 20 Gy IFRT). BEACOPP fue más eficaz que el tratamiento con ABVD cuando va seguida de 20 Gy IFRT (la SLF y la SLP a 5 años fueron del 86,8% y 87%, respectivamente, para BEACOPP. Las tasas correspondientes fueron del 81% y 82%, respectivamente, para ABVD). Sin embargo, no había ninguna diferencia entre los dos regímenes cuando el tratamiento era seguido de 30 Gy de IFRT (SLF y SLP a 5 años fueron del 87% y 88%, respectivamente, para BEACOPP, 85% y 87%, respectivamente, para ABVD). BEACOPP también se asoció con más toxicidad que ABVD.

Los resultados del estudio prospectivo realizado por el grupo de Stanford demostraron la eficacia del régimen Stanford V seguida de RT para áreas inicialmente voluminosas en los pacientes con enfermedad localmente avanzada<sup>(125)</sup>. En este estudio, 142 pacientes con estadio s I o II con enfermedad extensa a nivel del mediastino o pacientes en estadio III o IV se trataron con quimioterapia Stanford V (12 semanas), seguido por RT (36 Gy) en áreas bulky ( $\geq$ 5 cm) o enfermedad macroscópica esplénica. Con una mediana de seguimiento de 5,4 años, las tasas de SLP y SG a 5 años fueron del 89% y 96%, respectivamente. Ningún paciente progresó durante el tratamiento y no hubo muertes relacionadas con el tratamiento ni leucemias secundarias. Entre los 16 pacientes que recayeron, la supervivencia libre de segunda recidiva fue del 69% a los 5 años.

Un análisis del seguimiento a largo plazo del ensayo italiano HD9601 mostró que ABVD y MOPPEBVCAD (mecloretamina, vincristina, procarbazona, prednisona, epidoxorubicina, bleomicina, vinblastina, lomustina, doxorubicina, y vindesina) fueron superiores al régimen Stanford V en la tasa de respuesta, SLR, y SLP en pacientes con estadios intermedio y avanzado<sup>(126)</sup>. Sin embargo, la interpretación de estos resultados fue difícil debido a que el tiempo de evaluación de la respuesta fue diferente entre los brazos (8 y 12 semanas de Stanford V, 16 semanas para



ABVD, y 24 semanas para MOPPEBVCAD). Además, las modificaciones del protocolo de RT en el brazo Stanford V eran sustanciales, con una limitación del número de sitios irradiados (no más de 2) y una definición diferente de lo que se consideraba enfermedad voluminosa.

Otros investigadores, sin embargo, han confirmado que el régimen Stanford V es altamente eficaz para el tratamiento de los pacientes con afectación local extensa y avanzada, con un perfil bajo de toxicidad, cuando la radioterapia se administra de acuerdo con el protocolo estándar Stanford V. En el estudio MSKCC, 126 pacientes con enfermedad localmente avanzada o extensa fueron tratados con el régimen de quimioterapia Stanford V de 12 semanas seguido de 36 Gy IFRT sobre áreas voluminosas (5 cm o más) y / o para enfermedad macroscópica esplénica<sup>(127)</sup>.

Las tasas de SG a 5 y 7 años fueron del 90% y 88%, respectivamente. Cincuenta y ocho por ciento de los pacientes en los que fracasó el régimen Stanford V se rescataron tras seguir un tratamiento de segunda línea de quimioterapia a altas dosis seguido de trasplante autólogo.

El ensayo aleatorio llevado a cabo por el grupo de estudio de linfomas del Instituto Nacional de Investigación del Cáncer del Reino Unido (ISRCTN Estudio 64141244) también mostró que las eficacias de Stanford V y ABVD fueron comparables en términos de tasa de respuesta general (ORR), SLP a 5 años, y tasa de SG en pacientes con estadio I a IIA con enfermedad voluminosa u otras características adversas o estadios IIB, III, o IV<sup>(128)</sup>. La RT se administró en ambos brazos en áreas voluminosas (> 5 cm) y en depósitos esplénicos. Con una mediana de seguimiento de 4,3 años, la tasa de respuesta global, la SLP a 5 años y la tasa de SG a 5 años fueron del 91%, 76% y 90%, respectivamente, para ABVD. Las tasas correspondientes para el Stanford V fueron de 92%, 74% y 92%, respectivamente.

El ensayo fase III E2496 también confirmó que no hubo diferencias significativas entre el tratamiento con ABVD y Stanford V en términos de tasas de respuesta, SLR, SG, y la toxicidad en pacientes con enfermedad localmente extensa (estadio I-II A / B con enfermedad mediastínica “bulky”) y en pacientes con estadios III-IV<sup>(129)</sup>. En este ensayo, 854 pacientes fueron asignados al azar a ABVD (n = 428;

6-8 ciclos más 36 Gy de RT sólo para los pacientes con enfermedad mediastínica voluminosa) o Stanford V (n = 426; 12 semanas de quimioterapia más 36 Gy de RT sobre áreas > 5 cm o en enfermedad esplénica macroscópica). El criterio de valoración principal fue la SLP, que se define como el tiempo desde la aleatorización hasta la progresión, la recaída o muerte, lo que ocurra primero. Con una mediana de seguimiento de 6,4 años, no hubo diferencia en la ORR (tasas de RC del 72,7% para ABVD y 68,7% para Stanford V), SG (88% a los 5 años tanto para ABVD y Stanford V,  $p=0.86$ ), o SLP (74% de ABVD y 71% de Stanford V a los 5 años;  $p=0,32$ ) entre los dos brazos. La toxicidad también fue similar en ambos grupos. El análisis por subgrupos mostró que el resultado de los pacientes con enfermedad localmente extensa fue significativamente mejor que la de los pacientes con estadios III-IV. Las tasas de SLP a 3 y 5 años fueron del 82% en pacientes con enfermedad localmente extensa, mientras que para estadios III y IV fueron del 71% y 67% ( $p = 0,001$ ). Las tasas de supervivencia a 5 años fueron del 94% y 85%, respectivamente ( $p < 0.001$ ).

El ensayo HD14 del GHSG demostró que BEACOPP seguido de ABVD y radioterapia IFRT mejoraba significativamente el control tumoral y la SLP en pacientes con enfermedad desfavorable en estadio temprano (estadio IA, IB, o IIA con al menos uno de los siguientes factores de riesgo: masa mediastínica “bulky”; afectación extranodal;  $VSG \geq 50$  [sin síntomas B] o  $VSG \geq 30$  [con síntomas B], o  $\geq 3$  ganglios linfáticos involucrados) y enfermedad en estadio IIB con cualquiera de los dos últimos factores de riesgo)<sup>(130)</sup>. En este ensayo, 1528 pacientes fueron asignados al azar a recibir 4 ciclos de quimioterapia con el esquema ABVD (n = 765) o 2 ciclos de BEACOPP escalado seguido por 2 ciclos de ABVD (n=763). La quimioterapia fue seguida de radioterapia (30 Gy IFRT en ambos brazos). Con una mediana de seguimiento de 43 meses, la tasa de ausencia de fracaso al tratamiento a 5 años fue del 94,8% en comparación con el 87,7% de ABVD ( $p < 0.001$ ). La tasa de SLP a 5 años fue del 95,4% y 89,1%, respectivamente ( $p < 0.001$ ). La tasa de SG a 5 años no fue significativamente diferente entre los 2 grupos (97,2% y 96,8%, respectivamente;  $p=0,731$ ). La tasa de progresión o recaída también fue menor en los pacientes tratados con BEACOPP seguido de ABVD (2,5% vs. 8,4%,  $p < 0.001$ ).

Estos resultados sugieren que el tratamiento con ABVD más 30 Gy de IFRT sigue siendo el tratamiento estándar para los pacientes con enfermedad en estadio temprano desfavorable. El esquema Stanford V (cuando se administra tal y como se describe anteriormente, con RT) o BEACOPP seguido de ABVD son alternativas aceptables para algunos pacientes.

#### **1.6.7.2. Estadios III-IV:**

Mientras que la quimioterapia se utiliza siempre para los pacientes con enfermedad en estadio avanzado, el tratamiento combinado es usado en algunos regímenes de tratamiento, especialmente para los pacientes con enfermedad voluminosa, o en situaciones de respuesta deficiente a la quimioterapia en combinación otros regímenes de tratamiento.

La quimioterapia esquema MOPP fue el primer régimen usado con éxito en pacientes con enfermedad avanzada, con una tasa de respuestas del 84% y una SLE del 66% a los 10 años. Sin embargo, además de otras toxicidades a largo plazo, el MOPP se ha asociado a infertilidad (sobre todo en los hombres) y mielodisplasia<sup>(131)</sup>.

El ensayo clínico llevado a cabo por el CALGB, demostró que ABVD sólo o alternado con MOPP fue superior a MOPP exclusivo en pacientes con diagnóstico reciente de LH avanzado (estadios III-IV)<sup>(132)</sup>. El esquema con ABVD también presentó una menor mielotoxicidad comparado con MOPP o con el esquema alterno ABVD/MOPP. Estos resultados fueron confirmados en un estudio a gran escala que comparó ABVD con un régimen híbrido MOPP / ABV en 856 pacientes con LH avanzado<sup>(133)</sup>. Las tasas de remisión completa (76% vs. 80%), SLP a 5 años (63% vs. 66%), y la SG (82% vs. 81%) fueron similares para ABVD y MOPP / ABV, respectivamente. Sin embargo, MOPP / ABV se asoció con un mayor riesgo de sufrir una mayor toxicidad pulmonar aguda, hematológica, SMD y leucemia.

Otro ensayo realizado por el grupo de linfomas del Reino Unido (ensayo LY09) también confirmó que no hubo diferencias significativas en la supervivencia

específica ni en la SG entre ABVD y otros regímenes de poliquimioterapia en pacientes con LH avanzado<sup>(134)</sup>. Los otros regímenes diferentes del ABVD eran más tóxicos y se asociaron con resultados más pobres en pacientes de edad avanzada.

Una actualización de los resultados de este ensayo con una mediana de seguimiento de 83 meses fue consistente con los resultados iniciales<sup>(135)</sup>. Desde entonces, ABVD ha sido considerado el tratamiento estándar para los pacientes con enfermedad en estadios III-IV.

Stanford V y BEACOPP son los otros dos regímenes desarrollados para mejorar el pronóstico de los pacientes con enfermedad avanzada. Los resultados de estudios prospectivos llevados a cabo por el grupo de Stanford y otros investigadores han demostrado la eficacia del régimen Stanford V y RT IFRT en pacientes en estadio avanzado. Los resultados del ensayo fase III E2496 mostraron que no había diferencias significativas entre el tratamiento con ABVD y el Stanford V (con RT, cuando está indicada, de acuerdo con las directrices del protocolo de Stanford V) en la tasa de respuestas globales, SLP o SG, así como tampoco en cuanto a toxicidad, entre los pacientes con enfermedad en estadios III-IV<sup>(129)</sup>. Sin embargo, en pacientes de alto riesgo (IPS  $\geq$  3), la tasa de SLP 5 años fue significativamente mejor para ABVD que para Stanford V (67% vs. 57%,  $p=0.02$ ), pero sin diferencias significativas en la tasa de SG a 5 años (84% vs. 77%;  $p=0.15$ ).

La eficacia de BEACOPP en pacientes con enfermedad avanzada se demostró en dos ensayos aleatorizados fase III llevados a cabo por el GHSG. En el estudio HD9, 1196 pacientes con enfermedad en estadios IIB y IIIA con factores de riesgo o enfermedad en estadios IIIB y IV fueron aleatorizados a tratarse con 8 ciclos de COPP-ABVD, 8 ciclos BEACOPP estándar u 8 ciclos de BEACOPP escalado<sup>(136)</sup>. Cada régimen fue seguido de tratamiento con RT en áreas con enfermedad mayor de 5 cm. La mayoría de los pacientes en cada grupo de tratamiento tenía enfermedad en estadios III-IV. En el análisis a 5 años, BEACOPP escalado mostró un mejor control tumoral y mejor SG comparado con COPP-ABVD. Así mismo demostró tasas más bajas de progresión temprana comparado con COPP-ABVD o BEACOPP estándar. El análisis a 10 años confirmó que BEACOPP escalado fue

significativamente mejor BEACOPP estándar o COPP-ABVD en términos de SLP (82%, 70% y 64%, respectivamente) y de SG (86%, 80%, y 75%, respectivamente). BEACOPP escalado fue significativamente mejor que BEACOPP estándar en términos de SLP ( $p < 0.0001$ ) y SG ( $p = 0.0053$ )<sup>(137)</sup>.

Los resultados finales del estudio HD12 ( $n = 1670$ ) que compararon 8 ciclos de BEACOPP escalado con 4 ciclos de BEACOPP escalado seguidos de 4 ciclos de BEACOPP estándar, con o sin RT, también confirmaron la eficacia del escalado para pacientes con LH en estadio avanzado de alto riesgo (los detallados en el ensayo HD9)<sup>(138)</sup>. En este estudio, a los 5 años, la supervivencia libre de fallo de tratamiento (86,4% y 84,8%, respectivamente) y la SLP (87,5% y 85%, respectivamente) fueron mejor (aunque la diferencia no fue significativa) tras 8 ciclos de BEACOPP escalado en comparación con 4 ciclos de BEACOPP escalado seguidos de 4 ciclos de BEACOPP estándar. La tasa de SG a 5 años, sin embargo, no fue diferente (92% y 90,3%, respectivamente).

El análisis final del ensayo HD15<sup>(139)</sup> demostró que 6 ciclos de BEACOPP escalado seguido por RT guiada por PET tuvo como resultado una SG y control tumoral superiores a 8 ciclos de BEACOPP escalado en pacientes con enfermedad en estadios avanzados (estadio IIB con gran masa mediastínica o estadios III-IV). En este estudio, 2182 pacientes fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes 3 grupos de tratamiento: 8 ciclos de BEACOPP escalado ( $n = 728$ ), 6 ciclos de BEACOPP escalado ( $n = 726$ ), u 8 ciclos de BEACOPP estándar con intensificación en el tiempo ( $n = 728$ ). La RT (30 Gy) se restringió a los pacientes con enfermedad residual PET positivos (2,5 cm o más) después de la quimioterapia. Las tasas de supervivencia libre de fallo de tratamiento a 5 años fueron del 84,4%, 89,3% y 85,4%, respectivamente, para los 3 grupos. Las tasas de SG fueron de 91,9%, 95,3% y 94,5%, respectivamente, y fueron significativamente mejores con 6 ciclos de BEACOPP escalado que con 8 ciclos de BEACOPP escalado ( $p = 0.019$ ). El esquema con BEACOPP escalado también se asoció con una menor mortalidad relacionada con el tratamiento (4,6% vs. 7,5% tras 8 ciclos de BEACOPP escalado y 5,2% tras 8 ciclos de BEACOPP a dosis estándar intensificado en el tiempo) y un menor número de segundos tumores

(2,4% frente a 4,7% y 3,1%, respectivamente, tras 8 ciclos de BEACOPP escalado y 8 ciclos de BEACOPP a dosis estándar intensificado en el tiempo). Estos resultados confirman que 6 ciclos de BEACOPP escalado seguido por RT guiada por PET es un tratamiento aceptable para los pacientes con enfermedad en estadios avanzados.

Los resultados de los estudios que han comparado BEACOPP escalado con BEACOPP estándar o ABVD no lograron mostrar una ventaja en cuanto a SG para BEACOPP escalado, a pesar de que dio lugar a un mejor control tumoral en pacientes con enfermedad avanzada. Sin embargo, estos estudios no han tenido la suficiente potencia como para determinar las diferencias de ambos tratamientos en cuanto a SG debido al escaso número de pacientes recogidos. El seguimiento a largo plazo del ensayo HD2000 también mostró que el riesgo de inducir neoplasias secundarias a los 10 años fue significativamente mayor con BEACOPP que con ABVD (6,7 frente a 0,9;  $p=0.027$ )<sup>(140)</sup>. El ensayo de la EORTC 20012<sup>(141)</sup> ha evaluado el resultado de administrar BEACOPP (4 ciclos escalados y 4 ciclos a dosis estándar) o ABVD (8 ciclos) en pacientes de alto riesgo con enfermedad en estadios III-IV e IPS  $\geq 3$  (274 pacientes en el brazo de BEACOPP y 275 pacientes en el brazo de ABVD). Los resultados han mostrado que no hay mejoría en la SG (86,7% y 90,3, respectivamente, a los 4 años;  $p=0.208$ ) o SLE (63,7% y 69,3%, respectivamente, a los 4 años;  $p=0.312$ ), aunque la SLP fue significativamente mejor con BEACOPP (83,4% frente a 72,8% para ABVD;  $p=0.005$ ). Interrupciones tempranas del tratamiento también fueron más frecuentes con BEACOPP. La mediana de seguimiento fue de 3,8 años por lo que se precisa un mayor seguimiento a largo plazo de es necesario para confirmar estos hallazgos preliminares.

Varios ensayos han abordado el papel de la RT de consolidación después de la finalización de la quimioterapia en pacientes con estadios III a IV. El estudio multicéntrico del Southwest Oncology Group no demostró ninguna mejoría en las tasas de SG para los pacientes que siguieron tratamiento con RT IFRT a dosis bajas después de MOP-BAP (mecloretamina, vincristina, procarbazona más bleomicina, doxorubicina y prednisona), pero la duración de la remisión fue más

prolongada en varios subgrupos, especialmente en pacientes con esclerosis nodular y enfermedad voluminosa<sup>(142)</sup>. En el ensayo de la EORTC 20884 se evaluó el papel de la RT de consolidación después de la quimioterapia MOPP-ABV en los pacientes con enfermedad avanzada<sup>(143)</sup>; 739 pacientes con estadio III y IV recibieron de 6 a 8 ciclos de MOPP-ABV. Los pacientes en RC tras TC después de la quimioterapia, fueron asignados al azar a ningún tratamiento adicional o RT tipo IFRT. Los que obtuvieron una RP recibieron IFRT en las zonas afectas (nodales y extranodales). La SG a 8 años y la SG específica de enfermedad en el grupo de RP fueron del 76% y 84%, respectivamente. Estos resultados no fueron significativamente diferentes en los pacientes con una RC (con o sin IFRT), lo que sugiere que la RT tipo IFRT de consolidación es beneficiosa para los pacientes que entran en RP después de la quimioterapia.

En el ensayo LY09 que comparó ABVD con otros dos regímenes de múltiples fármacos<sup>(135)</sup>, la RT tipo IFRT se recomienda en casos de respuesta incompleta a la quimioterapia o en caso de enfermedad voluminosa al diagnóstico. La SLP fue superior en los pacientes que recibieron RT (SLP a 5 años fue del 71% sin RT y el 86% con RT) observándose una ventaja similar también en cuanto a SG. Los resultados finales del ensayo HD12 también demostraron que la consolidación con RT era beneficiosa para los pacientes con enfermedad residual después de BEACOPP escalado (supervivencia libre de fallo de tratamiento fue de 90,4% y 87%, respectivamente), mientras que este efecto no se observó en los pacientes con enfermedad voluminosa inicial que estaban en RC después de quimioterapia.

En el ensayo HD15, la RT (30 Gy) después de la quimioterapia BEACOPP estaba restringida a aquellos pacientes en RP con enfermedad residual PET-positiva (2,5 cm o más)<sup>(139)</sup>. Los pacientes PET-negativos no recibieron tratamiento con RT. De los 739 pacientes considerados con enfermedad residual (2,5 cm o más) después de 6 a 8 ciclos de BEACOPP, 548 pacientes (74%) fueron PET negativos; 191 pacientes (26%) eran PET positivos y recibieron tratamiento con RT de consolidación. El análisis final mostró que el pronóstico de los pacientes en RP con enfermedad persistente PET negativos después de la quimioterapia fue similar a los que estaban en CR, evaluados con TC convencional (la SLP a 4 años fue de

92,1%), lo que sugiere que la consolidación con RT podría ser obviada en pacientes que se encuentran en RP con PET negativo. Sin embargo, el uso de RT de consolidación fue eficaz para los pacientes en situación de RP con PET positivo, ya que a 4 años la SLP fue del 86,2%.

Dos ensayos recientes europeos evaluaron el papel de la quimioterapia a altas dosis seguida de trasplante autólogo como terapia de consolidación para los pacientes con estadios avanzados y LH desfavorable que responden a tratamiento inicial de quimioterapia<sup>(144,145)</sup>. Ninguno de los ensayos mostró una ventaja sobre la quimioterapia convencional para pacientes con LH desfavorable y avanzado tras obtener remisión completa o parcial después de un ciclo inicial de quimioterapia basada en doxorrubicina. En lugar de ello, los cursos adicionales de la misma quimioterapia convencional que se utiliza como tratamiento inicial producen resultados equivalentes o mejores que el la quimioterapia a altas dosis seguida de trasplante.

Como resumen de este apartado podemos considerar que el tratamiento con quimioterapia esquema ABVD, Stanford V (pacientes seleccionados con IPS<3), o BEACOPP escalado (en pacientes seleccionados < 60 años con IPS≥4) son opciones válidas como tratamiento inicial en pacientes con enfermedad de Hodgkin en estadios III y IV.

#### **Linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular:**

Este tipo de linfoma se caracteriza por un curso indolente y la posibilidad de una recidiva tardía. Tiene una historia natural y una respuesta al tratamiento diferente a la modalidad clásica<sup>(146)</sup>. La mayoría de los pacientes se presentan con enfermedad en estadio inicial y rara vez con síntomas B, afectación mediastínica, masa voluminosa o compromiso extranodal.

La células de este tipo de linfoma, suelen expresar el antígeno CD20. Varios estudios clínicos han evaluado la eficacia del rituximab (anticuerpo anti-CD20) para los pacientes con diagnóstico reciente y en recaída o en refractarios<sup>(147)</sup>.



Los diferentes estudios retrospectivos apoyan el uso de la radioterapia en modalidad ISRT en monoterapia como una opción válida de tratamiento para los pacientes en estadios iniciales (ISRT 30-36 Gy en pacientes con estadio IA o IIA no voluminoso).

La observación puede ser una opción aceptada para pacientes muy seleccionados con enfermedad en estadio IA con afectación de un único ganglio completamente extirpado. Un curso breve de quimioterapia más ISRT con o sin rituximab se recomienda para pacientes con enfermedad en estadios IB o IIB y para los pacientes que se presentan al diagnóstico en estadios IA o IIA ambos con masa voluminosa.

Se recomienda quimioterapia con o sin rituximab con o sin ISRT para todos los pacientes con enfermedad en estadios III-IV.

La terapia de mantenimiento con rituximab puede ser considerada durante 2 años en algunos pacientes tratados con rituximab exclusivo. La afectación abdominal se ha asociado con un aumento del riesgo de transformación a un linfoma de células B agresivo, por lo que es recomendable la biopsia de áreas sospechosas subdiafragmáticas persistentes o de nueva aparición.

## ***2. TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.***

### **2.1. Hipótesis de trabajo.**

El papel de la angiogénesis en el desarrollo neoplásico y pronóstico clínico de los tumores sólidos, ha sido ampliamente investigado durante los últimos años. Este hecho ha llevado a incorporar los llamados fármacos antiangiogénicos como una herramienta más dentro del arsenal terapéutico disponible. En el caso de las neoplasias de origen hematológico y en el linfoma de Hodgkin en particular, tanto la angiogénesis como los procesos inflamatorios relacionados con el microambiente peritumoral mediados por COX-2 son aspectos importantes no totalmente explorados en la evolución de estos pacientes, de manera que podrían constituir factores pronósticos útiles así como convertirse en potenciales dianas terapéuticas en el manejo clínico de esta patología.

## **2.2. Objetivos.**

- 1. Evaluar la relación de la expresión de COX-2 en las CRS al diagnóstico con los principales factores pronósticos clínicos previos al tratamiento en una población con LH uniformemente tratada con ABVD +/- radioterapia.
- 2. Analizar la influencia de la expresión de COX-2 en las CRS al diagnóstico sobre la respuesta al tratamiento.
- 3. Analizar la influencia de la expresión de COX-2 en las CRS al diagnóstico sobre la incidencia de recaída, la SLP y la SG.
- 4. Analizar la influencia de la expresión de COX-2 en las CRS al diagnóstico sobre los resultados de los distintos tratamientos administrados a la población diana (quimioterapia con o sin radioterapia).

## **2.3. Material y métodos.**

### **Pacientes**

Para la realización de este estudio, incluimos de forma retrospectiva a un total de 242 pacientes diagnosticados de LH tratados de manera homogénea con ABVD (2-8 ciclos, en función de los factores de riesgo) con o sin radioterapia (se excluyeron regímenes de tratamiento más o menos intensivos). Todas las muestras se recogieron con la colaboración de la Red Nacional de Bancos de Tumores española, coordinado por el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) siguiendo los procedimientos técnicos y éticos de la red, incluyendo los procesos de anonimización. Se obtuvo la aprobación del Comité Ético del CNIO y el consentimiento informado de todos los casos de conformidad con la Declaración de Helsinki.

Sólo se incluyeron casos con muestras de tejido al diagnóstico . Se recabó información sobre la estadificación y los principales factores pronósticos clínicos para la mayoría de los casos, incluyendo los factores pronósticos de la

Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC) que definen los grupos de riesgo favorables y desfavorables de los estadios iniciales así como los del Índice Pronóstico Internacional (IPS ). La evaluación de la respuesta y el seguimiento se realizó con los criterios Cheson.

### **Diseño del “microarray” de tejido (TMA)**

La expresión inmunohistoquímica de COX-2 se evaluó utilizando la tecnología de TMA. Se utilizó un dispositivo específico (Beecher Instrumento, Silver Spring, MD) a fin de obtener el tejido para construir el TMA. Todos los casos fueron revisados histológicamente y se marcaron en los bloques de parafina las zonas más ricas en células RS. En cada caso, se seleccionaban 2 cilindros de 1 mm de diámetro a partir de 2 áreas diferentes, junto con diferentes controles para garantizar la calidad, reproducibilidad, y la tinción homogénea de las preparaciones. Por ello, se construyeron diferentes bloques TMA, cada uno conteniendo de 120 a 140 cilindros. Incluido en cada TMA había una muestra de tejido linfóide reactivo de amígdala a modo de control interno y otra muestra de tejido normal del colon como control positivo para la expresión de COX-2 (Figura 3).

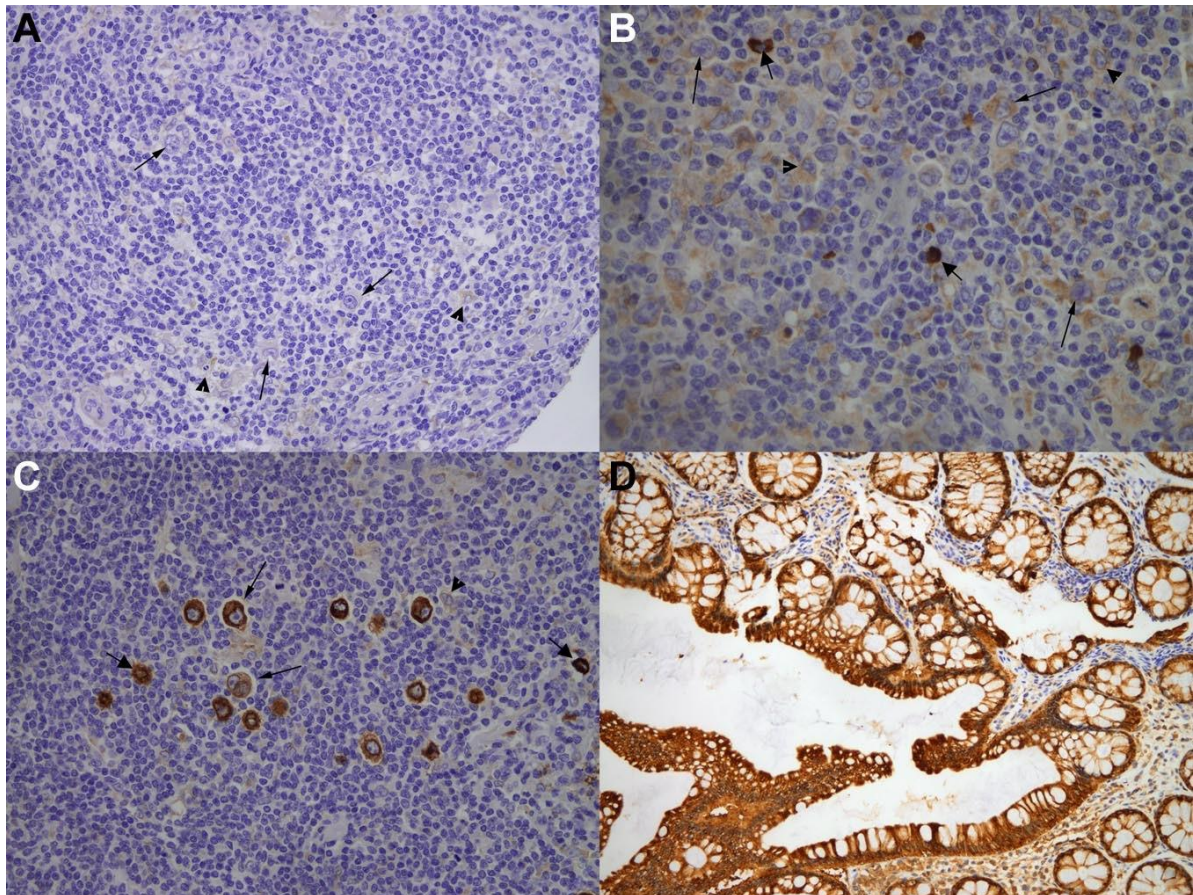
### **Inmunohistoquímica**

Los bloques de TMA se seccionaron a un espesor de 3  $\mu\text{m}$  y se secaron durante 16 horas a 56° C. Posteriormente se desparafinaron en xileno, se rehidrataron con etanol y se lavaron con una solución salina tamponada con fosfato. La recuperación del antígeno se consiguió mediante el tratamiento térmico en PT LINK con tampón de pH alto (DAKO).

La tinción inmunohistoquímica de las secciones de los bloques para la COX-2 se realizó con un anticuerpo monoclonal prediluido de conejo SP21 (RM-9121-R7; Neomarkers). El sistema de inmunodetección se realizó en un Autostainer PLUS con kit EnVision FLEX , utilizando cromógeno de diaminobencidina como sustrato. Las secciones fueron contrastadas con hematoxilina.

La tinción de las secciones de TMA fueron evaluadas por el consenso de 2 patólogos utilizando criterios uniformes. Para garantizar la reproducibilidad de este método, se decidió utilizar criterios sencillos y claros.

**Figura 3. Criterios para la evaluación de la tinción de COX-2 en la célula de RS.** Inmunohistoquímica representativa de los TMA en casos con células de RS negativas para la tinción de COX-2 (A), tinción positiva baja (B), o tinción positiva alta (C). Todos los casos se presentan con una ampliación de 40 x. Las flechas delgadas indican las células de RS; las puntas de flecha los histiocitos y las flechas gruesas las células plasmáticas. La mucosa de colon se utilizó como control positivo para la expresión de COX-2 (D).



El patrón de tinción para COX-2 se registró como positivo o negativo, teniendo en cuenta la tinción citoplásmica / membranosa, siendo positiva cuando más del 10% de las células de RS expresaban COX-2 (Figura 3). Para considerar que un caso era evaluable para el estudio, debía que tener al menos 10 células RS en al menos 1 de los 2 cilindros analizados en cada paciente. La reproducibilidad de los resultados obtenidos fue confirmada tras la comparación de los resultados del TMA con los de los bloques de parafina enteros en 34 casos seleccionados al azar que se tiñeron utilizando el mismo procedimiento.

### **Tratamiento radioterápico**

En todos los casos se utilizaron sistemas de inmovilización para asegurar la reproducibilidad diaria de los tratamientos. Los pacientes fueron tratados una vez al día, 5 veces por semana hasta una dosis total que varió entre 20 y 41 Gy. La radiación fue administrada con un acelerador lineal (energías de 6 o 18 MV) o con una unidad de cobalto (1,25 MV) utilizando para el cálculo de dosis algoritmos de 2D o con radioterapia conformacional 3D. La dosis se calculó al punto ICRU (siguiendo las recomendaciones de ICRU 50: Comisión Internacional de Unidades y mediciones de radiación). Los pacientes recibieron tratamiento con campos tipo "mantle" o "Y" invertida y fueron tratados tanto en decúbito supino como prono. Se utilizaron bloques individuales de protección. El borde superior del campo tipo "mantle" se situó en la punta inferior de la apófisis mastoides y en la mitad del cuerpo de la mandíbula. El borde inferior se encontraba situado en el espacio intermedio T10 / T11. El borde inferior de la "Y" invertida estaba en un nivel situado 2 cm por debajo de la tuberosidad isquiática. La técnica de campo afecto usada en pacientes con enfermedad en estadio IA consistió en un campo que cubría bien la región cervical, incluyendo la fosa supraclavicular (unilateral o bilateral) o la axila o el mediastino o las regiones inguinales - ilíacas (unilaterales). Para los pacientes con enfermedad en estadio IIA el campo incluyó las 2 regiones involucradas.

### **Análisis estadístico**

Para estudiar la relación entre las diferentes variables clínicas y COX-2, se estratificó la población en 2 cohortes (LH en fase temprana y avanzada). Para la comparación entre variables categóricas se utilizaron tanto el test de  $\chi^2$  de Pearson como la prueba exacta de Fisher. La SG y la SLP se midieron a partir de la fecha del diagnóstico y se estimaron de acuerdo con el método de Kaplan-Meier. Las comparaciones entre las variables de interés se realizaron mediante el test de Log-Rank. El análisis multivariante con las variables significativas en el análisis univariante además de los potenciales confusores se realizó de acuerdo con el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Todos los valores de  $P$  fueron reportados a 2 colas y la significación estadística se definió en  $P < 0,05$ .

## Resultados

### Características de los pacientes

Como se muestra en la Tabla 9, la mediana de edad al diagnóstico de los pacientes incluidos en la serie fue de 31 años para la cohorte diagnosticada de LH en estadios iniciales (n=143) y de 36 años para la cohorte de pacientes en situación avanzada (n=99). Comparando los dos grupos, estadios iniciales y avanzados, tenemos los siguientes resultados: 30% y 56% presentaban síntomas B, el 30% y el 27% tenían enfermedad voluminosa, y el 6% y el 16% tenía una puntuación en base a la escala del Eastern Cooperative Oncology Group Performance Score (ECOG PS) mayor que 1, respectivamente. En los casos con estadios iniciales con información clínica suficiente, la puntuación EORTC fue desfavorable en el 84% de los pacientes. El IPS fue 3 ó superior en el 45% de los pacientes con enfermedad avanzada. Un total de 124 pacientes (51%) recibieron RT añadido a la quimioterapia ABVD, con un 66% de estos pacientes en estadio I-II de Ann Arbor y un 30% en estadio III-IV. En cuanto a la distribución de los pacientes en función de los diferentes subtipos histológicos, el resultado fue el siguiente: 62% LH clásico subtipo esclerosis nodular (LHC), 32% celularidad mixta, 3% con depleción linfocitaria, y el 3% rico en linfocitos.

La mayoría de los pacientes con características de alto riesgo, tales como estadio III-IV (88%), con IPS > 2 (93%) o enfermedad voluminosa (93%) recibieron 6-8 ciclos de quimioterapia con o sin RT. En los estadios I-II localizado, la mayoría de los pacientes con características de alto riesgo, tales como IPS > 2 (89%) o enfermedad voluminosa (95%) siguieron o bien tratamiento de consolidación con radioterapia sobre campo afecto o bien tratamiento con más quimioterapia. Para controlar la variabilidad del tratamiento, consideramos tratamientos cortos (2-4 ciclos) y largos (6-8 ciclos) en todos los análisis estadísticos realizados. Dado que el tratamiento realizado se adaptó en función del estadio inicial y de los factores de riesgo no ha tenido ninguna influencia en el resultado, como se muestra en las tablas 9-12.

Tabla 9. Características de los pacientes

CARACTERÍSTICAS		COX-2 +	COX-2 -	P
<b>Estadio inicial</b>				
Edad, años (rango)	31 (10-79)	31 (12-79)	31 (10-71)	0,82
Edad ≥ 50 años, n (%)	24 (17%)	6 (13%)	18 (17%)	0,41
Sexo, M/F (%)	77 (54%)/ (46%)	66 24 (52%)/ (48%)	22 53 (55%)/ (45%)	44 0,78
Síntomas B, n (%)	43 (30%)	15 (33%)	28 (29%)	0,65
Masa voluminosa, n (%)	42 (30%)	15 (33%)	27 (28%)	0,53
ECOG PS >1, n (%)	8 (6%)	3 (7%)	5 (5%)	0,70
Puntuación desfavorable EORTC, n (%)	70 (84%)	27 (77%)	43 (90%)	0,12
Radioterapia, n(%)	95 (66%)	33 (72%)	62 (64%)	0,35
Determinación de COX-2	46 (32%)	100 %	0 %	—
<b>Estadio avanzado</b>				
Edad, años (rango)	36 (16-83)	35 (18-83)	38 (16-81)	0,94
Edad ≥ 45 años, n (%)	34 (34%)	16 (37%)	18 (32%)	0,60
Sexo, M/F (%)	54 (54%)/ (45%)	45 23 (53%)/ (46%)	20 31 (55%)/ (45%)	25 0,85
Síntomas B, n (%)	55 (56%)	25 (58%)	30 (54%)	0,65
Masa voluminosa, n (%)	27 (27%)	11 (26%)	16 (29%)	0,74
ECOG PS >1, n (%)	16 (16%)	8 (19%)	8 (14%)	0,56
IPS > 2, n (%)	45 (45%)	22 (51%)	23 (41%)	0,32
Radioterapia, n (%)	29 (30%)	13 (31%)	16 (29%)	0,80
Determinación de COX-2	43 (43%)	100 %	0 %	—

### Expresión de COX-2

Se evaluó la tinción de COX-2 en las células de RS a nivel citoplasmático / membranoso. Un análisis comparativo de los resultados obtenidos usando TMA y el conjunto de bloques completos en 34 casos seleccionados al azar mostró una concordancia del 88%, una cifra que es consistente con los resultados en otros

biomarcadores o modelos tumorales. Además, la reproducibilidad intraobservador e interobservador fue del 97 % y 90%, respectivamente.

La tinción de COX-2 en las células de RS fue como sigue: 89 pacientes (37%) mostraron tinción positiva y 153 (63%) negativa. La tinción de COX-2 no se relacionó con ninguna de las variables clínicas. Sin embargo, hubo una tendencia hacia un mayor porcentaje de positividad en estadios de Ann Arbor más avanzados ( $p=0.074$ ) y esta tendencia también se observó en los subtipos esclerosis nodular y depleción linfocítica ( $p=0.088$ ).

### **Tratamiento Radioterápico**

Un total de 95 pacientes siguieron tratamiento con radioterapia tras la quimioterapia con el esquema ABVD. El tratamiento con campos extensos (nodal total, manto, o Y invertida ) se utilizó en un 31% de los casos. El otro 69% de los pacientes recibieron tratamiento radioterápico sobre campo afecto. La radiación se administró con un acelerador lineal (6, 15, o 18 MV) o con cobaltoterapia. (se utilizó en el 12 % de los pacientes en la década de 1990. La dosis por fracción varió entre 20 y 41 Gy (mediana de la dosis, 30 Gy).

### **Resultado y análisis de supervivencia global del grupo**

Con una mediana de seguimiento de 58 meses (rango, 8-199) para los pacientes vivos, las variables: edad  $\geq 60$  años, presencia de síntomas B, estadio III-IV, PS  $\geq 2$ , no haber recibido tratamiento con RT, y la expresión de COX-2, se asociaron con una SLP y la SG desfavorables (Tabla 10). La SLP a los 5 años fue del 60% y el 79% para los grupos COX-2<sup>+</sup> y COX-2<sup>-</sup>, respectivamente ( $p=0.003$ ), mientras que la SG a los 5 años fue del 73% y el 91% ( $p < 0.001$ ), respectivamente . En el análisis multivariante, los síntomas B (hazard ratio [HR] = 2.04), la positividad para COX-2 en las células de RS (HR=1.91), la edad  $\geq 60$  años (HR=1.89), y haber recibido RT (HR=0.54) se asociaron de forma independiente con la SLP, mientras que la edad  $\geq 60$  años (HR=4.34 ), un ECOG PS  $\geq 1$  (HR=4), y la positividad para COX-2 (HR=2.95) se asociaron de forma independiente con la SG. La tinción positiva para COX-2 en la célula de RS no fue diferente en los pacientes que respondieron a la terapia de primera línea y



consiguieron una respuesta completa (35%) y en los que consiguieron una respuesta menor a la remisión completa (48%,  $p < 0.17$ ).

**Tabla 10. Resultados globales de SLP y SG.**

Análisis Univariante				
Factor	5-años SLP (95% CI)	p	5-años SG (95% CI)	P
<b>Edad</b>		<b>0.003</b>		<b>&lt;0.001</b>
0-59	75% (68-81)		88% (83-93)	
≥ 60	54% (35-72)		61% (43-78)	
<b>Sexo</b>		<b>0.65</b>		<b>0.95</b>
Masculino	72% (64-80)		83% (76-90)	
Femenino	71% (61-81)		85% (78-92)	
<b>Bulky</b>		<b>0.55</b>		<b>0.58</b>
Si	67% (54-79)		85% (76-94)	
No	73% (66-80)		83% (77-89)	
<b>Síntomas B</b>		<b>&lt;0.001</b>		<b>&lt;0.001</b>
No	83% (77-89)		90% (85-95)	
Si	54% (42-66)		74% (64-84)	
<b>Estadío AA</b>		<b>0.001</b>		<b>0.007</b>
I-II	81% (74-88)		90% (85-95)	
III-IV	57% (46-68)		75% (66-85)	
<b>ECOG PS</b>		<b>0.004</b>		<b>&lt;0.001</b>
0-1	74% (67-80)		87% (83-92)	
2-4	47% (25-70)		45% (18-72)	
<b>IPS</b>		<b>&lt;0.001</b>		<b>&lt;0.001</b>
0-2	82% (76-88)		90% (85-94)	
3-7	41% (27-55)		68% (56-80)	
<b>Radioterapia</b>		<b>0.001</b>		<b>0.006</b>
Si	80% (72-88)		91% (86-97)	
No	64% (54-73)		75% (66-84)	
<b>Tinción COX2 CRS</b>		<b>0.003</b>		<b>&lt;0.001</b>
Positiva	60% (49-72)		73% (63-83)	
Negativa	79% (73-86)		91% (86-96)	
Análisis Multivariante				
	SLP		SG	
Factor	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	P
<b>IPS 3-7</b>	3.82 (2.32-6.29)	<b>&lt;0.001</b>	2.44 (1.22-4.89)	<b>0.012</b>
<b>Tinción COX2+ en CRS</b>	1.77 (1.08-2.90)	0.024	2.69 (1.38-5.24)	<b>0.004</b>
<b>Edad &gt; 60 años</b>	---	---	3.51 (1.77-6.94)	<b>&lt;0.001</b>
<b>ECOG PS &gt; 1</b>	---	---	<b>2.82 (1.31-6.10)</b>	<b>0.008</b>

### **Papel de la RT en la supervivencia**

En este trabajo valoramos el impacto de la radioterapia sobre todos los factores pronósticos que influyen de forma independiente en la SLP (expresión de COX-2 en la célula de RS e IPS). Teniendo en cuenta a los pacientes de la serie COX-2 +, los que recibieron RT tuvieron de forma significativa una mejor SLP a 5 años (80% vs 54%, si no RT;  $p=0.008$ ). Por el contrario, los pacientes COX-2- sólo obtuvieron un modesto beneficio, no significativo, del tratamiento con RT en términos de SLP a 5 años (90% vs 79%;  $p=0.13$ ) (Figura 7). Cuando se compararon los resultados de los pacientes que recibieron RT teniendo en cuenta la expresión de COX-2 en las células de RS, se encontró una diferencia no significativa del 10% en términos de la SLP entre pacientes COX-2+ y COX-2- ( $p=0.09$ ), mientras que la diferencia entre los 2 grupos fue importante (25%) en pacientes que no recibieron RT ( $p=0.04$ ).

El impacto de la RT en pacientes con LH en estadios iniciales con IPS > 2 fue el siguiente: no hubo diferencia en SLP entre los pacientes que recibieron o no recibieron RT, o entre pacientes con IPS > 2 ( $p=0.47$ ) o IPS 0-2 ( $p=0.10$ ) (Tabla 11 y Figura 4).

### **Resultado y subanálisis de la supervivencia según el estadio de Ann Arbor**

En las tablas 10 y 11 se presenta un subanálisis de SLP y SG de los pacientes con enfermedad localizada (estadios I-II) y LH avanzado (estadios III-IV), respectivamente. Se observó un mayor impacto sobre el pronóstico en los estadios de Ann Arbor favorables (I-II). De hecho, en estos grupos de bajo riesgo, la expresión de COX-2 define un subgrupo con pronóstico significativamente peor. En consecuencia, los 46 pacientes (32%) COX-2 + de los 143 pacientes que se presentaron en estadios I-II de Ann Arbor tenían una SLP a los 5 años del 72% versus 86% en los pacientes COX-2 - ( $p=0.017$ ) (Figura 4). Del mismo modo, la SG a los 5 años también difirió para ambos grupos, con valores del 82% y 94% para COX-2 + y COX-2-, respectivamente ( $p=0.004$ ) (Figura 5). En el análisis multivariante, la expresión de COX-2 ( $HR=276$ ), los síntomas B ( $HR=2.34$ ), y la administración de RT ( $HR=0,32$ ) se asociaron de forma independiente con la SLP (Tabla 11 y Figuras 4-5), mientras que sólo el ECOG >1 ( $HR=9$ ) y la positividad para COX-2 ( $HR=4.81$ ) se asociaron de forma independiente con la SG. El grupo

desfavorable siguiendo los criterios de la EORTC tendió a presentar una peor SLP y SG, pero sin llegar a alcanzar una diferencia estadísticamente significativa. Posiblemente esto sea debido a que sólo se pudo obtener esta información en 83 de los 143 (58%) pacientes con LH en estadios iniciales. Para los pacientes con LH en estadios avanzados, solamente el IPS >2 (HR=2.88) se asoció de forma independiente con una peor SLP, mientras que la edad ≥ 60 años (HR=5.07) y ECOG PS >1 (HR=3.38) se asociaron de forma independiente con la SG. En esta población en estadio avanzado, la expresión de COX-2 sólo mostró una tendencia hacia una peor SLP y SG (Tabla 12 y Figura 6) pero no estadísticamente significativa.

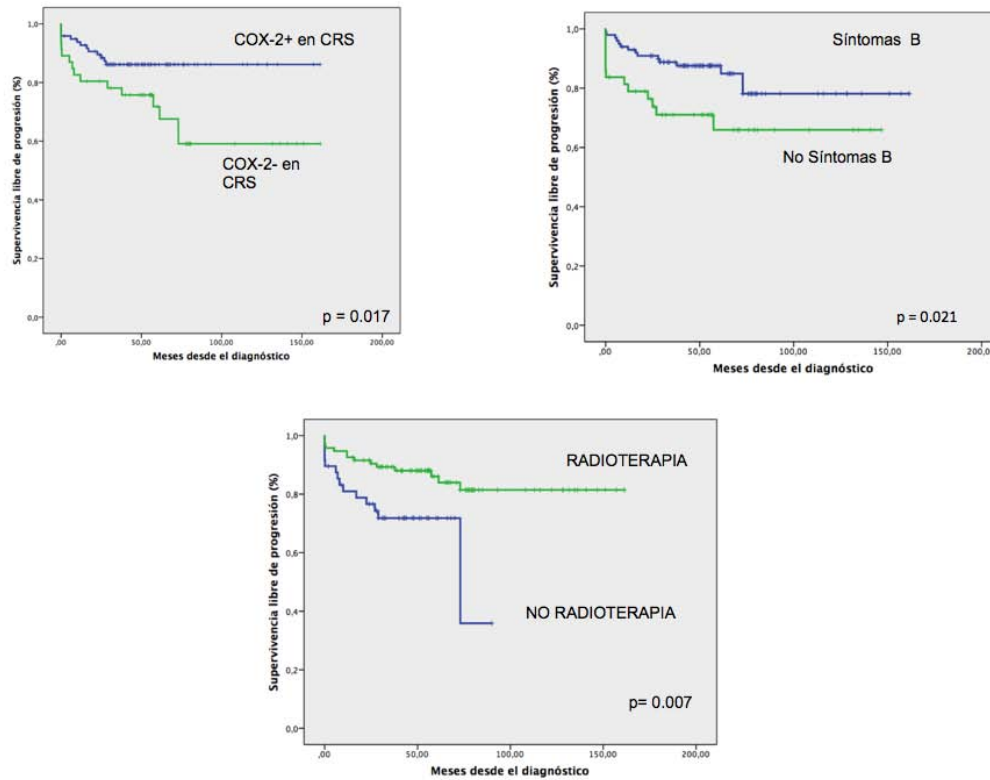
**Tabla 11. Análisis de SLP y SG en pacientes con LH en estadios tempranos.**

Análisis Univariante				
Factor	5-años SLP (95% CI)	p	5-años SG (95% CI)	P
<b>Edad</b>		0.37		<b>0.21</b>
0-49	82% (74-89)		90% (85-96)	
≥ 50	78% (61-95)		87% (74-100)	
<b>Sexo</b>		0.74		<b>0.71</b>
Masculino	81% (73-90)		90% (82-97)	
Femenino	80% (69-92)		90% (85-95)	
<b>Masa Bulky</b>		0.25		<b>0.79</b>
Si	73% (59-87)		86% (75-98)	
No	84% (76-92)		91% (85-97)	
<b>Síntomas B</b>		0.021		<b>0.003</b>
No	88% (81-95)		94% (89-99)	
Si	66% (50-82)		80% (67-93)	
<b>ECOG PS</b>		0.052		<b>0.001</b>
0-1	74% (67-80)		92% (87-97)	
2-4	56% (17-95)		47% (2-91)	
<b>VSG</b>		0.15		<b>0.02</b>
Normal	75 (53-96)		94% (84-100)	
Elevada	88 (73-100)		82% (63-100)	
<b>Áreas Ganglionares</b>		0.18		<b>0.68</b>
0-3	86% (75-97)		89 (79-99)	
≥ 4	50% (0-100)		50% (0-100)	
<b>EORTC score</b>		0.084		<b>0.054</b>
Favorable	91% (74-100)		100%	
Desfavorable	74% (63-85)		84% (75-93)	
<b>Tipo de tratamiento:</b>		0.16		<b>0.97</b>
2-4 ciclos	84 (75-94)		89 (81-97)	
6-8 ciclos	79 (69-88)		91 (83-98)	
<b>Radioterapia</b>		0.007		<b>0.11</b>
Si	86% (79-93)		93% (88-99)	
No	72% (59-85)		82% (69-95)	
<b>Tinción COX2 en CRS</b>		0.017		<b>0.004</b>
Positiva	72% (58-86)		82% (71-83)	
Negativa	86% (79-83)		94% (88-99)	
Análisis Multivariante				
Factor	SLP HR (95% CI)	p	SG HR (95% CI)	P
<b>Tinción COX2+ en CRS</b>	2.76 (1.29-5.90)	0.009	4.81 (1.60-14.44)	<b>0.005</b>
<b>Síntomas B</b>	2.34 (1.11-4.94)	0.026	---	---
<b>Radioterapia</b>	0.32 (0.14-0.69)	0.004	---	---
<b>ECOG PS &gt; 1</b>	---	---	<b>9.00 (2.37-34.22)</b>	<b>0.001</b>

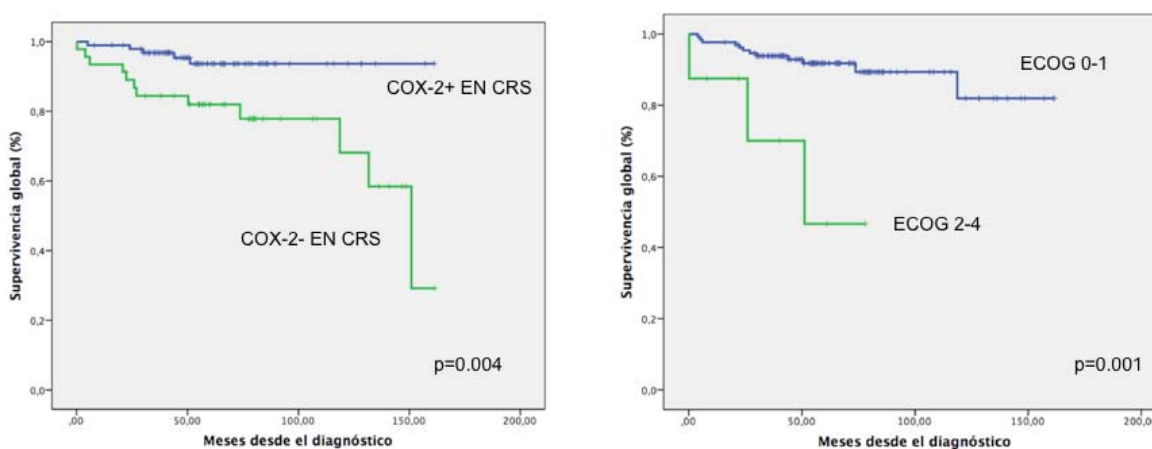
Tabla 12. Análisis de SLP y SG en pacientes con LH en estadios avanzados.

Análisis Univariante				
Factor	5-años SLP (95% CI)	p	5-años SG (95% CI)	P
<b>Edad</b>		<b>0.018</b>		<b>&lt;0.001</b>
0-60	64% (52-76)		83% (67-98)	
> 60	35% (11-58)		48% (26-71)	
<b>Edad</b>		<b>0.037</b>		<b>0.002</b>
0-44	65% (52-78)		84% (73-94)	
≥ 45	42% (22-62)		58% (40-76)	
<b>Sexo</b>		<b>0.83</b>		<b>0.99</b>
Masculino	57% (43-71)		74% (60-87)	
Femenino	58% (41-75)		77% (64-89)	
<b>Masa Bulky</b>		<b>0.91</b>		<b>0.53</b>
Si	45% (13-76)		82% (66-99)	
No	59% (47-71)		73% (62-84)	
<b>Síntomas B</b>		<b>0.071</b>		<b>0.15</b>
No	72% (59-86)		81% (69-93)	
Si	43% (27-60)		69% (55-84)	
<b>ECOG PS</b>		<b>0.14</b>		<b>0.039</b>
0-1	50% (48-72)		81% (72-90)	
2-4	43% (15-71)		41% (5-78)	
<b>IPS</b>		<b>0.001</b>		<b>0.007</b>
0-2	71% (58-85)		84% (73-95)	
3-7	40% (23-56)		66% (52-80)	
<b>Tipo de tratamiento:</b>		<b>0.75</b>		<b>0.86</b>
2-4 ciclos	67 (40-93)		75 (50-99)	
6-8 ciclos	56 (44-68)		75 (65-85)	
<b>Radioterapia</b>		<b>0.38</b>		<b>0.21</b>
Si	58% (46-70)		86% (73-99)	
No	57% (34-80)		71% (59-83)	
<b>Tinción COX2 en CRS</b>		<b>0.13</b>		<b>0.06</b>
Positiva	45% (28-63)		63% (46-79)	
Negativa	67% (54-80)		86% (76-95)	
Análisis Multivariante				
Factor	SLP HR (95% CI)	p	SG HR (95% CI)	P
Edad > 60 años	---	---	5.07 (2.20-11.65)	<0.001
IPS 3-7	2.88 (1.46-5.68)	0.002	---	---
ECOG PS > 1	---	---	<b>3.38 (1.36-8.45)</b>	<b>0.009</b>

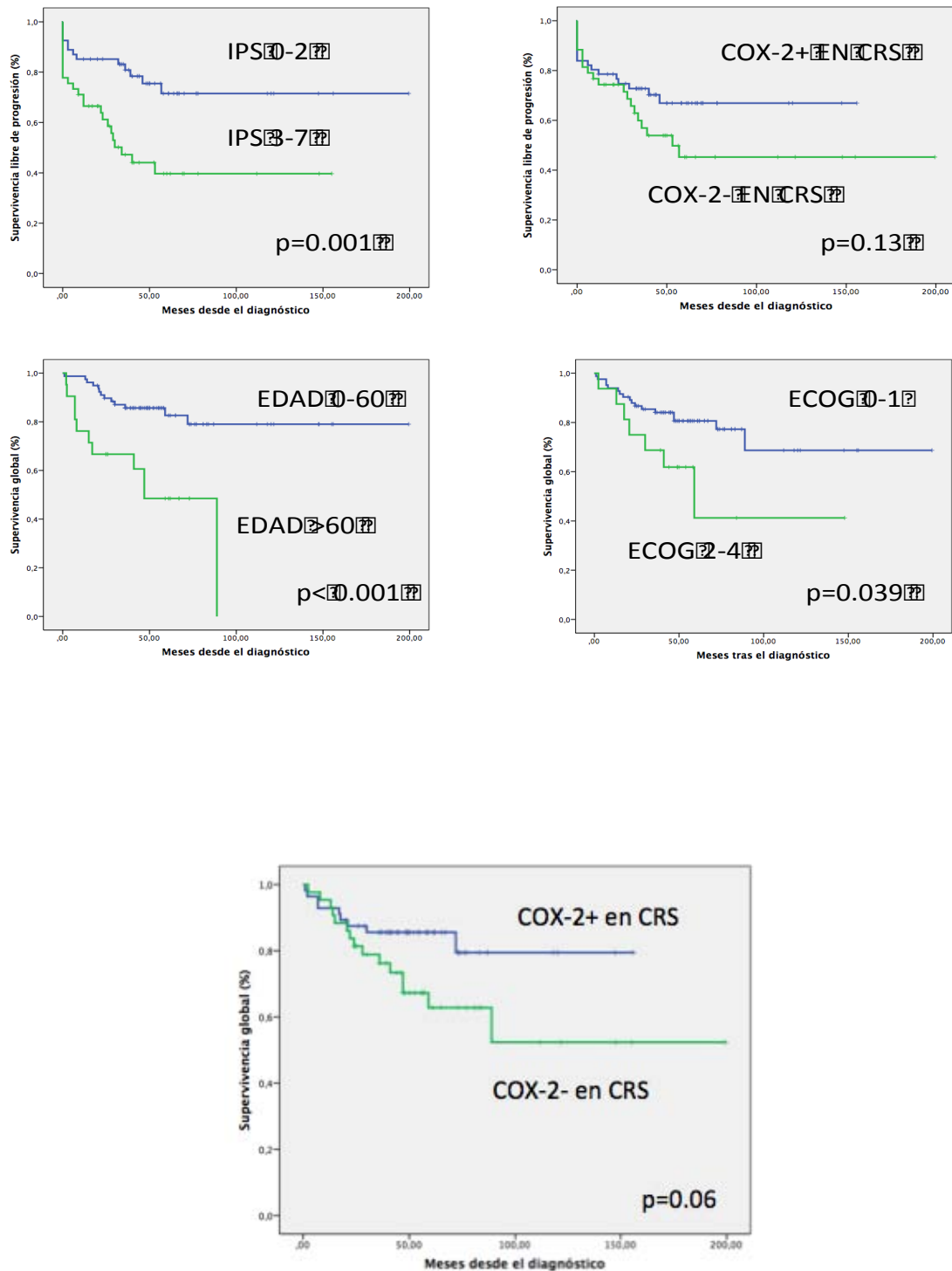
**Figura 4. Factores pronósticos asociados de forma independiente con la evolución de los pacientes con LH en estadio temprano. Factores pronósticos asociados con SLP.**



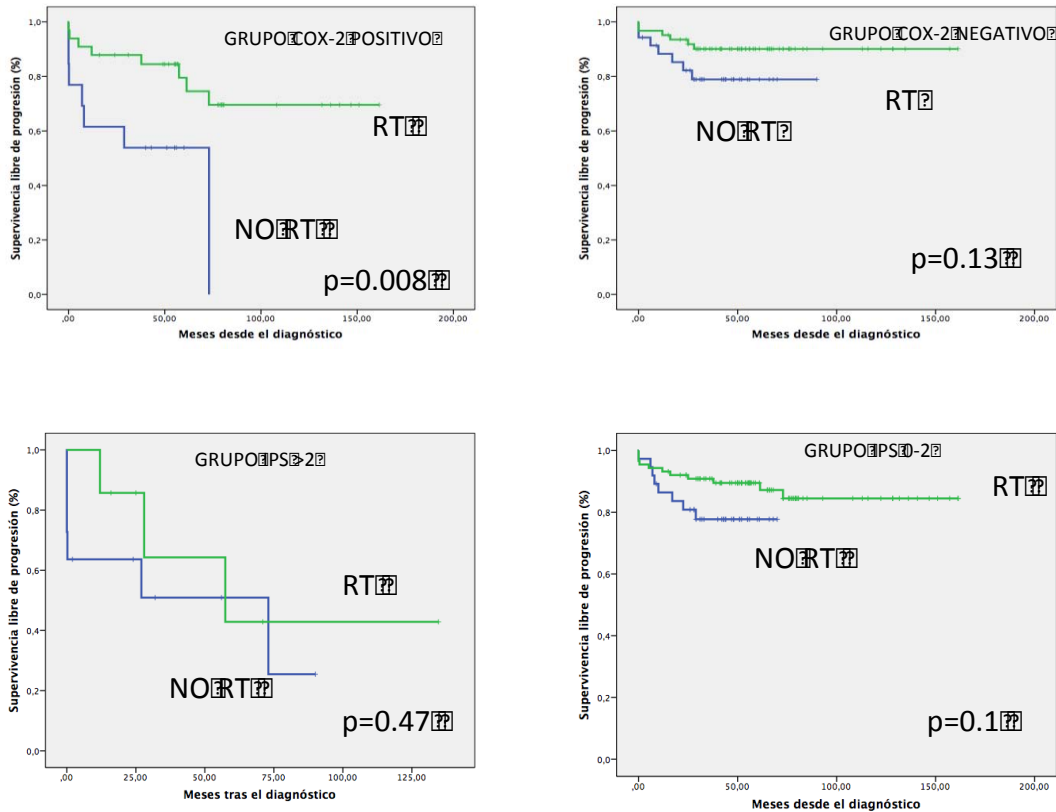
**Figura 5. Factores pronósticos asociados de forma independiente con la evolución de los pacientes con LH en estadio temprano. Factores pronósticos asociados con SG.**



**Figura 6. Factores pronósticos asociados de forma independiente con la evolución de los pacientes con LH en estadios avanzados. Factores pronósticos asociados con SLP y SG.**



**Figura 7. Factores pronósticos asociados de forma independiente con la evolución de los pacientes con LH en estadios iniciales.** Papel de la expresión de COX-2 en la CRS en estadios avanzados.



## Discusión

El LH es una neoplasia relativamente poco común que afecta a los ganglios y al sistema linfático. La mayoría de los pacientes se diagnostican entre los 15 y 30 años de edad, viéndose un segundo pico de incidencia en adultos de 55 años o más. La clasificación de la OMS divide el LH en 2 tipos principales: el LH clásico (LHC) y el LH de predominio linfocítico nodular (LHPLN). En los países occidentales, el LHC representa el 95% del total de LH, mientras que el LHPLN representa el 5% del total.

Durante el siglo pasado, el LH ha pasado de ser una enfermedad casi siempre mortal a una que es curable en aproximadamente el 75 por ciento de los pacientes

en todo el mundo. Mientras que la mayoría de los pacientes hoy en día se curaran de su linfoma, las toxicidades relacionadas con el tratamiento se han convertido en una causa importante de mortalidad a largo plazo. Por ello, la selección del tratamiento debe equilibrar el deseo de mantener un alto índice de curación con la necesidad de minimizar las complicaciones a largo plazo. El tratamiento ha evolucionado de tal manera que los pacientes con enfermedad en estadio temprano pueden lograr la remisión completa de la enfermedad a largo plazo siguiendo un tratamiento menos intensivo, mientras que los tratamientos más agresivos se reservarán para pacientes con enfermedad en estadios avanzados. A pesar del acuerdo general de que la terapia debe adaptarse al estadiaje de la enfermedad, hay un cierto desacuerdo con respecto a lo que debería constituir la terapia intensiva y con menor grado de intensidad.

En un intento de minimizar las complicaciones tardías, ha habido un cambio gradual en los regímenes de tratamiento, incluyendo una disminución considerable de la dosis de radiación y volúmenes; el uso de poliquimioterapia en combinación con radioterapia (que permite la administración de un menor número de ciclos de fármacos menos tóxicos); y el uso de poliquimioterapia de forma exclusiva, sobre todo en aquellos pacientes que tienen un alto riesgo de los efectos secundarios tardíos tras la exposición a la radiación (como es el caso de las mujeres jóvenes y el aumento de riesgo de cáncer de mama en caso de irradiación a nivel torácico).

La selección del tratamiento inicial para el LH generalmente se basa en el estadio de la enfermedad al diagnóstico y en los factores pronósticos asociados.

Los pacientes con enfermedad temprana, se clasifican a su vez en pronóstico favorable y desfavorable en base a la presencia o ausencia de ciertas características clínicas, tales como la edad, síntomas B, el número de sitios involucrados, y la presencia de una masa mediastínica voluminosa (“bulky”). Los grandes grupos cooperativos de investigación (EORTC, GHSG y NCCN) han utilizado diferentes definiciones de la enfermedad en estadio temprano de pronóstico favorable y desfavorable<sup>(85,93)</sup>.

Los pacientes que no caen dentro de las categorías de buen pronóstico se considera que tienen pronóstico desfavorable. Los pacientes con enfermedad



temprana de pronóstico favorable obtendrán buenos resultados tras seguir un tratamiento oncológico menos intensivo que el requerido para las personas que se presentan con un estadio temprano pero con factores que les confieren un pronóstico desfavorable o bien que debutan con la enfermedad en estadio avanzado.

En lo referente a los factores pronósticos de los pacientes en situación de enfermedad avanzada, tenemos fundamentalmente el IPS. Existen varios ensayos que han estudiado el uso de ABVD solo versus ABVD y radioterapia en pacientes que son PET negativo después de dos o tres ciclos de quimioterapia. Los principales son el RAPID TRIAL y el EORTC H10. En el RAPID TRIAL <sup>(148)</sup> 602 pacientes con LH en estadio IA o IIA recibieron tres ciclos de ABVD y luego se les realizó un PET. Los pacientes con PET negativo fueron asignados al azar a recibir radioterapia de campo afecto o ningún tratamiento adicional; pacientes con PET positivo recibieron un cuarto ciclo de ABVD y radioterapia. Los hallazgos del PET fueron negativos en 426 de estos pacientes (74,6%), de los cuales 420 fueron asignados al azar a un grupo de estudio (209 en el grupo de radioterapia y 211 con ningún tratamiento adicional). Con una mediana de seguimiento de 60 meses, se dieron 8 casos de progresión de la enfermedad en el grupo de radioterapia y 8 pacientes habían muerto (3 con progresión de la enfermedad, de los cuales 1 murió de LH); en el grupo sin tratamiento adicional se dieron 20 casos de progresión de la enfermedad y 4 pacientes habían muerto (2 con progresión de la enfermedad y ninguno de LH). En el grupo de radioterapia, 5 de las muertes ocurrieron en pacientes que no recibieron radioterapia. La SLP a 3 años fue del 94,6% en el grupo de radioterapia y del 90,8% en el grupo que no recibió tratamiento adicional. Los resultados de este estudio no muestran la no inferioridad de la estrategia de ningún tratamiento adicional después de la quimioterapia con respecto a la supervivencia libre de progresión. Sin embargo, los pacientes en este estudio tuvieron un muy buen pronóstico, ya fuera con o sin radioterapia de consolidación.

En el ensayo EORTC H10<sup>(149)</sup> se evaluaba si la radioterapia en campo afecto podría omitirse en pacientes con enfermedad temprana tras recibir 2 ciclos de ABVD con PET negativo tras su finalización, sin comprometer la SLP en

comparación con los pacientes tratados mediante terapia combinada. El análisis incluyó a 1.137 pacientes. En el subgrupo favorable, el 85,8% tenían una exploración PET negativa. En el subgrupo desfavorable, 74.8% tenían un estudio PET temprano negativo. El comité de seguimiento de datos independiente concluyó que era poco probable que los resultados demostraran una no inferioridad en los resultados finales para el grupo experimental y aconsejó suspender la asignación aleatoria de los pacientes PET-negativos.

Sobre la base de este análisis, la conclusión del grupo cooperativo fue que el tratamiento de modalidad combinada presentaba un menor número de progresiones tempranas (en estadio clínico I / II ), aunque el resultado fue excelente en ambos brazos. El análisis final revelará si este hallazgo se mantiene en el tiempo. El impacto sobre la toxicidad tardía y la supervivencia no se conoce todavía. Ambos ensayos necesitan mucho más tiempo de seguimiento antes de hacer recomendaciones firmes con respecto al papel de la PET en la toma de decisiones sobre el tratamiento inicial.

En lo que respecta al manejo de los pacientes en estadio temprano con factores desfavorables, el tratamiento combinado (QT + RT) ha demostrado tasas de SG superiores frente a esquemas de RT exclusiva. Dos estudios ( la Maignan y cols., Pavone V y cols.)<sup>(150,151)</sup> han demostrado mejores resultados en términos de SG y SLE de ABVD + RT frente a otros esquemas de QT (epirrubicina, vinblastina y etopósido o epirrubicina, bleomicina, vinblastina, y metotrexate) más RT.

Los resultados del estudio H8U de EORTC/GELA, en el que 996 pacientes fueron asignados a tres grupos de tratamiento (6 vs. 4 ciclos de MOPP/ABV + IF-RT vs. RT nodal subtotal) permitieron establecer el número de ciclos de QT en 4 como el estándar<sup>(120)</sup>. Por otro lado, el uso de regímenes más intensivos no parece mejorar los resultados. Así, el estudio HD11 del GHSG no mostró diferencias en eficacia entre 4 ciclos de ABVD + 30 Gy de RT frente a 4 ciclos de BEACOPP a dosis estándar + RT, pero sí mayor toxicidad con BEACOPP<sup>(124)</sup>.

Un metanálisis publicado en Cochrane ha analizado los datos de 2.868 pacientes procedentes de los estudios HD9 y HD14 del GHSG y HD2000 y GSM-HD del

grupo italiano, donde se ha comparado ABVD versus BEACOPP en pacientes con LH en estadios tempranos de pronóstico desfavorable y estadios avanzados <sup>(152)</sup>. En este análisis, no hubo diferencias significativas en términos de SG entre ambos esquemas, HR = 0.80 (95% CI 0.59 a 1.09), aunque sí existe un beneficio en SLP, HR= 0.53 (95% CI 0.44 a 0.64) con el esquema BEACOPP. Desafortunadamente, la toxicidad hematológica fue significativamente mayor con este esquema, así como la frecuencia de SMD y LMA. No hubo diferencias en segundas neoplasias, mortalidad relacionada con el tratamiento o en infertilidad entre los dos grupos.

Con la intención de tratar de mejorar los resultados de ABVD, el GHSG llevó a cabo un estudio aleatorizado que comparaba 4 ciclos de ABVD con 2 ciclos de ABVD seguidos de 2 ciclos de BEACOPP escalado. Ambas ramas recibían también RT complementaria. Los resultados de este estudio con 1.528 pacientes muestran que ABVD-BEACOPP se asocia a una mejor SLFT y SLP con una ventaja del 7% y 6% a los 5 años respecto al estándar ABVD, respectivamente<sup>(130)</sup>. Así, para este subgrupo de pacientes, la opción de tratamiento preferida es la combinación de 4 ciclos de quimioterapia esquema ABVD seguido de radioterapia sobre campo afecto (30 Gy).

A lo largo de las últimas décadas se han publicado numerosos estudios que han ido perfilando la estrategia terapéutica para los estadios avanzados de LH. Inicialmente, los esquemas de quimioterapia MOPP, ABVD, MOPP/ABVD y MOPP/ABV, entre otros, fueron estudiados en ensayos clínicos aleatorizados, con seguimientos superiores a los diez años y quedó establecido el esquema ABVD como el que presentó un mejor perfil de toxicidad con una tasa de RC y una SLP semejante al resto de esquemas<sup>(110,112,132,133,136)</sup>. Por todo ello, ABVD es considerado en la actualidad el tratamiento estándar del LH en estadios avanzados en Norteamérica y en muchos países europeos con una SLP de alrededor del 70% y de SG del 82-90%.

Con la finalidad de aumentar la tasa de curación del LH en estadios avanzados, el GHSG desarrolló la combinación BEACOPP (bleomicina, etopósido, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbina y prednisona). En el estudio GHSG HD9 1.195 pacientes fueron aleatoriamente asignados a tratamiento con 8 ciclos de

COPP y ABVD alternos, 8 ciclos de BEACOPP estándar u 8 ciclos de BEACOPP escalado más RT sobre áreas voluminosas y masas residuales<sup>(136,137)</sup>. La SLFT a los 10 años fue del 82% en el grupo de BEACOPP escalado significativamente superior al resto de grupos. En el estudio de largo seguimiento el beneficio sobre la SG de BEACOPP escalado fue estadísticamente significativo sólo en el grupo con IPS intermedio (2-3), mientras que no hubo diferencias en aquellos de bajo riesgo (0-1) o alto riesgo (> 4). Tampoco hubo diferencias en SLFT ni en SG en los pacientes mayores de 60 años. BEACOPP escalado se asoció a mayor toxicidad hematológica, más infecciones, neoplasias secundarias e infertilidad<sup>(153,154)</sup>.

El mismo grupo ha publicado recientemente la comparación de 8 vs. 6 ciclos de BEACOPP escalado vs. 8 ciclos de BEACOPP. Los pacientes con masa residual > 2,5 cm PET positiva recibían 30 Gy de RT. En este estudio, HD15, el tratamiento con 6 ciclos de BEACOPP escalado seguido de RT guiada por PET fue el esquema más eficaz en términos de SLFT y menos tóxico, por lo que los autores lo consideran el estándar de tratamiento en este grupo de pacientes<sup>(115)</sup>.

En el estudio aleatorizado HD2000 se compararon los esquemas ABVD, BEACOPP (4 ciclos de BEACOPP escalado y 2 ciclos de BEACOPP estándar) y COPPEBVCAD. No se observaron diferencias significativas entre los tres brazos en términos de SG, quizás por el hecho de que el tamaño muestral era insuficiente en un estudio con tres ramas de tratamiento, pero la SLP fue superior en el brazo de BEACOPP, especialmente en aquellos pacientes de mal pronóstico (IPS >2). BEACOPP también se asoció a una mayor toxicidad hematológica e infecciosa grado 3-4<sup>(112)</sup>.

Como hemos comentado en la parte de tratamiento de pacientes con enfermedad inicial desfavorable, Cochrane evaluó datos procedentes de los estudios HD9 y HD14 del GHSG y HD2000 y GSM-HD del grupo italiano, donde se ha comparado ABVD versus BEACOPP en pacientes con LH en estadios iniciales de pronóstico desfavorable y estadios avanzados<sup>(152)</sup>. Posteriormente al mencionado metanálisis se ha publicado un estudio en el que se incluyeron 331 pacientes que se aleatorizaron a recibir ABVD vs. BEACOPP escalado incluyendo en el análisis el

TAPH siguiendo los estándares actuales<sup>(155)</sup>. La tasa libre de primera progresión a los 7 años fue del 85% para los tratados con BEACOPP escalado frente al 73% en aquellos que recibieron ABVD ( $p=0,004$ ). Sin embargo, tras completar todo el tratamiento, incluyendo el de rescate, la tasa libre de segunda progresión y la SG fueron similares entre ambos grupos (88% y 89% vs. 82% y 84%, respectivamente,  $p>0.1$ ).

De todos estos estudios podemos concluir que BEACOPP es un régimen con mayor capacidad de control de la enfermedad pero también con mayor toxicidad sin que parezca existir un beneficio neto en cuanto a la SG de los pacientes. Por otro lado hay que aclarar que estos resultados hacen referencia únicamente a población adulta de 16 a 60 años. Los pacientes mayores de 60 años, presentan más efectos secundarios tóxicos y mayor mortalidad en comparación con la población joven y en general, no se consideran candidatos a tratamiento con BEACOPP. Así pues, el tratamiento más extendido para este grupo de pacientes consiste en la administración de 6-8 ciclos de ABVD.

Respecto al beneficio adicional de la RT en este subgrupo de pacientes con enfermedad avanzada sobre los esquemas actuales de quimioterapia (capaces de curar a un elevado número de pacientes), es motivo de debate. De hecho, la mayoría de los datos disponibles de largo seguimiento sugieren que la RT ayuda a mejorar las tasas de control del linfoma pero sin mejorar la SG tras los 10 años debido a un exceso de mortalidad atribuible a las complicaciones tóxicas, fundamentalmente cardíacas y segundas neoplasias. Por otro lado, es importante tener en cuenta que en estos estudios se usaron esquemas de QT antiguos tales como MOPP y dosis y campos de RT muy extensos que no se aplican en la actualidad.

En los aspectos referentes a la radioterapia de consolidación, el ensayo aleatorizado EORTC 20884 mostró que la RT de consolidación no mejoraba los resultados en pacientes en RC tras 6-8 ciclos de MOPP-ABV<sup>(143)</sup>. En el estudio del grupo GELA, la RT no fue superior a 2 ciclos adicionales de QT<sup>(156)</sup>. En el estudio británico publicado por Johnson y cols. los pacientes con LH avanzado fueron tratados con ABVD vs. otros dos esquemas de QT más RT complementaria en

aquellos con masa voluminosa o sin RC tras la QT<sup>(135)</sup>. Los pacientes que recibieron RT tuvieron una SLP y SG a los 5 años superiores a aquellos pacientes no irradiados. Por lo tanto, estos estudios nos permiten afirmar que la RT complementaria no parece ser necesaria en aquellos pacientes que alcanzan RC tras ABVD o esquemas equivalentes. Por otro lado, el uso cada vez más extendido de la PET en la evaluación de la respuesta a la QT y en la propia definición de la RC cambiará muy probablemente la indicación de la RT en estos pacientes. En este sentido, los resultados del estudio HD15 del GHSG muestran que la RT se puede omitir en los pacientes con masa residual PET-negativa tras BEACOPP escalado con un 96% de pacientes libres de enfermedad tras una mediana de seguimiento de 18 meses<sup>(115)</sup>. Los pacientes con masa residual PET-positiva recibieron 30 Gy, con una SLP a los 3 años del 86%, inferior a la de aquellos que alcanzaron RC, pero mejor que la observada en otras series en las que las decisiones terapéuticas no están basadas en la PET. Sin embargo, algunos estudios sugieren que la RT es beneficiosa en aquellos pacientes con masa voluminosa inicial o con masa residual PET negativa y que han sido tratados con esquemas menos agresivos que BEACOPP<sup>(157,158)</sup>. En este sentido, en un análisis retrospectivo de la British Columbia Cancer Agency se mostraron los resultados en un grupo de 163 pacientes que presentaban masa residual > 2 cm. tras ABVD<sup>(159)</sup>. Sólo aquellos con PET positiva recibieron RT complementaria. Los pacientes con PET negativa tuvieron una SLP a los 3 años del 89%, mientras que fue del 55% para aquellos con PET positiva a pesar de la RT. Estos resultados apoyan la omisión de la RT en los pacientes con PET negativa tras 6 ciclos de ABVD.

Visto todo lo anterior, los pacientes con LH en estadio avanzado sin masa voluminosa al diagnóstico que alcanzan RC con PET negativa tras ABVD o BEACOPP no precisarían de tratamiento con RT complementaria. En los casos de masa voluminosa al diagnóstico o de enfermedad residual > 1.5 cm PET positiva, la RT puede considerarse como una opción terapéutica adicional.

La eficacia del TAPH ha sido evaluada en dos estudios aleatorizados en pacientes con LH en estadios avanzados. En primer lugar, en el ensayo HD3 se incluyeron 126 pacientes distribuidos aleatoriamente en dos ramas de tratamiento que comparaban 3 ciclos de un esquema híbrido de QT seguido de TAPH frente a 5

ciclos de QT híbrida. Ambos grupos tuvieron una tasa de fallo terapéutico similar y no hubo diferencias significativas en SG<sup>(145)</sup>. En el segundo estudio, 163 pacientes en RC o RP recibieron intensificación precoz con TAPH vs. 4 ciclos adicionales de QT convencional. Tras una mediana de seguimiento de 11 años, no hubo diferencias entre grupos en SG, SLFT y SLP<sup>(144,160)</sup>. El estudio H97-HR del GOELAMS, aunque no analizaba explícitamente la eficacia del trasplante en los 158 pacientes de alto riesgo incluidos, obtuvo resultados similares cuando comparó 3 ciclos de un esquema de tratamiento intensivo no mieloablativo precoz con dosis bajas de RT frente a 4 ciclos ABVD seguidos de TAPH<sup>(161)</sup>.

Con todo ello cabe concluir que los pacientes con LH en estadios avanzados que alcanzan RC tras el tratamiento de primera línea no se benefician de una intensificación con altas dosis de QT y TAPH. Entre un 20-40% de los pacientes con LH no responderán al tratamiento inicial (refractoriedad o resistencia) o bien recaerán tras el mismo (progresión o recaída). La resistencia al tratamiento en el LH es poco frecuente en estadios localizados de la enfermedad, mientras que en los estadios avanzados las tasas de resistencia primaria a la QT de primera línea varían entre el 20-25% en los pacientes tratados con ABVD, frente al 10% cuando se utilizan esquemas más intensivos como BEACOPP escalado<sup>(125,132,136)</sup>.

El pronóstico de estos enfermos es malo y las posibilidades de curación con QT de rescate convencional están en torno al 20%. La introducción de esquemas de QT más intensivos y el uso del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH) en el tratamiento de rescate, ha mejorado notablemente la supervivencia de estos pacientes<sup>(162,163)</sup>. Varios estudios coinciden en que la recaída del LH durante el primer año tras finalizar la QT de primera línea es el principal factor adverso en estos pacientes<sup>(164-167)</sup>. Otros factores pronósticos predictivos de la SLE son la presencia de enfermedad extraganglionar, el estadio avanzado en la recaída, la anemia, la presencia de síntomas B y la RT durante el tratamiento de primera línea.

Recientemente, varias series retrospectivas han identificado el posible valor pronóstico de las técnicas funcionales de imagen mediante PET. En un estudio retrospectivo de 211 pacientes con LH en recaída, los pacientes con PET negativa pre-trasplante mostraron una SLP y una SG a tres años de 69% y 87%

respectivamente, superiores significativamente al 23% y 58% alcanzado por los pacientes con PET positiva<sup>(168)</sup>. En otro análisis retrospectivo de 135 pacientes con LH refractario o en recaída quimiosensible, los pacientes con PET positivos pre-TAPH mostraron una SLE a 5 años del 31% frente al 75% de los pacientes PET negativos. El resultado de la PET antes del TAPH fue el único factor con impacto significativo sobre la SG y la SLE en el análisis multivariante<sup>(169)</sup>.

En los casos de LH refractario a tratamiento de primera línea o en recaída tras la RC se recomienda la revisión de la biopsia inicial o mejor aún, la toma de una nueva biopsia, ya que hasta el 9% de ellos son reclasificados en otro tipo de linfoma. En un análisis retrospectivo sobre 513 pacientes del GHSG ningún paciente con enfermedad resistente primaria sobrevivió más de 8 años tras ser tratado con QT convencional. La supervivencia proyectada a 20 años fue del 11% para los pacientes que recayeron antes del primer año tras la QT de primera línea y 22% para los pacientes con recaída tardía. Estos datos indican que la QT convencional tiene un escaso papel curativo en los resistentes primarios o con recaída precoz<sup>(165,170)</sup>. Por otro lado, dos estudios prospectivos aleatorizados demostraron un incremento significativo en la SLE y la SLP, en pacientes tratados con TAPH, con respecto a los tratados solo con QT convencional <sup>(171,172)</sup>.

Respecto al esquema de QT de rescate, el ideal sería aquél que proporcionase una máxima reducción tumoral, con escasa toxicidad y elevada capacidad de movilización. La eficacia y toxicidad de los esquemas de QT de rescate pre-TAPH han sido analizados en series retrospectivas o estudios fase II, pero no existen ensayos aleatorizados que demuestren claramente la superioridad de un esquema en particular<sup>(162,173)</sup>.

Se han estudiado combinaciones de fármacos sin resistencia cruzada, como el platino y la citarabina, en esquemas como DHAP, ASHAP, o ESHAP, o los basados en ifosfamida, como el ICE o el MINE, demostrando que son eficaces (tasas de respuestas hasta del 88%) y buenos movilizadores<sup>(166,174-177)</sup>. Más recientemente, la gemcitabina, bien como agente único o en combinación con ifosfamida, vinorelbina o platino ha demostrado una alta tasa de respuestas completas y un perfil favorable de toxicidad en diferentes estudios. Entre los



estudios que evalúan la administración de gemcitabina con oxaliplatino (esquema GemOx) destaca el de Gutiérrez et al.<sup>(178)</sup>, que incluyeron a 24 pacientes diagnosticados de LH en recaída o refractarios recibiendo tratamiento combinado con gemcitabina y oxaliplatino. Con una mediana de seguimiento de 37 meses, el 71% respondió al esquema anterior (38% de los pacientes logrando respuesta completa). Los factores asociados con mejor SLP fueron: síntomas B; respuesta a GemOx; y consolidación con trasplante de células madre. La SLP fue mejor en pacientes con-solidados con trasplante de células madre. La recolección de células madre de sangre periférica después de GemOx tuvo éxito en todos los pacientes. Su eficacia y perfil de toxicidad favorable posibilita múltiples administraciones. El esquema IGEV utilizado en una serie de 91 pacientes con LH resistentes y en recaída resultó en 81% de respuestas de las que un 54% fueron completas con un excelente rendimiento de movilización y poca toxicidad<sup>(179)</sup>.

Las combinaciones de QT convencional intensiva, como el dexaBEAM, y el miniBEAM también proporcionan un índice de respuestas del 80% pero con alta toxicidad y una pobre capacidad de movilización al contener fármacos que dañan la célula stem como el melfalán y la carmustina, por lo que han caído en desuso <sup>(172,180)</sup>.

En lo que se refiere al TAPH, en un estudio aleatorizado por el British National Lymphoma Investigation (BNLI), los pacientes en recaída o refractarios que fueron tratados con TAPH presentaron una SLE a los 3 años significativamente superior a los pacientes que recibieron solo QT con el régimen mini-BEAM (53% frente a 10%, respectivamente)<sup>(171)</sup>.

En el estudio aleatorizado por el European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) en el que se incluyeron 144 pacientes en recaída quimiosensible, la SLP de los pacientes que recaían tras la QT de primera línea y recibían QT de rescate con dexa-miniBEAM seguido de TAPH con acondicionamiento BEAM, fue significativamente superior a la SLP de los pacientes únicamente tratados con QT (55% vs 34%)<sup>(172)</sup>.

Por otro lado, los avances realizados en la terapia de soporte en TAPH han sido determinantes en el descenso de la tasa de mortalidad relacionada con el procedimiento, actualmente situada en torno al 4%, o incluso menos.

Todo ello ha contribuido a que el TAPH sea recomendado en todas las guías internacionales como la terapia de rescate de elección en los pacientes con LH que fracasan al tratamiento de primera línea<sup>(85,93,181)</sup>.

Los datos de grandes series de pacientes con enfermedad primariamente resistente sometidos a TAPH con largo seguimiento indican que estos pacientes tienen una SLP entre el 25-40% y una SG entre el 30-40%, significativamente peores que los que recaen tras haber alcanzado la RC con tratamiento de primera línea<sup>(182-186)</sup>. No obstante, los pacientes que no alcanzan la RC tras la primera línea de tratamiento pueden ser rescatados con una QT de segunda línea seguido de TAPH. Un estudio de casos y controles comparó altas dosis de QT seguido de TAPH frente a QT convencional y demostró que el TAPH es la opción más beneficiosa para los pacientes primariamente resistentes que no tienen enfermedad voluminosa residual y no progresan antes del TAPH, con una toxicidad aceptable<sup>(182)</sup>.

No existen estudios prospectivos aleatorizados que comparen los diferentes esquemas de altas dosis de QT o acondicionamiento previo al TAPH. La irradiación corporal total se desaconseja por su mayor toxicidad e incidencia de neoplasias secundarias<sup>(184)</sup>. El esquema de acondicionamiento BEAM es el más utilizado<sup>(187,188)</sup>. Alternativas a BEAM son CBV<sup>(189)</sup> o los esquemas basados en busulfán, ciclofosfamida y etopósido<sup>(190)</sup>, todos ellos con SLP en torno al 50%.

La adición de QT secuencial intensiva antes del acondicionamiento no tiene un beneficio claro. En un estudio multicéntrico realizado en 284 pacientes con LH en primera recaída quimiosensible, los pacientes se aleatorizaron a recibir acondicionamiento con BEAM y TAPH o dosis altas secuenciales de ciclofosfamida, metotrexate y etopósido antes del BEAM y TAPH. La SLP a tres años fue similar en los dos grupos, pero los pacientes tratados con el esquema intensificado presentaron más toxicidad y violaciones del protocolo<sup>(191)</sup>.

El trasplante autólogo doble o en tándem se ha sugerido como una alternativa eficaz para los pacientes con LH de muy alto riesgo: refractarios primarios, en recaída precoz o con estadio avanzado. Varios estudios han demostrado que este procedimiento es factible y que mejora la SG<sup>(192–194)</sup>. En un estudio prospectivo del GELA con un diseño de tratamiento adaptado al riesgo, se compararon los resultados de 150 pacientes en primera recaída de alto riesgo que recibieron un doble trasplante frente a 95 pacientes de riesgo intermedio que recibieron un solo TAPH. Las tasas de supervivencia libre de fallo y la SG a los 5 años fueron de 46% y 57% respectivamente en los pacientes de alto riesgo con doble trasplante, frente al 73% y 85% de los pacientes de riesgo intermedio con un solo trasplante. El doble trasplante, aunque con una toxicidad no desdeñable, proporcionó una SG del 46% a 5 años en los pacientes quimioresistentes, superior al 30% reportado previamente en este subgrupo de tan alto riesgo<sup>(195)</sup>.

La RT puede tener algún papel en pacientes muy seleccionados con recaída localizada que presenten comorbilidades que contraindiquen la QT de rescate y el TAPH. En un análisis retrospectivo del GHSG de 100 pacientes con LH en recaída localizada sin factores pronósticos adversos tratados sólo con RT, un 77% alcanzaron una RC, con una SLP y SG a los 5 años del 28% y del 51% respectivamente<sup>(196)</sup>.

Los pacientes que progresan tras un TAPH tienen muy mal pronóstico con una mediana de supervivencia inferior a los dos años<sup>(197)</sup>. El interés del trasplante alogénico (aloTPH) en el LH deriva no únicamente de la cito-reducción causada por la QT, sino también del potencial beneficio del efecto injerto anti-linfoma mediado por el sistema inmune del donante. Sin embargo, los resultados iniciales del aloTPH con acondicionamiento mieloablativo en pacientes con LH refractarios o en recaída fueron desalentadores, debido a unas tasas de mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) superiores al 50%<sup>(198,199)</sup>.

La introducción de los acondicionamientos de intensidad reducida (AIR), y la infusión de linfocitos del donante, ha permitido disminuir significativamente las tasas de MRT manteniendo el efecto injerto contra linfoma, y haciendo accesible el

aloTPH a pacientes con comorbilidad o con edad avanzada<sup>(200–203)</sup>. En el estudio publicado por Robinson et al con 285 receptores de aloTPH AIR del registro EBMT la mortalidad relacionada con el trasplante, la SG y SLP fueron del 21%, 43% y 25%, respectivamente. Los pacientes con LH quimiorrefractario en el momento del trasplante presentaron peor SG, SLP y mayor mortalidad. La edad > 45 años y el mal estado general fueron también factores pronósticos adversos. El desarrollo de enfermedad del injerto contra huésped crónica se asoció a una menor recaída<sup>(204)</sup>.

El grupo italiano de trasplante realizó un estudio retrospectivo en 185 pacientes que progresaron tras un TAPH, a los que se realizó un estudio HLA con intención de realizar un trasplante alogénico de intensidad reducida (aloTIR). Se compararon los resultados de los pacientes con donante con los pacientes sin donante disponible. La SLP y la SG a los 2 años fueron significativamente mejores en el grupo con donante (39% vs. 14% y 66% vs 42% respectivamente. En el análisis multivariante, tener un donante se identificó como un factor pronóstico favorable para la SG<sup>(200)</sup>. En una serie de 76 pacientes con LH en recaída de muy alto riesgo la estrategia consistió en realizar un aloTIR incluyendo alemtuzumab para depleción in vivo de linfocitos T, e infusión de linfocitos del donante en caso de quimera mixta o recaída. La SG y la SLP a 4 años fue del 64% y del 59% respectivamente<sup>(205)</sup>.

Finalmente, los resultados del mayor estudio prospectivo fase II publicado hasta la fecha que incluye 78 pacientes con una mediana de seguimiento de 4 años muestra una mortalidad del 15% al año. La recaída fue la principal causa de fracaso del tratamiento. La SLP fue del 48% a un año y 24% a los 4 años. De nuevo, el desarrollo de EICH crónica se asoció con menor tasa de recaídas y mejor SLP. Los pacientes trasplantados en RC tuvieron mejor pronóstico. En este estudio, la SG fue del 43% a los 4 años<sup>(206)</sup>.

Una vez establecida la importancia de los diferentes factores pronósticos conocidos en pacientes con LH así como las implicaciones en cuanto a la elección del tratamiento (el más eficaz y el menos tóxico), numerosos estudios han tratado de identificar nuevos factores pronósticos que nos ayuden a mejorar la selección de

los pacientes y los resultados de los tratamientos utilizados. COX-2 es un factor molecular bien conocido relacionado con la quimioterapia y radiorresistencia en tumores sólidos (cabeza y cuello, ovario, mama, pulmón, etc). Esta relación entre la expresión COX-2 y el mal pronóstico se ha asociado con diferentes fenómenos biológicos, tales como la inducción de la angiogénesis, la quimiorresistencia a través de la inducción de mecanismos antiapoptóticos tales como la regulación positiva de bcl-2 o resistencia a Fas, promoción de la invasión a través de la inducción de algunas metaloproteinasas o debido a su fuerte correlación con la expresión del gen MDR. De hecho, en varios ensayos clínicos sobre tumores sólidos se ha explorado la inhibición de la COX-2 como una forma de reducir la quimio o la radiorresistencia<sup>(207-209)</sup>.

Como hemos descrito en la introducción, el LH, por tratarse de una neoplasia constituida por un pequeño número de células neoplásicas rodeadas de un microambiente peritumoral de células inflamatorias y accesorias, hace que se trate de un modelo único en el que valorar aspectos relacionados con la interrelación de las células tumorales con su microambiente peritumoral así como los procesos de angiogénesis<sup>(210,211)</sup>. Los pocos casos que son resistentes al tratamiento y que tienen una baja supervivencia, nos han llevado a la búsqueda de marcadores que nos lleven a identificar a aquellos subgrupos de mal pronóstico, susceptibles de ser tratados de forma individualizada teniendo en cuenta la causa de su quimiorresistencia.

El microambiente peritumoral constituye una parte fundamental no neoplásica del LH pero que contribuye al mantenimiento y a la resistencia de las CRS de varias maneras. Este microambiente está constituido por una mezcla de linfocitos T, mayoritariamente CD4 de los subtipos Th2 o T reguladores, y B no neoplásicos y células del sistema inmune innato (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos o mastocitos) con su correspondiente matriz extracelular que dan lugar a una cascada de citoquinas y factores tróficos que favorece la supervivencia y el crecimiento del componente neoplásico. Por ello son muy importantes las vías de comunicación entre las CRS y el microambiente que dan lugar a una respuesta inmune anormal que sustenta tanto la neoplasia como su microambiente <sup>(58)</sup>.

También se ha descrito el papel pronóstico adverso de la presencia de macrófagos infiltrantes del tumor (CD68+) a partir de estudios de perfiles de expresión génica e inmunohistoquímicos<sup>(97)</sup>.

El fenotipo proliferativo y antiapoptótico de las CRS depende profundamente de esta interacción con el microambiente mediada por la secreción autocrina y paracrina de múltiples citoquinas y quimoquinas, que se traduce en la activación de vías como la del nuclear factor kappa B (NFkB) o JAK-STAT así como de las relacionadas con varias tirosina-quinasa<sup>(58)</sup>.

Menos estudiada está la participación de enzimas relacionadas con vías inflamatorias como la de la COX-2 cuyo impacto pronóstico describimos de forma reciente<sup>(51)</sup>. Nuestro grupo ha comunicado que la expresión de COX-2 en las CRS valorada a través de inmunohistoquímica se asocia con un menor porcentaje de respuestas completas y con una menor SLE o progresión en una serie de 252 pacientes de LH uniformemente tratada, con especial impacto en los estadios tempranos. Dicho papel de la expresión de COX-2 en las CRS tuvo una significación estadística independiente del resto de los factores pronósticos clínicos, incluyendo el IPS. Esta influencia adversa ha sido confirmada de forma posterior por otros grupos correlacionándola con la expresión de VEGF, angiogénesis y la progresión tumoral<sup>(212)</sup>.

La enzima COX-2 es la isoforma inducible del grupo de las ciclooxigenasas, responsables de la formación de los prostanoïdes a partir del ácido araquidónico, que ejercen su actividad a través de receptores unidos a proteínas G<sup>(213)</sup>. La expresión de la COX-2 se produce en respuesta a múltiples estímulos mitogénicos o inflamatorios, dando lugar entre otras a la prostaglandina E2 (PGE2) que modula la proliferación y muerte celular así como participa en mecanismos de invasión tumoral. La PGE2 actúa sobre cuatro receptores (EP1, 2, 3 y 4) que activan diferentes efectores y segundos mensajeros, los cuales intervienen activando varias moléculas que participan tanto en la transformación neoplásica como en su progresión. Entre ellas tenemos Bcl-2, Akt, ERK y beta-catenina<sup>(214,215)</sup>.

Concretamente se conoce que la COX-2 está implicada en el control de la apoptosis y la parada de ciclo. La administración de inhibidores de COX-2 como el NS-398 o el celecoxib inducen una regulación negativa respectivamente de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2<sup>(216)</sup> y Akt, de forma independiente de Bcl-2<sup>(208)</sup>. Además, la sobreexpresión de COX-2 puede potenciar la angiogénesis y migración tumoral a través de la activación de moléculas clave como el VEGF y metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP)<sup>(217,218)</sup>. En este sentido, la exposición a inhibidores del COX-2 redujo las metástasis en modelos murinos o incluso la formación de tumores<sup>(219,220)</sup>. Concretamente en LH se ha reportado que la expresión de COX-2 está asociada a una mayor proliferación, evaluada como un mayor porcentaje de CRS Ki-67 positivas, y una mayor microdensidad de vasos<sup>(221)</sup>. Se ha descrito también en varios modelos tumorales (incluyendo tumores sólidos y linfoma no Hodgkin) una correlación entre la expresión de COX-2 y la de proteínas de resistencia a múltiples drogas como MDR 1/P-glicoproteína, MRP1, MRP2 y BCRP<sup>(222)</sup>.

Todo ello apunta hacia evidencias sólidas de la participación de COX-2 en procesos de carcinogénesis, proliferación, antiapoptosis, quimiorresistencia y metástasis. Pero la mayoría de esta información está obtenida en modelos de tumor sólido faltando información en linfomas y particularmente en LH donde tenemos evidencias clínicas que apoyan su participación.

La determinación de que algunas de estas moléculas o vías estén implicadas en el subgrupo de casos de LH de mal pronóstico abriría la puerta al desarrollo de estrategias terapéuticas o fármacos eficaces en dichas situaciones. De hecho de forma reciente hemos comunicado que el papel pronóstico adverso de la expresión de COX-2 por parte de la CRS en LH en estadios localizados puede ser contrarrestado a través de consolidación con radioterapia<sup>(223)</sup>.

Nuestros hallazgos del valor de COX-2 como biomarcador pronóstico clave en esta enfermedad es importante, porque los sistemas de riesgo actuales se basan en variables clínicas. Por tanto, disponer de información biológica relevante podría ser importante para aplicar terapias nuevas y más específicas. Por otra parte,

nuestra identificación de un subgrupo de pacientes (alrededor del 30% de los pacientes) que tienen un pronóstico significativamente peor porque expresan la COX-2, es importante para desarrollar futuras nuevas estrategias terapéuticas.

Además, la identificación de un subgrupo en las etapas limitadas de la enfermedad puede facilitar las decisiones en dos direcciones opuestas. Por un lado, el subgrupo COX-2 negativo con una SG del 94% y una SLP del 82% puede ser el objetivo de ensayos que se centren en la limitación de la toxicidad del tratamiento, manteniendo la eficacia del mismo. A la inversa, el subgrupo COX-2 positivo con una SLP del 73%, puede necesitar de una terapia más intensa que la que se lleva a cabo en la actualidad, tales como un mayor número de ciclos de ABVD, regímenes más intensivos como BEACOPP o, alternativamente, probar el uso de nuevas terapias diana que actúen sobre esta vía patógena. Esto es importante porque en los estadios tempranos o grupos de bajo riesgo de LH ningún factor de riesgo pronóstico publicado hasta ahora ha podido identificar con fiabilidad a los pacientes con peor pronóstico. Por otra parte, se descartó un posible sesgo asociado a la posibilidad de que algunos pacientes que requirieran un tratamiento más intenso recibieran tratamientos cortos, tanto en el análisis univariante y multivariante, ya que esta decisión se tomó teniendo en cuenta las características del estadio clínico y de riesgo.

Todavía existe debate acerca de si la radioterapia se debe utilizar para el tratamiento del LH en estadio temprano. El tratamiento combinado de quimio y radioterapia (CMT), incluyendo la radioterapia de consolidación, proporciona excelentes resultados. Sin embargo, su administración se asocia con mayores tasas de efectos secundarios a largo plazo, tales como tumores malignos secundarios y toxicidad cardíaca ( a pesar de la gran variabilidad en las distintas series en los volúmenes irradiados y de las dosis administradas). Para evitar la toxicidad inducida por la radioterapia, varios ensayos han utilizado la quimioterapia exclusiva. Teniendo en cuenta estos ensayos que compararon la CMT con quimioterapia sola, un reciente meta-análisis mostró que no hay ninguna diferencia en términos de tasa de respuesta completa, pero la CMT sí que se asocia a un mejor control tumoral con una mejor SLP y SG.



Sin embargo, la identificación de los pacientes con bajo riesgo de recaída podría constituir una alternativa a la radioterapia de consolidación para los pacientes de estas características. La evaluación convencional de la respuesta completa tras quimioterapia no es capaz de identificar con precisión un grupo de pacientes que no se benefician de la radioterapia. Sin embargo, la evaluación intermedia o final del tratamiento PET puede ser una alternativa, aunque en pacientes con LH en estadio temprano con masa voluminosa y negativa en PET/TC se ha visto una mayor tasa de recaída cuando no se consolidaron con radioterapia.

En nuestra serie la radioterapia mejora específicamente la SLP en pacientes que presentan positividad para COX-2 en la célula de RS. Nuestro trabajo abre la posibilidad de utilizar determinados biomarcadores, tales como nuestra expresión de COX-2 en las CRS, que permite la detección de pacientes de alto riesgo dentro de grupos de pacientes con aparente buen pronóstico clínico. Nuestra identificación de un grupo considerable de alrededor del 30% de los pacientes que tienen un pronóstico significativamente peor porque expresan la COX-2 puede ser importante para identificar aquellos pacientes candidatos tanto para la terapia de consolidación o implementar nuevas estrategias terapéuticas.

Sin embargo, en el grupo de enfermedad avanzada sólo hemos podido observar una tendencia hacia una disminución de la SG y de la SLP en pacientes que expresan la COX-2. Tal vez, múltiples alteraciones biológicas en estas etapas avanzadas de la enfermedad hacen que este biomarcador de forma aislada sea incapaz de proporcionar información significativa independiente. Otra posible explicación es que la mayor intensidad de tratamiento que están recibiendo estos pacientes pueda compensar el fenotipo positivo para COX-2. Por esta razón, estos pacientes podrían beneficiarse también de regímenes más intensos como BEACOPP o TAPH de primera línea o de nuevos agentes.

Nuestros datos per se no permiten identificar la razón por la cuál la sobreexpresión de COX-2 es importante en el LH. La importancia patógena de la COX-2 se ha descrito en tumores sólidos. De hecho, la expresión de COX-2 se ha asociado con varias vías antiapoptóticas, como la inducción de Bcl-2 y de los mecanismos de

supervivencia subsiguientes, o por inducción de ATM y ATR en algunos tumores sólidos. Por otra parte, la COX-2 se ha asociado con resistencia a quimioterapia y radioterapia a través de la inducción de neoangiogénesis y también debido a su fuerte correlación con la expresión de la gene21 MDR.

Sin embargo, es menos conocido el papel específico de la vía de la COX-2 en la patogénesis de los tumores malignos hematológicos. Por ejemplo, Ladetto et al reportaron el papel pronóstico adverso de la asociación de la expresión de COX-2 en el mieloma múltiple, sugiriendo una interacción recíproca entre COX-2 y IL-6, que es un marcador biológico importante implicado en la patogénesis del mieloma múltiple. De hecho, COX-2 e IL-6 se regulan recíprocamente, especulando la posibilidad de un bucle biológico.

Llamativamente, se ha publicado el papel de la IL-6 como un marcador pronóstico desfavorable en LH. Del mismo modo que COX-2 potencia indirectamente VEGF a través de la inducción de HIF-alfa, se ha propuesto la asociación de COX-2 en la estimulación del fenómeno angiogénico. Por otra parte, son numerosas las publicaciones a favor de un pronóstico adverso que los marcadores de neoangiogénesis confieren a los pacientes con HL.

Dada la importancia de la COX-2 como biomarcador pronóstico y dada la probabilidad de que juegue un papel patogénico importante en esta enfermedad, uno se pregunta si podría ser utilizado como diana terapéutica, del mismo modo que ya se está utilizando en tumores sólidos con una eficacia prometedora. Sin embargo, los inhibidores de COX-2 actualmente disponibles tienen una potencial toxicidad importante, lo que hace difícil su introducción en la práctica clínica de LH. Curiosamente, Fujita et al documentaron la inhibición de la COX-2 por talidomida y otros fármacos considerados inmunomoduladores. La lenalidomida ha demostrado una eficacia prometedora en LH, por lo que puede estar asociada con la inhibición de COX-2, entre otros múltiples efectos y COX-2 puede ser un predictor de la eficacia de este fármaco. Este es otro ejemplo del nuevo paradigma de tratamiento de tumores apuntando al microambiente tumoral. Es este enfoque terapéutico en LH el que fue utilizado por Younes et al, incorporando el Rituximab contra el

componente de células B del tumor en el régimen ABVD actual.

A nivel práctico clínico nuestro grupo ha tratado con éxito un caso de LH refractario en recaída con una combinación de lenalidomida y celecoxib, obteniendo una respuesta de 2 años de duración (caso pendiente de publicación). Otro ejemplo del papel terapéutico de los inhibidores de COX-2 en tumores hematológicos, es una publicación reciente de nuestro grupo donde se evalúa la combinación de lenalidomida, celecoxib y azacitidina en una paciente de edad avanzada afecta de una neoplasia de células dendríticas plasmocitoides. Este tipo de tumores requieren generalmente de tratamientos agresivos que suelen ser bastante tóxicos y muchas veces no apropiados para pacientes de edad avanzada y con comorbilidades asociadas. Este esquema consiguió una respuesta clínica completa con una SLP y una SG mucho mayor de la esperada en una paciente de estas características y con un bajo perfil de toxicidad que hace que sea un tratamiento mejor tolerado que el considerado estándar.

Por todo ello nuestro grupo está trabajando en la actualidad en el estudio de los mecanismos patogénicos de la sobreexpresión de COX-2 en las CRS del LH con el objetivo de dilucidar el papel de la COX-2 en estos casos así como indagar en la utilización de terapias dirigidas a actuar sobre esta vía.

## Conclusiones

- 1) La sobreexpresión de COX-2 en las CRS al diagnóstico no mostró ninguna relación con las principales variables pronósticas previas al tratamiento.
- 2) La sobreexpresión de COX-2 en las CRS al diagnóstico no se tradujo en peores tasas de respuesta tanto en la población global como en las cohortes de estadio temprano o avanzado.
- 3) En nuestra cohorte de LH en estadio temprano, la sobreexpresión de COX-2 en la CRS al diagnóstico fue un factor pronóstico independiente asociado con una peor SLP y SG.
- 4) En nuestra cohorte de LH en estadio temprano, la administración de radioterapia adyuvante fue capaz de compensar el papel pronóstico adverso de la sobreexpresión de COX-2 en las CRS. Por tanto este subgrupo de pacientes en estadio temprano podría beneficiarse de tratamientos más intensos combinando la quimioterapia y la radioterapia.
- 5) De forma adicional, la información previa abre la puerta para el desarrollo, investigación en ensayos e incorporación de fármacos que inhiban la expresión de COX-2 o tengan como diana sus vías de señalización.

### 3. BIBLIOGRAFÍA

1. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: Regulators and clinical applications. Vol. 61, Biochemical Pharmacology. 2001. p. 253–70.
2. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med. 2000;6(4):389–95.
3. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer. 2003;3(6):401–10.
4. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. Nat Rev Cancer. 2002;2(10):795–803.
5. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber H-P, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nat Rev Drug Discov. 2004;3(5):391–400.
6. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. Science (80- ) [Internet]. 1987;235(4787):442–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2432664>
7. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst. 1990;82(1):4–6.
8. Goel S, Wong AHK, Jain RK. Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(3).
9. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. Nature. 2005;438(7070):967–74.
10. Rosen LS. Inhibitors of the vascular endothelial growth factor receptor. Hematol Oncol Clin North Am [Internet]. 2002;16(5):1173–87. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12512388](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12512388)
11. Wicki A, Christofori G. The angiogenic switch in tumorigenesis. In: Tumor Angiogenesis: Basic Mechanisms and Cancer Therapy. 2008. p. 67–88.
12. Folkman J, Hanahan D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. Princess Takamatsu Symp. 1991;22:339–47.
13. Kaban K, Herbst RS. Angiogenesis as a target for cancer therapy. Vol. 16, Hematology/Oncology Clinics of North America. 2002. p. 1125–71.
14. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature. 2005;438(7070):932–6.
15. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. Nature. 2005;438(7070):937–45.

16. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* [Internet]. 2000;5 Suppl 1(suppl 1):3–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10804084>
17. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* [Internet]. 2002;29(6 Suppl 16):10–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516033>
18. Alitalo K, Tammela T, Petrova T V. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005;438(7070):946–53.
19. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* [Internet]. 2003;3(7):643–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14601638>
20. List a F. Vascular endothelial growth factor signaling pathway as an emerging target in hematologic malignancies. *Oncologist*. 2001;6 Suppl 5(suppl 5):24–31.
21. Trujillo A, McGee C, Cogle CR. Angiogenesis in acute myeloid leukemia and opportunities for novel therapies. *Journal of Oncology*. 2012.
22. Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* [Internet]. 2000;95(1):309–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10607717> <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/95/1/309.full.pdf>
23. Fiedler W, Graeven U, Ergun S, Verago S, Kilic N, Stockschlader M, et al. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood* [Internet]. 1997;89(6):1870–5. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9058706](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9058706)
24. Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, Mansouri T, Gidel C, Keating M, et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* [Internet]. 1999;94(11):3717–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10572084>
25. Hu Q, Dey AL, Yang Y, Shen Y, Jilani IB, Estey EH, et al. Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1, and Not Receptor 2, Is an Independent Prognostic Factor in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Cancer*. 2004;100(9):1884–91.
26. Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* [Internet].

- 1997;150(3):815–21. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1857903&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
27. Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T, Gidel C, Estey E, Thomas D, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* [Internet]. 2000;96(6):2240–5. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10979972> \n<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/96/6/2240.full.pdf>
  28. Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res.* 1999;59:728–33.
  29. Chen H, Treweeke AT, West DC, Till KJ, Cawley JC, Zuzel M, et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* [Internet]. 2000;96(9):3181–7. Available from:  
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/96/9/3181.abstract>
  30. Ridell B, Norrby K. Intratumoral microvascular density in malignant lymphomas of B-cell origin. *APMIS* [Internet]. 2001;109(1):66–72. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecomwww.scopus.com/whalecom0/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035080419&partnerID=40&md5=66a461da776fbac8e6aeb3bdd678c0ff>
  31. Ferrajoli a, Manshour T, Estrov Z, Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, et al. High levels of vascular endothelial growth factor receptor-2 correlate with shortened survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2001;7(4):795–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309324>
  32. Molica S, Vitelli G, Levato D, Gandolfo GM, Liso V. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 1999;107(3):605–10. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10583266>
  33. Lundberg LG, Lerner R, Sundelin P, Rogers R, Folkman J, Palmblad J. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity [published erratum appears in *Am J Pathol* 2000 Aug;157(2):690]. *Am J Pathol.* 2000;157(1):15–9.
  34. Ribatti D, Nico B, Ranieri G, Specchia G, Vacca A. The role of angiogenesis in human non-Hodgkin lymphomas. *Neoplasia*

- [Internet]. 2013;15(3):231–8. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3593147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
35. Younes A. Angiogenesis in lymphoma: a short review. *Curr Mol Med* [Internet]. 2005;5(7):609–13. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16305487>
  36. Bertolini F, Paolucci M, Peccatori F, Cinieri S, Agazzi A, P-F F-, et al. Angiogenic growth factors and endostatin in non-Hodgkin's lymphoma. *BrJHaematol*. 1999;106(2):504–9.
  37. Wang ES, Teruya-Feldstein J, Wu Y, Zhu Z, Hicklin DJ, Moore MAS. Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo. *Blood*. 2004;104(9):2893–902.
  38. Giuliani N, Storti P, Bolzoni M, Palma BD, Bonomini S. Angiogenesis and multiple myeloma. Vol. 4, *Cancer Microenvironment*. 2011. p. 325–37.
  39. Jelinek DF. MECHANISMS OF MYELOMA CELL GROWTH CONTROL. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1999;13(6):1145–57.
  40. Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo G, Bagnato S, Giustolisi G, Florida P, et al. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica* [Internet]. 2000;85(8):800–5. Available from:  
<http://www.haematologica.org/content/85/8/800.abstract>
  41. Rajkumar S V., Witzig TE. A review of angiogenesis and antiangiogenic therapy with thalidomide in multiple myeloma. Vol. 26, *Cancer Treatment Reviews*. 2000. p. 351–62.
  42. Dominici M, Campioni D, Lanza F, Luppi M, Barozzi P, Pauli S, et al. Angiogenesis in multiple myeloma: correlation between in vitro endothelial colonies growth (CFU-En) and clinical-biological features. *Leukemia*. 2001;15(1):171–6.
  43. Rajkumar SV, Leong T, Roche PC, Fonseca R, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2000;6(8):3111–6.
  44. Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, Carboni N, Cortelezzi a, Ferrucci PF, et al. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer* [Internet]. 1999;81(8):1398–401. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2362976&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  45. Bellamy WT, Richter L, Sirjani D, Roxas C, Glinsmann-Gibson B, Frutiger Y, et al. Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic



- syndromes. *Blood*. 2001;97(5):1427–34.
46. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* [Internet]. 2000;96(10):3374–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11071630>
  47. Mainou-Fowler T, Angus B, Miller S, Proctor SJ, Taylor PRA, Wood KM. Micro-vessel density and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived endothelial cell growth factor (PdEGF) in classical Hodgkin lymphoma (HL). *Leuk Lymphoma* [Internet]. Taylor & Francis; 2006 Jan [cited 2016 Aug 23];47(2):223–30. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01674820500305838>
  48. Doussis-Anagnostopoulou IA, Talks KL, Turley H, Debnam P, Tan DC, Mariatos G, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *J Pathol* [Internet]. 2002 Aug [cited 2016 Aug 23];197(5):677–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12210089>
  49. Glimelius I, Edström A, Fischer M, Nilsson G, Sundström C, Molin D, et al. Angiogenesis and mast cells in Hodgkin lymphoma. *Leukemia* [Internet]. Nature Publishing Group; 2005 Dec 13 [cited 2016 Aug 23];19(12):2360–2. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.leu.2403992>
  50. Citak EC, Oguz A, Karadeniz C, Akyurek N. Immunohistochemical expression of angiogenic cytokines in childhood Hodgkin lymphoma. *Pathol - Res Pract*. 2008;204(2):89–96.
  51. Gutierrez A, Mestre F, Ramos R, Martinez-Serra J, Bautista A, Fuster J, et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression by Neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg Cells Is An Independent Adverse Prognostic Factor for Relapse in Hodgkin Lymphoma. *Blood*. American Society of Hematology; 2009;114(22):1561–1561.
  52. Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, Emmerich F, Müller G, Foss HD, et al. Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. *Blood* [Internet]. 1999 Sep 15 [cited 2016 Aug 23];94(6):2065–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477736>
  53. Mestre F, Gutierrez A, Ramos R, Martinez-Serra J, Sánchez L, Matheu G, et al. Expression of COX-2 on reed-sternberg cells is an independent unfavorable prognostic factor in Hodgkin

- lymphoma treated with ABVD. *Blood*. 2012;119(25):6072–9.
54. Korkolopoulou P, Thymara I, Kavantzias N, Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Kokoris SI, et al. Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma: a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications. *Leukemia* [Internet]. 2005 Jun [cited 2016 Aug 23];19(6):894–900. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800675>
  55. Kadin ME, Agnarsson BA, Ellingsworth LR, Newcom SR. Immunohistochemical evidence of a role for transforming growth factor beta in the pathogenesis of nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Am J Pathol* [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 1990 Jun [cited 2016 Aug 23];136(6):1209–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2356855>
  56. Lvaro TS, Noguera-Salvá R, Fariñ As-Guerrero F. La matriz extracelular: de la mecánica molecular al microambiente tumoral (parte II). *Rev Esp Patol*. 43:24–32.
  57. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2014;14(8):517–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3774> <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc3774>
  58. Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of hodgkin's lymphoma: Increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J Clin Oncol*. 2011;29(14):1812–26.
  59. Scott DW, Steidl C. The classical Hodgkin lymphoma tumor microenvironment: Macrophages and gene expression-based modeling. *Hematology*. 2014;2014(1):144–50.
  60. García Meijide JA, Gómez-Reino Carnota JJ. Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Rev Española Reumatol*. Elsevier; :33–5.
  61. Clària J. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2003 [cited 2016 Aug 23];9(27):2177–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14529398>
  62. Castells A, Rodríguez-Moranta F, Soriano A. Implicación de ciclooxigenasa 2 en el cáncer: utilidad de los coxib. *Rev Española Reumatol*. Elsevier; :386–92.
  63. Khanpure SP, Garvey DS, Janero DR, Letts LG. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2007 [cited 2016 Aug 23];7(3):311–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305573>
  64. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer*

- J Clin [Internet]. [cited 2016 Aug 20];66(1):7–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742998>
65. Cozen W, Katz J, Mack TM. Risk patterns of Hodgkin's disease in Los Angeles vary by cell type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. [cited 2016 Aug 23];1(4):261–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1303125>
  66. Glaser SL. Regional variation in Hodgkin's disease incidence by histologic subtype in the US. *Cancer* [Internet]. 1987 Dec 1 [cited 2016 Aug 23];60(11):2841–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3677017>
  67. McNally RJQ, Alston RD, Cairns DP, Eden OB, Birch JM. Geographical and ecological analyses of childhood acute leukaemias and lymphomas in north-west England. *Br J Haematol* [Internet]. 2003 Oct [cited 2016 Aug 23];123(1):60–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14510943>
  68. Hu E, Hufford S, Lukes R, Bernstein-Singer M, Sobel G, Gill P, et al. Third-World Hodgkin's disease at Los Angeles County-University of Southern California Medical Center. *J Clin Oncol* [Internet]. 1988 Aug [cited 2016 Aug 23];6(8):1285–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3411341>
  69. Vianna NJ, Polan AK. Epidemiologic evidence for transmission of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* [Internet]. 1973 Sep 6 [cited 2016 Aug 23];289(10):499–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4723572>
  70. Alexander FE, Jarrett RF, Lawrence D, Armstrong AA, Freeland J, Gokhale DA, et al. Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein-Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other agents. *Br J Cancer* [Internet]. 2000 Mar [cited 2016 Aug 23];82(5):1117–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737396>
  71. Tinguely M, Vonlanthen R, Müller E, Dommann-Scherrer CC, Schneider J, Laissue JA, et al. Hodgkin's disease-like lymphoproliferative disorders in patients with different underlying immunodeficiency states. *Mod Pathol* [Internet]. 1998 Apr [cited 2016 Aug 23];11(4):307–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9578079>
  72. Hollander P, Rostgaard K, Smedby KE, Chang ET, Amini R-M, de Nully Brown P, et al. Autoimmune and Atopic Disorders and Risk of Classical Hodgkin Lymphoma. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2016 Aug 23];182(7):624–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26346543>
  73. Kharazmi E, Fallah M, Pukkala E, Olsen JH, Tryggvadottir L, Sundquist K, et al. Risk of familial classical Hodgkin lymphoma by

- relationship, histology, age, and sex: a joint study from five Nordic countries. *Blood* [Internet]. 2015 Oct 22 [cited 2016 Aug 23];126(17):1990–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26311361>
74. Huang X, Kushekhar K, Nolte I, Kooistra W, Visser L, Bouwman I, et al. Multiple HLA class I and II associations in classical Hodgkin lymphoma and EBV status defined subgroups. *Blood* [Internet]. 2011 Nov 10 [cited 2016 Aug 23];118(19):5211–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21921049>
  75. Mauch PM, Kalish LA, Kadin M, Coleman CN, Osteen R, Hellman S. Patterns of presentation of Hodgkin disease. Implications for etiology and pathogenesis. *Cancer* [Internet]. 1993 Mar 15 [cited 2016 Aug 25];71(6):2062–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8443755>
  76. Cavalli F. Rare syndromes in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* [Internet]. 1998 [cited 2016 Aug 25];9 Suppl 5:S109–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9926248>
  77. Rosenberg SA, Kaplan HS. Evidence for an orderly progression in the spread of Hodgkin's disease. *Cancer Res* [Internet]. 1966 Jun [cited 2016 Aug 25];26(6):1225–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5947346>
  78. Mani H, Jaffe ES. Hodgkin lymphoma: an update on its biology with new insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma* [Internet]. 2009;9(3):206–16. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2806063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  79. Lukes RJ, Butler JJ. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res* [Internet]. 1966 Jun [cited 2016 Aug 25];26(6):1063–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5947336>
  80. Strickler JG, Michie SA, Warnke RA, Dorfman RF. The "syncytial variant" of nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 1986 Jul [cited 2016 Aug 25];10(7):470–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2425645>
  81. von Wasielewski R, Mengel M, Fischer R, Hansmann ML, Hübner K, Franklin J, et al. Classical Hodgkin's disease. Clinical impact of the immunophenotype. *Am J Pathol* [Internet]. 1997 Oct [cited 2016 Aug 25];151(4):1123–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9327746>
  82. Browne P, Petrosyan K, Hernandez A, Chan JA. The B-cell transcription factors BSAP, Oct-2, and BOB.1 and the pan-B-cell

- markers CD20, CD22, and CD79a are useful in the differential diagnosis of classic Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2003 Nov [cited 2016 Aug 25];120(5):767–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14608905>
83. de Jong D, Bosq J, MacLennan KA, Diebold J, Audouin J, Chasle J, et al. Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma (LRCHL): clinico-pathological characteristics and outcome of a rare entity. *Ann Oncol* [Internet]. 2006 Jan [cited 2016 Aug 25];17(1):141–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284059>
  84. Nogová L, Rudiger T, Engert A. Biology, clinical course and management of nodular lymphocyte-predominant hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* [Internet]. 2006 [cited 2016 Aug 25];266–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124071>
  85. Eichenauer DA, Engert A, Dreyling M, Group O behalf of the EGW. Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* [Internet]. Oxford University Press; 2011 Sep 1 [cited 2016 Aug 25];22(Supplement 6):vi55–8. Available from: <http://annonc.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/annonc/mdr378>
  86. Caraway NP. Strategies to diagnose lymphoproliferative disorders by fine-needle aspiration by using ancillary studies. *Cancer* [Internet]. 2005 Dec 25 [cited 2016 Aug 25];105(6):432–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222688>
  87. Isasi CR, Lu P, Blaufox MD. A metaanalysis of 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography in the staging and restaging of patients with lymphoma. *Cancer* [Internet]. 2005 Sep 1 [cited 2016 Aug 25];104(5):1066–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16047335>
  88. Itti E, Meignan M, Berriolo-Riedinger A, Biggi A, Cashen AF, Véra P, et al. An international confirmatory study of the prognostic value of early PET/CT in diffuse large B-cell lymphoma: Comparison between Deauville criteria and  $\Delta$ sUVmax. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;40(9):1312–20.
  89. Carbone A, Gloghini A, Gaidano G, Franceschi S, Capello D, Drexler HG, et al. Expression status of BCL-6 and syndecan-1 identifies distinct histogenetic subtypes of Hodgkin's disease. *Blood* [Internet]. 1998 Oct 1 [cited 2016 Aug 25];92(7):2220–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746758>
  90. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease:

- Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* [Internet]. 1989 Nov [cited 2016 Aug 25];7(11):1630–6. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2809679>
91. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Sep 20 [cited 2016 Aug 25];32(27):3059–68. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25113753>
  92. Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Müeller SP, et al. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Sep 20 [cited 2016 Aug 25];32(27):3048–58. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25113771>
  93. Hoppe RT, Advani RH, Ai WZ, Ambinder RF, Aoun P, Bello CM, et al. Hodgkin lymphoma, version 2.2012: Featured updates to the NCCN guidelines. Vol. 10, *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2012. p. 589–97.
  94. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 1998 Nov 19 [cited 2016 Aug 25];339(21):1506–14. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819449>
  95. Venkataraman G, Mirza MK, Eichenauer DA, Diehl V. Current status of prognostication in classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2014;165(3):287–99.
  96. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2010;362(10):875–85. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2897174&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  97. Tan KL, Scott DW, Hong F, Kahl BS, Fisher RI, Bartlett NL, et al. Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: A correlative study from the E2496 Intergroup trial. *Blood*. 2012;120(16):3280–7.
  98. Tzankov A, Matter MS, Dirnhofer S. Refined prognostic role of CD68-positive tumor macrophages in the context of the cellular micromilieu of classical Hodgkin lymphoma. *Pathobiology* [Internet]. 2010 [cited 2016 Aug 26];77(6):301–8. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266828>
99. Greaves P, Clear A, Coutinho R, Wilson A, Matthews J, Owen A, et al. Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is predictive of outcome. *J Clin Oncol* [Internet]. 2013 Jan 10 [cited 2016 Aug 26];31(2):256–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23045593>
  100. Kamper P, Ludvigsen M, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Rabinovich GA, Møller MB, et al. Proteomic analysis identifies galectin-1 as a predictive biomarker for relapsed/refractory disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2011;117(24):6638–49.
  101. Ouyang J, Plütschow A, Pogge von Strandmann E, Reiners KS, Ponader S, Rabinovich GA, et al. Galectin-1 serum levels reflect tumor burden and adverse clinical features in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2013;121(17):3431–3.
  102. Hnátková M, Mociková H, Trnený M, Zivný J. The biological environment of Hodgkin's lymphoma and the role of the chemokine CCL17/TARC. *Prague Med Rep* [Internet]. 2009 [cited 2016 Aug 26];110(1):35–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19591376>
  103. van den Berg A, Visser L, Poppema S. High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* [Internet]. 1999 Jun [cited 2016 Aug 26];154(6):1685–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10362793>
  104. Plattel WJ, van den Berg A, Visser L, van der Graaf A-M, Pruim J, Vos H, et al. Plasma thymus and activation-regulated chemokine as an early response marker in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* [Internet]. 2012 Mar [cited 2016 Aug 26];97(3):410–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22058214>
  105. Sauer M, Plütschow A, Jachimowicz RD, Kleefisch D, Reiners KS, Ponader S, et al. Baseline serum TARC levels predict therapy outcome in patients with Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2016 Aug 26];88(2):113–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23225085>
  106. Eichenauer DA, Plütschow A, Fuchs M, von Tresckow B, Böll B, Behringer K, et al. Long-Term Course of Patients With Stage IA Nodular Lymphocyte-Predominant Hodgkin Lymphoma: A Report From the German Hodgkin Study Group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Sep 10 [cited 2016 Aug 27];33(26):2857–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26240235>

107. Yahalom J, Mauch P. The involved field is back: issues in delineating the radiation field in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* [Internet]. 2002 [cited 2016 Aug 27];13 Suppl 1:79–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12078908>
108. Specht L, Yahalom J, Illidge T, Berthelsen AK, Constine LS, Eich HT, et al. Modern radiation therapy for Hodgkin lymphoma: field and dose guidelines from the international lymphoma radiation oncology group (ILROG). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2016 Aug 27];89(4):854–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23790512>
109. Paumier A, Ghalibafian M, Beaudre A, Ferreira I, Pichenot C, Messai T, et al. Involved-node radiotherapy and modern radiation treatment techniques in patients with Hodgkin lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2016 Aug 27];80(1):199–205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21481723>
110. Santoro A, Bonadonna G, Valagussa P, Zucali R, Viviani S, Villani F, et al. Long-term results of combined chemotherapy-radiotherapy approach in Hodgkin's disease: superiority of ABVD plus radiotherapy versus MOPP plus radiotherapy. *J Clin Oncol* [Internet]. 1987 Jan [cited 2016 Aug 27];5(1):27–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2433409>
111. Evens AM, Cilley J, Ortiz T, Gounder M, Hou N, Rademaker A, et al. G-CSF is not necessary to maintain over 99% dose-intensity with ABVD in the treatment of Hodgkin lymphoma: low toxicity and excellent outcomes in a 10-year analysis. *Br J Haematol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2016 Aug 27];137(6):545–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459049>
112. Federico M, Luminari S, Iannitto E, Polimeno G, Marcheselli L, Montanini A, et al. ABVD compared with BEACOPP compared with CEC for the initial treatment of patients with advanced Hodgkin's lymphoma: results from the HD2000 Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfomi Trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2009 Feb 10 [cited 2016 Aug 27];27(5):805–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19124807>
113. Martin WG, Ristow KM, Habermann TM, Colgan JP, Witzig TE, Ansell SM. Bleomycin pulmonary toxicity has a negative impact on the outcome of patients with Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Oct 20 [cited 2016 Aug 27];23(30):7614–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16186594>
114. Bonadonna G, Bonfante V, Viviani S, Di Russo A, Villani F, Valagussa P. ABVD plus subtotal nodal versus involved-field



- radiotherapy in early-stage Hodgkin's disease: long-term results. *J Clin Oncol* [Internet]. 2004 Jul 15 [cited 2016 Aug 27];22(14):2835–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199092>
115. Engert A, Plütschow A, Eich HT, Lohri A, Dörken B, Borchmann P, et al. Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Aug 12 [cited 2016 Aug 27];363(7):640–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818855>
  116. Advani RH, Hoppe RT, Baer D, Mason J, Warnke R, Allen J, et al. Efficacy of abbreviated Stanford V chemotherapy and involved-field radiotherapy in early-stage Hodgkin lymphoma: mature results of the G4 trial. *Ann Oncol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2016 Aug 27];24(4):1044–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23136225>
  117. Straus DJ, Portlock CS, Qin J, Myers J, Zelenetz AD, Moskowitz C, et al. Results of a prospective randomized clinical trial of doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine (ABVD) followed by radiation therapy (RT) versus ABVD alone for stages I, II, and IIIA nonbulky Hodgkin disease. *Blood* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2016 Aug 27];104(12):3483–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15315964>
  118. Meyer RM, Gospodarowicz MK, Connors JM, Pearcey RG, Bezjak A, Wells WA, et al. Randomized comparison of ABVD chemotherapy with a strategy that includes radiation therapy in patients with limited-stage Hodgkin's lymphoma: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group and the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Jul 20 [cited 2016 Aug 27];23(21):4634–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15837968>
  119. Meyer RM, Gospodarowicz MK, Connors JM, Pearcey RG, Wells WA, Winter JN, et al. ABVD alone versus radiation-based therapy in limited-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Feb 2 [cited 2016 Aug 27];366(5):399–408. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22149921>
  120. Fermé C, Eghbali H, Meerwaldt JH, Rieux C, Bosq J, Berger F, et al. Chemotherapy plus involved-field radiation in early-stage Hodgkin's disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2007 Nov 8 [cited 2016 Aug 27];357(19):1916–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17989384>
  121. Hay AE, Klimm B, Chen BE, Goergen H, Shepherd LE, Fuchs M, et al. An individual patient-data comparison of combined modality

- therapy and ABVD alone for patients with limited-stage Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2016 Aug 27];24(12):3065–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24121121>
122. Engert A, Schiller P, Josting A, Herrmann R, Koch P, Sieber M, et al. 【HD8試験】. *J Clin Oncol* [Internet]. 2003;21(19):3601–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12913100>
  123. Sasse S, Klimm B, Gorgen H, Fuchs M, Heyden-Honerkamp A, Lohri A, et al. Comparing long-term toxicity and efficacy of combined modality treatment including extended- or involved-field radiotherapy in early-stage Hodgkin’s lymphoma. *Ann Oncol* [Internet]. 2012 Nov [cited 2016 Aug 27];23(11):2953–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22767583>
  124. Eich HT, Diehl V, Gorgen H, Pabst T, Markova J, Debus J, et al. Intensified chemotherapy and dose-reduced involved-field radiotherapy in patients with early unfavorable Hodgkin’s lymphoma: final analysis of the German Hodgkin Study Group HD11 trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Sep 20 [cited 2016 Aug 27];28(27):4199–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713848>
  125. Horning SJ, Hoppe RT, Breslin S, Bartlett NL, Brown BW, Rosenberg SA. Stanford V and radiotherapy for locally extensive and advanced Hodgkin’s disease: mature results of a prospective clinical trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2002 Feb 1 [cited 2016 Aug 27];20(3):630–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821442>
  126. Chisesi T, Bellei M, Luminari S, Montanini A, Marcheselli L, Levis A, et al. Long-term follow-up analysis of HD9601 trial comparing ABVD versus Stanford V versus MOPP/EBV/CAD in patients with newly diagnosed advanced-stage Hodgkin’s lymphoma: a study from the Intergruppo Italiano Linfomi. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 Nov 10 [cited 2016 Aug 27];29(32):4227–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21990405>
  127. Edwards-Bennett SM, Jacks LM, Moskowitz CH, Wu EJ, Zhang Z, Noy A, et al. Stanford V program for locally extensive and advanced Hodgkin lymphoma: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Ann Oncol* [Internet]. 2010 Mar [cited 2016 Aug 27];21(3):574–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759185>
  128. Hoskin PJ, Lowry L, Horwich A, Jack A, Mead B, Hancock BW, et al. Randomized comparison of the stanford V regimen and ABVD in the treatment of advanced Hodgkin’s Lymphoma: United

- Kingdom National Cancer Research Institute Lymphoma Group Study ISRCTN 64141244. *J Clin Oncol* [Internet]. 2009 Nov 10 [cited 2016 Aug 27];27(32):5390–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19738111>
129. Gordon LI, Hong F, Fisher RI, Bartlett NL, Connors JM, Gascoyne RD, et al. Randomized phase III trial of ABVD versus Stanford V with or without radiation therapy in locally extensive and advanced-stage Hodgkin lymphoma: an intergroup study coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group (E2496). *J Clin Oncol* [Internet]. 2013 Feb 20 [cited 2016 Aug 27];31(6):684–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23182987>
  130. von Tresckow B, Plütschow A, Fuchs M, Klimm B, Markova J, Lohri A, et al. Dose-intensification in early unfavorable Hodgkin's lymphoma: final analysis of the German Hodgkin Study Group HD14 trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012 Mar 20 [cited 2016 Aug 27];30(9):907–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271480>
  131. DeVita VT, Simon RM, Hubbard SM, Young RC, Berard CW, Moxley JH, et al. Curability of advanced Hodgkin's disease with chemotherapy. Long-term follow-up of MOPP-treated patients at the National Cancer Institute. *Ann Intern Med* [Internet]. 1980 May [cited 2016 Aug 27];92(5):587–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6892984>
  132. Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ, Nissen N, Cooper MR, Henderson ES, et al. Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *N Engl J Med* [Internet]. 1992 Nov 19 [cited 2016 Aug 27];327(21):1478–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1383821>
  133. Duggan DB, Petroni GR, Johnson JL, Glick JH, Fisher RI, Connors JM, et al. Randomized comparison of ABVD and MOPP/ABV hybrid for the treatment of advanced Hodgkin's disease: report of an intergroup trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2003 Feb 15 [cited 2016 Aug 27];21(4):607–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586796>
  134. Johnson PWM, Radford JA, Cullen MH, Sydes MR, Walewski J, Jack AS, et al. Comparison of ABVD and alternating or hybrid multidrug regimens for the treatment of advanced Hodgkin's lymphoma: results of the United Kingdom Lymphoma Group LY09 Trial (ISRCTN97144519). *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Dec 20 [cited 2016 Aug 27];23(36):9208–18. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314615>
135. Johnson PWM, Sydes MR, Hancock BW, Cullen M, Radford JA, Stenning SP. Consolidation radiotherapy in patients with advanced Hodgkin's lymphoma: survival data from the UKLG LY09 randomized controlled trial (ISRCTN97144519). *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Jul 10 [cited 2016 Aug 27];28(20):3352–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498402>
  136. Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M, Lathan B, Paulus U, Hasenclever D, et al. Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP-ABVD for advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2003 Jun 12 [cited 2016 Aug 27];348(24):2386–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12802024>
  137. Engert A, Diehl V, Franklin J, Lohri A, Dörken B, Ludwig W-D, et al. Escalated-dose BEACOPP in the treatment of patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: 10 years of follow-up of the GHSG HD9 study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2009 Sep 20 [cited 2016 Aug 27];27(27):4548–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19704068>
  138. Engert A. ABVD or BEACOPP for Advanced Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol* [Internet]. American Society of Clinical Oncology; 2016 Apr 10 [cited 2016 Aug 27];34(11):1167–9. Available from: <http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2015.64.8683>
  139. Engert A, Haverkamp H, Kobe C, Markova J, Renner C, Ho A, et al. Reduced-intensity chemotherapy and PET-guided radiotherapy in patients with advanced stage Hodgkin's lymphoma (HD15 trial): a randomised, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2012 May 12 [cited 2016 Aug 27];379(9828):1791–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22480758>
  140. Merli F, Luminari S, Gobbi PG, Cascavilla N, Mammi C, Ilariucci F, et al. Long-Term Results of the HD2000 Trial Comparing ABVD Versus BEACOPP Versus COPP-EBV-CAD in Untreated Patients With Advanced Hodgkin Lymphoma: A Study by Fondazione Italiana Linfomi. *J Clin Oncol* [Internet]. 2016 Apr 10 [cited 2016 Aug 27];34(11):1175–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26712220>
  141. Carde P, Karrasch M, Fortpied C, Brice P, Khaled H, Casasnovas O, et al. Eight Cycles of ABVD Versus Four Cycles of BEACOPPescalated Plus Four Cycles of BEACOPPbaseline in Stage III to IV, International Prognostic Score  $\geq 3$ , High-Risk Hodgkin Lymphoma: First Results of the Phase III EORTC 20012

- Intergroup Trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2016 Jun 10 [cited 2016 Aug 27];34(17):2028–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27114593>
142. Fabian CJ, Mansfield CM, Dahlberg S, Jones SE, Miller TP, Van Slyck E, et al. Low-dose involved field radiation after chemotherapy in advanced Hodgkin disease. A Southwest Oncology Group randomized study. *Ann Intern Med* [Internet]. 1994 Jun 1 [cited 2016 Aug 27];120(11):903–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8172436>
  143. Aleman BMP, Raemaekers JMM, Tomišić R, Baaijens MHA, Bortolus R, Lybeert MLM, et al. Involved-field radiotherapy for patients in partial remission after chemotherapy for advanced Hodgkin's lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2016 Aug 27];67(1):19–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17097834>
  144. Carella AM, Bellei M, Brice P, Gisselbrecht C, Visani G, Colombat P, et al. High-dose therapy and autologous stem cell transplantation versus conventional therapy for patients with advanced Hodgkin's lymphoma responding to front-line therapy: long-term results. *Haematologica* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Aug 27];94(1):146–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001284>
  145. Proctor SJ, Mackie M, Dawson A, White J, Prescott RJ, Lucraft HL, et al. a population. *Eur J Cancer* [Internet]. 2002 Apr [cited 2016 Aug 27];38(6):795–806. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937314>
  146. Advani RH, Hoppe RT. XVIII. Management of nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol* [Internet]. 2015 Jun [cited 2016 Aug 27];33 Suppl 1:90–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26062064>
  147. Advani RH, Horning SJ, Hoppe RT, Daadi S, Allen J, Natkunam Y, et al. Mature results of a phase II study of rituximab therapy for nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Mar 20 [cited 2016 Aug 27];32(9):912–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516013>
  148. Radford J, Illidge T, Counsell N, Hancock B, Pettengell R, Johnson P, et al. RAPID trial Results of a trial of PET-directed therapy for early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2015;372(17):1598–607. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25901426>
  149. Raemaekers JMM, André MPE, Federico M, Girinsky T, Oumedaly R, Brusamolino E, et al. Omitting radiotherapy in early positron

- emission tomography-negative stage I/II Hodgkin lymphoma is associated with an increased risk of early relapse: Clinical results of the preplanned interim analysis of the randomized EORTC/LYSA/FIL H10 trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Apr 20 [cited 2016 Aug 28];32(12):1188–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637998>
150. le Maignan C, Desablens B, Delwail V, Dib M, Berthou C, Vigier M, et al. Three cycles of... *Blood* [Internet]. American Society of Hematology; 2004 Jan 1 [cited 2016 Aug 28];103(1):58–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907440>
  151. Pavone V, Ricardi U, Luminari S, Gobbi P, Federico M, Baldini L, et al. ABVD plus radiotherapy versus EVE plus radiotherapy in unfavorable stage IA and IIA Hodgkin's lymphoma: results from an Intergruppo Italiano Linfomi randomized study. *Ann Oncol* [Internet]. 2008 Apr [cited 2016 Aug 28];19(4):763–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18180244>
  152. Brillant C, Bauer K, Herbst C, Monsef I, Skoetz N, Engert A. Comparison of chemotherapy including escalated BEACOPP versus chemotherapy including ABVD for patients with early unfavourable or advanced stage Hodgkin lymphoma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2009.
  153. Sieniawski M, Reineke T, Nogova L, Josting A, Pfistner B, Diehl V, et al. Fertility in male patients with advanced Hodgkin lymphoma treated with BEACOPP: a report of the German Hodgkin Study Group (GHSG). *Blood* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2016 Aug 28];111(1):71–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17890456>
  154. Behringer K, Breuer K, Reineke T, May M, Nogova L, Klimm B, et al. Secondary amenorrhea after Hodgkin's lymphoma is influenced by age at treatment, stage of disease, chemotherapy regimen, and the use of oral contraceptives during therapy: a report from the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Oct 20 [cited 2016 Aug 28];23(30):7555–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16234521>
  155. Viviani S, Zinzani PL, Rambaldi A, Brusamolino E, Levis A, Bonfante V, et al. ABVD versus BEACOPP for Hodgkin's lymphoma when high-dose salvage is planned. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Jul 21 [cited 2016 Aug 28];365(3):203–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21774708>
  156. Fermé C, Mounier N, Casasnovas O, Brice P, Divine M, Sonet A, et al. Long-term results and competing risk analysis of the H89 trial in patients with advanced-stage Hodgkin lymphoma: a study by

- the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* [Internet]. 2006 Jun 15 [cited 2016 Aug 28];107(12):4636–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478882>
157. Picardi M, De Renzo A, Pane F, Nicolai E, Pacelli R, Salvatore M, et al. Randomized comparison of consolidation radiation versus observation in bulky Hodgkin's lymphoma with post-chemotherapy negative positron emission tomography scans. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2007 Sep [cited 2016 Aug 28];48(9):1721–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17786707>
  158. Yahalom J. Omitting radiotherapy after attaining FDG PET-negative status following chemotherapy alone for Hodgkin lymphoma: a randomized study caveat. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2007 Sep [cited 2016 Aug 28];48(9):1667–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17786699>
  159. Savage KJ, Skinnider B, Al-Mansour M, Sehn LH, Gascoyne RD, Connors JM. Treating limited-stage nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma similarly to classical Hodgkin lymphoma with ABVD may improve outcome. *Blood* [Internet]. 2011 Oct 27 [cited 2016 Aug 28];118(17):4585–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21873543>
  160. Federico M, Bellei M, Brice P, Brugiattelli M, Nagler A, Gisselbrecht C, et al. High-dose therapy and autologous stem-cell transplantation versus conventional therapy for patients with advanced Hodgkin's lymphoma responding to front-line therapy. *J Clin Oncol* [Internet]. 2003 Jun 15 [cited 2016 Aug 28];21(12):2320–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12805333>
  161. Arakelyan N, Berthou C, Desablens B, de Guibert S, Delwail V, Moles M-P, et al. Early versus cycles. *Cancer* [Internet]. 2008 Dec 15 [cited 2016 Aug 28];113(12):3323–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18988286>
  162. Byrne BJ, Gockerman JP. Salvage therapy in Hodgkin's lymphoma. *Oncologist* [Internet]. 2007 Feb [cited 2016 Aug 28];12(2):156–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17296811>
  163. Kuruvilla J. Standard therapy of advanced Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* [Internet]. 2009 [cited 2016 Aug 28];497–506. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20008235>
  164. Brice P, Bouabdallah R, Moreau P, Divine M, André M, Aoudjane M, et al. Prognostic factors for survival after high-dose therapy and autologous stem cell transplantation for patients with relapsing

- Hodgkin's disease: analysis of 280 patients from the French registry. Société Française de Greffe de Moëlle. Bone Marrow Transplant [Internet]. 1997 Jul [cited 2016 Aug 28];20(1):21–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9232251>
165. Josting A, Franklin J, May M, Koch P, Beykirch MK, Heinz J, et al. New prognostic score based on treatment outcome of patients with relapsed Hodgkin's lymphoma registered in the database of the German Hodgkin's lymphoma study group. J Clin Oncol [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2016 Aug 28];20(1):221–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773173>
  166. Moskowitz CH, Nimer SD, Zelenetz AD, Trippett T, Hedrick EE, Filippa DA, et al. A 2-step comprehensive high-dose chemoradiotherapy second-line program for relapsed and refractory Hodgkin disease: analysis by intent to treat and development of a prognostic model. Blood [Internet]. 2001 Feb 1 [cited 2016 Aug 28];97(3):616–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157476>
  167. Sureda A, Constans M, Iriondo A, Arranz R, Caballero MD, Vidal MJ, et al. Prognostic factors affecting long-term outcome after stem cell transplantation in Hodgkin's lymphoma autografted after a first relapse. Ann Oncol [Internet]. 2005 Apr [cited 2016 Aug 28];16(4):625–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15737986>
  168. Jabbour E, Hosing C, Ayers G, Nunez R, Anderlini P, Pro B, et al. Pretransplant positive positron emission tomography/gallium scans predict poor outcome in patients with recurrent/refractory Hodgkin lymphoma. Cancer [Internet]. 2007 Jun 15 [cited 2016 Aug 28];109(12):2481–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17497648>
  169. Moskowitz AJ, Yahalom J, Kewalramani T, Maragulia JC, Vanak JM, Zelenetz AD, et al. Pretransplantation functional imaging predicts outcome following autologous stem cell transplantation for relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. Blood [Internet]. 2010 Dec 2 [cited 2016 Aug 28];116(23):4934–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20733154>
  170. Longo DL, Duffey PL, Young RC, Hubbard SM, Ihde DC, Glatstein E, et al. Conventional-dose salvage combination chemotherapy in patients relapsing with Hodgkin's disease after combination chemotherapy: the low probability for cure. J Clin Oncol [Internet]. 1992 Feb [cited 2016 Aug 28];10(2):210–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1732422>
  171. Linch DC, Winfield D, Goldstone AH, Moir D, Hancock B, McMillan



- A, et al. Dose intensification with autologous bone-marrow transplantation in relapsed and resistant Hodgkin's disease: results of a BNLI randomised trial. *Lancet* (London, England) [Internet]. 1993 Apr 24 [cited 2016 Aug 28];341(8852):1051–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8096958>
172. Schmitz N, Pfistner B, Sextro M, Sieber M, Carella AM, Haenel M, et al. Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: a randomised trial. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2002 Jun 15 [cited 2016 Aug 28];359(9323):2065–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086759>
173. Brusamolino E, Carella AM. Treatment of refractory and relapsed Hodgkin's lymphoma: facts and perspectives. *Haematologica* [Internet]. 2007 Jan [cited 2016 Aug 28];92(1):6–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17229629>
174. Josting A, Rudolph C, Reiser M, Mapara M, Sieber M, Kirchner HH, et al. Time-intensified dexamethasone/cisplatin/cytarabine: an effective salvage therapy with low toxicity in patients with relapsed and refractory Hodgkin's disease. *Ann Oncol* [Internet]. 2002 Oct [cited 2016 Aug 28];13(10):1628–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377653>
175. Rodriguez J, Rodriguez MA, Fayad L, McLaughlin P, Swan F, Sarris A, et al. ASHAP: a regimen for cytoreduction of refractory or recurrent Hodgkin's disease. *Blood* [Internet]. 1999 Jun 1 [cited 2016 Aug 28];93(11):3632–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10339468>
176. Aparicio J, Segura A, Garcerá S, Oltra A, Santaballa A, Yuste A, et al. ESHAP is an active regimen for relapsing Hodgkin's disease. *Ann Oncol* [Internet]. 1999 May [cited 2016 Aug 28];10(5):593–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10416011>
177. Rodriguez MA, Cabanillas FC, Hagemeister FB, McLaughlin P, Romaguera JE, Swan F, et al. A phase II trial of mesna/ifosfamide, mitoxantrone and etoposide for refractory lymphomas. *Ann Oncol* [Internet]. 1995 Jul [cited 2016 Aug 28];6(6):609–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8573542>
178. Gutierrez A, Rodriguez J, Martinez-Serra J, Gines J, Paredes P, Garcia F, et al. Gemcitabine and oxaliplatin: an effective regimen in patients with refractory and relapsing Hodgkin lymphoma. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2014 [cited 2016 Aug 28];7:2093–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25419147>

179. Santoro A, Magagnoli M, Spina M, Pinotti G, Siracusano L, Michieli M, et al. Ifosfamide, gemcitabine, and vinorelbine: a new induction regimen for refractory and relapsed Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* [Internet]. 2007 Jan [cited 2016 Aug 28];92(1):35–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17229633>
180. Martín A, Fernández-Jiménez MC, Caballero MD, Canales MA, Pérez-Simón JA, García de Bustos J, et al. Long-term follow-up in patients treated with Mini-BEAM as salvage therapy for relapsed or refractory Hodgkin's disease. *Br J Haematol* [Internet]. 2001 Apr [cited 2016 Aug 28];113(1):161–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328296>
181. Brusamolino E, Bacigalupo A, Barosi G, Biti G, Gobbi PG, Levis A, et al. Classical Hodgkin's lymphoma in adults: guidelines of the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology, and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation on initial work-up, management, and follow-up. *Haematologica* [Internet]. 2009 Apr [cited 2016 Aug 28];94(4):550–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19278966>
182. André M, Henry-Amar M, Pico JL, Brice P, Blaise D, Kuentz M, et al. Comparison of high-dose therapy and autologous stem-cell transplantation with conventional therapy for Hodgkin's disease induction failure: a case-control study. *Société Française de Greffe de Moelle. J Clin Oncol* [Internet]. 1999 Jan [cited 2016 Aug 28];17(1):222–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458237>
183. Tarella C, Cuttica A, Vitolo U, Liberati M, Di Nicola M, Cortelazzo S, et al. High-dose sequential chemotherapy. *Cancer* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2016 Aug 28];97(11):2748–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12767087>
184. Sureda A, Arranz R, Iriando A, Carreras E, Lahuerta JJ, García-Conde J, et al. Autologous stem-cell transplantation for Hodgkin's disease: results and prognostic factors in 494 patients from the Grupo Español de Linfomas/Transplante Autólogo de Médula Osea Spanish Cooperative Group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2016 Aug 28];19(5):1395–404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230484>
185. Sweetenham JW, Carella AM, Taghipour G, Cunningham D, Marcus R, Della Volpe A, et al. High-dose therapy and autologous stem-cell. *J Clin Oncol* [Internet]. 1999 Oct [cited 2016 Aug 28];17(10):3101–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10506605>

186. Lazarus HM, Rowlings PA, Zhang MJ, Vose JM, Armitage JO, Bierman PJ, et al. Autotransplants for Hodgkin's disease in patients never achieving remission: a report from the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol* [Internet]. 1999 Feb [cited 2016 Aug 28];17(2):534–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10080597>
187. Chopra R, McMillan AK, Linch DC, Yuklea S, Taghipour G, Pearce R, et al. The place of high-dose BEAM therapy and autologous bone marrow transplantation in poor-risk Hodgkin's disease. A single-center eight-year study of 155 patients. *Blood* [Internet]. 1993 Mar 1 [cited 2016 Aug 28];81(5):1137–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8443375>
188. Caballero MD, Rubio V, Rifon J, Heras I, García-Sanz R, Vázquez L, et al. BEAM chemotherapy followed by autologous stem cell support in lymphoma patients: analysis of efficacy, toxicity and prognostic factors. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 1997 Sep [cited 2016 Aug 28];20(6):451–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9313877>
189. Benekli M, Smiley SL, Younis T, Czuczman MS, Hernandez-Ilizaliturri F, Bambach B, et al. Intensive conditioning regimen of etoposide (VP-16), cyclophosphamide and carmustine (VCB) followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation for relapsed and refractory Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2008 Apr [cited 2016 Aug 28];41(7):613–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18071290>
190. Wadehra N, Farag S, Bolwell B, Elder P, Penza S, Kalaycio M, et al. Long-term outcome of Hodgkin disease patients following high-dose busulfan, etoposide, cyclophosphamide, and autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2006 Dec [cited 2016 Aug 28];12(12):1343–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17162217>
191. Josting A, Müller H, Borchmann P, Baars JW, Metzner B, Döhner H, et al. Dose intensity of chemotherapy in patients with relapsed Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2016 Aug 28];28(34):5074–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20975066>
192. Fung HC, Stiff P, Schriber J, Toor A, Smith E, Rodriguez T, et al. Tandem autologous stem cell transplantation for patients with primary refractory or poor risk recurrent Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2007 May [cited 2016 Aug 28];13(5):594–600. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17448919>

193. Castagna L, Magagnoli M, Balzarotti M, Sarina B, Siracusano L, Nozza A, et al. Tandem high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in refractory/relapsed Hodgkin's lymphoma: a monocenter prospective study. *Am J Hematol* [Internet]. 2007 Feb [cited 2016 Aug 28];82(2):122–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17019686>
194. Brice P, Divine M, Simon D, Coiffier B, Leblond V, Simon M, et al. Feasibility of tandem autologous stem-cell transplantation (ASCT) in induction failure or very unfavorable (UF) relapse from Hodgkin's disease (HD). SFGM/GELA Study Group. *Ann Oncol* [Internet]. 1999 Dec [cited 2016 Aug 28];10(12):1485–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10643540>
195. Morschhauser F, Brice P, Fermé C, Diviné M, Salles G, Bouabdallah R, et al. Risk-adapted salvage treatment with single or tandem autologous stem-cell transplantation for first relapse/refractory Hodgkin's lymphoma: results of the prospective multicenter H96 trial by the GELA/SFGM study group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Dec 20 [cited 2016 Aug 28];26(36):5980–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19018090>
196. Josting A, Nogová L, Franklin J, Glossmann J-P, Eich HT, Sieber M, et al. Salvage radiotherapy in patients with relapsed and refractory Hodgkin's lymphoma: a retrospective analysis from the German Hodgkin Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2016 Aug 28];23(7):1522–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15632410>
197. Moskowitz AJ, Perales M-A, Kewalramani T, Yahalom J, Castro-Malaspina H, Zhang Z, et al. Outcomes for patients who fail high dose chemoradiotherapy and autologous stem cell rescue for relapsed and primary refractory Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2016 Aug 28];146(2):158–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19438504>
198. Gajewski JL, Phillips GL, Sobocinski KA, Armitage JO, Gale RP, Champlin RE, et al. Bone marrow transplants from HLA-identical siblings in advanced Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* [Internet]. 1996 Feb [cited 2016 Aug 28];14(2):572–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8636773>
199. Milpied N, Fielding AK, Pearce RM, Ernst P, Goldstone AH. Allogeneic bone marrow transplant is not better than autologous transplant for patients with relapsed Hodgkin's disease. European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation. *J Clin Oncol* [Internet]. 1996 Apr [cited 2016 Aug 28];14(4):1291–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8648386>

200. Corradini P, Sarina B, Farina L. Allogeneic transplantation for Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* [Internet]. 2011 Feb [cited 2016 Aug 28];152(3):261–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21155760>
201. Peggs KS, Hunter A, Chopra R, Parker A, Mahendra P, Milligan D, et al. Clinical evidence of a graft-versus-Hodgkin's-lymphoma effect after reduced-intensity allogeneic transplantation. *Lancet* (London, England) [Internet]. [cited 2016 Aug 28];365(9475):1934–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15936420>
202. Alvarez I, Sureda A, Caballero MD, Urbano-Ispizua A, Ribera JM, Canales M, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation is an effective therapy for refractory or relapsed hodgkin lymphoma: results of a spanish prospective cooperative protocol. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2006 Feb [cited 2016 Aug 28];12(2):172–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16443515>
203. Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2010 Feb [cited 2016 Aug 28];45(2):219–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584824>
204. Robinson SP, Sureda A, Canals C, Russell N, Caballero D, Bacigalupo A, et al. Reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for Hodgkin's lymphoma: identification of prognostic factors predicting outcome. *Haematologica* [Internet]. 2009 Feb [cited 2016 Aug 28];94(2):230–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066328>
205. Peggs KS, Kayani I, Edwards N, Kottaridis P, Goldstone AH, Linch DC, et al. Donor lymphocyte infusions modulate relapse risk in mixed chimeras and induce durable salvage in relapsed patients after T-cell-depleted allogeneic transplantation for Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 Mar 10 [cited 2016 Aug 28];29(8):971–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282545>
206. Sureda A, Pereira MIB, Dreger P, Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. The role of hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma. *Curr Opin Oncol* [Internet]. 2012 Nov [cited 2016 Aug 28];24(6):727–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23079783>
207. Wang D, Guo X-Z, Li H-Y, Zhao J-J, Shao X-D, Wu C-Y.

- Prognostic significance of cyclooxygenase-2 protein in pancreatic cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol* [Internet]. 2014 Oct [cited 2016 Aug 28];35(10):10301–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25034525>
208. Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem*. 2000;275(15):11397–403.
  209. Sicking I, Rommens K, Battista MJ, Böhm D, Gebhard S, Lebrecht A, et al. Prognostic influence of cyclooxygenase-2 protein and mRNA expression in node-negative breast cancer patients. *BMC Cancer* [Internet]. 2014 [cited 2016 Aug 28];14:952. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25511800>
  210. Koh YW, Park C, Yoon DH, Suh C, Huh J. Prognostic Significance of COX-2 Expression and Correlation With Bcl-2 and VEGF Expression. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(8):1242–51.
  211. Dimtsas GS, Georgiadi EC, Karakitsos P, Vassilakopoulos TP, Thymara I, Korkolopoulou P, et al. Prognostic significance of immunohistochemical expression. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2014 Mar [cited 2016 Aug 28];55(3):558–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23772669>
  212. Koh YW, Park C, Yoon DH, Suh C, Huh J. Prognostic significance of COX-2 expression and correlation with Bcl-2 and VEGF expression, microvessel density, and clinical variables in classical Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2013 Aug [cited 2016 Aug 23];37(8):1242–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23851330>
  213. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2001;41:661–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264472>
  214. Reader J, Holt D, Fulton A. Prostaglandin E2 EP receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2011;30(3-4):449–63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3640271&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  215. Woodgett JR. Regulation and functions of the glycogen synthase kinase-3 subfamily. [Internet]. Vol. 5, *Seminars in cancer biology*. 1994. p. 269–75. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2570553&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  216. Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective

- cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* [Internet]. 1998;58(19):4245–9. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9766645](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9766645)
217. Rundhaug JE, Simper MS, Surh I, Fischer SM. The role of the EP receptors for prostaglandin E2 in skin and skin cancer. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2011 Dec [cited 2016 Aug 23];30(3-4):465–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22012553>
218. Ji B, Liu Y, Zhang P, Wang Y, Wang G. COX-2 expression and tumor angiogenesis in thyroid carcinoma patients among northeast Chinese population-result of a single-center study. *Int J Med Sci*. 2012;9(3):237–42.
219. Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, et al. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as of Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res*. 2000;60(17):4705–8.
220. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc(??716) knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*. 1996;87(5):803–9.
221. Ohsawa M, Fukushima H, Ikura Y, Inoue T, Shirai N, Sugama Y, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in Hodgkin's lymphoma: its role in cell proliferation and angiogenesis. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2006 Sep [cited 2016 Aug 23];47(9):1863–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17064999>
222. Szczuraszek K, Materna V, Halon A, Mazur G, Wróbel T, Kuliczowski K, et al. Positive correlation between cyclooxygenase-2 and ABC-transporter expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Oncol Rep*. 2009;22(6):1315–23.
223. Mestre F, Gutiérrez A, Rodríguez J, Ramos R, Garcia JF, Martínez-Serra J, et al. Radiation therapy overcomes adverse prognostic role of cyclooxygenase-2 expression on Reed-Sternberg cells in early Hodgkin lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2015 May 1;92(1):84–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25475251>

## **4. ANEXOS**

**4.1. Publicación:** Mestre F, Gutierrez A, Ramos R, Martinez-Serra J, Sánchez L, Matheu G, et al. Expression of COX-2 on reed-sternberg cells is an independent unfavorable prognostic factor in Hodgkin lymphoma treated with ABVD. *Blood*. 2012;119(25):6072–9.



**TITLE:** Expression of COX-2 on Reed-Sternberg cells is an independent unfavorable prognostic factor in Hodgkin lymphoma treated with ABVD

**RUNNING HEAD:** Prognostic value of COX-2 on Reed-Sternberg cells

**AUTHORS:** Francisco Mestre<sup>1\*</sup>, Antonio Gutierrez<sup>2\*</sup>, Rafael Ramos<sup>3</sup>, Jordi Martinez-Serra<sup>2</sup>, Lydia Sánchez<sup>4</sup>, Gabriel Matheu<sup>5</sup>, Teresa Ros<sup>2</sup>, Juan Fernando Garcia<sup>4</sup> and Jose Rodriguez<sup>6</sup>.

\* Both authors contributed equally to this paper

**AFFILIATIONS:** <sup>1</sup>Dept. of Radiotherapy; <sup>2</sup>Dept. of Hematology; <sup>3</sup>Dept. of Pathology, University Hospital Son Espases, Palma de Mallorca, Balearic Islands; <sup>4</sup>Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid; <sup>5</sup>Dept. of Pathology, Fundación Hospital de Manacor, Balearic Islands; <sup>6</sup>Dept. of Internal Medicine. University Hospital Severo Ochoa. Leganes, Madrid. Spain.

**CORRESPONDING AUTHOR'S CONTACT INFORMATION:** Dr. J. Rodríguez, Dept. of Internal Medicine. University Hospital Severo Ochoa. Avenida de Orellana s/n. 28911 Leganes, Madrid. Phone: 34-914-818000. E-mail: joseguez89@hotmail.com

**WORD COUNTS:**

## TESIS DOCTORAL

- Text: 2670
- Abstract: 191
- Figures: 3
- Tables: 4
- References: 34

**SCIENTIFIC CATEGORY:** lymphoid neoplasia

## **ABSTRACT**

Cyclooxygenase 2 (COX-2) is an inflammatory enzyme involved in pathogenesis and prognosis of several malignancies. We aim to investigate the prognostic value of COX-2 expression in a large (n=242), uniformly treated HL population from the Spanish Network of HL using tissue microarrays. Univariate and multivariate analysis was done including most recognized clinical variables, considering the early and advanced stage subgroups. COX-2 was expressed on Reed-Sternberg (RS) cells in 37% of patients. There were no differences in the distribution of clinical variables according to COX-2 expression. With a median follow up of 58 months, PFS at 5 years was 60% and 79% for COX-2 positive and COX-2 negative patients respectively ( $p=0.003$ ). OS was 73% and 91% respectively ( $p<0.001$ ). The major impact on prognosis was observed in the early AA stage (I-II) group. In fact, in these low risk groups the expression of COX-2 defined a group of significantly worse PFS and OS. In conclusion, COX-2 was expressed on RS cells in a third of HL patients and was a major independent unfavorable prognostic factor in early stage HL. COX-2 may be a major prognostic variable in HL and a potential therapeutic target.

## INTRODUCTION

Hodgkin lymphoma (HL) represents 10-15% of all types of lymphoma<sup>1</sup>. At present, around 80%-90% of patients in early and limited stages can be cured<sup>2</sup>. In fact, the behavior of the disease is determined by intrinsic features of tumor cells, Reed-Sternberg (RS) cells, and the characteristics of the tumor microenvironment. This microenvironment is basically composed of several other cell populations associated with their respective extracellular matrix compartment, which includes a deregulated cytokine network with secretion of inflammatory cytokines<sup>3,4</sup>. Recently, an increased number of tumor-associated macrophages have been related to short survival, representing a new biomarker for risk prediction<sup>5</sup>.

COX-2 is an inflammation-associated enzyme involved in the pathogenesis and prognosis of several solid malignancies (colorectal, breast, ovarian, lung and others)<sup>6,7</sup>. Its role in hematological malignancies has been recently recognized<sup>8,9</sup>. It has been reported that COX-2 constitutes an independent prognostic variable in multiple myeloma<sup>10</sup> and also that a significant proportion of HL patients express COX-2, as this expression is associated with proliferation and angiogenesis<sup>8</sup>. Furthermore, it is claimed that COX-2 upregulates several key survival and pro-angiogenic factors, which contribute to tumor growth and survival<sup>11</sup>.

Aside from the aforementioned prognostic value in multiple myeloma, its prognostic value has not been studied in any other hematological malignancy. Current Prognostic indexes in this disease are based on clinical variables<sup>12</sup>; however, it could be interesting to evaluate biological markers for both the RS malignant cell

and the inflammatory microenvironment that could add prognostic and pathogenic information to the known important clinical variables in this disease.

Thus, given the characteristic pro-inflammatory milieu of HL we investigated the prognostic value of COX-2 expression in a large series of uniformly treated HL patients with the standard ABVD regimen with or without radiotherapy (RT).

## **METHODS**

### **Patients**

We retrospectively included 242 patients uniformly treated with ABVD (2-8 cycles, in function of risk factors) with or without RT (more or less intensive regimens were excluded). All the samples were collected with the collaboration of the Spanish National Tumor Bank Network, coordinated by the Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), following the technical and ethical procedures of the network, including anonymization processes. Approval was obtained from the CNIO institutional review board. Informed consent was obtained in all cases.

All patients were treated with curative intent, pre-treatment specimens were adequate and information was available about staging and main clinical prognostic factors. Based on this information, international prognostic score could be determined for all patients. For early stage HL we included European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) prognostic factors defining favourable and unfavourable subsets<sup>13</sup>. Response assessment and follow-up was based on Cheson criteria<sup>14</sup>.

### **Tissue microarray (TMA) design**

Immunohistochemical expression of COX-2 was assessed using TMA technology. We used a Tissue Arrayer device (Beecher Instrument, Silver Spring, MD) as previously described<sup>15</sup>. Briefly, all HL cases were histologically reviewed and the richest areas of RS cells were marked in the paraffin blocks. In each case, 2 selected 1-mm-diameter cylinders from 2 different areas were included, along with different controls to ensure the quality, reproducibility, and homogenous staining of

the slides. Thus, 6 different TMA blocks were constructed, each containing 120-140 cylinders. Included in each TMA was a representation of reactive lymphoid tissue of tonsil as internal control and normal colon tissue as positive control for COX-2 expression (Figure 1D).

### **Immunohistochemistry**

TMA blocks were sectioned at a thickness of 3  $\mu\text{m}$  and dried for 16 hours at 56°C before being dewaxed in xylene and rehydrated through a graded ethanol series and washed with phosphate-buffered saline. Antigen retrieval was achieved by heat treatment in PT LINK with pH High buffer (DAKO).

Immunohistochemical staining for COX-2 was performed on these sections with pre-diluted rabbit monoclonal clone SP21 (Neomarkers, RM -9121-R7). The complete immunodetection system was performed on an Autostainer PLUS with EnVision FLEX kit, employing diaminobenzidine chromogen as substrate. Sections were counterstained with hematoxylin.

The staining of the TMA sections was evaluated by the consensus of 2 pathologists, using uniform criteria. In order to guarantee the reproducibility of this method, we decided to employ straightforward and clear-cut criteria. The pattern of staining for COX-2 was recorded as positive or negative taking into account the cytoplasmatic/membranous staining, being positive when more than 10% of RS cells expressed COX-2 (Figure 1). To consider a case evaluable for the study it should have at least 10 RS cells in at least one of the two core cylinders analyzed in each patient. The reproducibility of the results obtained was confirmed by

comparing them with those from whole sections in 34 randomly selected cases, stained using the same procedure.

### **Statistical methods**

To study the relationship between COX-2 and clinical variables we stratified the whole population in two cohorts (early and advanced HL). The Pearson chi-square test and Fisher exact test were used where appropriate. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were measured from the date of diagnosis and they were estimated according to the Kaplan-Meier method. Comparisons between the variables of interest were performed by the log-rank test. Multivariate analysis with the variables that appeared to be significant in the univariate analysis was performed according to the Cox proportional hazard regression model. All p-values reported were two-sided and statistical significance was defined at a p-value <0.05.

## **RESULTS**

### **Patients characteristics**

As shown in Table 1, median age was 31 and 36 years for early (n=143) and advanced (n=99) HL cohorts. Respectively, comparing these groups: 30% and 56% presented B symptoms, 30% and 27% had bulky disease and 6% and 16% had an ECOG PS higher than 1. For early HL, EORTC score was unfavorable in 84% of the patients. IPS was 3 or higher in 45% of patients with advanced disease. 124 patients (51%) received radiotherapy added to ABVD chemotherapy, 66% of these patients presenting with AA stage I-II and 30% presenting with AA stage III-IV. Histological subtypes were as follows: 62% nodular sclerosis classical HL (CHL),



32% mixed cellularity CHL, 3% lymphocyte-depleted CHL and 3% lymphocyte-rich CHL.

Most patients with high risk features such as III-IV AA stage (88%), with IPS >2 (93%) or bulky disease (93%) received 6-8 cycles of chemotherapy with or without involved field (IF) RT. In the localized I-II AA stage group, most of the patients with high risk features such as IPS>2 (89%) or bulky disease (95%) were consolidated with IF RT or received longer number of chemotherapy cycles. To control treatment variability we analysed it by considering short (2-4 cycles) and long (6-8 cycles) treatments in all outcome statistical analysis. As treatment was adapted considering stage and risk features it had no influence on outcome, as shown on Tables 2, 3 and 4.

### **COX-2 expression**

We evaluated COX-2 cytoplasmatic/membranous staining in RS cells. An analysis comparing the results obtained using TMAs and the whole sections in 34 randomly selected cases showed a concordance of 88%, a figure that accords with previously reported results for other tumoral models<sup>16</sup>. Additionally, intraobserver and interobserver reproducibility were 97% and 90%.

COX-2 staining on RS cells was as follows: 89 patients (37%) showed positive stain while 153 (63%) had no staining. Considering clinical variables, COX-2 staining was not related with any of them. However, there was a trend towards a higher positivity percentage with a higher AA stage ( $p=0.074$ ) and this trend was also observed in the nodular sclerosis and lymphocyte-depleted subtypes ( $p=0.088$ ).

**Outcome and survival analysis of the global group**

With a median follow up of 58 months (8-199) for patients alive, the variables age higher than 60 years, presence of B symptoms, AA stage III-IV, PS  $\geq 2$ , no radiotherapy and COX-2 expression were associated with an unfavorable PFS and OS (Table 2). The PFS at 5 years were 60% and 79% for COX-2 positive and negative respectively ( $p=0.003$ ), while OS at 5 years were 73% and 91% ( $p<0.001$ ), respectively. By multivariate analysis B symptoms (HR 2.04), COX-2 expression (HR 1.91), age  $\geq 60$  years (HR 1.89) and radiotherapy (HR 0.54) were independently associated with PFS, while age  $\geq 60$  (HR 4.34), ECOG PS  $> 1$  (HR 4) and COX-2 expression (HR 2.95) were independently associated to OS. RS positive COX-2 staining was not different in patients responding to first line therapy with CR (35%) and less than CR cases (48%) ( $p=0.17$ ).

**Outcome and survival subanalysis according to AA stage**

In Tables 3 and 4 we present a subanalysis of PFS and OS of patients with localized (I-II AA stage) and advanced (III-IV AA stage) HL. Interestingly, the major impact in the prognosis was observed in the favorable AA stage (I-II) group. In fact, in these low risk groups the expression of COX-2 defines a subgroup of significantly worse prognosis. Accordingly, the 46 (32%) COX-2 positive patients of the 143 patients presenting with an AA stage I-II had a PFS at 5 years of 72% versus 86% of those COX-2 negative ( $p=0.017$ ). Similarly, the OS at 5 years also differs for both groups with 82% and 94% for COX-2 positive and negative respectively ( $p=0.004$ ). By multivariate analysis COX-2 expression (HR 2.76), B symptoms (HR 2.34) and administration of radiotherapy (HR 0.32) were independently associated with PFS

(Figure 2A), while only ECOG PS (HR 9) and COX-2 RS expression (HR 4.81) were independently associated to OS (Figure 2B). EORTC unfavorable subset tended to have a worse PFS and OS, but without reaching statistical significance. This may be related to the fact that we could only obtain this information in 83 of the 143 (58%) patients with early HL.

For patients with advanced HL, only IPS >2 (HR 2.88) was independently associated to a worse PFS while age higher than 60 years (HR 5.07) and ECOG PS > 1 (HR 3.38) were independently associated to OS (Figure 3A). In this advanced stage population COX-2 RS expression only showed a tendency to a worse PFS and OS (Table 4; Figure 3B).

## DISCUSSION

More than 70% of patients with HL can be cured with currently available therapeutic strategies<sup>17</sup>. Current risk systems are able to properly identify patients with worse prognosis in advanced stages of the disease. However, the use of prognostic factors is much less uniform in early HL. While trials and recommendations in the United States and the United Kingdom often distinguish between nonbulky and bulky early stage HL, the EORTC defines distinct risk subsets for adapting the intensity of treatment<sup>13</sup>. So, in patients with early stage HL is particularly important to find prognostic factors associated to a worse outcome.

As far as we know, our finding of COX-2 expression associated with poor prognosis in HL is the first observation in this disease. In solid tumors (head and neck, ovarian, breast, lung, etc) this relationship between COX-2 expression and poor prognosis has been associated with pathogenic phenomena such as induction of angiogenesis, chemoresistance through induction of antiapoptotic mechanisms such as upregulation of bcl-2 or resistance to Fas, or promotion of invasion through induction of some metalloproteinases<sup>18</sup>. Its role in HL is basically unknown, although it has been associated with higher proliferation and angiogenesis<sup>8</sup>. In our work we observed that RS cells express this marker in around one third of cases.

It may be that the COX-2 pathway is important in the pathogenesis of this disease characterized by a small tumor cell population in a milieu composed of a deregulated cytokine and chemokine network and several proinflammatory and immune cell populations, which contribute to the maintenance of the neoplasia by several antiapoptotic and survival mechanisms<sup>19</sup>. Our findings of its value as a key

prognostic biomarker in this disease are important because current risk systems are based on clinical variables, thus relevant biological information could be important to implement new and more specific therapies. Moreover, our identification of a sizable group of around 30% of patients who have a significantly worse prognosis because they express COX-2 is important to implement new therapeutic strategies.

Furthermore, the identification of a subgroup in the limited stages of the disease may facilitate decisions in two opposite directions. On one hand the COX-2 negative subgroup with an OS of 94% and a PFS of 82% may be the target of trials focusing on limiting treatment toxicity while maintaining efficacy. Conversely, the COX-2 positive subgroup with a PFS of 73% even in this apparently excellent prognostic group may need a more intense therapy than currently performed, such as a higher number of ABVD cycles, more intensive regimens as BEACOPP, or, alternatively, testing the use of novel agents targeting this pathogenic pathway. This is important because in limited stages or low risk groups of HL no prognostic risk factor system published so far can reliably identify patients with worse prognosis. Furthermore, we discarded a potential bias associated to the possibility that some patients requiring more treatment could be undertreated. In fact, outcome was not worse in patients receiving short treatments both in the univariate and multivariate analysis as shown on Tables 2, 3 and 4, as this decision was taken considering stage and risk features.

However, in the advanced disease groups we could only observe a trend towards a lower OS and PFS in patients expressing COX-2 (Figure 3B). Perhaps, multiple

biological derangements in these advanced stages of the disease make this single biomarker unable to provide meaningful independent information. Another potential explanation is that the increased therapies these patients are receiving may overcome the COX-2 positive phenotype. For this reason these patients could also benefit from more intense regimens such as BEACOPP, frontline ASCT or novel agents.

We cannot determine why COX-2 expression is important in this disease based on this current study. The pathogenic importance of COX-2 has been reported in the more comprehensively studied solid tumors. In fact, COX-2 expression has been associated with several antiapoptotic pathways, such as induction of bcl-2 and subsequent survival mechanisms, or by induction of ATM and ATR in some solid tumors<sup>20</sup>. Furthermore, COX-2 has been associated with chemoresistance and radiation resistance by inducing neo angiogenesis and also due to its strong correlation with the expression of the MDR gene<sup>21</sup>.

Nevertheless, the specific role of the COX-2 pathway in the pathogenesis of hematological malignancies is not known. For example, Ladetto et al reported the association of COX-2 expression and poor prognosis in multiple myeloma and suggested a reciprocal interaction of COX-2 and IL-6, which is a major biomarker involved in the pathogenesis of multiple myeloma<sup>10</sup>. In fact, both COX-2 and IL-6 upregulate each other reciprocally, speculating the possibility of a biological loop. Interestingly, IL-6 is a reported unfavorable prognostic marker of HL<sup>22</sup>. In the same way as COX-2 indirectly induces VEGF through induction of HIF-alfa, an association of COX-2 and promotion of angiogenesis has been proposed.

Moreover, the adverse prognosis that markers of neo-angiogenesis confer to patients with HL is much more established<sup>23-26</sup>.

Given the importance of COX-2 as a prognostic biomarker and given the probability that it plays an important pathogenic role in this disease, one wonders whether it could be used as therapeutic target as it is already in solid tumors with promising efficacy<sup>27,28</sup>. However, the presently available COX-2 inhibitors have serious potential toxicity, making their introduction difficult in the clinical practice of HL<sup>29,30</sup>. Interestingly, Fujita et al recently reported inhibition of COX-2 by thalidomide and other immunomodulatory drugs<sup>31</sup>. Lenalidomide has demonstrated promising efficacy in HL<sup>32</sup>, thus it may be associated with COX-2 inhibition among other multiple effects and COX-2 may be a predictor of efficacy for this drug. This is another example of the new paradigm of tumor treatment by targeting the tumor microenvironment. In HL this therapeutic approach was used by Younes et al, as they incorporated Rituximab targeting the B-cell component of the tumor in the current ABVD regimen<sup>33,34</sup>.

In summary, for the first time we herein report the value of RS COX-2 expression as a prognostic factor in HL. We have identified a hidden subgroup of patients with theoretically excellent prognosis, but indeed having a significantly worse prognosis associated to the expression of this marker. Its use as meaningful prognostic variable and potential therapeutic target needs to be confirmed in other independent series. If both facts are confirmed, trials incorporating drugs that inhibit its expression are warranted.





## REFERENCES

1. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon; 2008.
2. Armitage JO. Early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010;363:653-662.
3. Hsi ED. Biologic features of Hodgkin lymphoma and the development of biologic prognostic factors in Hodgkin lymphoma: tumor and microenvironment. *Leuk Lymphoma*. 2008;49:1668-1680.
4. Herreros B, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Lymphoma microenvironment: culprit or innocent? *Leukemia*. 2008;22:49-58.
5. Steidl C, Lee T, Shah SP, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010;362:875-885.
6. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*. 1999;18:7908-7916.
7. Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001;127:411-417.
8. Ohsawa M, Fukushima H, Ikura Y, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in Hodgkin's lymphoma: its role in cell proliferation and angiogenesis. *Leuk Lymphoma*. 2006;47:1863-1871.
9. Paydas S, Ergin M, Erdogan S, Seydaoglu G. Cyclooxygenase-2 expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 2007;48:389-395.
10. Ladetto M, Vallet S, Trojan A, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is frequently expressed in multiple myeloma and is an independent predictor of poor outcome. *Blood*. 2005;105:4784-4791.
11. Wun T, McKnight H, Tuscano JM. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. *Leuk Res*. 2004;28:179-190.
12. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med*. 1998;339:1506-1514.
13. Eghbali H, Raemaekers J, Carde P. The EORTC strategy in the treatment of Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol*. 2005;75 (Suppl. 66):135-140.
14. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol*. 1999;17:1244.
15. Garcia JF, Camacho FI, Morente M, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood*. 2003;101:681-689.
16. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*. 2001;195:72-79.
17. Evens AM, Hutchings M, Diehl V. Treatment of Hodgkin lymphoma: the past, present, and future. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008;5:543-556.
18. Meric JB, Rottey S, Olausen K, et al. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;59:51-64.
19. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002;99:4283-4297.

20. Kim YM, Lee EJ, Park SY, Cho KH, Kim JY, Pyo H. Cyclooxygenase-2 up-regulates ataxia telangiectasia and Rad3 related through extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol Cancer Res.* 2009;7:1158-1168.
21. Ratnasinghe D, Daschner PJ, Anver MR, et al. Cyclooxygenase-2, P-glycoprotein-170 and drug resistance; is chemoprevention against multidrug resistance possible? *Anticancer Res.* 2001;21:2141-2147.
22. Kurzrock R, Redman J, Cabanillas F, Jones D, Rothberg J, Talpaz M. Serum interleukin 6 levels are elevated in lymphoma patients and correlate with survival in advanced Hodgkin's disease and with B symptoms. *Cancer Res.* 1993;53:2118-2122.
23. Giles FJ, Vose JM, Do KA, et al. Clinical relevance of circulating angiogenic factors in patients with non-Hodgkin's lymphoma or Hodgkin's lymphoma. *Leuk Res.* 2004;28:595-604.
24. Passam FH, Alexandrakis MG, Kafousi M, et al. Histological expression of angiogenic factors: VEGF, PDGFRalpha, and HIF-1alpha in Hodgkin lymphoma. *Pathol Res Pract.* 2009;205:11-20.
25. Gutierrez A, Mestre F, Ramos R, et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression by Neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg Cells Is An Independent Adverse Prognostic Factor for Relapse in Hodgkin Lymphoma *Blood.* 2009;114:1561.
26. Reiners KS, Gossman A, von Strandmann EP, Boll B, Engert A, Borchmann P. Effects of the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab in a preclinical model and in patients with refractory and multiple relapsed Hodgkin lymphoma. *J Immunother.* 2009;32:508-512.
27. Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, et al. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21:2645-2650.
28. Chow LW, Wong JL, Toi M. Celecoxib anti-aromatase neoadjuvant (CAAN) trial for locally advanced breast cancer: preliminary report. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;86:443-447.
29. Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA, et al. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med.* 2005;352:1071-1080.
30. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *Jama.* 2001;286:954-959.
31. Fujita J, Mestre JR, Zeldis JB, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Thalidomide and its analogues inhibit lipopolysaccharide-mediated induction of cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res.* 2001;7:3349-3355.
32. Boll B, Borchmann P, Topp MS, et al. Lenalidomide in patients with refractory or multiple relapsed Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2010;148:480-482.
33. Younes A, Romaguera J, Hagemeister F, et al. A pilot study of rituximab in patients with recurrent, classic Hodgkin disease. *Cancer.* 2003;98:310-314.
34. Oki Y, Younes A. Does rituximab have a place in treating classic hodgkin lymphoma? *Curr Hematol Malig Rep.* 2010;5:135-139.

## ACKNOWLEDGMENTS

Grant support: Grant DGAVAL\_PI\_044/10 from Govern Illes Balears and Research Project Grant from Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)-Junta Balears 7/2010.

The following centres and investigators participate in the Spanish Hodgkin Lymphoma Study Group and contribute to the studies with tumor samples and clinical data: R. Ramos, A. Gutiérrez, J. Rodríguez, F. Mestre (Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca); P. Domínguez, C. Jara (Fundación Hospital Alcorcón, Madrid); M. J. Mestre, R. Quibén, M. Méndez, L. Borbolla (Hospital de Móstoles, Madrid); M. A. Martínez, C. Grande (Hospital 12 de Octubre, Madrid); M. García-Cosío, C. Montalbán, J. García-Laraña (Hospital Ramón y Cajal, Madrid); M. Canales, J. Alves (Hospital La Paz, Madrid); C. Bellas, M. Provencio (Hospital Puerta de Hierro, Madrid); A. Castaño, P. Sánchez-Godoy (Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid); C. Martín, R. Martínez (Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid); J. Menárguez, P. Sabín, E. Flores (Hospital Gregorio Marañón, Madrid); J. González-Carrero, C. Poderós (Hospital Xeral-Cies, Vigo); A. Salar, S. Serrano (Hospital del Mar, Barcelona); T. Álvaro, L. Font (Hospital Verge de la Cinta, Tortosa); V. Romagosa, A. Fernández de Sevilla (Hospital Duran i Reynolds, Institut Catala d'Oncologia, Barcelona); M. Mollejo, M. A. Cruz (Hospital Virgen de la Salud, Toledo); A. Cánovas, C. Camarero (Hospital de Cruces, Baracaldo). H. Álvarez-Arguelles, M. Llanos (Hospital Universitario Canarias, Tenerife); R. Arranz, A. Acevedo (Hospital La Princesa, Madrid); R. García-Sanz, T. Flores (Hospital Universitario de Salamanca); C. Morante (Hospital Cabueñes, Gijón); A. Marín, E. Ríos (Hospital Virgen del Rocío, Seville); F. Mazorra, E. Conde (Hospital Marqués de Valdecilla, Santander); M. F. Fresno, C. Rayón, C. Nicolás (Hospital Central de Asturias, Oviedo); C. Santonja, Jose L. López (Fundación Jiménez Díaz, Madrid); T. Flores, R. García-Sanz (Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca); J. Guma (Hospital Sant Joan, Reus); P. Gonzalvo (Hospital Comarcal de Jarrio, Coaña); G. Fernández (Hospital Alvarez Buylla, Mieres); J. Forteza, M. Fraga, J. L. Bello (F Med Santiago de Compostela); A. Bas (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia); J. R. Méndez (Hospital Valle de Nalón, Asturias); J.F. Tomás, M. Estevez (MD Anderson España, Madrid); C. Ruiz-Marcellán, A. López (Hospital Vall d'Hebron) and J. F. García, M. M. Morente and M. A. Piris (CNIO, Madrid).

## **AUTHORSHIP**

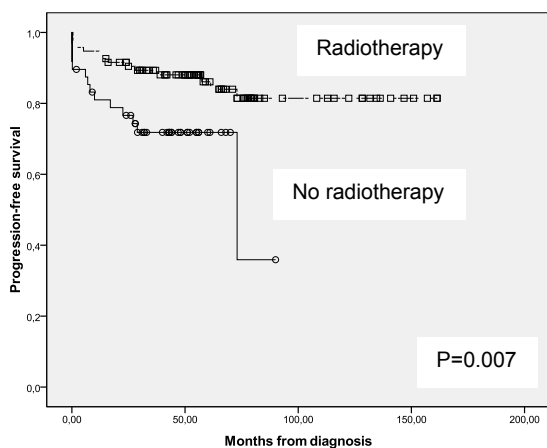
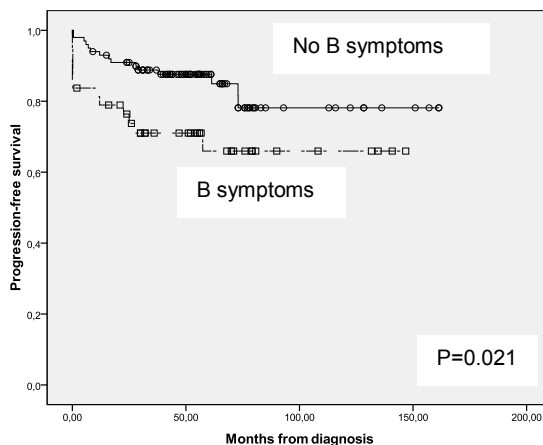
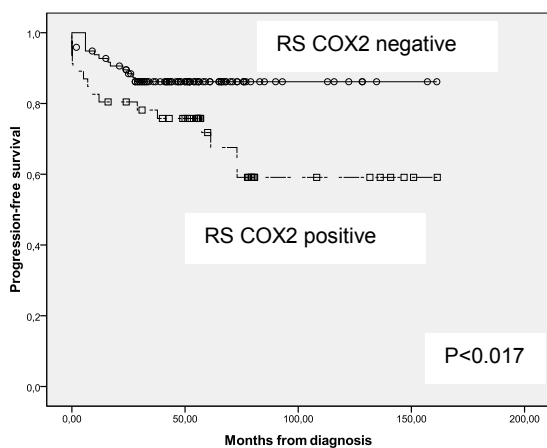
Contribution: FM, AGG, JMS, TR, JR collected and analyzed data; AGG and JR designed the research and wrote the paper; RR, LS, GM, JFG provided expert histopathologist analysis.

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

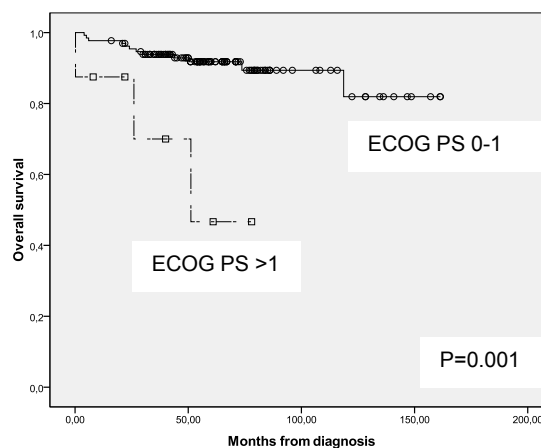
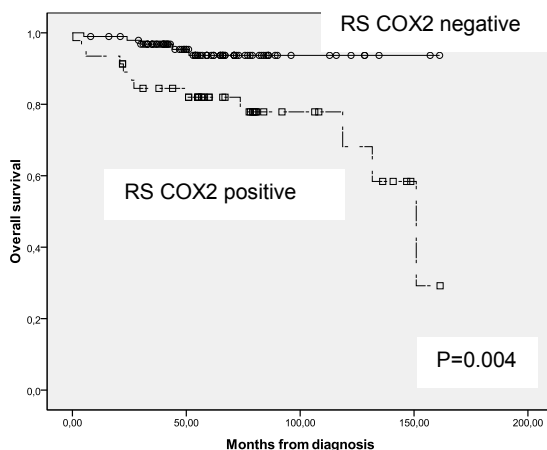
**Figure 1. Uniform criteria for evaluation of RS COX-2 staining.** Representative immunohistochemistry cases from the tissue microarrays of negative RS COX-2 staining (A), low positive RS COX-2 staining (B) or high positive RS COX-2 staining (C). All cases are presented at x40 magnification. Thin arrows: RS cells; arrow-heads: histiocytes; thick arrows: plasma cells. Colon mucosa was used as positive control for COX-2 expression (D).

**Figure 2. Prognostic factors independently associated with outcome in early stage patients. 2A: Prognostic factors associated with PFS; 2B: Prognostic factors associated with OS**

2A

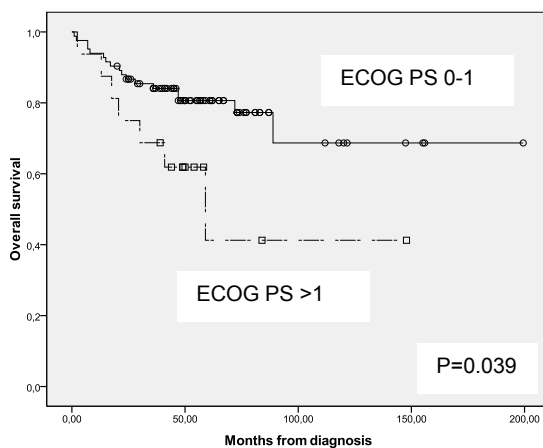
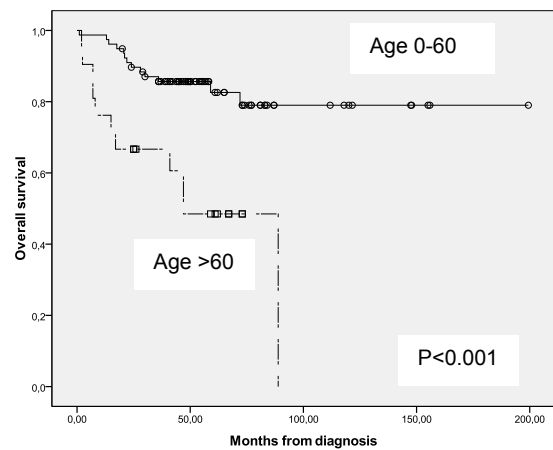
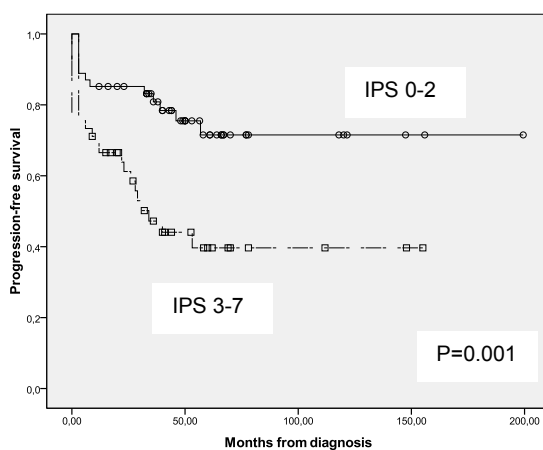


2B

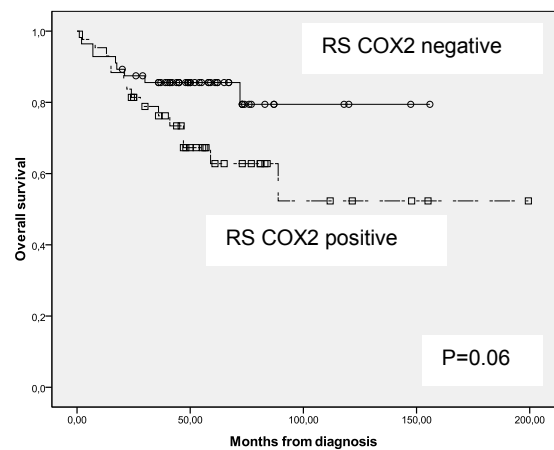
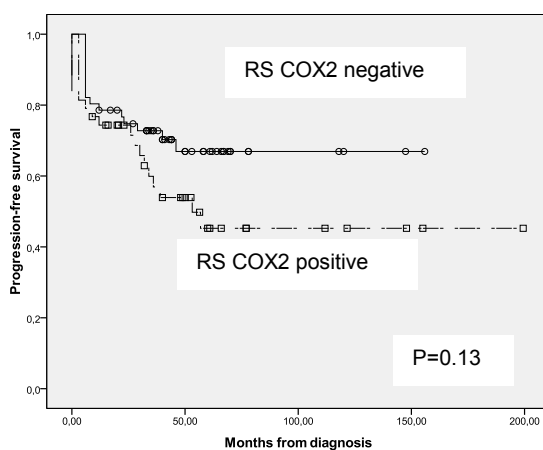


**Figure 3. Prognostic factors independently associated with outcome in advanced stage patients.** 3A: Prognostic factors associated with PFS and OS; 3B: Role of COX-2 RS expression in advanced HL

3A



3B



**Table 1.** Characteristics of patients: 1A for early stage and 2A for advanced stage.

1A

<b>Early stage VARIABLE</b>		<b>Cox-2 positive</b>	<b>Cox-2 negative</b>	<b>p</b>
<b>Age (range)</b>	31 (10-79)	31 (12-79)	31 (10-71)	0.82
<b>Age ≥ 50</b>	24 (17%)	6 (13%)	18 (17%)	0.41
<b>Sex (M/F)</b>	77 (54%) 66 (46%)	24 (52%) / 22 (48%)	53 (55%) / 44 (45%)	0.78
<b>B-symptoms</b>	43 (30%)	15 (33%)	28% (29%)	0.65
<b>Bulky disease</b>	42 (30%)	15 (33%)	27 (28%)	0.53
<b>ECOG &gt; 1</b>	8 (6%)	3 (7%)	5 (5%)	0.70
<b>EORTC score Unfavorable</b>	70 (84%)	27 (77%)	43 (90%)	0.12
<b>Radiotherapy</b>	95 (66%)	33 (72%)	62 (64%)	0.35
<b>COX2 staining</b>	46 (32%)	100%	0%	---

1B

<b>Advanced stage VARIABLE</b>		<b>Cox-2 positive</b>	<b>Cox-2 negative</b>	<b>p</b>
<b>Age (range)</b>	36 (16-83)	35 (18-83)	38 (16-81)	0.94
<b>Age &gt; 45</b>	34 (34%)	16 (37%)	18 (32%)	0.60
<b>Sex (M/F)</b>	54 (54%) 45 (45%)	23 (53%) / 20 (46%)	31 (55%) / 25 (45%)	0.85
<b>B-symptoms</b>	55 (56%)	25 (58%)	30% (54%)	0.65
<b>Bulky disease</b>	27 (27%)	11 (26%)	16 (29%)	0.74
<b>ECOG &gt; 1</b>	16 (16%)	8 (19%)	8 (14%)	0.56
<b>IPS &gt;2</b>	45 (45%)	22 (51%)	23 (41%)	0.32

<b>Radiotherapy</b>	29 (30%)	13 (31%)	16 (29%)	0.80
<b>COX2 staining</b>	43 (43%)	100%	0%	---



**Table 2.** Progression-free and overall survival analysis of the global group

<b>Univariate analysis</b>				
Factor	5-year PFS (95% CI)	p	5-year OS (95% CI)	P
Age		0.003		<0.001
0-59	75% (68-81)		88% (83-93)	
≥ 60	54% (35-72)		61% (43-78)	
Sex		0.65		0.95
Male	72% (64-80)		83% (76-90)	
Female	71% (61-81)		85% (78-92)	
Bulky mass		0.55		0.58
Yes	67% (54-79)		85% (76-94)	
No	73% (66-80)		83% (77-89)	
B symptoms		<0.001		<0.001
No	83% (77-89)		90% (85-95)	
Yes	54% (42-66)		74% (64-84)	
AA stage		0.001		0.007
I-II	81% (74-88)		90% (85-95)	
III-IV	57% (46-68)		75% (66-85)	
ECOG PS		0.004		<0.001
0-1	74% (67-80)		87% (83-92)	
2-4	47% (25-70)		45% (18-72)	
Type of treatment:		0.021		0.45
2-4 cycles	82 (72-91)		87 (79-94)	
6-8 cycles	66 (58-74)		82 (76-89)	
Radiotherapy		0.001		0.006
Yes	80% (72-88)		91% (86-97)	
No	64% (54-73)		75% (66-84)	
COX2 stain on RS		0.003		<0.001
Positive	60% (49-72)		73% (63-83)	
Negative	79% (73-86)		91% (86-96)	
<b>Multivariate analysis</b>				
	<b>PFS</b>		<b>OS</b>	
Factor	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	P
B symptoms	2.04 (1.22-3.43)	0.007	---	---
COX2+ stain on RS	1.91 (1.17-3.14)	0.010	2.95 (1.53-5.7)	0.001
Age ≥ 60 years	1.89 (1.05-3.42)	0.033	4.34 (2.23-8.43)	<0.001
Radiotherapy	0.54 (0.32-0.93)	0.028	---	---
ECOG PS >1	---	---	4.00 (1.94-8.25)	<0.001

**Table 3.** Progression-free and overall survival analysis of patients with early HL

<b>Univariate analysis</b>				
Factor	5-year PFS (95% CI)	p	5-year OS (95% CI)	P
Age		0.37		0.21
0-49	82% (74-89)		90% (85-96)	
≥ 50	78% (61-95)		87% (74-100)	
Sex		0.74		0.71
Male	81% (73-90)		90% (82-97)	
Female	80% (69-92)		90% (85-95)	
Bulky mass		0.25		0.79
Yes	73% (59-87)		86% (75-98)	
No	84% (76-92)		91% (85-97)	
B symptoms		0.021		0.003
No	88% (81-95)		94% (89-99)	
Yes	66% (50-82)		80% (67-93)	
ECOG PS		0.052		0.001
0-1	74% (67-80)		92% (87-97)	
2-4	56% (17-95)		47% (2-91)	
ESR*		0.15		0.02
Normal	75 (53-96)		94% (84-100)	
Elevated	88 (73-100)		82% (63-100)	
Lymph node areas		0.18		0.68
0-3	86% (75-97)		89 (79-99)	
≥ 4	50% (0-100)		50% (0-100)	
EORTC score		0.084		0.054
Favorable	91% (74-100)		100%	
Unfavorable	74% (63-85)		84% (75-93)	
Type of treatment:		0.16		0.97
2-4 cycles	84 (75-94)		89 (81-97)	
6-8 cycles	79 (69-88)		91 (83-98)	
Radiotherapy		0.007		0.11
Yes	86% (79-93)		93% (88-99)	
No	72% (59-85)		82% (69-95)	
COX2 stain on RS		0.017		0.004
Positive	72% (58-86)		82% (71-83)	
Negative	86% (79-83)		94% (88-99)	
<b>Multivariate analysis</b>				
	<b>PFS</b>		<b>OS</b>	
Factor	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	P
COX2+ stain on RS	2.76 (1.29-5.90)	0.009	4.81 (1.60-14.44)	0.005
B symptoms	2.34 (1.11-4.94)	0.026	---	---
Radiotherapy	0.32 (0.14-0.69)	0.004	---	---
ECOG PS > 1	---	---	9.00 (2.37-34.22)	0.001

\* Criteria for elevated ESR: ≥ 50, if no B symptoms and ≥ 30, if B symptoms.

**Table 4.** Progression-free and overall survival analysis of patients with advanced HL

<b>Univariate analysis</b>				
Factor	5-year PFS (95% CI)	p	5-year OS (95% CI)	P
Age		0.018		<0.001
0-60	64% (52-76)		83% (67-98)	
> 60	35% (11-58)		48% (26-71)	
Age		0.037		0.002
0-44	65% (52-78)		84% (73-94)	
≥ 45	42% (22-62)		58% (40-76)	
Sex		0.83		0.99
Male	57% (43-71)		74% (60-87)	
Female	58% (41-75)		77% (64-89)	
Bulky mass		0.91		0.53
Yes	45% (13-76)		82% (66-99)	
No	59% (47-71)		73% (62-84)	
B symptoms		0.071		0.15
No	72% (59-86)		81% (69-93)	
Yes	43% (27-60)		69% (55-84)	
ECOG PS		0.14		0.039
0-1	50% (48-72)		81% (72-90)	
2-4	43% (15-71)		41% (5-78)	
IPS		0.001		0.007
0-2	71% (58-85)		84% (73-95)	
3-7	40% (23-56)		66% (52-80)	
Type of treatment:		0.75		0.86
2-4 cycles	67 (40-93)		75 (50-99)	
6-8 cycles	56 (44-68)		75 (65-85)	
Radiotherapy		0.38		0.21
Yes	58% (46-70)		86% (73-99)	
No	57% (34-80)		71% (59-83)	
COX2 stain on RS		0.13		0.06
Positive	45% (28-63)		63% (46-79)	
Negative	67% (54-80)		86% (76-95)	
<b>Multivariate analysis</b>				
	<b>PFS</b>		<b>OS</b>	
Factor	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	P
Age > 60 years	---	---	5.07 (2.20-11.65)	<0.001
IPS 3-7	2.88 (1.46-5.68)	0.002	---	---
ECOG PS > 1	---	---	3.38 (1.36-8.45)	0.009

**4.2. Publicación:** Mestre F, Gutiérrez A, Rodríguez J, Ramos R, García JF, Martínez-Serra J, et al. Radiation therapy overcomes adverse prognostic role of cyclooxygenase-2 expression on Reed-Sternberg cells in early Hodgkin lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* . 2015 May 1;92(1):84–90.

**TITLE:** Radiotherapy Overcomes Adverse Prognostic Role Of COX-2 Expression On Reed-Sternberg Cells In Early Hodgkin Lymphoma

**SHORT RUNNING TITLE:** Radiotherapy on COX-2 positive early HL

**AUTHORS:** Francisco Mestre<sup>1\*</sup>, MD; Antonio Gutierrez<sup>2\*</sup>, MD, PhD; Jose Rodriguez<sup>3\*</sup>, MD, PhD; Rafael Ramos<sup>4</sup>, MD; Juan Fernando García<sup>5</sup>, MD, PhD; Jordi Martinez-Serra<sup>2</sup>, MD, PhD; Marta Casaus<sup>6</sup>, MD; Cristina Nicolau<sup>6</sup>, MD; Leyre Bento<sup>2</sup>, MD; Ines Herraiz<sup>2</sup>, M.D; Paloma Lopez-Perezagua<sup>7</sup>, MD; Jaime Daumal<sup>8</sup>, MD; Joan Besalduch<sup>2</sup>, MD, PhD.

\* These authors contributed equally to this paper

**AFFILIATIONS:** <sup>1</sup>Service of Radiotherapy; <sup>2</sup>Service of Hematology; University Hospital Son Espases, IDISPA, Palma de Mallorca; <sup>3</sup>MD. Anderson Cancer Centre, Madrid; <sup>4</sup>Service of Pathology, University Hospital Son Espases, IDISPA, Palma de Mallorca; <sup>5</sup>Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid; <sup>6</sup>Service of Radiotherapy, Policlínica Miramar. <sup>7</sup>Service of Radiology; <sup>8</sup>Service of Nuclear Medicine. IDISPA. Palma de Mallorca; Spain.

**CORRESPONDING AUTHOR'S CONTACT INFORMATION:**

Antonio Gutiérrez, MD, PhD

University Hospital Son Espases / IDISPA

Service of Hematology

Carretera de Valldemossa, 79

07010 Palma de Mallorca, Spain

Phone number: 34-871-205000 (extension 65118) / Fax: 34-871-909717

E-mail: [antoniom.gutierrez@ssib.es](mailto:antoniom.gutierrez@ssib.es)

**CONFLICT OF INTEREST:** none

**SUMMARY:**

COX-2 expression on Reed-Sternberg cell is a major independent, unfavorable prognostic factor in patients with early Hodgkin lymphoma treated with ABVD. We report the ability of radiotherapy for overcoming the adverse prognostic influence of RS COX-2 expression in early HL. This is important because allows to identify a subgroup of patients with theoretically excellent prognosis, but having a significantly worse prognosis associated to the expression of this marker, which could benefit of radiotherapy.

## ABSTRACT

**Background** Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an inflammatory enzyme involved in pathogenesis and prognostic of Hodgkin lymphoma. We previously reported that expression of COX-2 on Reed-Sternberg cell is a major independent, unfavorable prognostic factor in patients with early Hodgkin lymphoma treated with ABVD. The relationship between COX-2 expression and poor prognosis has been associated with pathogenic phenomena such as angiogenesis, chemoresistance or promotion of invasion. As patients in our series were treated with ABVD +/- radiotherapy, we aim to analyze the role of radiotherapy on the adverse prognostic factor of COX-2 RS expression.

**Methods** In the present study, we retrospectively investigated the prognostic value of COX-2 expression in a large (N = 143), uniformly treated early Hodgkin lymphoma (HL) population from the Spanish Network of HL using tissue microarrays. Univariate and multivariate analysis was done, including the most recognized clinical variables and the potential role of administration of adjuvant radiotherapy.

**Results** Median age was 31 years; the expression of COX-2 defined a subgroup with significantly worse prognosis. Considering patients COX-2+, those that received RT had a significantly better 5y-PFS (80% versus 54% if no RT;  $p = .008$ ). In contrast, COX-2- patients only had a modest non-significant benefit from RT in terms of 5y-PFS (90% versus 79%;  $p=0.13$ ). When compared the outcome of patients receiving RT considering the expression of COX-2 on RS we found a non-significant 10% difference in terms of PFS between COX-2+ and COX-2- patients ( $p=0.09$ ) while this difference between the two groups was important (25%) in patients non receiving RT ( $p=0.04$ ).

**Conclusions** COX-2 RS expression is an adverse independent prognostic factor in early HL. Radiotherapy overcome the worse prognosis associated to COX-2 expression on RS acting in a chemotherapy-independent way. COX-2 RS expression may be useful to determine patients with early HL candidates to receive consolidation with RT.

## INTRODUCTION

Hodgkin lymphoma (HL) represents 10-15% of all types of lymphoma[1]. At present, around 80%-90% of patients in early and limited stages can be cured with standard therapy including ABVD chemotherapy and radiotherapy[2]. However the behavior of the disease and response to therapy are determined by intrinsic features of tumor cells, Reed-Sternberg (RS) cells, and the characteristics of the tumor microenvironment. This microenvironment is basically composed of several other cell populations associated with their respective extracellular matrix compartment, which includes a deregulated cytokine network with secretion of inflammatory cytokines[3,4]. Several biomarkers related to microenvironment have been described including CD68 for tumor-associated macrophages[5].

COX-2 is an inflammation-associated enzyme involved in the pathogenesis and prognosis of several solid (colorectal, breast, ovarian, lung and others)[6,7] as well as hematological malignancies[8,9] [10]. We previously reported that expression of COX-2 on Reed-Sternberg cell is a major independent, unfavorable prognostic factor in patients with early Hodgkin lymphoma treated with ABVD[11].

The relationship between COX-2 expression and poor prognosis has been associated with pathogenic phenomena such as induction of angiogenesis, chemoresistance through induction of antiapoptotic mechanisms as up-regulation of bcl-2 or resistance to Fas, its strong correlation with the expression of the MDR gene or promotion of invasion through induction of some metalloproteinases[12-14].



The treatment of early HL requires a careful balance between providing enough therapy to eradicate the tumor and avoiding overtreatment that could result in excessive toxicity and long-term treatment-related side effects. Patients with unfavorable early HL are treated with chemotherapy followed by involved field or site radiotherapy in a combined modality program, improving disease-free survival[15,16]. The administration of chemotherapy alone for the treatment of early stage unfavorable HL is controversial. Nearly all of the trials evaluating chemotherapy with or without radiation therapy have been conducted in favorable prognosis patients[15,17-19]. To take the right decision it is important to find biomarkers that could allow us to identify those cases which may benefit from radiotherapy consolidation treatment.

As patients in our series were treated with ABVD +/- radiotherapy, we aim to analyze the role of radiotherapy on the adverse prognostic factor of COX-2 RS expression on early HL.

## **METHODS**

### **Patients**

We retrospectively included 143 patients with early HL uniformly treated with ABVD (2-8 cycles, in function of risk factors) with or without RT (more or less intensive regimens were excluded) from January 1985 to December 2003. All the samples were collected with the collaboration of the Spanish National Tumor Bank Network, coordinated by the Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), following the technical and ethical procedures of the network, including anonymization processes. Approval was obtained from the CNIO institutional review board. Informed consent was obtained in all cases.

All patients were treated with curative intent with ABVD with or without radiotherapy. Pre-treatment specimens were adequate and information was available about staging and main clinical prognostic factors, including European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) prognostic factors defining favourable and unfavourable subsets[20] as well as those from International Prognostic Score (IPS)[21]. Response assessment and follow-up was based on Cheson criteria[22].

### **Radiotherapy**

All patients underwent immobilization to ensure daily reproducibility of the radiotherapy fields. They were treated once a day, five times a week to total dose ranging between 20 and 41 Gy. The radiation was delivered with lineal accelerator or cobalt unit using a conventional treatment planning system or three-dimensional (3D) conformal radiotherapy. The dose was calculated at the ICRU intersection point [International Commission on Radiation Units and Measurements (report

Nº.50)]. Patients that received the mantle or inverted Y technique were treated supine and prone with individually-shaped shielding blocks. The superior border of the mantle field was to the inferior tip of the mastoid process and the middle of the body of the mandible. The inferior border was the T10/T11 interspace. The inferior border of the inverted Y was at a level 2 cm below the ischial tuberosity. The involved field technique for patients with stage IA disease was to use a field which covered either the cervical region, including the supraclavicular fossa (unilaterally or bilaterally) or the axilla or the mediastinum, or the inguinal and iliac regions (unilaterally). For patients with stage IIA disease the field covered the two involved regions.

#### **Tissue microarray (TMA) design and immunohistochemistry**

Immunohistochemical expression of COX-2 was assessed using TMA technology. We used a Tissue Arrayer device (Beecher Instrument, Silver Spring, MD) as previously described[11,23]. Briefly, all HL cases were histologically reviewed and the richest areas of RS cells were marked in the paraffin blocks. In each case, 2 selected 1-mm-diameter cylinders from 2 different areas were included, along with different controls to ensure the quality, reproducibility, and homogenous staining of the slides. Thus, different TMA blocks were constructed, each containing 120-140 cylinders. Included in each TMA was a representation of reactive lymphoid tissue of tonsil as internal control and normal colon tissue as positive control for COX-2 expression.

TMA blocks were sectioned at a thickness of 3 µm and dried for 16 hours at 56°C before being dewaxed in xylene and rehydrated through a graded ethanol series and washed with phosphate-buffered saline. Antigen retrieval was achieved by heat treatment in PT LINK with pH High buffer (DAKO).

Immunohistochemical staining for COX-2 was performed on these sections with pre-diluted rabbit monoclonal clone SP21 (Neomarkers, RM -9121-R7). The complete immunodetection system was performed on an Autostainer PLUS with EnVision FLEX kit, employing diaminobenzidine chromogen as substrate. Sections were counterstained with hematoxylin.

The staining of the TMA sections was evaluated by the consensus of 2 pathologists, using uniform criteria. In order to guarantee the reproducibility of this method, we decided to employ straightforward and clear-cut criteria. The pattern of staining for COX-2 was recorded as positive or negative taking into account the cytoplasmatic/membranous staining, being positive when more than 10% of RS cells expressed COX-2. To consider a case evaluable for the study it should have at least 10 RS cells in at least one of the two core cylinders analyzed in each patient. The reproducibility of the results obtained was confirmed by comparing them with those from whole sections in 34 randomly selected cases, stained using the same procedure.

### **Statistical methods**

The Pearson chi-square test and Fisher exact test were used where appropriate. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were measured from the date of diagnosis and they were estimated according to the Kaplan-Meier method.

Comparisons between the variables of interest were performed by the log-rank test. Multivariate analysis with the variables that appeared to be significant in the univariate analysis was performed according to the Cox proportional hazard regression model. All p-values reported were two-sided and statistical significance was defined at a p-value <0.05.

## **RESULTS**

### **Patients characteristics**

As shown in Table 1, median age was 31, 30% presented B symptoms, 30% had bulky disease and 6% had an ECOG PS higher than 1. EORTC score was unfavorable in 84% of the patients and IPS was higher than 2 in 13% of cases. Histological subtypes were as follows: 63% nodular sclerosis classical HL (CHL), 34% mixed cellularity CHL, 1% lymphocyte-depleted CHL and 1% lymphocyte-rich CHL.

Most patients with high risk features such as IPS>2 (89%) or bulky disease (95%) were consolidated with IF RT or received longer number of chemotherapy cycles. To control treatment variability we analysed it by considering short (2-4 cycles) and long (6-8 cycles) treatments in all outcome statistical analysis. As treatment was adapted considering stage and risk features it had no influence on outcome, as shown on Table 2.

### **Radiotherapy**

A total number of 95 patients were recorded as having received radiotherapy added to ABVD chemotherapy. Extended field radiotherapy (total nodal, mantle or inverted

Y radiotherapy) was used in 31%. The other 69% of patients received involved field radiotherapy. The radiotherapy was delivered with a linear accelerator (6,15 or 18 MV); <sup>60</sup>Co teletherapy was used in some patients (12%) in the 1990s. The dose per fraction prescribed to the field center was between 1.2 and 2 Gy and the range of total dose was between 20 and 41 Gy (median dose 30 Gy).

### **COX-2 expression**

We evaluated COX-2 cytoplasmatic/membranous staining in RS cells. An analysis comparing the results obtained using TMAs and the whole sections in 34 randomly selected cases showed a concordance of 88%, a figure that accords with previously reported results for other tumoral models[24]. Additionally, intraobserver and interobserver reproducibility were 97% and 90%.

COX-2 staining on RS cells was as follows: 46 patients (32%) showed positive stain while 97 (68%) had no staining. Considering clinical variables, COX-2 staining was not related with any of them (Table 1).

### **Outcome and survival analysis**

With a median follow up of 59 months (8-161), the expression of COX-2 defined a subgroup of significantly worse prognosis. In fact in the univariate analysis, the COX-2 positive patients had a PFS at 5 years of 72% versus 86% of those COX-2 negative ( $p=0.017$ ). Presence of B symptoms, radiotherapy and IPS also influenced PFS. Similarly, in the univariate analysis the OS at 5 years also differed for both groups with 82% and 94% for COX-2 positive and negative respectively ( $p=0.004$ ); as well as B symptoms, ECOG PS, ESG and IPS (Table 2).

By multivariate analysis COX-2 expression (HR 2.87 and 4.99) and IPS >2 (HR 2.86 and 3.44) independently influenced respectively PFS and OS. Also, radiotherapy administration independently influenced PFS (HR 0.40) (Table 2).

### **Role of radiotherapy on survival**

We explored the impact of radiotherapy in all prognostic factors independently influencing PFS (RS COX-2 expression and IPS). Considering patients COX-2+, those that received RT had a significantly better 5y-PFS (80% versus 54% if no RT;  $p=0.008$ ). In contrast, COX-2- patients only had a modest non-significant benefit from RT in terms of 5y-PFS (90% versus 79%;  $p=0.13$ ). When compared the outcome of patients receiving RT considering the expression of COX-2 on RS we found a non-significant 10% difference in terms of PFS between COX-2+ and COX-2- patients ( $p=0.09$ ) while this difference between the two groups was important (25%) in patients non receiving RT ( $p=0.04$ ).

The impact of radiotherapy in early HL patients with IPS >2 was as follows: there was no difference in PFS between those patients who received or not received radiotherapy, between patients with IPS >2 ( $p=0.47$ ) or IPS 0-2 (0.10) (Figure 1).

## DISCUSSION

COX-2 is a well-known molecular factor related to chemo and radioresistance. In solid tumors (head and neck, ovarian, breast, lung, etc). This relationship between COX-2 expression and poor prognosis has been associated with pathogenic phenomena such as induction of angiogenesis, chemoresistance through induction of antiapoptotic mechanisms such as upregulation of bcl-2 or resistance to Fas, promotion of invasion through induction of some metalloproteinases[25] or due to its strong correlation with the expression of the MDR gene[14]. In fact in several solid tumors clinical trials have explored the inhibition of COX-2 as a way to reduce chemo or radioresistance[26].

We described the association of RS COX-2 expression with poor prognosis in early HL[11]. In our work we observed that RS cells express this marker in around one third of cases. The cause of this worse prognosis is not clear although it has been associated with higher proliferation and angiogenesis[8]. It may be that the COX-2 pathway is important in the pathogenesis of this disease characterized by a small tumor cell population in a milieu composed of a deregulated cytokine and chemokine network and several proinflammatory and immune cell populations, which contribute to the maintenance of the neoplasia by several antiapoptotic and survival mechanisms[27].

There is still a debate regarding if radiotherapy should be used for treatment of early HL. Combined modality treatment (CMT) including consolidation radiotherapy provides excellent outcomes, however its administration is associated to higher



rates of long term side effects such as secondary malignancies and cardiac toxicity[28,29], although this is based on patients treated with outdated large-field radiotherapy. To avoid additional radiation-induced toxicity, several trials have used chemotherapy-only approaches[15,17,30]. Considering these trials comparing CMT with chemotherapy alone, a recent meta-analysis showed that there is no difference in terms of complete response rate but CMT is associated to a better tumor control with improved progression-free survival and overall survival[15,19].

However, identifying patients at low risk of relapse might be considered an alternative to consolidation radiotherapy to all patients. Clinical scores for early or advanced HL have been developed by several HL groups[31]. In our series radiotherapy specifically improved PFS in patients showing RS COX-2 positivity (Figure 1). Conventional complete response assessment after chemotherapy also does not seem to accurately identify a group of patients who do not benefit from radiotherapy[17,32]. But interim or final PET assessment may be an alternative, although in PET- negative bulky early HL a higher relapse rate has been reported in patients who were not consolidated with radiotherapy[33].

Our work open the possibility of using particular biomarkers, such as our RS COX-2 expression, that allow detecting high-risk patients inside groups of patients with apparent clinical good prognosis. Our identification of a sizable group of around 30% of patients who have a significantly worse prognosis because they express COX-2 may be important to identify those patients candidates both to consolidation therapy or implement new therapeutic strategies.

In summary, we herein report the ability of radiotherapy for overcoming the adverse prognostic influence of RS COX-2 expression in early HL. This is important because allows to identify a subgroup of patients with theoretically excellent prognosis, but indeed having a significantly worse prognosis associated to the expression of this marker, which could benefit of combined therapy including radiotherapy.

**REFERENCES**

1. Who classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues Lyon; 2008.
2. Armitage JO. Early-stage hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010;363:653-662.
3. Hsi ED. Biologic features of hodgkin lymphoma and the development of biologic prognostic factors in hodgkin lymphoma: Tumor and microenvironment. *Leuk Lymphoma* 2008;49:1668-1680.
4. Herreros B, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Lymphoma microenvironment: Culprit or innocent? *Leukemia* 2008;22:49-58.
5. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, Delaney A, Jones SJ, Iqbal J, Weisenburger DD, Bast MA, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Rimsza LM, Campo E, Delabie J, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Jaffe ES, Lenz G, Connors JM, Staudt LM, Chan WC, Gascoyne RD. Tumor-associated macrophages and survival in classic hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010;362:875-885.
6. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999;18:7908-7916.
7. Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: A novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:411-417.
8. Ohsawa M, Fukushima H, Ikura Y, Inoue T, Shirai N, Sugama Y, Suekane T, Kitabayashi C, Nakamae H, Hino M, Ueda M. Expression of cyclooxygenase-2 in hodgkin's lymphoma: Its role in cell proliferation and angiogenesis. *Leuk Lymphoma* 2006;47:1863-1871.
9. Paydas S, Ergin M, Erdogan S, Seydaoglu G. Cyclooxygenase-2 expression in non-hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2007;48:389-395.
10. Ladetto M, Vallet S, Trojan A, Dell'Aquila M, Monitillo L, Rosato R, Santo L, Drandi D, Bertola A, Falco P, Cavallo F, Ricca I, De Marco F, Mantoan B, Bode-Lesniewska B, Pagliano G, Francese R, Rocci A, Astolfi M, Compagno M, Mariani S, Godio L, Marino L, Ruggeri M, Omede P, Palumbo A, Boccadoro M. Cyclooxygenase-2 (cox-2) is frequently expressed in multiple myeloma and is an independent predictor of poor outcome. *Blood* 2005;105:4784-4791.
11. Mestre F, Gutierrez A, Ramos R, Martinez-Serra J, Sanchez L, Matheu G, Ros T, Garcia JF, Rodriguez J. Expression of cox-2 on reed-sternberg cells is an independent unfavorable prognostic factor in hodgkin lymphoma treated with abvd. *Blood* 2012;119:6072-6079.
12. Kim YM, Lee EJ, Park SY, Cho KH, Kim JY, Pyo H. Cyclooxygenase-2 up-regulates ataxia telangiectasia and rad3 related through extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol Cancer Res* 2009;7:1158-1168.
13. Wun T, McKnight H, Tuscano JM. Increased cyclooxygenase-2 (cox-2): A potential role in the pathogenesis of lymphoma. *Leuk Res* 2004;28:179-190.
14. Ratnasinghe D, Daschner PJ, Anver MR, Kasprzak BH, Taylor PR, Yeh GC, Tangrea JA. Cyclooxygenase-2, p-glycoprotein-170 and drug resistance; is chemoprevention against multidrug resistance possible? *Anticancer Res* 2001;21:2141-2147.
15. Herbst C, Rehan FA, Brilliant C, Bohlius J, Skoetz N, Schulz H, Monsef I, Specht L, Engert A. Combined modality treatment improves tumor control and overall survival in patients with early stage hodgkin's lymphoma: A systematic review. *Haematologica* 2010;95:494-500.

16. Specht L, Yahalom J, Illidge T, Berthelsen AK, Constine LS, Eich HT, Girinsky T, Hoppe RT, Mauch P, Mikhaeel NG, Ng A. Modern radiation therapy for hodgkin lymphoma: Field and dose guidelines from the international lymphoma radiation oncology group (ilrog). *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2013.
17. Straus DJ, Portlock CS, Qin J, Myers J, Zelenetz AD, Moskowitz C, Noy A, Goy A, Yahalom J. Results of a prospective randomized clinical trial of doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine (abvd) followed by radiation therapy (rt) versus abvd alone for stages i, ii, and iia nonbulky hodgkin disease. *Blood* 2004;104:3483-3489.
18. Meyer RM, Gospodarowicz MK, Connors JM, Pearcey RG, Wells WA, Winter JN, Horning SJ, Dar AR, Shustik C, Stewart DA, Crump M, Djurfeldt MS, Chen BE, Shepherd LE. Abvd alone versus radiation-based therapy in limited-stage hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2012;366:399-408.
19. Raemaekers JM, Andre MP, Federico M, Girinsky T, Oumedaly R, Brusamolino E, Brice P, Ferme C, van der Maazen R, Gotti M, Bouabdallah R, Sebban CJ, Lievens Y, Re A, Stamatoullas A, Morschhauser F, Lugtenburg PJ, Abruzzese E, Olivier P, Casasnovas RO, van Imhoff G, Raveloarivahy T, Bellei M, van der Borght T, Bardet S, Versari A, Hutchings M, Meignan M, Fortpied C. Omitting radiotherapy in early positron emission tomography-negative stage i/ii hodgkin lymphoma is associated with an increased risk of early relapse: Clinical results of the preplanned interim analysis of the randomized eortc/lysa/fil h10 trial. *J Clin Oncol* 2014;32:1188-1194.
20. Eghbali H, Raemaekers J, Carde P. The eortc strategy in the treatment of hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 2005;75 (Suppl. 66):135-140.
21. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced hodgkin's disease. International prognostic factors project on advanced hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1998;339:1506-1514.
22. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-hodgkin's lymphomas. Nci sponsored international working group. *J Clin Oncol* 1999;17:1244.
23. Garcia JF, Camacho FI, Morente M, Fraga M, Montalban C, Alvaro T, Bellas C, Castano A, Diez A, Flores T, Martin C, Martinez MA, Mazorra F, Menarguez J, Mestre MJ, Mollejo M, Saez AI, Sanchez L, Piris MA. Hodgkin and reed-sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: Analyses using tissue microarrays. *Blood* 2003;101:681-689.
24. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (tma) technology: Miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 2001;195:72-79.
25. Meric JB, Rottey S, Olaussen K, Soria JC, Khayat D, Rixe O, Spano JP. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;59:51-64.
26. Liao Z, Milas L, Komaki R, Stevens C, Cox JD. Combination of a cox-2 inhibitor with radiotherapy or radiochemotherapy in the treatment of thoracic cancer. *American journal of clinical oncology* 2003;26:S85-91.

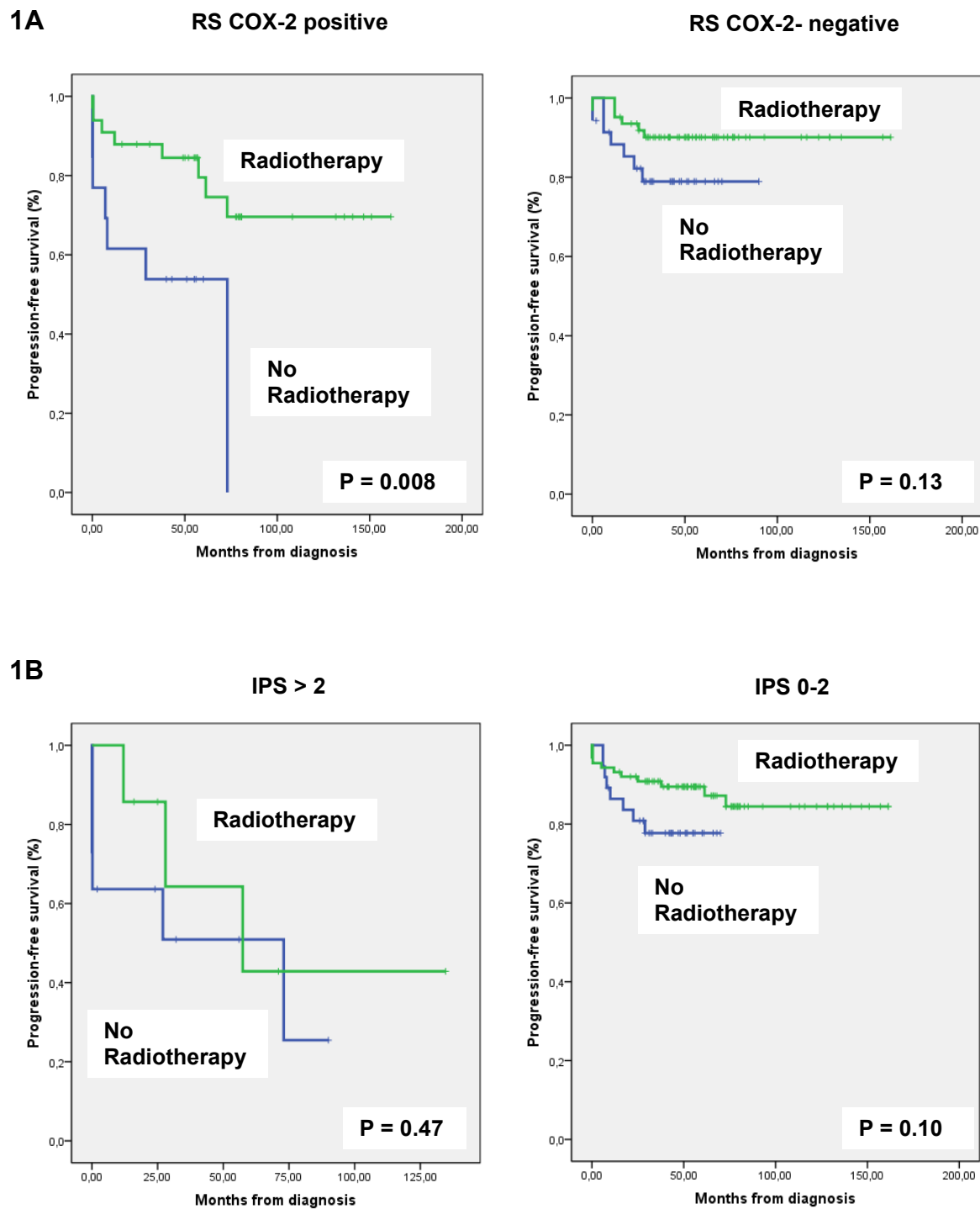
27. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical hodgkin lymphoma. *Blood* 2002;99:4283-4297.
28. Franklin JG, Paus MD, Pluetschow A, Specht L. Chemotherapy, radiotherapy and combined modality for hodgkin's disease, with emphasis on second cancer risk. *The Cochrane database of systematic reviews* 2005:CD003187.
29. Adams MJ, Lipsitz SR, Colan SD, Tarbell NJ, Treves ST, Diller L, Greenbaum N, Mauch P, Lipshultz SE. Cardiovascular status in long-term survivors of hodgkin's disease treated with chest radiotherapy. *J Clin Oncol* 2004;22:3139-3148.
30. Meyer RM, Gospodarowicz MK, Connors JM, Pearcey RG, Bezjak A, Wells WA, Burns BF, Winter JN, Horning SJ, Dar AR, Djurfeldt MS, Ding K, Shepherd LE. Randomized comparison of abvd chemotherapy with a strategy that includes radiation therapy in patients with limited-stage hodgkin's lymphoma: National cancer institute of canada clinical trials group and the eastern cooperative oncology group. *J Clin Oncol* 2005;23:4634-4642.
31. Klimm B, Goergen H, Fuchs M, von Tresckow B, Boll B, Meissner J, Glunz A, Diehl V, Eich HT, Engert A, Borchmann P. Impact of risk factors on outcomes in early-stage hodgkin's lymphoma: An analysis of international staging definitions. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013;24:3070-3076.
32. Aviles A, Delgado S. A prospective clinical trial comparing chemotherapy, radiotherapy and combined therapy in the treatment of early stage hodgkin's disease with bulky disease. *Clinical and laboratory haematology* 1998;20:95-99.
33. Picardi M, De Renzo A, Pane F, Nicolai E, Pacelli R, Salvatore M, Rotoli B. Randomized comparison of consolidation radiation versus observation in bulky hodgkin's lymphoma with post-chemotherapy negative positron emission tomography scans. *Leuk Lymphoma* 2007;48:1721-1727.

## ACKNOWLEDEGMENTS

Grant support: Grant DGAVAL\_PI\_044/10 from Govern Illes Balears and Research Project Grant from Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)-Junta Balears 7/2010.

The following centres and investigators participate in the Spanish Hodgkin Lymphoma Study Group and contribute to the studies with tumor samples and clinical data: R. Ramos, A. Gutiérrez, J. Rodríguez, F. Mestre (Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca); P. Domínguez, C. Jara (Fundación Hospital Alcorcón, Madrid); M. J. Mestre, R. Quibén, M. Méndez, L. Borbolla (Hospital de Móstoles, Madrid); M. A. Martínez, C. Grande (Hospital 12 de Octubre, Madrid); M. García-Cosío, C. Montalbán, J. García-Laraña (Hospital Ramón y Cajal, Madrid); M. Canales, J. Alves (Hospital La Paz, Madrid); C. Bellas, M. Provencio (Hospital Puerta de Hierro, Madrid); A. Castaño, P. Sánchez-Godoy (Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid); C. Martín, R. Martínez (Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid); J. Menárguez, P. Sabín, E. Flores (Hospital Gregorio Marañón, Madrid); J. González-Carrero, C. Poderós (Hospital Xeral-Cies, Vigo); A. Salar, S. Serrano (Hospital del Mar, Barcelona); T. Álvaro, L. Font (Hospital Verge de la Cinta, Tortosa); V. Romagosa, A. Fernández de Sevilla (Hospital Duran i Reynolds, Institut Catala d'Oncologia, Barcelona); M. Mollejo, M. A. Cruz (Hospital Virgen de la Salud, Toledo); A. Cánovas, C. Camarero (Hospital de Cruces, Baracaldo). H. Álvarez-Arguelles, M. Llanos (Hospital Universitario Canarias, Tenerife); R. Arranz, A. Acevedo (Hospital La Princesa, Madrid); R. García-Sanz, T. Flores (Hospital Universitario de Salamanca); C. Morante (Hospital Cabueñes, Gijón); A. Marín, E. Ríos (Hospital Virgen del Rocío, Seville); F. Mazorra, E. Conde (Hospital Marqués de Valdecilla, Santander); M. F. Fresno, C. Rayón, C. Nicolás (Hospital Central de Asturias, Oviedo); C. Santonja, Jose L. López (Fundación Jiménez Díaz, Madrid); T. Flores, R. García-Sanz (Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca); J. Guma (Hospital Sant Joan, Reus); P. Gonzalvo (Hospital Comarcal de Jarrío, Coaña); G. Fernández (Hospital Alvarez Buylla, Mieres); J. Forteza, M. Fraga, J. L. Bello (F Med Santiago de Compostela); A. Bas (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia); J. R. Méndez (Hospital Valle de Nalón, Asturias); J.F. Tomás, M. Estevez (MD Anderson España, Madrid); C. Ruiz-Marcellán, A. López (Hospital Vall d'Hebron) and J. F. García, M. M. Morente and M. A. Piris (CNIO, Madrid).

**Figure 1. Role of radiotherapy on PFS considering RS COX-2 expression (1A) and IPS status (1B)**



**Table 1. Characteristics of patients.**

<b>Early stage VARIABLE</b>		<b>Cox-2 positive</b>	<b>Cox-2 negative</b>	<b>p</b>
<b>Age (range)</b>	31 (10-79)	31 (12-79)	31 (10-71)	0.82
<b>Age ≥ 50</b>	24 (17%)	6 (13%)	18 (17%)	0.41
<b>Sex (M/F)</b>	77 (54%) 66 (46%)	24 (52%) / 22 (48%)	53 (55%) / 44 (45%)	0.78
<b>B-symptoms</b>	43 (30%)	15 (33%)	28% (29%)	0.65
<b>Bulky disease</b>	42 (30%)	15 (33%)	27 (28%)	0.53
<b>ECOG &gt; 1</b>	8 (6%)	3 (7%)	5 (5%)	0.70
<b>EORTC score Unfavorable</b>	70 (84%)	27 (77%)	43 (90%)	0.12
<b>IPS &gt; 2</b>	18 (13%)	5 (11%)	13 (13%)	0.67
<b>Radiotherapy</b>	95 (66%)	33 (72%)	62 (64%)	0.35
<b>COX2 staining</b>	46 (32%)	100%	0%	---



**Table 2.** Progression-free and overall survival analysis of patients

<b>Univariate analysis</b>				
Factor	5-year PFS (95% CI)	p	5-year OS (95% CI)	P
Age		0.37		0.21
0-49	82% (74-89)		90% (85-96)	
≥ 50	78% (61-95)		87% (74-100)	
Sex		0.74		0.71
Male	81% (73-90)		90% (82-97)	
Female	80% (69-92)		90% (85-95)	
Bulky mass		0.25		0.79
Yes	73% (59-87)		86% (75-98)	
No	84% (76-92)		91% (85-97)	
B symptoms		0.021		0.003
No	88% (81-95)		94% (89-99)	
Yes	66% (50-82)		80% (67-93)	
ECOG PS		0.052		0.001
0-1	74% (67-80)		92% (87-97)	
2-4	56% (17-95)		47% (2-91)	
ESR*		0.15		0.02
Normal	75 (53-96)		94% (84-100)	
Elevated	88 (73-100)		82% (63-100)	
Lymph node areas		0.18		0.68
0-3	86% (75-97)		89 (79-99)	
≥ 4	50% (0-100)		50% (0-100)	
EORTC score		0.084		0.054
Favorable	91% (74-100)		100%	
Unfavorable	74% (63-85)		84% (75-93)	
IPS:		<0.001		0.004
0-2	86% (80-92)		92% (87-97)	
>2	45% (16-73)		71% (45-98)	
Type of treatment:		0.16		0.97
2-4 cycles	84 (75-94)		89 (81-97)	
6-8 cycles	79 (69-88)		91 (83-98)	
Radiotherapy		0.007		0.11
Yes	86% (79-93)		93% (88-99)	
No	72% (59-85)		82% (69-95)	
COX2 stain on RS		0.017		0.004
Positive	72% (58-86)		82% (71-83)	
Negative	86% (79-83)		94% (88-99)	
<b>Multivariate analysis</b>				
Factor	PFS		OS	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	P
COX2+ stain on RS	2.87 (1.34-6.14)	0.007	4.99 (1.65-15.03)	0.004
IPS > 2	2.86 (1.17-7.01)	0.021	3.44 (1.04-11.39)	0.043
Radiotherapy	0.40 (0.18-0.91)	0.028	---	---
B symptoms	1.78 (0.80-3.97)	0.16	2.43 (0.75-7.81)	0.14
ECOG PS > 1	---	---	3.35 (0.75-14.87)	0.11

\* Criteria for elevated ESR:  $\geq 50$ , if no B symptoms and  $\geq 30$ , if B symptoms.