



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>



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**Diagnóstico y prevención de la infiltración del sistema  
nervioso central en pacientes con síndromes  
linfoproliferativos B**

**Tesis Doctoral presentada por**

Sabela Bobillo Varela

Programa de Doctorado en Medicina, Departamento de Medicina

Universidad Autònoma de Barcelona

**Director**

Francesc Bosch Albareda

**Tutor**

Francesc Bosch Albareda

Barcelona, 2021



A mis padres, Jaime y Carmen

## **AGRADECIMIENTOS**



A mis padres, por darme una educación y una vida privilegiadas, por su apoyo incondicional y por sus buenos consejos.

A mis hermanas, María y Carmen, por todos los buenos momentos juntas.

A Alfonso, por su ayuda en la edición de esta Tesis Doctoral y, sobre todo, por estar siempre a mi lado.

A Francesc Bosch, gracias por confiar en mi desde el principio, por motivarme a aprender, estudiar, investigar y mejorar cada día.

A Pau Abrisqueta, por la inmensa suerte de aprender a su lado todos estos años.

Al Dr. Joan Seoane por su inestimable ayuda. Muchas gracias también a su equipo, en especial a Laura Escudero y Regina Mayor por su enorme colaboración.

A Marta Crespo por despertar mi interés hacia el mundo del laboratorio.

A mi Coi, por ser la mejor amiga y compañera de aventuras.

Al Dr. Anas Younes, por darme la oportunidad de aprender e investigar a su lado, por su cariño y por conseguir que mi estancia en el Memorial Sloan Kettering fuera inolvidable.

A todos mis compañeros del servicio de Hematología, médicos, residentes y secretarías, que han colaborado de alguna manera en la elaboración de esta Tesis Doctoral.

A los pacientes que han participado en estos proyectos, por su generosidad.







## **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

ABC: activated B cell, célula B activada

BCR: B-cell receptor, receptor de célula B

CC: citología convencional

CFM: citometría de flujo multiparamétrica

CNS-IPI: índice pronóstico internacional del sistema nervioso central

ctDNA: cell-free circulating tumor DNA, DNA circulante tumoral

cfDNA: cell-free circulating DNA, DNA circulante

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

FISH: fluorescence in situ hybridization, hibridación in situ con sondas fluorescentes

GCB: germinal center B cell; célula B del centro germinal

GEP: gene expression profiling; perfil de expresión génica

GELTAMO: Grupo Español de Linfomas y Trasplante de Médula Ósea

HD-MTX: high-dose methotrexate, dosis altas de metotrexato

HHV8: virus herpes 8 humano

IELSG: International Extranodal Lymphoma Study Group

IPI: índice pronóstico internacional

IGH: cadena pesada de las inmunoglobulinas

IT: intratecal

LCP: linfoma cerebral primario

LCR: líquido cefalorraquídeo

LDCGB: linfoma difuso de células grandes B

LDH: lactato deshidrogenasa

LNH: linfoma no Hodgkin

MALT: mucosa-associated lymphoid tissue, tejido linfoide asociado a mucosas

MSKCC: Memorial Sloan Kettering Cancer Center

MTX: metotrexato

MYD88: myeloid differentiation primary response 88

NGS: next generation sequencing

NK: natural killer

PETHEMA: Programa Español para el Tratamiento en Hematología

RC: respuesta completa

RT: radioterapia

SEER: Surveillance Epidemiology and End Results

SG: supervivencia global

SLP: supervivencia libre de progresión

SNC: sistema nervioso central

TASP: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa

PD-1: programmed death 1

PD-L1: programmed death ligand 1

PD-L2: programmed death ligand 2

VAF: variant allele frequency

VEB: virus Epstein Barr

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

## ÍNDICE

# ÍNDICE

RESUMEN.....	16
RESUMEN.....	17
ABSTRACT .....	18
1 INTRODUCCIÓN.....	20
1.1 NEOPLASIAS LINFOPROLIFERATIVAS.....	22
1.1.1 Concepto, epidemiología y etiopatogenia.....	22
1.1.2 Clasificación .....	23
1.2 LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES B .....	27
1.2.1 Definición, epidemiología y subtipos .....	27
1.2.2 Presentación clínica y diagnóstico.....	27
1.2.3 Alteraciones genéticas y moleculares.....	29
1.2.4 Factores pronósticos.....	31
1.2.5 Tratamiento.....	32
1.3 LINFOMA B DE ALTO GRADO .....	33
1.3.1 Definición y epidemiología .....	33
1.3.2 Presentación clínica y diagnóstico.....	34
1.3.3 Alteraciones genéticas y moleculares.....	35
1.3.4 Factores pronósticos y tratamiento.....	36
1.4 LINFOMA DE BURKITT .....	37
1.4.1 Definición y epidemiología .....	37
1.4.2 Presentación clínica y diagnóstico.....	38
1.4.3 Alteraciones genéticas y moleculares.....	38
1.4.4 Factores pronósticos y tratamiento.....	39
1.5 LINFOMA DIFUSO DE CÉLULA GRANDE B PRIMARIO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL .....	41
1.5.1 Definición y epidemiología .....	41
1.5.2 Presentación clínica .....	41
1.5.3 Diagnóstico y perfil molecular.....	42
1.5.4 Biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo.....	42
1.5.5 Detección de DNA tumoral libre circulante.....	43
1.5.6 Factores pronósticos.....	45
1.5.7 Tratamiento.....	46
1.6 INFILTRACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN LOS SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CON AFECTACIÓN SISTÉMICA .....	47

1.6.1	Definición y características clínicas .....	47
1.6.2	Factores de riesgo de infiltración del sistema nervioso central.....	48
1.6.3	Pruebas diagnósticas en el líquido cefalorraquídeo .....	51
1.6.4	Pronóstico y tratamiento.....	53
1.7	ESTRATEGIAS DE PROFILAXIS DE LA RECAÍDA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	54
1.7.1	Profilaxis intratecal .....	54
1.7.2	Profilaxis sistémica.....	56
2	HIPÓTESIS .....	61
2.1	HIPÓTESIS .....	62
3	OBJETIVOS .....	63
3.1	OBJETIVOS .....	64
3.1.1	Objetivo principal .....	64
3.1.2	Objetivos secundarios.....	64
4	METODOLOGÍA.....	65
4.1	PRIMERA PUBLICACIÓN .....	67
4.2	SEGUNDA PUBLICACIÓN.....	78
5	RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS.....	86
6	RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN.....	93
7	CONCLUSIONES.....	104
8	LÍNEAS DE FUTURO .....	108
9	BIBLIOGRAFÍA.....	111



## **RESUMEN**

## RESUMEN

La infiltración del sistema nervioso central (SNC) en los pacientes con síndromes linfoproliferativos es un hallazgo poco frecuente pero asociado con mal pronóstico. En el caso del linfoma cerebral primario, el diagnóstico es complicado en muchas ocasiones debido a la dificultad para realizar la biopsia cerebral y los riesgos asociados al proceso quirúrgico. Por otro lado, las recaídas en el SNC en los pacientes con linfoma sistémico son en general poco frecuentes, aunque determinados subtipos histológicos y la presencia de ciertos factores clínicos y biológicos aumentan el riesgo forma significativa. Además, la mayoría de las recaídas en el SNC ocurren de forma precoz lo que sugiere que las células malignas podrían estar ya presentes en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y no ser detectadas por los estudios convencionales. Debido al mal pronóstico asociado con las recaídas neuromeningeas, se recomienda realizar profilaxis del SNC en los pacientes de alto riesgo, aunque su eficacia es controvertida y tanto el esquema como la vía de administración no están del todo establecidas. En el primer trabajo, observamos que el análisis de DNA circulante tumoral (ctDNA) en el LCR permite detectar enfermedad y monitorizar la respuesta al tratamiento en los pacientes con linfoma cerebral. Además, el análisis de ctDNA fue capaz de detectar la presencia de enfermedad en el SNC de forma precoz en un paciente con linfoma sistémico y otro con linfoma cerebral. En el segundo trabajo, observamos que la profilaxis del SNC con quimioterapia intratecal no parece aportar un beneficio claro en la prevención de la recaída neuromeningea en los pacientes con linfoma difuso de células grandes B de alto riesgo. Además, nuestros resultados tampoco demuestran que la profilaxis con dosis altas de metotrexato endovenoso sea más eficaz que la profilaxis IT. Estos resultados sugieren que el análisis de ctDNA en el LCR permitiría detectar y caracterizar mejor la presencia de linfoma en el SNC, además podría ayudar a predecir la recaída neuromeningea. Además, ponen de manifiesto la necesidad de investigar esquemas de profilaxis más eficaces.

## ABSTRACT

Central nervous system involvement (CNS) in patients with non-Hodgkin lymphoma is an uncommon event associated with dismal prognosis. The diagnosis of CNS lymphoma can be challenging due to the difficulty in accessing the tumor and the inherent risks associated with cranial surgery. Although CNS relapse is an uncommon complication in patients with systemic lymphoma, the presence of certain risk factors might increase the risk of CNS relapse significantly. Furthermore, CNS relapse is usually diagnosed during frontline chemotherapy shortly after the completion of treatment, suggesting the tumor cells were undetected in the cerebrospinal fluid (CSF) by standard techniques. In high-risk patients, CNS prophylaxis is usually recommended, although the optimal regimen remains unclear. In the first work, we showed that cell free circulating tumor DNA (ctDNA) in the CSF could complement de diagnosis, identify somatic mutations, monitor tumor burden and response to treatment in patients with CNS lymphoma. In addition, we observed that CSF ctDNA facilitated early detection of CNS relapse in one patient with high-risk systemic lymphoma and one patient with CNS lymphoma. In the second work, we did not observe a clear benefit of intrathecal (IT) prophylaxis on preventing CNS relapse. Furthermore, we did not demonstrate clinical advantage for using intravenous high-dose methotrexate (MTX) over traditional IT. Overall, our results suggest that CSF ctDNA analysis could be useful to detect and characterize CNS lymphoma, as well as facilitate early detection of CNS relapse. Moreover, they highlight the need for developing more effective CNS prophylaxis regimens than MTX.



## **1 INTRODUCCIÓN**



## 1.1 NEOPLASIAS LINFOPROLIFERATIVAS

### 1.1.1 Concepto, epidemiología y etiopatogenia

Los síndromes linfoproliferativos son un grupo heterogéneo de neoplasias originadas en células linfoides en diferentes estadios madurativos.(1) Representan aproximadamente el 4% de todos los nuevos diagnósticos de cáncer cada año, con una incidencia de 33 casos por 100.000 habitantes por año según los datos procedentes del SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) en Estados Unidos.(2) La etiopatogenia de los linfomas es desconocida en la mayoría de los casos, aunque las alteraciones del sistema inmunológico, las inmunodeficiencias primarias o adquiridas como la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o los tratamientos inmunosupresores, y las enfermedades autoinmunes se han relacionado con un mayor riesgo de desarrollar una neoplasia linfoide.(1, 3-5) También se ha demostrado que ciertos agentes infecciosos contribuyen al desarrollo de determinados síndromes linfoproliferativos, como el virus de Epstein Barr (VEB), implicado en la mayoría de los casos de linfoma de Burkitt endémico y otras neoplasias de células B, T y NK, el virus herpes 8 humano (HHV8) asociado con la enfermedad de Castleman multicéntrica, y el virus HTLV-I (human T-cell leukemia virus type I) causante de la leucemia/linfoma T del adulto.(6-9) También algunas bacterias se han visto implicadas en la patogénesis de los linfomas de la zona marginal asociados a mucosas (MALT, del inglés “marginal associated lymphoid tissue”), como por ejemplo: *Helicobacter pylori* asociado con el el linfoma MALT gástrico, *Borrelia burgorferi* con el linfoma MALT cutáneo o *Chlamidia psittaci* con los linfomas MALT de los anejos oculares.(10)

### **1.1.2 Clasificación**

La clasificación de los síndromes linfoproliferativos ha ido cambiando a lo largo de los años en base a los nuevos conocimientos obtenidos sobre su biología. La clasificación actual de las neoplasias linfoides y otras neoplasias hematológicas es la realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), siendo la versión vigente la clasificación del año 2016.(1) Las neoplasias linfoides se dividen en base a la naturaleza de la célula tumoral en 3 categorías principales: neoplasias de células B, neoplasias de células T/NK, y linfomas de Hodgkin. Además, la OMS utilizando criterios morfológicos, inmunofenotípicos, genéticos y moleculares, distingue más de 60 subtipos de neoplasias linfoides que se detallan en la tabla 1.(1)



**Tabla 1.** Clasificación de la OMS 2016 de las neoplasias linfoides

---

**Neoplasias de célula B maduras**

---

Leucemia linfática crónica/linfoma linfocítico de célula pequeña  
Linfocitosis B monoclonal  
Leucemia prolinfocítica B  
Linfoma de la zona marginal esplénico  
Tricoleucemia  
Linfoma esplénico de célula B inclasificable

- *Linfoma esplénico difuso de la de pulpa roja de célula B pequeña*
- *Tricoleucemia variante*

Linfoma linfoplasmacítico  
Linfoma marginal extranodal del tejido linfoide asociado a mucosas (linfoma MALT)  
Linfoma marginal nodal

- *Linfoma marginal nodal pediátrico*

Linfoma folicular

- Linfoma folicular in situ
- Linfoma folicular duodenal
- Linfoma folicular testicular

Linfoma folicular tipo pediátrico  
*Linfoma de células grandes B con reordenamiento de IRF4*  
Linfoma centrofolicular primario cutáneo  
Linfoma de células del manto

- Linfoma de células del manto in situ
- Linfoma del manto variante leucémica, no nodal

Linfoma difuso de célula grande B (LDCGB), no especificado (NOS)  
Linfoma B de célula grande rico en células T e histiocitos  
LDCGB primario del sistema nervioso central  
LDCGB cutáneo primario, tipo pierna  
LDCGB VEB positivo, NOS  
*Úlcera mucocutánea VEB positivo*  
LDCGB asociado con inflamación crónica  
Granulomatosis linfomatoide  
Linfoma B de célula grande primario de mediastino (tímico)  
Linfoma B de célula grande intravascular  
Linfoma B de célula grande ALK positivo  
Linfoma plasmablastico  
Linfoma primario de cavidades  
Síndromes linfoproliferativos asociados a HHV-8

- Enfermedad de Castleman
- LDCGB asociado a HHV-8, NOS
- Síndrome linfoproliferativo germinotrópico asociado a HHV-8

Linfoma de Burkitt  
*Linfoma Burkitt-like con alteraciones en 11q*  
Linfoma B de alto grado

- Linfoma B de alto grado con reordenamiento de *MYC* y *BCL2* y/o *BCL6*, NOS
- Linfoma B de alto grado NOS

Linfoma B inclasificable con características intermedias entre LDCGB y LH clásico

---

**Neoplasias de células T y NK maduras**

---

Leucemia prolinfocítica T  
Leucemia linfática T de linfocitos grandes granulares  
*Trastorno linfoproliferativo crónico de células NK*  
Leucemia agresiva de células NK  
Enfermedades linfoproliferativas T y NK de la infancia VEB +

- Linfoma T sistémico de la infancia VEB +
- Síndrome linfoproliferativo hydroa vaccini-forme-like

Leucemia/linfoma T del adulto

---

---

Linfoma extranodal T/NK tipo nasal

Linfoma T intestinal

- Linfoma T asociado a enteropatía
- Linfoma T intestinal monomórfico epiteliotropo
- Linfoma T intestinal, NOS
- *Síndrome linfoproliferativo T indolente del tracto gastrointestinal*

Linfoma T hepatoesplénico

Linfoma T subcutáneo paniculitis-like

Micosis fungoides

Síndrome de Sézary

Linfomas primarios cutáneos T CD30 positivos

- Papulomatosis linfomatoide
- Linfoma primario cutáneo anaplásico de célula grande

Linfomas T periféricos cutáneos, subtipos raros

- Linfoma T cutáneo primario gamma-delta
- *Linfoma T cutáneo primario epidermotrópico agresivo CD8+*
- *Linfoma T primario cutáneo acral CD8+*
- *Linfoma T cutáneo de célula pequeña/mediana CD4+*

Linfoma T periférico, NOS

Linfoma T angioinmunoblástico y otros linfomas T nodales de origen T folicular helper (TFH)

- Linfoma T angioinmunoblástico
- Linfoma T folicular
- Linfoma T periférico nodal con fenotipo TFH

Linfoma anaplásico de célula grande ALK positivo

Linfoma anaplásico de célula grande ALK negativo

*Linfoma anaplásico de célula grande asociado a prótesis mamarias*

---

### Linfomas de Hodgkin

Linfoma de Hodgkin predominio linfocítico nodular

Linfoma de Hodgkin clásico

- Linfoma de Hodgkin clásico esclerosis nodular
- Linfoma de Hodgkin clásico celularidad mixta
- Linfoma de Hodgkin clásico rico en linfocitos
- Linfoma de Hodgkin clásico con depleción linfoide

---

### Síndromes linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencias

Enfermedades linfoproliferativas asociadas con alteraciones primarias inmunes

Linfomas asociados con la infección por VIH

Síndromes linfoproliferativos post-trasplante (SLPT)

- SLPT no destructivo
- SLPT polimorfo
- SLPT monomorfo
- SLPT tipo linfoma de Hodgkin clásico

Otros síndromes linfoproliferativos iatrogénicos asociados a inmunodeficiencias

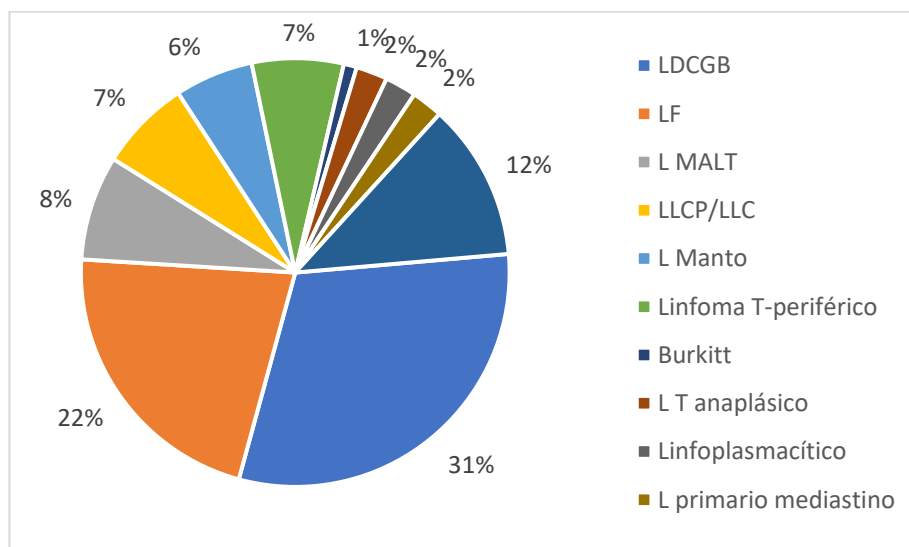
---

Adaptado de la WHO Classification of Tumors of Hematopoietics and Lymphoid Tissues, 2017(1).

HHV-8, virus humano herpes tipo 8; OMS, Organización Mundial de la Salud; NK, natural killer; VEB, virus Epstein Barr; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana.

Las entidades en *cursiva* son provisionales.

Los síndromes linfoproliferativos de células B representan aproximadamente el 90% de las neoplasias linfoides, siendo más frecuentes los linfomas no Hodgkin B (LNH B) que el linfoma de Hodgkin. Aunque su incidencia varía según el área geográfica, globalmente los subtipos más frecuentes son el linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) y el linfoma folicular, que juntos representan alrededor del 60% de todos los LNH B.(11) Otros subtipos menos frecuentes son el linfoma MALT, el linfoma del manto, el linfoma B de alto grado y el linfoma de Burkitt (figura 1). Por otro lado, el linfoma de Hodgkin representa aproximadamente el 10% de todas las neoplasias linfoides. Las neoplasias maduras de células T son mucho menos frecuentes y su incidencia también varía según el área geográfica, siendo más comunes en Asia. El linfoma T periférico no especificado (NOS) y el linfoma T anaplásico son los más frecuentes globalmente (figura 1).(12)



**Figura 1.** Distribución de los linfomas no Hodgkin según su frecuencia.

Adaptado de The Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project.1997.(11)

LDCGB, Linfoma difuso de células grandes B; LF, linfoma folicular; L, linfoma; L MALT, linfoma de la zona marginal asociado a mucosas; LLCP, linfoma linfocítico de célula pequeña; LLC, leucemia linfática crónica; L T, linfoma T

## **1.2 LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES B**

### **1.2.1 Definición, epidemiología y subtipos**

El linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) es una neoplasia linfoide compuesta por células linfoides B de tamaño grande y un patrón de crecimiento difuso.(1) Es el subtipo más frecuente de los LNH B, representando aproximadamente un 30-40% del total, con una incidencia de 7.1 casos por 100.000 habitantes por año según los datos procedentes del SEER en Estados Unidos.(2, 11) La mediana de edad al diagnóstico es alrededor de los 65 años, aunque también puede aparecer en adultos jóvenes. La mayoría de los casos son formas “de novo”, aunque también pueden presentarse como transformación de un síndrome linfoproliferativo previo como el linfoma folicular, la leucemia linfática crónica u otros linfomas indolentes.(1)

Existe una gran heterogeneidad biológica y clínica dentro de la enfermedad, y la actual clasificación de la OMS los subdivide según sus características morfológicas en: variante centroblastica, variante inmunoblastica, variante anaplásica, y otras variantes raras; y según sus características moleculares en: subtipo de célula B del centro germinal y subtipo de célula B activada.(1)

### **1.2.2 Presentación clínica y diagnóstico**

El LDCGB tiene un comportamiento clínico agresivo, y los pacientes normalmente presentan afectación de los ganglios linfáticos, aunque hasta en un 40% de los casos la afectación puede ser primariamente extraganglionar. La localización extraganglionar más frecuente es el tracto gastrointestinal (estómago y unión ileocecal), siendo también frecuente la afectación ósea, testicular, hepática, renal, suprarrenal y de tejidos blandos.(13) La médula ósea está infiltrada en aproximadamente el 15-20% de los casos. La afectación del sistema nervioso central (SNC) al diagnóstico o durante la

evolución de la enfermedad es en general poco frecuente, inferior al 5%, aunque la presencia de ciertas características clínicas o biológicas pueden aumentar el riesgo de forma considerable, tal y como se detalla en el apartado 1.6.2.(14, 15) La mayoría de pacientes están asintomáticos al diagnóstico, aunque pueden aparecer síntomas B (fiebre > 38°C, sudoración nocturna, pérdida de peso), astenia, anorexia u otros síntomas relacionados con la localización del linfoma.(16)

Al igual que todos los síndromes linfoproliferativos con afectación primariamente ganglionar, el sistema de estadificación que se utiliza es el de “Ann Arbor”, desarrollado en los años 70 y modificado en el año 1989; aunque su valor pronóstico ha disminuido considerablemente en los últimos años (tabla 2).(17)

**Tabla 2.** Sistema de estadificación “Ann Arbor”

<b>Sistema de estadificación Ann Arbor</b>	
<b>Estadio I</b>	Afectación de una localización ganglionar o de una sola localización extraganglionar (IE)
<b>Estadio II</b>	Afectación de dos o más territorios ganglionares o estructuras linfoides en el mismo lado del diafragma
<b>Estadio III</b>	Afectación de territorios ganglionares a ambos lados del diafragma
<b>Estadio IV</b>	Afectación diseminada de una o más localizaciones extraganglionares, con o sin afectación ganglionar

Nota: Las amígdalas, el anillo de Waldeyer y el bazo se consideran tejidos ganglionares

El diagnóstico se realiza en una biopsia de un ganglio linfático o un tejido extraganglionar afectado.(18) Morfológicamente se caracteriza por una infiltración difusa de células de mediano o gran tamaño que alteran la arquitectura del ganglio linfático. Las células neoplásicas expresan normalmente marcadores de célula B como CD19, CD20, CD79b y PAX5. La expresión de MYC y BCL2 varía considerablemente en función del punto de corte empleado para definir la positividad.(1) A nivel molecular, los estudios de perfil de

expresión génica (GEP, del inglés *gene expression profiling*) llevados a cabo hace 2 décadas, describieron 2 subtipos de LDCGB en función de su célula de origen: el subtipo de célula B del centro germinal (GCB, del inglés *germinal center B cell*), con un pronóstico más favorable, y el subtipo de célula B activada (ABC, del inglés *activated B cell*) con un pronóstico más adverso; quedando un tercer grupo de casos (10-15%) no clasificables en ninguno de estos dos subgrupos.(19, 20)

Debido a la dificultad para realizar estudios de GEP en la práctica clínica habitual, en los últimos años se han desarrollado diversos algoritmos basados en la expresión inmunohistoquímica de diferentes marcadores para determinar la célula de origen. De ellos, el más utilizado es el algoritmo de Hans que utiliza los marcadores CD10, BCL6 e IRF4/MUM-1 para diferenciar los subtipos centro germinal y no-centro germinal, con una correlación del 85% con los estudios de GEP.(21, 22) Recientemente, investigadores de la British Columbia Cancer Agency (BCCA), determinaron la célula de origen en 334 muestras de tumor parafinado utilizando un test digital basado en la expresión génica llamado Lymph2Cx, con una buena concordancia con los estudios iniciales de GEP.(23)

### **1.2.3 Alteraciones genéticas y moleculares**

#### *1.2.3.1 Alteraciones cromosómicas*

La translocación más frecuente en el LDCGB es la que afecta a la región 3q27 que codifica al gen *BCL6* y que está presente hasta en el 30% de los casos, siendo más habitual en el subtipo ABC. La translocación t(14;18)(q32;q21.3) que afecta al gen *BCL2* ocurre en el 20-30% de los casos, y se presenta casi de forma exclusiva en el subtipo GCB (40%).(31) Por otro lado, el reordenamiento del gen *MYC* se observa aproximadamente en el 10-15% de los pacientes, y se puede producir con los IG *loci* (IGH, IGK o IGL) o con otros *partners*.(32-34)

Estudios de arrays de hibridación genómica comparada (aCHG) han descrito ganancias recurrentes en los cromosomas 1q, 2p (REL), 3q (FOXP1), 7q, 12q (MDM2), 18q (BCL2) y pérdidas en 1p (TNFRSF14), 6q (PRDM1, TNAFAIP3), 9p (CDKN2A), 10q (PTEN), y 17p (TP53) entre otras.(31, 35)

### 1.2.3.2 Perfil mutacional

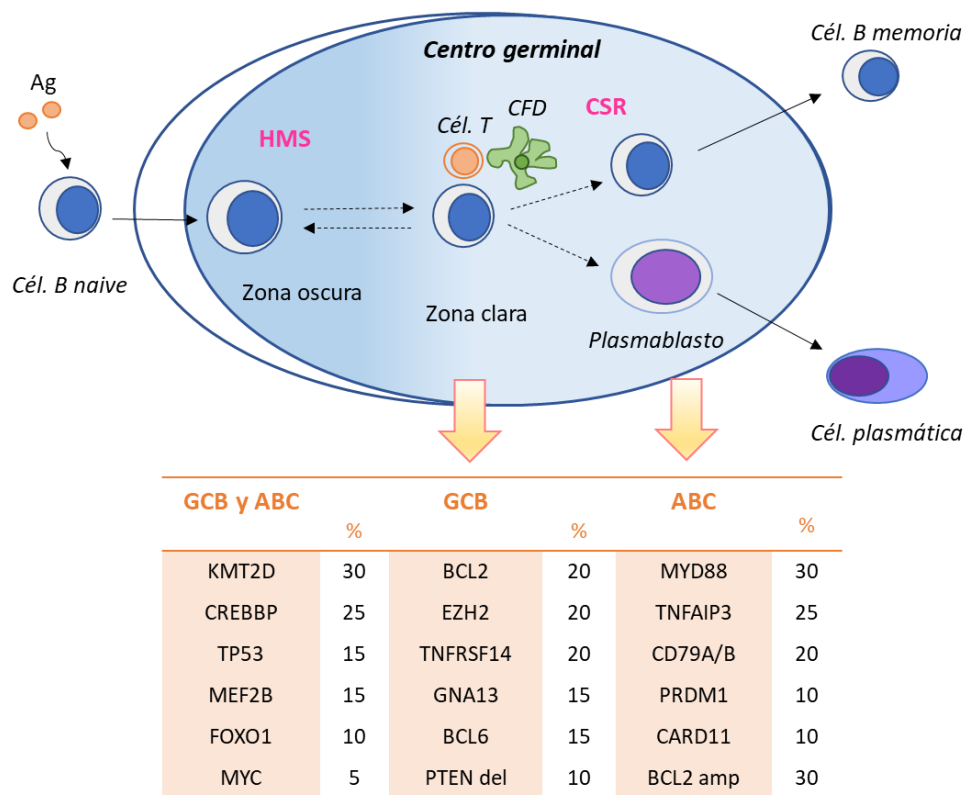
En la última década, gracias a las nuevas técnicas de secuenciación masiva, diferentes estudios han demostrado que el perfil mutacional del LDCGB es altamente complejo y que existe una gran variabilidad interindividual, por lo que la mayoría de las mutaciones recurrentes están presentes en menos del 10% de los pacientes.(26-30)

Entre las alteraciones más frecuentes se encuentran las mutaciones somáticas en genes implicados en la regulación epigenética, como *KMT2D* (30%), *CREBBP* (25%) y *EP300* (5%). También se han descrito mutaciones en el factor de transcripción *MEF2B* (15%); así como en genes relacionados con la evasión inmune, como por ejemplo *B2M*, *CD58*, o *HLA*. También se han descrito mutaciones recurrentes en el gen *TP53* (15%) y con menor frecuencia en *MYC* (5%).

En el subtipo molecular GCB, son frecuentes las mutaciones recurrentes en *EZH2* (20%), un gen que codifica una histona metiltransferasa con un papel clave en la regulación del centro germinal.(37) En este subtipo también son frecuentes las mutaciones en *TNFRSF14* (20%), *GNA13* (10-20%) y *BCL2* (20%) entre otras.(38)

En subtipo molecular ABC, con frecuencia se encuentran alterados genes implicados en la vía de señalización del receptor de célula B (BCR, del inglés *B cell receptor*) y en la vía de señalización del receptor *toll-like* (TLR, del inglés *toll like receptor*), que dan lugar a la activación constitutiva del complejo de transcripción nuclear kappa (NF-κB). Aproximadamente un 30-40% de los casos presentan mutaciones en *MYD88*, un gen implicado tanto en la vía de NF-κB como en la vía de JAK/STAT. También son frecuentes

las mutaciones en *CD79B* (~20%), *TNFAIP3* (20-30%), *CARD11* (5-10%) y *PRDM1* (10-15%). (26-30) (Figura 2) Por último, más allá de la categorización por perfiles de expresión génica, recientemente se han definido nuevos subgrupos moleculares a partir de la integración de datos genómicos mediante el análisis de genes recurrentemente alterados por mutaciones, translocaciones y/o alteraciones en el número de copias. (24, 25, 39)



**Figura 2.** Célula de origen en el LDCGB y las alteraciones genéticas asociadas con los distintos subtipos moleculares.

Adaptado de Pasqualucci L and Dalla-Favera R. Blood 2018;131(38)

Ag, antígeno; cél, célula; HMS, hipermutación somática; CFD, células dendríticas foliculares; CSR, *class switch recombination*; GCB, centro germinal; ABC, célula activada; del, delección; amp, amplificación

### 1.2.4 Factores pronósticos



El índice pronóstico más utilizado en los linfomas agresivos es el índice pronóstico internacional (IPI), desarrollado en los años 90. Este índice utiliza las variables: edad mayor de 60 años, estadio Ann Arbor III-IV, afectación de 2 ó más órganos extraganglionares, afectación del estado general (ECOG > 1) y lactato deshidrogenasa (LDH) sérica superior al valor normal; para dividir a los pacientes en 4 grupos de riesgo según la presencia de 0–1, 2, 3, o 4–5 factores, con una supervivencia a los 5 años del 73%, 51%, 43% y 26%, respectivamente.(40) Tras la introducción del rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20), se realizó una revisión del IPI (R-IPI), demostrando que mantiene su utilidad pronóstica.(41) En los últimos años han surgido otros índices pronósticos como el NCCN-IPI, aunque el más utilizado en la actualidad sigue siendo el IPI.(42) También ciertos factores biológicos como el subtipo molecular ABC, o la doble expresión por inmunohistoquímica de las proteínas BCL2 (valores superiores al 50% o 70%) y MYC (valores superiores al 40%), se han visto asociados con un pronóstico más desfavorable.(43, 44) Por último, dos estudios recientes de análisis integrado del genoma del LDCGB, han conseguido establecer distintos subgrupos moleculares con diferencias pronósticas significativas. (24, 25)

### **1.2.5 Tratamiento**

El tratamiento estándar del LDCGB se basa en la combinación de los fármacos de quimioterapia ciclofosfamida, adriamicina y vincristina, con prednisona (CHOP) y rituximab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD20 de los linfocitos; con el que se consiguen aproximadamente un 60% de respuestas duraderas.(45) La introducción del rituximab a principios de los años 2000 supuso un incremento del número de respuestas completas (RC), así como una mejoría significativa de la supervivencia global (SG) en comparación con los resultados obtenidos previamente con la quimioterapia CHOP.(45-48) En los últimos años, se han llevado a cabo varios estudios aleatorizados, con el fin de investigar si la adición de nuevos fármacos al

esquema R-CHOP podría mejorar sus resultados en términos de eficacia y supervivencia. Así se estudiaron combinaciones de R-CHOP más bortezomib (inhibidor del proteasoma), ibrutinib [inhibidor de la tirosin quinasa de Bruton (BTK)], y lenalidomida (inmunomodulador), sin que finalmente ninguna combinación demostrase ser superior a R-CHOP.(49-51) Tampoco la sustitución de rituximab por el nuevo anticuerpo monoclonal humanizado tipo II, obinutuzumab, demostró mejores resultados, por lo que en la actualidad el esquema R-CHOP sigue siendo el estándar de tratamiento.(52)

En la recaída, el tratamiento de elección se basa en dosis altas de quimioterapia más un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASP). Con esta estrategia, aproximadamente un 30% de los pacientes consiguen respuestas prolongadas.(53) En pacientes mayores o no candidatos a un TASP, no existe un estándar de tratamiento y el pronóstico es en general malo.(54) Recientemente, la terapia de células T con receptores quiméricos de antígenos (CAR T, del inglés *chimeric antigen receptor T-cell*) ha supuesto un gran avance en el tratamiento de estos pacientes en recaída tras 2 o más líneas de tratamiento, consiguiendo hasta un 40% de respuestas completas, muchas de ellas duraderas. (55-57)

## **1.3 LINFOMA B DE ALTO GRADO**

### **1.3.1 Definición y epidemiología**

La entidad linfoma B de alto grado incluye un grupo de neoplasias linfoides con unas características clínicas y biológicas específicas, por lo que no pueden ser clasificadas como LDCGB o como linfoma de Burkitt.(1) Representa una entidad nueva dentro de la clasificación actual de la OMS, aunque se ha reconocido su existencia durante años.(58) La clasificación de la OMS reconoce 2 subtipos: el linfoma B de alto grado con reordenamientos de *MYC* y *BCL2* y/o *BCL6*, donde se incluyen los linfomas con

morfología similar al LDCGB o linfoma de Burkitt que presenten reordenamientos en los genes *MYC* y *BCL2* y/o *BCL6* también llamados *double hit* o *triple hit* y el linfoma B de alto grado NOS, que es un grupo heterogéneo donde se incluyen linfomas con comportamiento agresivo y morfología intermedia entre LDCGB y linfoma de Burkitt, que no presenten los reordenamientos mencionados anteriormente.(1)

Dado que representan una nueva entidad y que para su diagnóstico se necesitan estudios de citogenética, su incidencia no está del todo establecida. Diversos trabajos han reportado que hasta un 10% de pacientes con diagnóstico inicial de LDCGB presentan reordenamientos de *MYC* y en aproximadamente un 6-7% se encuentran también reordenamientos de *BCL2*, *BCL6* o ambos.(34, 59) Se suelen presentar en pacientes mayores, con una mediana de edad de 60 años, aunque también pueden aparecer en pacientes más jóvenes.

### 1.3.2 Presentación clínica y diagnóstico

El linfoma B de alto grado se caracteriza por presentar un curso clínico agresivo. Normalmente se diagnostica en estadios avanzados y es frecuente la afectación extraganglionar.(60-63) La infiltración del SNC también es frecuente, aunque el porcentaje es variable entre las distintas series retrospectivas que describen entre un 7-50% de pacientes con infiltración al diagnóstico y entre un 5-48% a la recaída (Tabla 3).

**Tabla 3.** Infiltración del SNC en pacientes con linfoma B de alto grado “*double-hit*”

Estudio (año)	Tipo de estudio	n	SNC al diagnóstico	Recaída en SNC
Le Gouill S (2007)(63)	Retrospectivo	16	50%	NR
Tomita N (2009) (61)	Retrospectivo	27	9% (2/22)	13 (48%)
Li S (2012) (64)	Retrospectivo	52	23% (7/39)	NR

<b>Oki Y (2014) (60)</b>	Retrospectivo	129	10% (5/50)	Riesgo 3 años: 13%
<b>Petrich AM (2014) (65)</b>	Retrospectivo	311	7%	NR
<b>Sun H (2015) (66)</b>	Retrospectivo	32	13%	NR
<b>Savage K (2016) (67)</b>	Retrospectivo	24	NR	Riesgo 2 años: 4.5%
<b>Landsburg L (2017) (68)</b>	Retrospectivo	159	NR	5/25
<b>Dunleavy K (2018) (69)</b>	Prospectivo	24	5% (1/21)	NR

SNC, sistema nervioso central; NR, no reportado; n, número

Morfológicamente se caracteriza por presentar una infiltración difusa por células B grandes, similar al LDCGB, que en ocasiones pueden tener un aspecto blastoide. En aproximadamente la mitad de los casos también se puede observar una infiltración por células de mediano tamaño con un patrón de cielo estrellado similar al linfoma de Burkitt o presentar características intermedias entre el LDCGB y el linfoma de Burkitt.(1) Las células neoplásicas normalmente expresan CD20, CD19, CD79a, CD10 y BCL6. Es frecuente que también expresen MYC y BCL2, aunque el punto de corte para definir la positividad no está del todo establecido. El índice de proliferación Ki67 normalmente es elevado, aunque en algunas ocasiones puede ser bajo, sobre todo en los casos que presentan una morfología más similar al LDCGB.(1) Los estudios de hibridación fluorescente in situ (FISH) son esenciales para la identificación de los reordenamientos de *MYC*, *BCL2* y *BCL6*. La combinación que se observa con más frecuencia es la de *MYC* y *BCL2* (60%) seguido de *MYC* y *BCL6* (22%) y de la combinación de los tres reordenamientos *MYC*, *BCL2* y *BCL6* (18%).(34)

### 1.3.3 Alteraciones genéticas y moleculares

A nivel citogenético, además de las translocaciones mencionadas previamente, presentan con frecuencia cariotipos complejos con varias alteraciones cromosómicas.(1) El perfil mutacional, al igual que en el LDCGB es muy heterogéneo.

Dos estudios recientes han descrito la presencia de mutaciones recurrentes en genes que controlan la epigenética como *CREBBP* (14%), *KMT2D* (8%), y *EZH2* (4%), y en genes implicados en la apoptosis celular como *GNA13* (3%), *TP53* (4%), y *FOXO1* (3%), todos ellos también alterados con frecuencia en el LDCGB. Las mutaciones en *MYC* (10%) y *BCL2* (14%) también son frecuentes.(70, 71) Recientemente, también se han descrito mutaciones en los genes *TCF3* y su regulador negativo *ID3*, que se encuentran típicamente alterados en el linfoma de Burkitt.(72-74)

#### **1.3.4 Factores pronósticos y tratamiento**

Históricamente, este grupo de linfomas se ha asociado con un pronóstico desfavorable con una mediana de SLP de 1 año y una SG inferior a 2 años.(60, 65, 75, 76) Sin embargo, la mayoría de estos datos provienen de series retrospectivas donde los pacientes estaban probablemente seleccionados. Recientemente, el *Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium*, analizó la presencia de reordenamientos *MYC*, *BCL2* y *BCL6* en 2383 pacientes con diagnóstico de LDCGB tratados con R-CHOP. Los resultados de este estudio demuestran la presencia de estos reordenamientos en 139 pacientes y confirman que confieren un peor pronóstico, aunque no tan desfavorable como se había descrito inicialmente, con una SLP y SG a los 2 años del 55% y 60%, respectivamente.(77) Como en la mayoría de los linfomas agresivos, las recaídas ocurren normalmente en los dos primeros años.(77) y al igual que sucede en otros linfomas, la afectación del SNC al diagnóstico o a la recaída se asocia con una peor supervivencia.(60, 67, 68).

No existe un tratamiento estándar y como se ha descrito previamente, el esquema R-CHOP no consigue respuestas duraderas en un elevado número de casos, por lo que se recomienda utilizar combinaciones de quimioterapia de intensidad intermedia o alta. Diferentes estudios retrospectivos han demostrado buenos resultados con esquemas como R-EPOCH (rituximab, etopósido, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y prednisona), R-CODOX-M/IVAC (rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina,

metotrexato, ifosfamida, etopósido y citarabina) u otros esquemas similares, con los que se obtiene una SLP a los 2 años alrededor del 70%.(60, 65, 68, 69) Debido al alto riesgo de infiltración del SNC, se recomienda realizar profilaxis del SNC aunque la vía de administración y la pauta de tratamiento no están bien establecidas.(78, 79) Este punto se desarrolla con más detalle en el apartado 1.7.

## 1.4 LINFOMA DE BURKITT

### 1.4.1 Definición y epidemiología

El linfoma de Burkitt es un linfoma B maduro con un comportamiento clínico muy agresivo caracterizado por la translocación del gen *MYC*. Es una enfermedad poco frecuente, que representa menos del 1-2% de todos los linfomas en el mundo occidental.(11) Se reconocen tres variantes epidemiológicas, que se diferencian fundamentalmente por su distribución geográfica, presentación clínica y características biológicas.(1)

- a) Endémico: Se diagnostica principalmente en países de África ecuatorial y Papúa Nueva Guinea, sobre todo en zonas endémicas de malaria. En su etiopatogenia está implicado el VEB, presente en > 95% de los casos.
- b) Esporádico: No tiene una distribución geográfica definida, y es la forma más frecuente en los países occidentales. Es un linfoma poco frecuente con una incidencia de 2-3 casos por millón de habitantes/año. Normalmente se diagnostica en individuos jóvenes con mediana de edad de 30 años y predominio en varones (ratio 2-3:1). El VEB se detecta en un 20-30% de los casos.
- c) Asociado a inmunodeficiencia: Afecta con mayor frecuencia a personas infectadas por el VIH, sobre todo aquellas con recuento de linfocitos T CD4 superiores a 200/uL. Se identifica el VEB hasta en un 25-40% de los casos.

### 1.4.2 Presentación clínica y diagnóstico

El linfoma de Burkitt se caracteriza por presentar un curso clínico muy agresivo, masas voluminosas de crecimiento rápido y afectación extraganglionar. La localización extraganglionar más frecuente es el intestino aunque también es habitual la afectación de otros órganos.(1, 80) La variante endémica se caracteriza además por la presencia de masas mandibulares (50-70%).(1) En las tres variantes es frecuente la infiltración del SNC al diagnóstico, que está presente hasta en un 15-20% de los casos, sobre todo a nivel de leptomeníngeo (Tabla 4)(81-87).

Morfológicamente, las células tumorales presentan un tamaño intermedio y se disponen formando un patrón difuso y uniforme, siendo habitual la presencia de imágenes de mitosis. También se observan con frecuencia imágenes de “cielo estrellado”, debido a la presencia de macrófagos que fagocitan detritus celulares producidos por la alta tasa de proliferación celular. Las células normalmente expresan CD20, BCL6 y CD10. También es característica una alta expresión de MYC. El índice proliferativo es muy elevado con un Ki67 de alrededor del 100% en la mayoría de los casos. Desde el punto de vista genético se caracteriza por el reordenamiento del gen *MYC*. La translocación más frecuente (80%) es la t(8;14)(q24;q32) que yuxtapone del gen *MYC* en el cromosoma 8 con promotores del gen que codifica la cadena pesada de las inmunoglobulinas IgH (IGH) en el cromosoma 14. En los casos restantes el gen *MYC* se yuxtapone a los promotores de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas kappa t(2;8)(p12;q24) o lambda t(8;22)(q24;q11).(1)

### 1.4.3 Alteraciones genéticas y moleculares

En el año 2006, investigadores del *Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project*, demostraron que el linfoma de Burkitt posee un perfil de expresión génica propio, con

una elevada expresión de *MYC* y otros genes target de *MYC*.(88) Recientemente, diversos grupos han identificado la presencia de mutaciones recurrentes en *TCF3* o su regulador negativo *ID3*, hasta en un 70% de los pacientes.(73, 74, 89-91) Las mutaciones en *MYC* también son frecuentes y se observan en un 40-70% de los pacientes.(89, 90) Además, se han descrito mutaciones recurrentes en otros genes como *CCND3*, *GNA13*, *MKI67*, *SMARCA4*, *ARID1A* y *TP53*, que se encuentra mutado en el 30-40% de los casos.(73, 74, 89-91)

#### **1.4.4 Factores pronósticos y tratamiento**

La presencia de ciertas características al diagnóstico como la edad avanzada, afectación del estado general (ECOG  $\geq 2$ ), elevación de la LDH sérica o la infiltración de del SNC se han relacionado con un pronóstico más adverso.(80, 83, 87, 92, 93) Recientemente, un estudio retrospectivo de 641 pacientes con linfoma de Burkitt tratados en diferentes centros de Estados Unidos desarrolló un índice pronóstico llamado BL-IPI con las variables: edad superior a 40 años, ECOG 2-4, elevación de la LDH sérica al diagnóstico, y afectación del SNC. Este índice permite clasificar a los pacientes en 3 categorías en base a la presencia de 0 (riesgo bajo), 1 (riesgo intermedio) y 2 o más (riesgo alto) de estas características, con una SG a los 3 años de 96%, 82% y 63% respectivamente.(94)

El tratamiento se basa en esquemas de quimioterapia a dosis altas incluyendo fármacos con capacidad para penetrar al SNC, en combinación con rituximab, con lo que se consiguen buenas respuestas y una SG a los 3 años del 70-90% (Tabla 4) (81, 85, 87, 93, 95-97). El principal inconveniente de estos esquemas es su elevada toxicidad, sobre todo en los pacientes con comorbilidades o infección por VIH, con una tasa de mortalidad relacionada con el tratamiento entre el 5% y el 15%.(81, 93) En los últimos años, el esquema R-EPOCH ha demostrado también buenos resultados, con menor



toxicidad que los esquemas más intensivos.(82, 98). Sin embargo, uno de los inconvenientes es que este esquema no incluye fármacos con capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y la profilaxis del SNC se realiza solamente mediante la administración de MTX IT. A pesar de que en este estudio no se ha visto un mayor número de recaídas neuromeningeas, la presencia de infiltración del SNC al diagnóstico, se asoció de forma significativa con un mayor riesgo de progresión, con una SLP a los 4 años del 45% comparado con un 89% en los pacientes sin infiltración del SNC.(82) Los pacientes que presentan una recaída de la enfermedad tienen un pronóstico infausto con una supervivencia inferior a 3 meses.(83, 99)

**Tabla 4.** Infiltración del SNC y esquemas de tratamiento en el linfoma de Burkitt en la era del rituximab

Estudio (año)	n	VIH	SNC diagnóstico	Tratamiento	Recaída SNC	SG 3 años
Ribera JM (2013) (81)	118	38	12%	Burkimab	2%	74%
Thomas DA (2006) (95)	31	-	NR	R-HyperCVAD	NR	89%
Dunleavy K (2013) (98)	30	11	3%	DA-EPOCH-R SC-EPOCH-R	NR	100% 90%
Hoelzer D (2014) (85)	363	-	10%	R-QMT dosis altas	14%	80% (5a)
Noy A (2015) (86)	34	34	20%	CODOX/M-IVAC	NR	69% (2a)
Roschewski M (2020) (82)	113	28	10%	DA-EPOCH-R	2%	87% (4a)
Zhu KY (2020) (87)	81	18	11%	CODOX/M-IVAC-R	NR	81% (2a)
Zayac AS (2021) (83)	641	141	19%	CODOX-M-IVAC(R) HyperCVAD (R) DA-EPOCH-(R)	4% 3% 13%	72%*

n, número; SNC, sistema nervioso central; NR, no reportado; SG, supervivencia global; a, años; R, rituximab; QMT, quimioterapia; R-HyperCVAD, combinación de: rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, dexametasona, vincristina, citarabina y metotrexate; DA-EPOCH-R, dosis ajustadas de la combinación: rituximab, etopósido, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona; SC-EPOCH-R, dosis bajas del esquema EPOCH-R; CODOX/M-IVAC, combinación de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, metotrexato, ifosfamida, etopósido y citarabina.

\*En los pacientes tratados con quimioterapia y rituximab (90% del total)

## **1.5 LINFOMA DIFUSO DE CÉLULA GRANDE B PRIMARIO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

### **1.5.1 Definición y epidemiología**

El linfoma difuso de célula grande B primario del sistema nervioso central (LCP) es un tipo de LDCGB que se origina en el cerebro, la médula espinal, las leptomeninges o en los ojos. No se consideran LCP aquellos linfomas con afectación sistémica previa o con afectación sistémica concomitante, ni tampoco los linfomas asociados con inmunodeficiencias.(1)

Es un linfoma muy poco frecuente con una incidencia de 0.5 casos por 100.000 habitantes/año, y representa menos del 1% de todos los LNH y un 2-3% de todos los tumores cerebrales.(100) Puede afectar a personas de cualquier edad, con un pico de incidencia entre los 50 y 70 años.(100, 101)

### **1.5.2 Presentación clínica**

La presentación clínica es variable y depende de la localización del linfoma. La mayoría de pacientes presentan síntomas neurológicos como deterioro cognitivo o psicomotor (60%), síntomas visuales (30%) o convulsiones (20%).(102) La afectación leptomeníngea concomitante ocurre en un 15-20% de los casos y normalmente es asintomática.(103).

El linfoma cerebral primario se puede presentar en forma de una única lesión cerebral (65%) o múltiples lesiones (35%). La zona más frecuentemente afectada son los hemisferios cerebrales (38%), seguido del tálamo/ganglios de la base (16%), cuerpo calloso (14%), ventrículos cerebrales (12%) y cerebelo (9%).(104)

### 1.5.3 Diagnóstico y perfil molecular

A nivel histológico, presenta un patrón de crecimiento difuso, con un marcado angiotropismo, por lo que las células tumorales tienden a acumularse alrededor de los pequeños vasos. Las células tumorales expresan marcadores de células B como CD20, CD22 y CD79a. También es frecuente la expresión de IRF4/MUM1 y BCL6 y hasta un 20% de los casos expresan CD10.(1) El estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) debe realizarse siempre y cuando no existan contraindicaciones para estudiar la presencia de afectación leptomeníngea. La citología convencional (CC) sigue siendo la técnica *gold standard* para el análisis del LCR, aunque en los últimos años se ha añadido también la citometría de flujo multiparamétrica (CFM), que ofrece una mayor sensibilidad para detectar la presencia de células malignas.(106, 107) A nivel molecular, entre las alteraciones más frecuentes se encuentran mutaciones recurrentes en *MYD88* y *CD79b* presentes hasta en un 70% de los casos.(108) También se han descrito con frecuencia mutaciones en los genes *CARD11*, *TNFAIP3*, *PRDM1* y *TBL1XR1*.(109-111)

### 1.5.4 Biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo

En los últimos años, numerosos estudios han investigado la presencia de proteínas u otras moléculas en el LCR de estos pacientes, para utilizarlas como potenciales biomarcadores que ayuden al diagnóstico. Roy et al, utilizando estudios de proteómica, demostraron que los niveles elevados de antitrombina III (ATIII) en el LCR detectaban con mayor sensibilidad y especificidad la presencia de linfoma que la CC.(112) Más recientemente, otros grupos observaron que los pacientes con LCP, presentan niveles elevados de IL-6, IL10 y CXCL13 en el LCR, a diferencia de otros tumores cerebrales o enfermedades no malignas del SNC, aunque los puntos de corte utilizados en los diferentes estudios son muy variables.(113-117) Del mismo modo, también se han detectado niveles elevados de CD27 soluble o CD19 soluble en el LCR de pacientes

con linfoma cerebral.(118, 119) Por último, también se ha descrito la presencia de los microRNA miR-21, miR-19b y miR-92<sup>a</sup> con una sensibilidad y especificidad diagnósticas del 95% y 96%, respectivamente.(120) Sin embargo, la utilidad de todos estos biomarcadores en la práctica clínica habitual está aún por determinar.

### 1.5.5 Detección de DNA tumoral libre circulante

Debido a las dificultades para el diagnóstico y los riesgos asociados con la obtención de las biopsias cerebrales, en los últimos años ha habido un gran interés por analizar la presencia de DNA tumoral libre circulante (ctDNA, del inglés *cell free circulating tumor DNA*) en el plasma y el LCR de los pacientes con neoplasias cerebrales.(121-125)

#### a) Análisis de ctDNA en plasma

En los últimos años, varios trabajos han demostrado la presencia de ctDNA en el plasma de los pacientes con síndromes linfoproliferativos con afectación sistémica, demostrando que existe una buena correlación entre los niveles de ctDNA, el volumen metabólico tumoral y el pronóstico.(126-130) Recientemente, también se ha investigado la presencia de ctDNA en el plasma de los pacientes con linfoma cerebral (Tabla 5). Hattori et al. utilizando la técnica de *droplet digital PCR* (ddPCR), demostraron la presencia de la mutación *MYD88* L265P en el plasma de 8 (57%) de los pacientes que presentaban esta mutación en el tumor.(131) De forma similar, otro estudio, utilizando un panel de secuenciación de NGS, detectó la presencia de mutaciones somáticas en el plasma de 8 (32%) pacientes con LCP, aunque con *mutant allele frequencies* (MAFs) significativamente inferiores a las detectadas en el tumor.(132) Por último, un trabajo reciente encontró la mutación de *MYD88* L265P en un 4% de las muestras de plasma de pacientes con LCP a pesar de que se detectaba en el 85% de los tumores analizados. (133) Estos estudios sugieren que, en el LCP, al igual que sucede en otras neoplasias

cerebrales, la cantidad de ctDNA circulante en plasma es baja y por tanto el plasma no sería una buena fuente para determinar el ctDNA.

*b) Análisis de ctDNA en el LCR*

Existen todavía pocos trabajos que hayan utilizado el LCR como fuente para el estudio de ctDNA en pacientes con LCP (Tabla 5). En el año 2018, Hiewke-Jiwa et al, demostraron por primera vez la presencia de la mutación *MYD88* L265P en el LCR de 5 pacientes con linfoma e infiltración del SNC.(134) De forma similar, otro estudio detectó la mutación *MYD88* L265P en el LCR de 10 de 16 pacientes con LCP.(135) Posteriormente, otro grupo de investigadores observó la mutación *MYD88* L265P en el LCR de 6 (35%) pacientes al diagnóstico y en 3 (25%) en tratamiento.(136) También, Hickman et al. detectaron mutaciones somáticas en el LCR de 3 de 5 pacientes con LCP. Además, en los 3 pacientes también se detectaron mutaciones en el plasma, aunque con MAFs significativamente inferiores a las del LCR.(137) Recientemente, un grupo de investigadores del Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC), también realizó un análisis de ctDNA en 8 pacientes con LCP o secundario mediante un panel customizado de NGS. Previo al inicio del tratamiento, todos los pacientes presentaban ctDNA en el LCR. Además, analizaron muestras secuenciales de 9 pacientes y observaron que en aquellos que alcanzaban RC, la cantidad de ctDNA disminuía hasta hacerse indetectable; mientras que en 1 paciente con progresión precoz, los niveles de ctDNA permanecieron estables.(138) Por último, un grupo de investigadores de la Universidad de Brown examinaron recientemente la presencia de clonotipos específicos en el DNA libre circulante (cfDNA) del LCR utilizando una nueva técnica de NGS combinada con una PCR múltiple. En este estudio se detectó un clonotipo específico del tumor en el LCR de todos pacientes con linfoma cerebral (n=6), a pesar de que en algunos de ellos no se detectaba enfermedad por CC ni CFM.(139)

**Tabla 5.** Estudios de ctDNA en LCR y plasma en pacientes con linfoma cerebral

Estudio	Pacientes	Muestra	Técnica ctDNA	Resultados
<b>Hiemcke-Jiwa LS (2018)(134)</b>	3 LCP dx, 5 MW recaída	LCR	ddPCR	Se detectó la mutación <i>MYD88</i> L265P en 4 pacientes con MW y en 1 LCP
<b>Zorofchian S (2018) (140)</b>	1 LC secundario recaída	LCR	ddPCR	Se detectó la mutación <i>MYD88</i> L265P
<b>Rimelen V (2019) (135)</b>	11 LCP al dx 5 recaída	LCR	ddPCR	Se detectó <i>MYD88</i> L265P en 8 pacientes al dx y en 2 a la recaída
<b>Grommes C (2019) (138)</b>	8 LCP y secundario recaída	LCR	Panel NGS	Se detectaron $\geq 1$ mutación en todos los pacientes antes del tratamiento
<b>Hickmann AK (2019) (137)</b>	3 LCP dx	LCR y plasma	PCR digital	Se detectó ctDNA en el LCR y plasma de los 3 pacientes. La concentración de ctDNA en LCR fue superior al plasma
<b>Hiemcke-Jiwa LS (2019) (136)</b>	17 LCP retrospectivo 9 prospectivo al dx	LCR y plasma	ddPCR	Se detectó <i>MYD88</i> L265P en 6/17 (35%) pacientes con muestras retrospectivas y en 8/11 (73%) muestras de 9 pacientes de forma prospectiva. Se detectó <i>MYD88</i> en el plasma de 2/10 pacientes
<b>Olszewski AJ (2020) (139)</b>	6 LC primario y secundario 19 linfoma sistémico sin SNC	LCR y plasma	NGS IGH, IGK, IGL	Se detectó ctDNA en el LCR de todos los pacientes con linfoma cerebral y en 8 con linfoma sistémico (2 presentaron recaída en SNC)
<b>Hattori K (2018)(131)</b>	14 LCP dx	Plasma	ddPCR	Se detectó la mutación <i>MYD88</i> L265P en 8 (57%) pacientes
<b>Fontanilles M (2017) (132)</b>	25 LCP dx	Plasma	Panel NGS	$\geq 1$ mutación somática en 8 (32%) pacientes
<b>Montesinos-Rongen M (2020)(133)</b>	27 LCP dx	Plasma	Panel NGS	Se detectó <i>MYD88</i> L265P en 85% de los tumores y 4% de las muestras de plasma. <i>CD79B</i> en 59% de los tumores y en ningún plasma

LCP, linfoma cerebral primario; MW, macroglobulinemia de Waldenström; LC, linfoma cerebral; PCR; polimerase chain reaction; ddPCR, droplet digital PCR; ctDNA, cell free DNA; NGS, next generation sequencing; dx, diagnóstico; IGH, cadena pesada de las inmunoglobulinas; IGK, cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas; IGL, cadena ligera lambda de las inmunoglobulinas

### 1.5.6 Factores pronósticos

Los factores pronósticos más importantes en el LCP son la edad y el estado general del paciente. Además, el retraso en el inicio del tratamiento también ha demostrado ser uno de los factores más importantes asociado con un pronóstico desfavorable.(114) En las

últimas décadas, se han desarrollado dos índices pronósticos específicos. El *International Extranodal Lymphoma Study Group* (IELSG) utilizando 5 parámetros: edad > 60 años, ECOG > 1, LDH sérica elevada, proteínas en el LCR elevadas, y afectación de las estructuras profundas del cerebro, diferencian 3 grupos pronósticos según la presencia de 0–1, 2–3 ó 4–5 variables, con una SG a los 2 años del 80%, 48% y 15%, respectivamente.(141) Los investigadores del MSKCC desarrollaron otro índice que estratifica a los pacientes en tres grupos en función de la edad y el estado general. Así, los pacientes menores de 50 años tienen el mejor pronóstico con una mediana de SG de 8.5 años, los pacientes mayores de 50 años con un Karnofsky Performance Score (KPS) > 70 tienen una SG mediana de 3.2 años, y los pacientes mayores de 50 años pero con un KPS < 70 son los que tienen el peor pronóstico con una mediana de SG de 1 año.(142)

### **1.5.7 Tratamiento**

El tratamiento se basa en esquemas de quimioterapia que incluyan MTX a dosis intermedias o altas (1.5-8 g/m<sup>2</sup>) y otros fármacos con capacidad para penetrar la barrera hematoencefálica. Además, hace unos años se confirmó que la incorporación de rituximab mejoraba el pronóstico de estos pacientes, por lo que desde entonces se ha añadido a la mayoría de los esquemas terapéuticos. La radioterapia (RT) holocraneal también consigue un alto porcentaje de respuestas e históricamente ha sido uno de los tratamientos más utilizados. Sin embargo, las respuestas no son duraderas, debido sobre todo a las recaídas precoces fuera del campo irradiado con una supervivencia inferior a 12 meses.(143) Además, está bien descrita la aparición de toxicidad neurológica a largo plazo, principalmente en pacientes mayores de 60 años, por lo que en la actualidad se utiliza casi exclusivamente como tratamiento de rescate.

Recientemente, investigadores del grupo IELSG, demostraron en un estudio aleatorizado fase 2 (IELSG32), que la combinación de rituximab, tiotepa, citarabina y MTX (brazo C) era superior a la combinación de MTX y citarabina y tiotepa (brazo B) y MTX y citarabina (brazo A), con una SLP a los 2 años del 61% vs. 46% vs. 36%, respectivamente.(144) Una segunda aleatorización, asignaba a los pacientes que respondían al tratamiento de inducción, a recibir como consolidación un TASP vs. RT holocraneal. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos, con una SG a los 2 años del 77% vs. 82%.(145) Para los pacientes mayores, el uso de dosis intermedias o altas de MTX se ha asociado con una mejor supervivencia, por lo que siempre que sea posible se deberá incluir en el esquema de tratamiento.(147)

Para el tratamiento de la recaída, las opciones son más limitadas. En caso de que haya habido una respuesta previa, se recomienda utilizar nuevamente MTX en combinación con otros fármacos. La RT holocraneal también ha demostrado buenos resultados para el control de la enfermedad, aunque la duración de las respuestas es en general corta.(148) En los últimos años, nuevas moléculas como lenalidomida, pomalidomida o ibrutinib han demostrado resultados prometedores, aunque su papel está todavía por determinar.(138, 149-152)

## **1.6 INFILTRACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN LOS SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CON AFECTACIÓN SISTÉMICA**

### **1.6.1 Definición y características clínicas**

El linfoma cerebral secundario se define como la afectación del SNC por un linfoma sistémico, bien al momento del diagnóstico del linfoma, durante el transcurso de la enfermedad o al momento de la recaída. Es una complicación poco frecuente que ocurre



en aproximadamente 1-5% de los pacientes con linfomas agresivos, aunque existe una gran variabilidad según el subtipo de linfoma.(60, 81, 153) Además, la presencia de determinados factores clínicos y biológicos aumenta el riesgo de afectación del SNC, tal y como se detalla en el apartado 1.6.2.

Puede presentarse como una afectación aislada del SNC o puede ocurrir de forma concomitante a la afectación sistémica. La enfermedad puede aparecer como infiltración leptomeníngea, lesiones a nivel del parénquima cerebral o ambas. Las manifestaciones clínicas varían en función de la zona afectada, siendo los síntomas más frecuentes cefalea, náuseas o vómitos, deterioro cognitivo y parálisis de pares craneales. Algunos pacientes se encuentran asintomáticos sobre todo aquellos con infiltración leptomeníngea al diagnóstico.(154, 155)

## **1.6.2 Factores de riesgo de infiltración del sistema nervioso central**

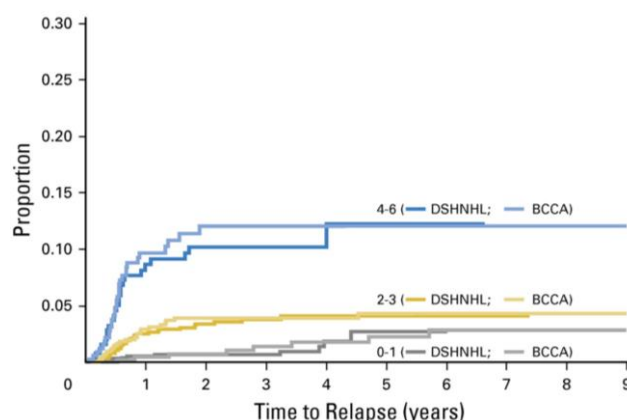
### *1.6.2.1 Subtipo histológico*

Los factores de riesgo de recaída en el SNC han sido evaluados en numerosos estudios a lo largo de los años. El subtipo histológico es el principal factor de riesgo, de modo que los linfomas agresivos son los que presentan un riesgo más elevado, en especial el linfoma de Burkitt, donde entre un 10-25% de los pacientes presentan afectación del SNC al diagnóstico.(81-83, 93) También el linfoma B de alto grado con reordenamientos de *MYC* y *BCL2* y/o *BCL6* se ha asociado históricamente con un riesgo elevado, aunque con una incidencia variable según los diferentes estudios entre el 5 y el 50%.(60, 61, 63-69) En el LDCGB el riesgo de recaída en el SNC es aproximadamente del 2%, aunque ciertas características clínicas y biológicas que se detallan en los apartados 1.6.2.2 y 1.6.2.3 pueden aumentar el riesgo hasta un 15%.(156) La variante blastoide del linfoma del manto también se ha asociado con un mayor riesgo de recaída.(157)

Los linfomas de curso clínico indolente, generalmente presentan un riesgo muy bajo de afectación neuromeningea. En el caso particular del linfoma linfoplasmacítico, la infiltración del SNC es una complicación poco frecuente pero bien descrita denominada síndrome de Bing Neel. Normalmente se asocia con un curso clínico benigno y un pronóstico más favorable que en los linfomas agresivos.(158)

#### 1.6.2.2 Factores clínicos

El general, los pacientes con LDCGB tienen un riesgo bajo de recaída en el SNC, sin embargo, la presencia de ciertas características clínicas, aumenta el riesgo de forma significativa. Recientemente, el *German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group* (DSHNHL) en colaboración con la *British Columbia Cancer Agency* (BCCA), desarrolló un índice pronóstico denominado CNS-IPI utilizando una cohorte de 2164 pacientes tratados dentro de ensayos clínicos con esquemas tipo R-CHOP. El CNS-IPI incluye las 5 variables del IPI y la afectación renal o de las glándulas suprarrenales; y divide a los pacientes en 3 grupos, según la presencia de 0-1, 2-3 o 4-6 variables, con un riesgo de recaída en el SNC a los 2 años del 0.6%, 3.4%, y 10.2%, respectivamente (Figura 4).(14)



**Figura 4.** Riesgo de recaída en el SNC según el índice pronóstico CNS-IPI. Se diferencian 3 grupos de riesgo, bajo (0-1), intermedio (2-3) y alto (4-6). BCCA, British Columbia Cancer Agency; DSHNHL, German High Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group.

\*Imagen adaptada de Schmitz et al. J Clin Oncol.2016;34:3150-3156

La afectación de ciertas regiones extraganglionares también se ha relacionado con un mayor riesgo de recaída neuromeningea, aunque la mayor parte de la evidencia proviene de estudios retrospectivos (tabla 6). La infiltración testicular, ya sea como localización primaria del linfoma o como extensión de un linfoma sistémico, se ha asociado a lo largo de los años con un riesgo de recaída en SNC de aproximadamente el 15–25% a los 10 años.(160-162) La afectación mamaria también se ha relacionado con un riesgo más elevado, de aproximadamente el 15%, tanto en estudios previos como posteriores a la introducción de rituximab.(163-165) También la afectación renal o de las glándulas suprarrenales se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedad en el SNC, tal y como se demuestra en el estudio del CNS-IPI y en otras series retrospectivas.(14, 165, 166) La relación entre la afectación de otras localizaciones y el riesgo de recaída neuromeningea es menos clara.(167-169) Por último, un estudio retrospectivo internacional con 1532 pacientes, demostró que la afectación de más de dos regiones extranodales identificadas por PET/TC, también se asociaba con un riesgo de infiltración del SNC del 15% a los 2 años.(13)

### 1.6.2.3 Factores biológicos

La presencia de reordenamientos de *MYC*, *BCL2* y/o *BCL6* confiere un mayor riesgo de recaída en el SNC. Las primeras series retrospectivas describían una tasa de infiltración del SNC de hasta el 50%, aunque cabe destacar un probable sesgo de selección.(61, 63) Estudios más recientes, han observado que existe un riesgo elevado, aunque no tanto como lo descrito inicialmente, con una tasa de recaída que oscila entre el 5% y el 20%, tal y como se detalla en el apartado 1.3.2 .(67, 68) La sobreexpresión por inmunohistoquímica de *MYC* y *BCL2* en el LDCGB, también se ha asociado en algunos estudios con un mayor riesgo de recaída, aunque estos hallazgos no han sido validados en otras series.(67, 159) La expresión de CD5 también se ha relacionado con un mayor riesgo de recaída en una serie retrospectiva de Japón.(170) Por último, un análisis

*posthoc* de una cohorte de 1418 pacientes con LDCGB incluidos en el ensayo clínico GOYA, demostró que la célula de origen determinada por GEP constituye un factor de riesgo independiente siendo los pacientes con fenotipo ABC o inclasificable y CNS-IPI de alto riesgo los que presentan un riesgo más elevado (15.2% a los 2 años).(159) (Tabla 6)

**Tabla 6.** Factores de riesgo de recaída en SNC en pacientes con LDCGB en la era de rituximab

	Frecuencia	Riesgo de recaída SNC (2 años)	Tiempo a la recaída (mediana)	Ref.
<b>Factores de riesgo clínicos</b>				
CNS-IPI alto $\geq 4$	12%-23%	10%-12%	NR	(14)
$\geq 2$ localizaciones EN	10%	15%	9 meses	(13)
Testículo	5%	6%-16% (5a)	2 años (5a loc)	(161, 162)
Riñón	4%	~20%	5 meses	(14, 165, 166)
Mama	2%	16%*-28% (10a)	3 años loc.	(163, 171)
<b>Factores de riesgo biológicos</b>				
Subtipo ABC <sup>#</sup>	~40%	9%	NR	(67)
ABC <sup>#</sup> + CNS-IPI $\geq 4$	8%	15%	8.5 meses	(159)
MYC+/BCL2+ IHQ <sup>+</sup>	30%	10%	NR	(67)
MYC+/BCL2+ double hit	~5%	5-48%*	6 meses	(60, 61, 67, 68)
CD5 + IHQ	~5%	13%*	16 meses	(170)

SNC, sistema nervioso central; Ref, referencia; EN, extranodal; ABC, *activated B cell*; IHQ, inmunohistoquímica; GEP, *gene expression profiling*; a, años; loc, localizado; NR, no reportado

\*Frecuencia de recaída en SNC, <sup>#</sup>Determinado por GEP, <sup>+</sup>MYC  $\geq 40\%$ , BCL2  $\geq 50\%$

### 1.6.3 Pruebas diagnósticas en el líquido cefalorraquídeo

En los pacientes que presentan síntomas neurológicos, o aquellos en los que haya una sospecha de afectación del SNC, se recomienda realizar una RMN cerebral y un análisis del LCR. Además, en los pacientes asintomáticos que presenten factores de riesgo, se recomienda realizar un análisis del LCR al momento del diagnóstico para evaluar la

presencia de células malignas. Los análisis que se realizan en el LCR de detallan a continuación.

#### *1.6.3.1 Citología convencional y citometría de flujo*

La citología convencional (CC) ha sido históricamente el método estándar para la analizar la afectación leptomenígea en los pacientes con síndromes linfoproliferativos.(172, 173) Es una técnica muy específica que sin embargo tiene una sensibilidad limitada, dando lugar hasta un 40% de falsos negativos.(174) En los últimos años, la citometría de flujo multiparamétrica (CFM) ha demostrado mejorar la sensibilidad de la CC para la detección de enfermedad leptomenígea en los linfomas agresivos, detectando células malignas en aproximadamente un 15% de casos donde la CC había resultado negativa.(106, 107, 175) Así, en un estudio del Grupo Español para el Estudio de la Enfermedad en el SNC, la CFM detectó células malignas en 27 de los 123 (22%) pacientes, mientras que la CC solo fue positiva en 7 (6%) casos.(106) De forma similar, un estudio internacional más reciente analizó muestras de LCR de pacientes con LDCGB de alto riesgo (n=246) y linfoma de Burkitt (n=80), antes de iniciar el tratamiento sistémico. La CFM demostró la presencia de enfermedad en un 13% de los pacientes con LDCGB y 11% de los pacientes con LB, mientras que la CC solo fue positiva en un 4.5% y un 6% de los casos, respectivamente.(107) Así pues, en la actualidad, se recomienda utilizar ambas técnicas, CC y CFM, en aquellos pacientes con linfomas agresivos que presenten factores de riesgo de afectación del SNC.(176)

#### *1.6.3.2 DNA circulante tumoral*

El LCR ha demostrado ser una buena fuente para el estudio del ctDNA en los tumores cerebrales sólidos y también en los linfomas con afectación cerebral única, tal y como

se ha comentado en el apartado 1.5.5. En cuanto a los linfomas sistémicos, los resultados preliminares de un estudio presentado en el *American Society of Hematology (ASH) Meeting* del año 2020, demostraron la presencia de clonotipos específicos del tumor en el LCR de 8 (42%) pacientes con linfoma sistémico con factores de riesgo de recaída en el SNC, pero sin evidencia de enfermedad. Con una mediana de seguimiento de 11 meses, 2 de los 8 pacientes con cfDNA detectable presentaron una recaída neuromeníngea; mientras que ningún paciente con resultado negativo había recaído por el momento.(139)

#### **1.6.4 Pronóstico y tratamiento**

La afectación del SNC por un linfoma sistémico se asocia a mal pronóstico, sobre todo cuando se presenta al momento de la recaída, con una supervivencia inferior a 6 meses.(14, 83, 155, 156, 177) En un estudio retrospectivo reciente de 254 pacientes con linfoma cerebral secundario, se observó que la presencia de determinadas variables como: edad < 60 años, buen estado general (ECOG 0-1), ausencia de afectación concomitante leptomeníngea y parenquimatosa, y recaída tras finalizar el tratamiento de primera línea; se asociaban con un pronóstico más favorable.(155)

El tratamiento de la infiltración del SNC se basa en el uso de terapias dirigidas contra el SNC, como la RT holocraneal o cráneo-espinal, fármacos de administración IT, clásicamente MTX y/o citarabina; o quimioterapia endovenosa con capacidad de penetrar la barrera hematoencefálica, aunque en general, la tasa de respuesta es baja.(83, 155, 178, 179) Varios estudios han demostrado que los mejores resultados se obtienen con esquemas de quimioterapia que incluyen dosis altas de MTX y/o citarabina,, seguido de un TASP de consolidación, con una SLP a los 2 años del 50%.(180, 181) En los últimos años, nuevas moléculas como lenalidomida, o ibrutinib, han mostrado resultados prometedores, aunque su papel está todavía por determinar.(138, 149-152) Por último, en una serie reciente de 8 pacientes con linfoma

cerebral secundario, la terapia con células CART demostró también resultados esperanzadores, con un perfil de toxicidad aceptable, por lo que actualmente su eficacia está siendo evaluada en ensayos clínicos prospectivos.(182)

## **1.7 ESTRATEGIAS DE PROFILAXIS DE LA RECAÍDA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

En los pacientes con linfomas agresivos, sin evidencia de enfermedad neuromeningea, pero con factores de riesgo de recaída en el SNC, se recomienda realizar tratamiento de profilaxis con fármacos con capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Esta recomendación proviene de los resultados observados en leucemia linfoblástica aguda y el linfoma de Burkitt, donde el número de recaídas en el SNC ha disminuido considerablemente tras la introducción de fármacos con capacidad de penetrar al SNC.(183). Sin embargo, en otros linfomas de alto grado como el LDCGB o el linfoma B de alto grado, la eficacia de la profilaxis del SNC es controvertida. Además, tampoco hay un consenso en cuanto a la vía de administración o la pauta de tratamiento.

### **1.7.1 Profilaxis intratecal**

La profilaxis intratecal (IT) con MTX y/o citarabina ha sido históricamente la más utilizada en los linfomas agresivos aunque en el LDCGB y linfoma B de alto grado existe controversia sobre su eficacia ya que la mayoría de la evidencia proviene de estudios prospectivos no aleatorizados o de estudios retrospectivos.(153, 156, 165, 177, 184-187) En la era del rituximab, el estudio RICOVER-60 llevado a cabo por el DSHNHL, comparó los esquemas CHOP-14 vs. R-CHOP-14 en 1217 pacientes mayores de 60 años. En este estudio, se recomendaba profilaxis del SNC con MTX IT en los pacientes con afectación testicular, de médula ósea o de estructuras de cabeza y cuello.

Finalmente, solo un 57% de los pacientes considerados de alto riesgo recibieron MTX IT profiláctico. El uso de profilaxis IT se asoció con un menor riesgo de recaídas neuromeníngeas en los pacientes tratados con CHOP; sin embargo, no se observó ningún beneficio en los pacientes que recibían R-CHOP. Además, observaron que la incorporación de rituximab al tratamiento se asociaba de forma significativa con un menor riesgo de recaída en el SNC.(153) Un análisis posterior de 2210 pacientes entre 18 y 60 años tratados dentro de diferentes ensayos clínicos con quimioterapia tipo CHOP asociada o no a rituximab, también observó falta de eficacia de la profilaxis con MTX IT, aunque los criterios de selección de los pacientes de riesgo que recibían profilaxis eran heterogéneos entre los diferentes ensayos clínicos.(177) Más recientemente, en otro estudio prospectivo de 984 pacientes que comparaba R-CHOP 14 vs. R-CHOP 21, tampoco se observó un menor número de recaídas en los pacientes que recibían profilaxis con MTX IT, aunque estos solo representaban un 18% de todos los pacientes incluidos.(156) De forma similar, varios estudios retrospectivos con un número elevado de pacientes llevados a cabo en los últimos años, tampoco han observado un claro beneficio de la profilaxis con MTX IT.(165, 184-188) Por último, un análisis *post hoc* del estudio GOYA que comparaba R-CHOP vs. obinutuzumab-CHOP, tampoco encontró diferencias significativas entre los pacientes con CNS-IPI de alto riesgo que recibían profilaxis con MTX IT y los pacientes que no recibían profilaxis.(159) Los resultados de los principales estudios prospectivos y retrospectivos que han evaluado la eficacia de la profilaxis con MTX IT llevados a cabo en la era de rituximab están resumidos en la tabla 7.

Un caso particular es el linfoma testicular, donde el uso de profilaxis con MTX IT sí que parece reducir el riesgo de recaída en el SNC.(162) Esta observación se basa en los resultados de un estudio prospectivo fase 2 con 53 pacientes con linfoma testicular localizado, tratados con R-CHOP más radioterapia testicular y 4 dosis de MTX IT. En



este estudio se observó un riesgo de recaída en el SNC del 6% a los 5 años, que es significativamente inferior a lo reportado en otras series.(160-162)

**Tabla 7.** Principales estudios de profilaxis con MTX IT en pacientes con LDCGB

Estudio	Tipo estudio	n	Pacientes	Tratamiento	Profilaxis IT	Riesgo recaída SNC	Tiempo recaída, mediana	Comentarios
<b>Boehme V 2009 (153)</b>	Análisis <i>post hoc</i> RICOVER-60	1217	61-80 a "agresivo"	CHOP vs. R-CHOP	57%	6.9% vs. 4.1% (2a)	8 m	No beneficio de MTX IT en pacientes de alto riesgo tratados con rituximab. Rituximab reduce el riesgo de recaída en SNC
<b>Tai WM 2011 (165)</b>	Retrospectivo	499	≥18 a	(R)-CHOP	18%*	6%* (2a)	6.7 m	No beneficio MTX IT, tampoco en pacientes de alto riesgo (UVA)
<b>Villa D 2011 (184)</b>	Retrospectivo	435	≥16 a, III-IV ó testicular	(R)-CHOP	4%*	6.4%*	6.7m*	No beneficio MTX IT en pacientes tratados con R-CHOP p=0.36 (UVA)
<b>Schmitz N 2012 (177)</b>	Análisis <i>post hoc</i> MinT y otros	2210	18-60 a	CHOP vs. R-CHOP	NR	2.3% (2a)	7 m	No diferencias entre IT vs. no px en pacientes tratados con R
<b>Kumar A 2012 (185)</b>	Prospectivo NCCN database	989	≥18 a	R-CHOP	11% (72% IT)	2% (2.5 a)	12.8 m	No diferencias entre px y no px en el grupo de alto riesgo. 5.4% px vs. 1.4% no px, p=0.08
<b>Tomita N 2015 (186)</b>	Retrospectivo	332	18-80 a	R-CHOP	12%	3.6% (3a)	8.2 m	IT MTX 8.7% vs. 2.9% no px (p=0.14). Tampoco diferencias en el grupo de alto riesgo
<b>Gleeson M 2017 (156)</b>	Análisis <i>post hoc</i> EC UK NCRI	984	≥18 a, II-IV ó I Bulky	R-CHOP 14 vs. R-CHOP 21	18%	1.9% (6a)	8 m	No diferencias IT vs. no px, tampoco ajustado por CNS-IPI (HR 1.12; 95% CI 0.4-3-14)
<b>Eyre T 2019 (187)</b>	Retrospectivo	690	> 70 a	R-CHOP	14%	3.1% (3a)	9.4 m	No diferencias entre IT y no px, tampoco ajustado por CNS-IPI
<b>Klanova M 2019 (159)</b>	Análisis <i>post hoc</i> GOYA	1418	≥18 a, IPI ≥ 2 ó IPI 1 si <60 ó IPI 0 si Bulky	R-CHOP vs. O-CHOP	10%	2.5% (2a)	8.5 m	No diferencias IT vs. no px (2.8% vs. 2.6%). Tampoco diferencias ajustado por CNS-IPI

NCCN, National Comprehensive Cancer Network; EC, ensayos clínicos; NR, no reportado; n, número; a, años; IT, intratecal; px, profilaxis; R, rituximab; O, obinutuzumab; m, meses. UVA, análisis univariado;

### 1.7.2 Profilaxis sistémica

En los últimos años, dada la dudosa eficacia de la profilaxis con MTX IT, se ha comenzado a utilizar MTX a dosis altas (HD-MTX) por vía endovenosa en los pacientes con LDCGB o linfoma B de alto grado con factores de riesgo de recaída en el SNC.

Numerosos estudios han observado que en la actualidad, la mayoría de las recaídas en los pacientes con LDCGB se producen en el parénquima cerebral y no a nivel leptomeníngeo, como sucedía antes de la introducción del rituximab.(168, 184, 185, 189) Dado que la administración por vía endovenosa de dosis altas de MTX 3–8 g/m<sup>2</sup> consigue niveles terapéuticos más elevados y mantenidos en el parénquima cerebral y el LCR, numerosos autores sugieren que sería más útil que el MTX IT para prevenir las recaídas en ambas localizaciones.(190, 191) Una de las principales limitaciones a la hora de administrar HD-MTX es la toxicidad asociada, sobre todo a nivel renal , por lo que su uso debe limitarse a pacientes sin comorbilidades y con una función renal adecuada.(192-194)

En los últimos años varios estudios han investigado la eficacia de este tipo de profilaxis en pacientes con LDCGB. Inicialmente, Abramson et al. analizaron retrospectivamente 65 pacientes con LDCGB de alto riesgo que habían recibido HD-MTX (3.5mg/m<sup>2</sup>) como profilaxis durante el tratamiento con R-CHOP, habitualmente el día 15 de los ciclos 2, 4 y 6. Solamente 2 (3%) pacientes presentaron una recaída en el SNC, y la tolerancia al tratamiento fue en general buena, aunque un 40% de los pacientes presentaron insuficiencia renal (IR) aguda transitoria y en 8 casos se tuvo que retrasar el siguiente ciclo de quimioterapia.(192) Otro estudio multicéntrico retrospectivo, comparó pacientes con LDCGB de alto riesgo que habían recibido tratamiento con: 1) (R)-CHOP más MTX IT; 2) (R)-CHOP más dos ciclos de HD-MTX; y 3) dosis altas de quimioterapia (HyperCVAD o CODOXM/IVAXC) con MTX IT y HD-MTX. En este estudio, los pacientes que recibían profilaxis con HD-MTX o dosis altas de citarabina presentaron un menor número de recaídas en el SNC que los que recibían solamente tratamiento con MTX IT, con un riesgo a los 3 años de 18%, 7% y 2%, en los grupos 1, 2 y 3 respectivamente.(193) Sin embargo, una de las limitaciones de este estudio es la heterogeneidad en cuanto a los factores de riesgo de recaída en SNC, y la

administración desigual de rituximab entre los diferentes grupos de tratamiento. Otro estudio retrospectivo del grupo italiano también observó un menor número de recaídas en los pacientes que recibían HD-MTX comparado con los que recibían IT.(188) Por el contrario, diversos estudios retrospectivos recientes no han demostrado un beneficio claro de la profilaxis con HD-MTX en pacientes con LDCGB de alto riesgo.(194, 195) Los principales estudios de profilaxis con HD-MTX en pacientes con LDCGB están resumidos en la tabla 8.

**Tabla 8.** Principales estudios retrospectivos de profilaxis con dosis altas de MTX en pacientes con LDCGB en la era de rituximab

Estudio, año	n	Factores de riesgo	Tratamiento	Tipo de profilaxis	Recaída SNC	Comentarios
<b>Abramson JS 2010 (192)</b>	65	EN alto riesgo <sup>†</sup> > 2 EN + LDH elevada Criterios de Hollander	R-CHOP	MTX 3-3.5g/m <sup>2</sup>	3%*	IR transitoria, 7/65 Retraso QMT, 8/65
<b>Cheah C 2014 (193)</b>	217	EN alto riesgo <sup>‡</sup> EN multiple, LDH elevada o síntomas B	1. CHOP +/- R 2. CHOP +/-R 3. Hyper-CVAD CODOX	1. Ninguna 2. MTX 1-3g/m <sup>2</sup> 3. MTX 1-3g/m <sup>2</sup> + IT	1. 18.4% (3a) 2. 6.9% (3a) 3. 2.3% (3a)	Beneficio px vs. no px 20 pacientes paran MTX por IR**
<b>Ferreri AJM 2015 (188)</b>	107	EN alto riesgo <sup>§</sup> Estadío III-IV + LDH elevada	R-CHOP	1. Ninguna ó IT 2. MTX 3g/m <sup>2</sup> (n=33)	1. 12%* 2. 0%	Beneficio No toxicidad grado ≥3
<b>Lee K 2019 (194)</b>	130	EN alto riesgo <sup>^</sup> ≥2 EN y LDH elevada CNS-IPI ≥ 4	R-CHOP	1. Ninguna 2. MTX 3.5g/m <sup>2</sup> (n=64)	1. 6.9% (2a) 2. 8.1% (2a)	No beneficio Toxicidad hepatica 20%, toxicidad renal 7.8%
<b>Goldschmidt N 2019 (195)</b>	480	EN alto riesgo <sup>#</sup> Estadío IV LDH elevada ≥1 EN	CHOP +/- R (80%)	MTX ≥ 3g/m <sup>2</sup> (27%)	6.5%	No beneficio
<b>Wilson MR 2020 (196)</b>	334	EN alto riesgo <sup>¶</sup> ≥2 EN + elevación LDH CNS-IPI ≥ 4	R-CHOP	1. MTX intercal. 2. MTX final	1. 6.8% (3a) 2. 4.7% (3a)	No diferencias entre intercalado y al final Más toxicidad con el esquema intercalado
<b>Orellana-Noia V 2020 (197)</b>	1030	Haber recibido profilaxis del SNC	R-CHOP R-EPOCH	1. MTX (20%) 2. IT (77%)	1. 7% 2. 5%	No beneficio MTX iv vs. IT. Tampoco en análisis de subgrupos (CNS-IPI, EN riesgo, elevación LDH)
<b>Puckrin R 2020 (198)</b>	326	CNS-IPI ≥ 4 Testicular <i>Double-hit</i> LDH elevada + ECOG >1 + > 1 EN	R-CHOP QMT dosis altas (11%) +/- TASP (21%)	1. Ninguna 2. MTX 3.5g/m <sup>2</sup> (35%)	1. 12.2% 2. 11.2%	No beneficio

FR; factores de riesgo; IR, insuficiencia renal; EN, extranodal; IT, intratecal; Ara-C, citarabina; ns, no significativo; QMT, quimioterapia; NR, no reportado; TASP, trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

\*frecuencia de recaída en SNC

\*\*solo descrita en pacientes del grupo 2

†Médula ósea, senos paranasales, testículos, epidural, riñón/adrenales y orbita.

‡Médula ósea, mamas, testículo, riñón/adrenales, senos, nasofaringe, hígado y paravertebral.

§Testículo, espinal, cráneo, senos, órbita, nasofaringe, riñón/adrenales y mama.

^Médula ósea, mama, testículo y senos paranasales.

#Médula ósea, testículo, órbita y mama.

¶Testículo, riñón/adrenales, mama, senos paranasales, paraespinal, ovario.



## **2 HIPÓTESIS**

## 2.1 HIPÓTESIS

La mayoría de las recaídas en el SNC en los pacientes con linfoma sistémico se producen de forma precoz tras el tratamiento de primera línea, lo que sugiere que las células malignas podrían estar ya presentes en el LCR al momento del diagnóstico y no ser detectadas por las técnicas convencionales.

Además, las recaídas en el SNC se asocian con muy mal pronóstico, con una supervivencia inferior a 6 meses. Por ello, en los pacientes que presentan factores de riesgo de recaída neuromeníngea se recomienda realizar profilaxis del SNC con fármacos con capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, aunque en la actualidad su eficacia es controvertida. Además, tampoco existe un consenso sobre cuál es el esquema de profilaxis más eficaz.

Las hipótesis sobre las cuales se asienta la presente Tesis Doctoral son las siguientes:

1. La detección de DNA tumoral libre circulante en el LCR podría ser más sensible que las técnicas convencionales para detectar la enfermedad en el SNC en pacientes con síndromes linfoproliferativos.
2. La profilaxis del SNC con fármacos con capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica administrados por vía endovenosa o IT, podría disminuir el número de recaídas neuromeníngeas en los pacientes con LDCGB con factores de riesgo de recaída en el SNC.

### **3 OBJETIVOS**



## 3.1 OBJETIVOS

### 3.1.1 Objetivo principal

1. Determinar la presencia de DNA tumoral circulante (ctDNA) mediante *droplet digital* PCR (ddPCR) en el LCR de los pacientes con linfoma cerebral o linfoma sistémico y factores de riesgo de recaída en el SNC, y analizar su correlación con las técnicas convencionales.

### 3.1.2 Objetivos secundarios

1. Analizar los niveles de ctDNA en muestras secuenciales de LCR y el plasma de pacientes con linfoma cerebral y linfoma sistémico al diagnóstico, durante y al final del tratamiento.
2. Correlacionar los resultados del estudio de ctDNA en el LCR con el riesgo de recaída en el SNC en pacientes con linfoma sistémico con factores de riesgo de recaída neuromeníngea y en pacientes con linfoma cerebral.
3. Analizar la eficacia de la profilaxis del SNC en los pacientes con LDCGB y factores de riesgo de recaída neuromeníngea.
4. Comparar la eficacia de los dos esquemas de profilaxis más utilizados, quimioterapia intratecal y dosis altas de metotrexato endovenoso, en los pacientes con LDCGB y factores de riesgo de recaída en el SNC.

## **4 METODOLOGÍA**



## 4.1 PRIMERA PUBLICACIÓN

Cell free circulating tumor DNA in cerebrospinal fluid detects and monitors central nervous system involvement of B-cell lymphomas. By Bobillo S, Crespo M, Escudero L, Mayor R, Raheja P, Carpio C, Rubio-Perez C, Tazón-Vega B, Palacio C, Carabia J, Jiménez I, Nieto JC, Montoro J, Martínez-Ricarte F, Castellvi J, Simó M, Puigdefàbregas L, Abrisqueta P, Bosch F, Seoane J. *Haematologica*. 2021 Feb 1;106(2):513-521. doi: 10.3324/haematol.2019.241208.

# Cell free circulating tumor DNA in cerebrospinal fluid detects and monitors central nervous system involvement of B-cell lymphomas



Ferrata Storti Foundation

Sabela Bobillo,<sup>1\*</sup> Marta Crespo,<sup>1\*</sup> Laura Escudero,<sup>2\*</sup> Regina Mayor,<sup>2</sup> Priyanka Raheja,<sup>1</sup> Cecilia Carpio,<sup>1</sup> Carlota Rubio-Perez,<sup>2</sup> Bárbara Tazón-Vega,<sup>1</sup> Carlos Palacio,<sup>1</sup> Júlia Carabia,<sup>1</sup> Isabel Jiménez,<sup>1</sup> Juan. C. Nieto,<sup>1</sup> Julia Montoro,<sup>1</sup> Francisco Martínez-Ricarte,<sup>3</sup> Josep Castellví,<sup>4</sup> Marc Simó,<sup>5</sup> Lluís Puigdefàbregas,<sup>1</sup> Pau Abrisqueta,<sup>1</sup> Francesc Bosch<sup>1#</sup> and Joan Seoane<sup>2,6#</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Experimental Hematology, Department of Hematology, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Vall d'Hebron University Hospital (HUVH), Universitat Autònoma de Barcelona, Department of Medicine; <sup>2</sup>Translational Research Program, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Vall d'Hebron University Hospital (HUVH), Universitat Autònoma de Barcelona; <sup>3</sup>Department of Neurosurgery, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital Vall d'Hebron; <sup>4</sup>Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona; <sup>5</sup>Department of Nuclear Medicine, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona and <sup>6</sup>Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain and CIBERONC

\*SB, MC and LE contributed equally as co-first authors.

#FB and JS contributed equally as co-senior authors.

Haematologica 2021  
Volume 106(2):513-521

## ABSTRACT

The levels of cell free circulating tumor DNA (ctDNA) in plasma correlate with treatment response and outcome in systemic lymphomas. Notably, in brain tumors, the levels of ctDNA in the cerebrospinal fluid (CSF) are higher than in plasma. Nevertheless, their role in central nervous system (CNS) lymphomas remains elusive. We evaluated the CSF and plasma from 19 patients: 6 restricted CNS lymphomas, 1 systemic and CNS lymphoma, and 12 systemic lymphomas. We performed whole exome sequencing or targeted sequencing to identify somatic mutations of the primary tumor, then variant-specific droplet digital polymerase chain reaction was designed for each mutation. At time of enrollment, we found ctDNA in the CSF of all patients with restricted CNS lymphoma but not in patients with systemic lymphoma without CNS involvement. Conversely, plasma ctDNA was detected in only 2 out of 6 patients with restricted CNS lymphoma with lower variant allele frequencies than CSF ctDNA. Moreover, we detected CSF ctDNA in one patient with CNS lymphoma in complete remission and in one patient with systemic lymphoma, 3 and 8 months before CNS relapse was confirmed, indicating that CSF ctDNA might detect CNS relapse earlier than conventional methods. Finally, in two cases with CNS lymphoma, CSF ctDNA was still detected after treatment even though no tumoral cells were observed by flow cytometry (FC), indicating that CSF ctDNA detected residual disease better than FC. In conclusion, CSF ctDNA can detect CNS lesions better than plasma ctDNA and FC. In addition, CSF ctDNA predicted CNS relapse in CNS and systemic lymphomas.

## Introduction

Central nervous system (CNS) involvement in B-cell malignancies is associated with dismal prognosis, especially in the relapse setting.<sup>1</sup> Primary central nervous system lymphoma (PCNSL) is defined by the presence of CNS lymphoma in the absence of systemic disease.<sup>2</sup> Conversely, secondary involvement of the CNS (SCNSL) is characterized by CNS infiltration with concomitant or previous history of systemic lymphoma.<sup>3</sup> The diagnosis of CNS lymphoma is commonly based on cra-

## Correspondence:

JOAN SEOANE  
jseoane@vhio.net

FRANCESC BOSCH  
fbosch@vhio.net

Received: October 22, 2019.

Accepted: February 18, 2020.

Pre-published: February 20, 2020.

<https://doi.org/10.3324/haematol.2019.241208>

©2021 Ferrata Storti Foundation

Material published in Haematologica is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>. Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>, sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.



nial magnetic resonance imaging (MRI) along with brain excisional biopsy or analysis of cerebrospinal fluid (CSF) or vitreous fluid.<sup>4</sup> In some cases, biopsies can be challenging owing to the difficulty in accessing the tumor and the inherent risks associated with cranial surgery.

Patients with aggressive systemic lymphomas and risk factors for CNS relapse are routinely monitored by cytology and flow cytometry (FC) analysis of CSF. Cytology is highly specific but has a very limited sensitivity, showing up to 40% false negatives. In contrast, FC is more sensitive, detecting malignant cells in up to 5-15% of patients with negative cytology.<sup>5,6</sup> However, FC still has some limitations, and in a relevant fraction of patients, recurrence in the CNS is found shortly after a negative result by FC, suggesting that tumor cells were undetected.

Several studies have demonstrated that cell free circulating tumor DNA (ctDNA) can be detected in plasma from patients with B-cell lymphomas and correlates with metabolic tumor volume and outcome.<sup>7,8</sup> Due to the difficulties in the diagnosis of brain tumors, there is growing interest in the analysis of ctDNA in plasma and CSF and their potential utility in the management of these patients. Thus, we and others have explored the analysis of CSF in solid brain tumors as a better source of ctDNA compared with plasma.<sup>9-12</sup> As per B-cell lymphomas, only a minority of patients with restricted CNS lymphomas present detectable ctDNA in plasma<sup>13,14</sup> and only a few studies of ctDNA in CSF have been performed so far.<sup>15-19</sup> In this regard, the *MYD88* L265P mutation has been identified in the CSF ctDNA from some patients with PCNSL and lymphoplasmacytic lymphoma with CNS involvement.<sup>17-19</sup> More recently, a different study using a next-generation sequencing (NGS)-based assay, detected at least one tumor-derived genetic alteration in the CSF from eight patients with relapsed CNS lymphoma and demonstrated that CSF ctDNA levels correlated with treatment response.<sup>15</sup>

Taken together, these studies demonstrate that CSF ctDNA could be detected in patients with CNS lymphomas and could be useful to monitor the disease, but a thorough analysis of its relevance on the diagnosis and monitoring of the disease is still needed.

Here, we conducted a study to explore whether the analysis of ctDNA in the CSF and plasma could be useful to complement the diagnosis and molecular profile of tumors, as well as to monitor treatment response in CNS lymphomas. In addition, we evaluated whether the presence of CSF ctDNA in patients with systemic lymphoma could be more sensitive to detect CNS malignancies than CSF standard analyses and plasma ctDNA.

## Methods

### Patients and samples

Nineteen patients diagnosed with the following conditions were included: restricted CNS lymphomas, n=6; PCNSL, n=1; SCNSL, n=5; systemic lymphoma with concomitant CNS involvement, n=1; and systemic lymphoma without CNS disease but risk factors for CNS relapse, n=12. Risk factors for CNS relapse were defined as: diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) with testis, kidney or adrenal involvement; DLBCL with involvement of two or more extranodal sites along with high lactate dehydrogenase; high-grade B-cell lymphoma (HGBCL) with *MYC* and/or *BCL2* rearrangements or Burkitt lymphoma. All patients were diagnosed and treated at Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona,

Spain). Diagnosis of CNS disease was established by MRI imaging and tumor biopsy in cases with parenchymal involvement, or by FC and cytology in cases with leptomeningeal disease.

A written informed consent was obtained from all individuals in accordance with the Declaration of Helsinki and the study was approved by the local clinical research ethics committee. As part of standard of care practice, in patients with systemic lymphoma and risk factors for CNS relapse, prophylactic intrathecal (IT) methotrexate (MTX) was administered every 3 weeks together with systemic chemotherapy. In addition, in cases with leptomeningeal disease, IT chemotherapy was administered every 3-4 days until malignant cells were not detected by FC. CSF (1-2 mL) and plasma were collected before treatment in all patients and sequentially in patients who received IT chemotherapy as part of routine practice. Cytology and FC were performed in all CSF samples. Two out of 7 patients with CNS lymphoma and 3 out of 12 with systemic lymphoma received steroids before the baseline CSF sample. Evaluation of response was assessed at the end of treatment and/or on suspicion of disease progression by using MRI imaging in cases with CNS parenchymal involvement and by CSF analysis (FC and cytology) in patients with leptomeningeal disease. Positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) was used to assess response at the end of treatment in patients with systemic lymphoma.

### Sample collection and DNA extraction

The median volume of plasma and CSF obtained was 2.5 mL (range: 1-6) and 1 mL (range: 0.3-2), respectively. Peripheral blood was collected in tubes containing K2EDTA (Vacutainer) and centrifuged at 1600xg for 10 minutes (min). The plasma was then transferred to another tube that was further centrifuged at 3000xg for 5 min. CSF samples were centrifuged at 3000xg for 5 min. The supernatant was collected and CSF-derived and plasma-derived circulating cell free DNA (cfDNA) was extracted using the QIAamp Circulating Nucleic Acids kit and quantified using a fluorimeter. DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples using the QIAamp DNA FFPE tissue kit. Germline DNA was extracted from peripheral blood granulocytes using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit.

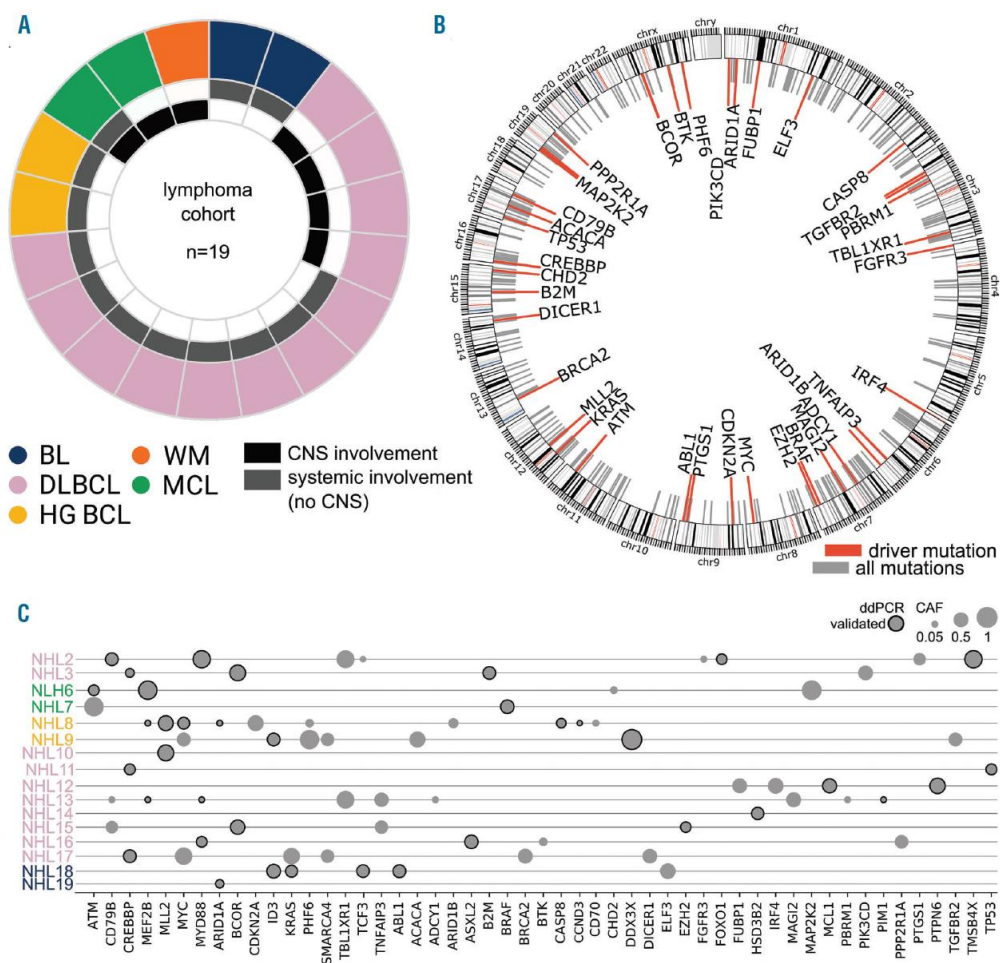
### DNA sequencing and mutation genomic analysis

We performed DNA sequencing of the tumors of 16 out of 19 patients: 11 of 16 were sequenced using a 300 gene targeted NGS panel (Vall d'Hebron Institute of Oncology, Genomics Facility) and in the remaining five, whole-exome DNA sequencing (WES) was performed in both the tumor and germline DNA. SureSelect Human All Exon V5 (Agilent Technologies) was used to perform whole exome enrichment for the Illumina paired-read sequencing platform HiSeq2500 with a read length of 2x100bp (*Online Supplementary Appendix*). The amount of DNA used for NGS panel and WES was 1 µg and 0.4-4 µg, respectively. In 3 out of 19 patients (NHL1, NHL4 and NHL5), *MYD88* L265P mutation was detected in the tumor by routine genomic analysis performed at diagnosis, therefore tumor DNA sequencing was not performed.

### Droplet digital polymerase chain reaction and quantification of circulating tumor-specific DNA

Given the limited amount of cfDNA available, ddPCR was performed to determine the presence of ctDNA mutations in the CSF and plasma, ensuring sensitivity and precision. A set of driver mutations along with additional mutations not predicted as drivers by Cancer Genome Interpreter (CGI), but relevant according to expert knowledge, were selected for further validation by ddPCR.

Custom Taqman SNP genotyping assays for ddPCR were designed to specifically detect the selected point mutations and



**Figure 1. Genomic landscape of the cohort of study.** (A) Pie chart representing the proportion of samples of each lymphoma type (see color legend). Two sectors in each sample depict whether the patient had systemic (gray) or central nervous system (CNS) restricted disease (black). (B) Circus plot representing all mutations identified across 16 lymphoma patients. A mutation was defined as driver according to Cancer Genome Interpreter (see *Online Supplementary Appendix*) colored in red (see Methods section). Genes with recurrent mutations have been highlighted in bold. (C) Bubble plot representing all driver mutations and droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) validated mutations identified in each patient. The bubble size represents the cancer allelic fraction (CAF) (see *Online Supplementary Appendix*) and the border has been highlighted in black if it has been found by ddPCR, in either the cerebrospinal fluid or plasma of each patient. NHL: non-Hodgkin lymphoma; DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma; HGBCL: high-grade B-cell lymphoma; WM: Waldenström macroglobulinemia; MCL: mantle cell lymphoma; BL: Burkitt lymphoma.

the corresponding wild-type alleles. Genomic DNA from tumor tissues (10 ng), germline DNA from peripheral blood granulocytes (10 ng), plasma DNA, and CSF DNA (1-5 ng) were used for ddPCR analysis using the QX200 Droplet Digital PCR system according to manufacturer's protocols and the literature.<sup>20</sup>

**Results**

**Circulating tumor DNA in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system restricted B-cell lymphoma is more abundant than in plasma**

Here, we sought to analyze the presence of ctDNA in the CSF and plasma from 19 patients with B-cell lymphomas with and without CNS disease at time of enrollment (Table 1). Six patients exhibited CNS restricted disease, one systemic and CNS disease, and 12 systemic disease with no

CNS involvement. CSF was obtained at the same time as plasma in all patients. WES or targeted sequencing of the tumors was performed to identify somatic mutations (Figure 1). Variant-specific ddPCR detecting 1-5 variants per patient was performed to detect ctDNA.

To demonstrate that the variant-specific ddPCR was highly specific, we performed *MYD88* L265P ddPCR in ten CSF samples obtained from patients with hydrocephalus without a brain tumor (n=6), and from patients diagnosed with glioma (n=3) and a cavernoma (n=1). No mutant allele was found in any of the cases.

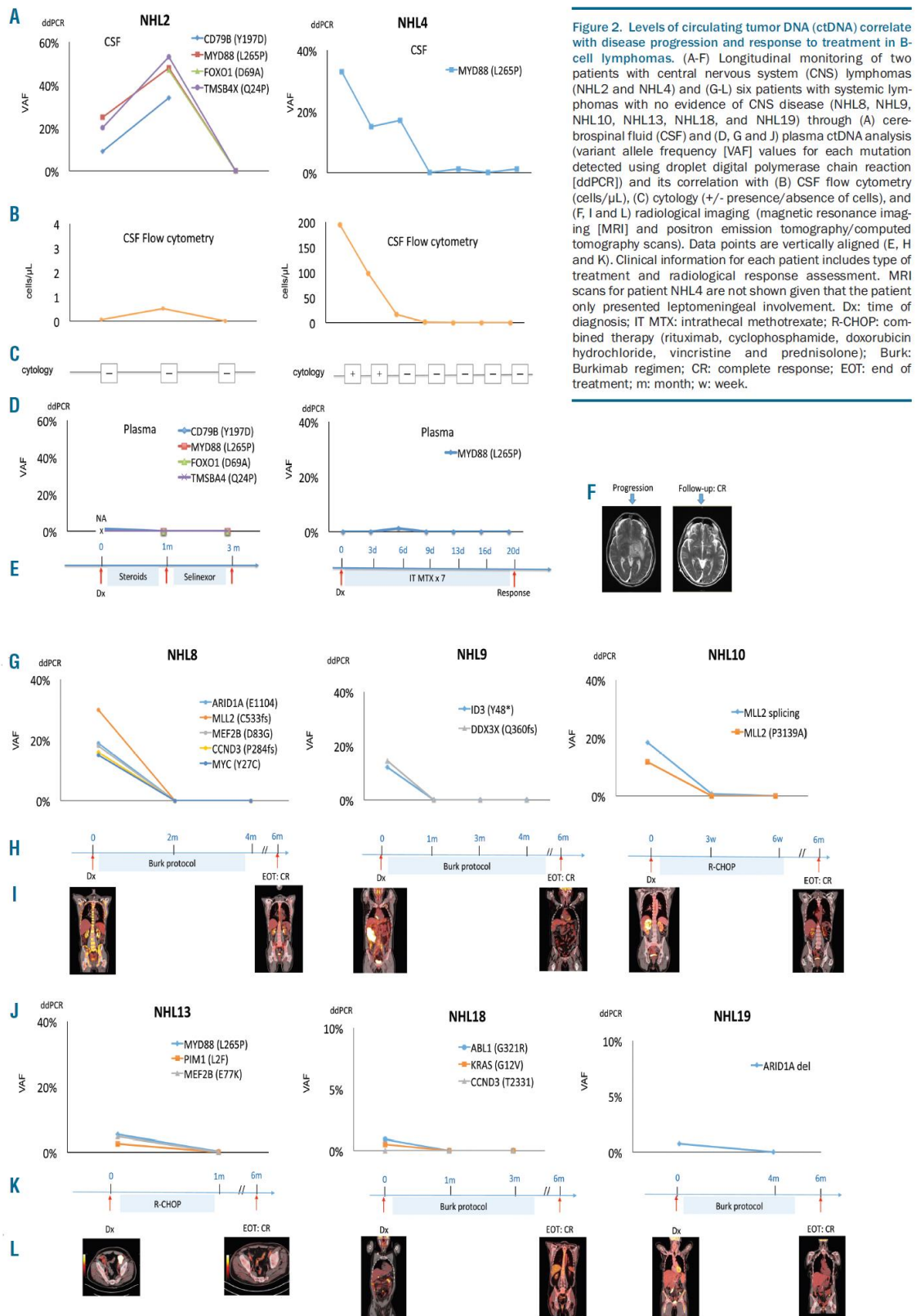
Analysis of the ctDNA in the CSF and plasma of the six CNS restricted lymphomas showed detectable ctDNA at high variant allele frequency (VAF) (ranging from 1% to 95%) in all cases. In contrast, ctDNA in plasma was only detected in 2 out of 6 cases at very low VAF (always <5%) (Table 1), highlighting that in CNS restricted lymphomas,

Table 1. Patients' characteristics and tumor mutations at the time of enrolment and outcome.

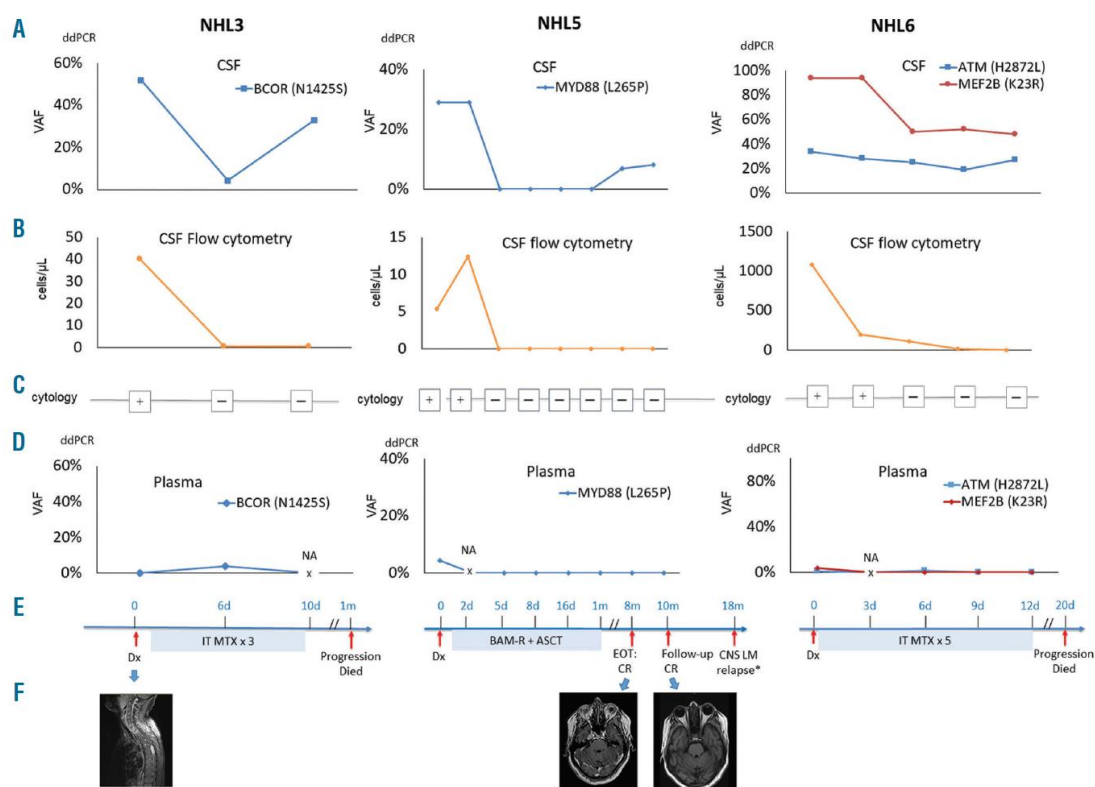
ID	Age	Histol	Dx	Disease status	Systemic inv	CNS inv	CNS (FC/C)	Tumor seq	Tumor mutations	VAF tumor	VAF CSF	VAF plasma	Outcome
<b>CNS lymphoma</b>													
NHL1	59	DLBCL	PCNSL	New dx	No	P	-/-	-	MYD88 L265P	-	48%	N	CR
NHL2	60	DLBCL	SCNSL	Relapse	No	P, LM	+/-	WES	CD79B Y197D	17%	9%	-	CR
									MYD88 L265P	22%	25%	-	
									FOXO1 D69A	13%	-	-	
									TMSB4A Q24P	54%	20%	-	
NHL3	53	DLBCL	SCNSL	Relapse	No	P, LM	+/+	Panel	B2M MIT	41%	N	N	PD, died
									BCOR N145S	68%	52%	N	
									CREBBP R1664C	21%	N	N	
NHL4	75	WM	SCNSL	Relapse	No	LM	+/+	-	MYD88 L265P	-	33%	N	CR
NHL5	58	DLBCL	SCNSL	Relapse	No	P, LM	+/+	-	MYD88 L265P	86%	29%	5%	CR, CNS relapse
NHL6	73	MCL	SCNSL	Relapse	No	LM	+/+	Panel	ATM H2872L	31%	34%	2%	PD, died
									MEF2B K23R	90%	95%	4%	
<b>CNS and systemic lymphoma</b>													
NHL7	72	MCL	SCNSL	Relapse	LN	LM	+/+	Panel	BRAF N581S	44%	N	7%	PD, died
<b>Systemic lymphoma</b>													
NHL8	50	HGBCL	-	New dx	LN, bone, intestine	No	-/-	WES	MYC Y27C	28%	N	16%	CR
									ARID1A E1104	32%	N	20%	
									MEF2B D83G	33%	N	18%	
									MLL2 C533fs	50%	N	31%	
									CCND3 P284fs	29%	N	16%	
NHL9	38	HGBCL	-	New dx	LN, intestine	No	-/-	WES	ID3 Y48*	38%	N	12%	CR
									DDX3X Q360fs	98%	N	15%	
NHL10	73	DLBCL	-	New dx	LN, kidney	No	-/-	Panel	MLL2 splicing	60%	N	19%	CR
									MLL2 P3139A	34%	N	12%	
NHL11	72	DLBCL	-	New dx	LN, lung, ileum	No	-/-	Panel	TP53 R273C	32%	N	12%	CR
									CREBBP Y145C	25%	N	27%	
NHL12	86	DLBCL	-	New dx	LN, breast	No	-/-	Panel	MCL1 L186F	31%	N	0.9%	CR
									PTNPN6 T80fs	26%	N	N	
NHL13	77	DLBCL	-	New dx	LN, testes	No	-/-	WES	MYD88 L265P	29%	N	5%	CR
									PIMI1 L2F	27%	N	3%	
									MEF2B E77K	27%	N	5%	
NHL14	62	DLBCL	-	New dx	Teste	No	-/-	Panel	HSD3B2 L108W	22%	N	N	CR
									MYD88 L265P	31%	N	N	
NHL15	75	DLBCL	-	New dx	LN, testes, liver, adrenal	No	-/-	Panel	BCOR S1517fs	63%	N	N	CR
									EZH2 P557L	34%	N	N	
NHL16 <sup>†</sup>	57	DLBCL	-	New dx	LN, sinus, bones	No	-/-	Panel	MYD88 V217F	28%	N	N	CR, CNS relapse
									ASXL2 K927R	42%	N	N	
NHL17	58	HGBCL	-	New dx	LN	No	-/-	Panel	CREBBP S1436I	50%	N	16%	CR, CNS relapse
NHL18 <sup>†</sup>	60	BL	-	New dx	LN, intestine	No	-/-	WES	ID3 L54V	37%	N	N	CR
									KRAS G12V	34%	N	1%	
									TCF3 D561E	42%	N	N	
									ABL1 G321R	43%	N	0.5%	
NHL19 <sup>†</sup>	65	BL	-	New dx	LN, bone	No	-/-	Panel	ARID1A del	9%	N	1%	CR

BL: Burkitt lymphoma; C: cytology; CNS: central nervous system; CR: complete response; CSF: cerebrospinal fluid; DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma; Dx: diagnosis; FC: flow cytometry; HGBCL: high-grade B-cell lymphoma; Histol: histology; ID: patient identification number; inv: involvement; LM: leptomeningeal; LN: lymph nodes; MCL: mantle cell lymphoma; N: not detectable; Neg: negative; NHL: non-Hodgkin lymphoma; P: parenchyma; PCNSL: primary central nervous system lymphoma; PD: progressive disease; Pos: positive; SCNSL: secondary central nervous system lymphoma; seq: sequencing; VAF: variant allele frequency; WES: whole exome sequencing; WM: Waldenström macroglobulinemia. <sup>†</sup>Plasma samples were collected after administration of systemic chemotherapy.





**Figure 2.** Levels of circulating tumor DNA (ctDNA) correlate with disease progression and response to treatment in B-cell lymphomas. (A-F) Longitudinal monitoring of two patients with central nervous system (CNS) lymphomas (NHL2 and NHL4) and (G-L) six patients with systemic lymphomas with no evidence of CNS disease (NHL8, NHL9, NHL10, NHL13, NHL18, and NHL19) through (A) cerebrospinal fluid (CSF) and (D, G and J) plasma ctDNA analysis (variant allele frequency [VAF] values for each mutation detected using droplet digital polymerase chain reaction [ddPCR]) and its correlation with (B) CSF flow cytometry (cells/ $\mu$ L), (C) cytology (+/- presence/absence of cells), and (F, I and L) radiological imaging (magnetic resonance imaging [MRI] and positron emission tomography/computed tomography scans). Data points are vertically aligned (E, H and K). Clinical information for each patient includes type of treatment and radiological response assessment. MRI scans for patient NHL4 are not shown given that the patient only presented leptomeningeal involvement. Dx: time of diagnosis; IT MTX: intrathecal methotrexate; R-CHOP: combined therapy (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin hydrochloride, vincristine and prednisolone); Burk: Burkimab regimen; CR: complete response; EOT: end of treatment; m: month; w: week.



**Figure 3.** Cerebrospinal fluid (CSF) circulating tumor DNA (ctDNA) is more sensitive than flow cytometry (FC) to detect central nervous system (CNS) relapse and residual disease in CNS-restricted lymphomas. Longitudinal monitoring of three patients with CNS-restricted lymphomas (NHL3, NHL5 and NHL6) through (A) CSF and (D) plasma ctDNA analysis (variant allele frequency [VAF] values for each mutation obtained by droplet digital polymerase chain reaction [ddPCR]) and its correlation with (B) CSF flow cytometry (cells/ $\mu$ L), (C) cytology (+/- presence/absence of cells), (E) Type of treatment and response assessment, (F) radiological imaging (MRI). Data points are vertically aligned. MRI scans for patient NHL6 and NHL5 are not shown given that the patient only presented leptomeningeal involvement at diagnosis. Dx: time of diagnosis; IT MTX: intrathecal methotrexate; BAM-R: combined therapy (rituximab, carmustine, cytarabine and methotrexate); ASCT: autologous stem cell transplant; CR: complete response; LM: leptomeningeal; EOT: end of treatment; d: day; m: month; NA: not available. \*CSF sample was not available for ctDNA analyses.

ctDNA is better identified in the CSF than in plasma. Interestingly, these two cases with restricted CNS lymphoma in which plasma ctDNA was detected had a previous history of systemic disease. This finding might reveal a systemic nature of some restricted SCNSL and deserves further investigation in larger studies.

We then analyzed 12 patients with systemic lymphoma without CNS involvement but with high risk for CNS relapse. In these cases, lumbar puncture was performed to rule out CNS infiltration and to administer IT MTX. As opposed to cases with CNS involvement, no ctDNA was detected in the CSF while it was detected at high VAF in the plasma of the majority of cases (Table 1). Finally, the patient with systemic and concomitant CNS disease had ctDNA in plasma but not in the CSF, suggesting that some CNS lesions cannot be captured through CSF ctDNA.

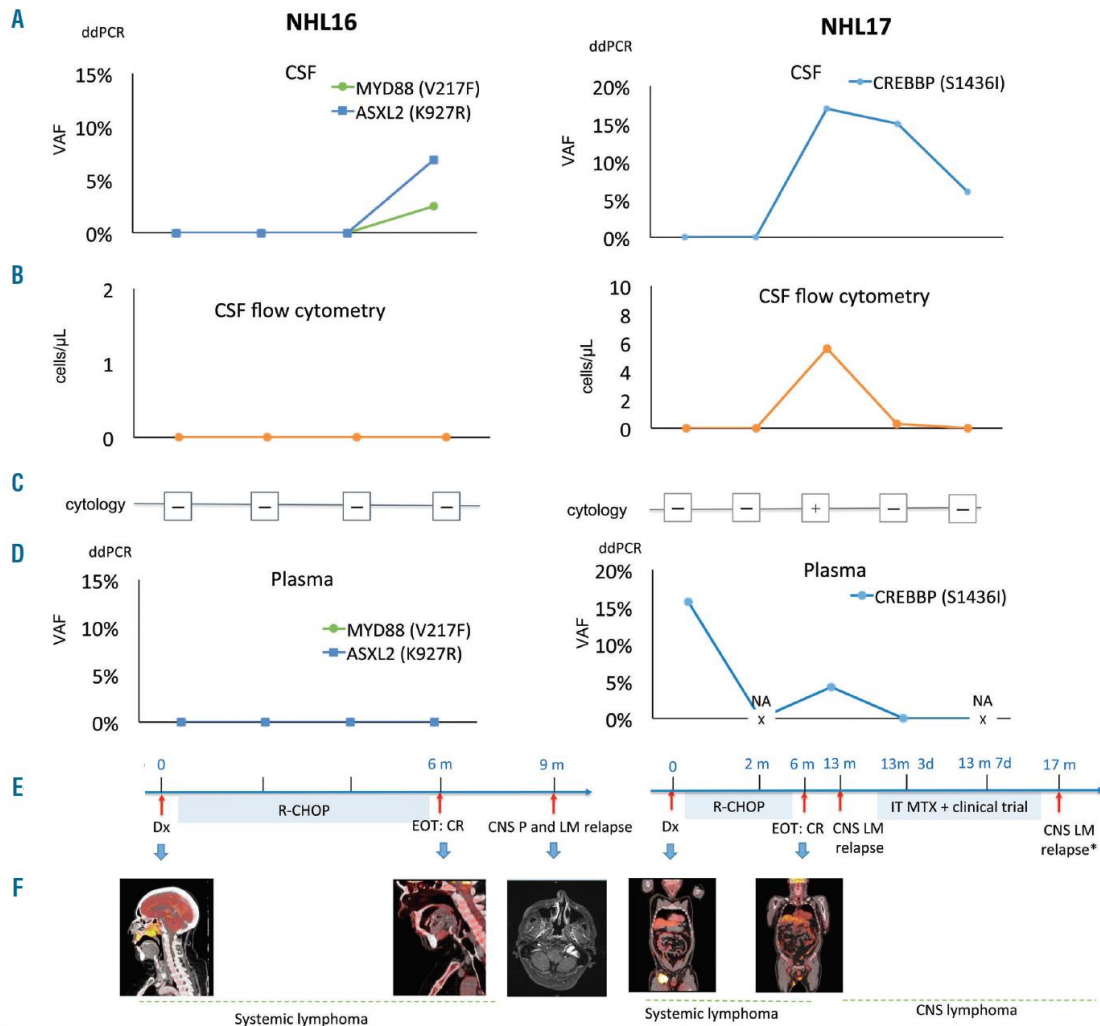
#### Central nervous system circulating tumor DNA exhibits higher sensitivity than flow cytometry in detecting central nervous system lesions

We next correlated the detection of ctDNA with the identification of malignant cells by conventional tests in the same CSF samples at time of enrollment. Cytology detected the presence of malignant cells in 4 out of 6 CNS restricted lymphomas. In these four cases the FC analysis also detect-

ed lymphoma cells. In one case (NHL2), cytology was normal but a small amount of tumor cells was observed by FC (0.06 cell/ $\mu$ L). Notably, all six cases exhibited CSF ctDNA. Importantly, in a patient with newly diagnosed PCNSL (NHL1) we could not detect lymphoma cells by FC or cytology; however, ctDNA was abundantly found in the CSF (Table 1). These results indicate that ctDNA analysis of the CSF can improve the detection of CNS lymphoma by conventional techniques.

#### Cerebrospinal fluid circulating tumor DNA can be used to monitor central nervous system tumor burden and response to treatment

To address whether the amount of CSF ctDNA could be useful to monitor tumor burden in CNS lymphomas, we analyzed sequential concomitant samples of CSF and plasma. CSF was obtained as part of the standard procedures before each administration of IT MTX or on suspicion of relapse. Tumor burden was evaluated by MRI and/or FC depending on the lymphoma location. We observed that CSF ctDNA levels correlated with disease response and progression (Figure 2). In addition, tumor burden measured by MRI and FC was concordant with CSF ctDNA levels in two patients with CNS lymphoma (Figure 2). Importantly, plasma ctDNA levels remained constantly low (VAF <6%)



**Figure 4.** Cerebrospinal fluid (CSF) circulating tumor DNA (ctDNA) detects central nervous system (CNS) involvement and residual disease in patients with systemic lymphoma and is more sensitive than conventional tests. Longitudinal analyses of (A) CSF and (D) plasma ctDNA (VAF values for each mutation detected using ddPCR) and correlation with (B) CSF FC (cells/μL), (C) cytology (+/- presence/absence of cells), and (E) type of treatment and radiological response assessment. (F) Radiological imaging (magnetic resonance imaging [MRI] and positron emission tomography/computed tomography scans) in two patients with systemic lymphoma (NHL16 and NHL17) that present CNS relapse. Data points are vertically aligned. MRI scans for patient NHL17 are not shown given that the patient only presented leptomeningeal involvement. Dx: time of diagnosis; R-CHOP: combined therapy (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone); IT MTX: intrathecal methotrexate; CR: complete response; P: parenchymal; LM: leptomeningeal; EOT: end of treatment; m: month; d: days; NA: not available. \*CSF sample was not available for ctDNA analyses

in sequential samples and did not correlate with the disease status, underlining the fact that plasma ctDNA is not useful to monitor the activity of CNS restricted lymphomas (Figure 2).

Six patients with systemic lymphoma without CNS involvement had sequential plasma samples collected at the same time as CSF. We observed that plasma ctDNA became undetectable after the first cycle of treatment in all cases, in agreement with PET/CT results (Figure 2), suggesting that plasma ctDNA is a good tool to monitor response to treatment in these patients.

**Cerebrospinal fluid circulating tumor DNA can identify central nervous system relapse and residual central nervous system disease better than flow cytometry**

We then addressed whether the presence of ctDNA in

the CSF could be more sensitive than conventional CSF analyses to monitor CNS lymphoma and detect CNS relapse.

In two cases of CNS lymphoma (NHL3 and NHL5), we observed that CSF ctDNA levels increased earlier than the detection of cells by FC. In NHL3, after the first dose of IT MTX, despite the fact that the patient did not exhibit a complete neurological response, we observed a sharp decrease in CSF ctDNA levels concomitant with a decrease in the tumor cells by FC. However, after three doses of IT MTX, although FC was negative, a clear ctDNA increase was observed. The patient died 1 month later due to progression (Figure 3). In NHL5, CSF ctDNA levels also decreased with response to treatment and remained undetectable after complete remission. However, CSF ctDNA reappeared in two CSF samples collected 2 and 4 months

after treatment due to the presence of minimal neurological symptoms, when brain-spinal MRI and CSF FC did not show any evidence of disease; 8 months later CNS relapse was confirmed (Figure 3). Taken together, our results indicate that ctDNA can be a more sensitive tool than FC to monitor relapse of CNS lymphomas.

In one additional case of CNS lymphoma (NHL6) treatment with IT MTX decreased the number of cells in the CSF till they were no longer detectable by FC. However, CSF ctDNA was still detectable. Notably, this patient relapsed shortly after the analysis (Figure 3). In a similar way, we found persistence of ctDNA in the CSF from case NHL17 after treatment for CNS relapse, despite the fact that FC did not detect malignant cells. Four months later, the patient relapsed. (Figure 4). These results point out that the detection of CSF ctDNA may help to identify patients with residual disease who are likely to relapse.

A subset of patients with systemic lymphoma presents high risk of CNS relapse, which frequently occurs during treatment or shortly thereafter. To address whether the presence of CSF ctDNA could be more sensitive than FC to detect CNS disease, we analyzed sequential CSF samples from eight patients with systemic lymphoma obtained while receiving prophylactic IT MTX. Two out of 8 patients relapsed in the CNS during the time of study (Figure 4). In one case (NHL17), we found CSF ctDNA at the same moment in which FC showed a positive result. However, we could not detect ctDNA in the CSF samples collected 9 and 7 months before CNS progression. Notably, in case NHL16, the detection of ctDNA in the CSF with a VAF of 7% antedated by 3 months the CNS relapse. Importantly, at the time of ctDNA detection, the patient was asymptomatic and CSF FC was normal (Figure 4). This case points out that CSF ctDNA could detect CNS involvement in systemic lymphomas earlier than standard procedures. Finally, in the remaining six patients with systemic lymphoma and sequential CSF samples, ctDNA was not detected and, with a median follow-up of 18 months (range: 12-28 months), these patients did not develop CNS disease.

## Discussion

The diagnosis and monitoring of CNS lymphoma are still challenging. MRI can be misleading and not sufficiently sensitive, and the difficulties of the intracranial tumor biopsies challenge histological diagnosis. Mutational analysis of the CSF could be useful in these cases, since the presence of MYD88 L265P mutation strongly suggests the diagnosis of PCNSL.<sup>13,14,16-18</sup> Ours is a proof of concept study aiming to identify and characterize ctDNA in the CSF of patients with CNS lymphoma and to evaluate its role in the management of these patients. We were able to identify ctDNA in the CSF from all patients with restricted CNS disease and show that CSF ctDNA could complement the diagnosis, identify somatic mutations, monitor tumor burden and response to treatment, and facilitate early detection of relapse, as well as detect residual disease after treatment. In addition, our results support the notion that the CSF is a better source of ctDNA than plasma.

Assessment of therapeutic response in CNS lymphomas is usually performed by brain MRI along with FC

and cytology. Regrettably, around 50-60% of patients with CNS lymphoma will eventually relapse.<sup>21</sup> Notably, we observed that CSF ctDNA was able to detect CNS lesions better than FC and cytology. In addition, CSF ctDNA was able to predict CNS relapse months before MRI or FC, indicating that it can be used for early detection of tumor relapse.

CNS relapse from systemic lymphoma is a fatal complication with an overall survival of less than 6 months, and early identification of patients with CNS relapse is of paramount value.<sup>3</sup> High-risk patients are usually tested for CNS disease by CSF analysis including cytology and FC. Although FC is a more sensitive test than conventional cytology,<sup>5,6</sup> it has some limitations<sup>22</sup> and some patients with no evidence of CNS disease by FC still relapse, suggesting the presence of undetected malignant cells in the CSF. We identified ctDNA in the CSF in the absence of MRI or FC detection earlier than CNS relapse. This indicates that CSF ctDNA could facilitate early detection of CNS relapse in high-risk systemic lymphomas who undergo serial lumbar punctures to administrate prophylactic IT chemotherapy, therefore improving management of these patients.

Moreover, we observed the persistence of high levels of CSF ctDNA in some patients even though FC did not detect tumor cells. This suggested that the detection of a residual disease by CSF ctDNA could be used to determine the type and duration of treatments.

Taken together, and with the limitation of the reduced number of patients analyzed, our findings show that CSF ctDNA can be an important tool to complement standard procedures to evaluate the CNS lymphoma disease status. This technology can be exploited as a 'liquid biopsy' of CNS lymphoma opening a novel way forward for research in circulating biomarkers of CNS lymphoma with an important impact on the future characterization, diagnosis, prognosis, and management of this type of diseases.

## Disclosures

*JS is a co-founder of Mosaic Biomedicals and Northern Biologics. JS received grant/research support from Mosaic Biomedicals, Northern Biologics and Roche/Glycart. M. C. has received research funding from Karyopharm, Pharmacyclics, Roche, Arqule and AstraZeneca. Francesc Bosch has received research funding and honoraria from Roche, Celgene, Takeda, AstraZeneca, Novartis, Abbvie and Janssen. All remaining authors have declared no conflicts of interest.*

## Contributions

*SB, MC, LE, FB and JS contributed equally.*

## Funding

*This work was supported by research funding from Fundació Asociación Española contra el Cáncer (AECC) (to JS, MC and PA); FERO (to JS), laCaixa (to JS), BBVA (CAIMI) (to JS), the Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI16/01278 to JS; PI17/00950 to MC; PI17/00943 to FB) co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF) and Gilead Fellowships (GLD16/00144, GLD18/00047, to FB). MC holds a contract from Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RYC-2012-12018). SB received funding from Fundación Alfonso Martín Escudero. LE received funding from the Juan de la Cierva fellowship. We thank CERCA Programme / Generalitat de Catalunya for institutional support.*

## References

1. Yamamoto W, Tomita N, Watanabe R, et al. Central nervous system involvement in diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2010;85(1):6-10.
2. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th ed. Lyon, France: IARC; 2017.
3. El-Galaly TC, Cheah CY, Bendtsen MD, et al. Treatment strategies, outcomes and prognostic factors in 291 patients with secondary CNS involvement by diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Cancer*. 2018;93:57-68.
4. Grommes C, Rubenstein JL, DeAngelis LM, Ferreri AJM, Batchelor TT. Comprehensive approach to diagnosis and treatment of newly diagnosed primary CNS lymphoma. *Neuro Oncol*. 2019;21(3):296-305.
5. Quijano S, López A, Manuel Sancho J, et al. Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol*. 2009;27(9):1462-1469.
6. Hegde U, Filie A, Little RF, et al. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood*. 2005;105(2):496-502.
7. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol*. 2015;16(5):541-549.
8. Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, et al. Circulating tumor DNA measurements as early outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2018;36(28):2845-2853.
9. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun*. 2015;6:8839.
10. Pentsova EI, Shah RH, Tang J, et al. Evaluating cancer of the central nervous system through next-generation sequencing of cerebrospinal fluid. *J Clin Oncol*. 2016;34(20):2404-2415.
11. Momtaz P, Pentsova E, Abdel-Wahab O, et al. Quantification of tumor-derived cell free DNA (cfDNA) by digital PCR (DigPCR) in cerebrospinal fluid of patients with BRAFV600 mutated malignancies. *Oncotarget*. 2016;7(51):85430-85436.
12. Martínez-Ricarte F, Mayor R, Martínez-Sáez E, et al. Molecular diagnosis of diffuse gliomas through sequencing of cell-free circulating tumor DNA from cerebrospinal fluid. *Clin Cancer Res*. 2018;24(12):2812-2819.
13. Fontanilles M, Marguet F, Bohers É, et al. Non-invasive detection of somatic mutations using next-generation sequencing in primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget*. 2017;8(29):48157-48168.
14. Hattori K, Sakata-Yanagimoto M, Suehara Y, et al. Clinical significance of disease-specific MYD88 mutations in circulating DNA in primary central nervous system lymphoma. *Cancer Sci*. 2018;109(1):225-230.
15. Grommes C, Tang SS, Wolfe J, et al. Phase 1b trial of an ibrutinib-based combination therapy in recurrent/refractory CNS lymphoma. *Blood*. 2019;133(5):436-445.
16. Hiemcke-Jiwa LS, Leguit RJ, Snijders TJ, et al. MYD88 p.(L265P) detection on cell-free DNA in liquid biopsies of patients with primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol*. 2019;185(5):974-977.
17. Hiemcke-Jiwa LS, Minnema MC, Radersma-van Loon JH, et al. The use of droplet digital PCR in liquid biopsies: a highly sensitive technique for MYD88 p.(L265P) detection in cerebrospinal fluid. *Hematol Oncol*. 2018;36(2):429-435.
18. Hickmann AK, Frick M, Hadaschik D, et al. Molecular tumor analysis and liquid biopsy: a feasibility investigation analyzing circulating tumor DNA in patients with central nervous system lymphomas. *BMC Cancer*. 2019;19(1):192.
19. Rimelen V, Ahle G, Pencreach E, et al. Tumor cell-free DNA detection in CSF for primary CNS lymphoma diagnosis. *Acta Neuropathol Commun*. 2019;7(1):43.
20. Forsheo T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med*. 2012;4(136):136ra168.
21. Langner-Lemercier S, Houillier C, Soussain C, et al. Primary CNS lymphoma at first relapse/progression: characteristics, management, and outcome of 256 patients from the French LOC network. *Neuro Oncol*. 2016;18(9):1297-1303.
22. Canovi S, Campioli D. Accuracy of flow cytometry and cytomorphology for the diagnosis of meningeal involvement in lymphoid neoplasms: a systematic review. *Diagn Cytopathol*. 2016;44(10):841-856.



## 4.2 SEGUNDA PUBLICACIÓN

Prophylaxis with intrathecal or high-dose methotrexate in diffuse large B-cell lymphoma and high risk of CNS relapse. By Bobillo S, Joffe E, Sermer D, Mondello P, Ghione P, Caron PC, Hamilton A, Hamlin PA, Horwitz SM, Kumar A, Matasar MJ, Batlevi CL, Moskowitz A, Noy A, Owens CN, Palomba ML, Straus D, von Keudell G, Dogan A, Zelenetz AD, Seshan VE, Younes A. *Blood Cancer J.* 2021 Jun 16;11(6):113. doi: 10.1038/s41408-021-00506-3.

## ARTICLE OPEN



# Prophylaxis with intrathecal or high-dose methotrexate in diffuse large B-cell lymphoma and high risk of CNS relapse

Sabela Bobillo<sup>1,2,3</sup>, Erel Joffe<sup>1</sup>, David Sermer<sup>1</sup>, Patrizia Mondello<sup>1</sup>, Paola Ghione<sup>1</sup>, Philip C. Caron<sup>1</sup>, Audrey Hamilton<sup>1</sup>, Paul A. Hamlin<sup>1,4</sup>, Steven M. Horwitz<sup>1,4</sup>, Anita Kumar<sup>1,4</sup>, Matthew J. Matasar<sup>1,4</sup>, Connie L. Batlevi<sup>1,4</sup>, Alison Moskowitz<sup>1,4</sup>, Ariela Noy<sup>1,4</sup>, Collette N. Owens<sup>1</sup>, M. Lia Palomba<sup>1,4</sup>, David Straus<sup>1,4</sup>, Gottfried von Keudell<sup>1,4</sup>, Ahmet Dogan<sup>5</sup>, Andrew D. Zelenetz<sup>1,4</sup>, Venkatraman E. Seshan<sup>6</sup> and Anas Younes<sup>1,4</sup>✉

© The Author(s) 2021

Although methotrexate (MTX) is the most widely used therapy for central nervous system (CNS) prophylaxis in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), the optimal regimen remains unclear. We examined the efficacy of different prophylactic regimens in 585 patients with newly diagnosed DLBCL and high-risk for CNS relapse, treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) or R-CHOP-like regimens from 2001 to 2017, of whom 295 (50%) received prophylaxis. Intrathecal (IT) MTX was given to 253 (86%) and high-dose MTX (HD-MTX) to 42 (14%). After a median follow-up of 6.8 years, 36 of 585 patients relapsed in the CNS, of whom 14 had received prophylaxis. The CNS relapse risk at 1 year was lower for patients who received prophylaxis than patients who did not: 2% vs. 7.1%. However, the difference became less significant over time (5-year risk 5.6% vs. 7.5%), indicating prophylaxis tended to delay CNS relapse rather than prevent it. Furthermore, the CNS relapse risk was similar in patients who received IT and HD-MTX (5-year risk 5.6% vs. 5.2%). Collectively, our data indicate the benefit of MTX for CNS prophylaxis is transient, highlighting the need for more effective prophylactic regimens. In addition, our results failed to demonstrate a clinical advantage for the HD-MTX regimen.

*Blood Cancer Journal* (2021)11:113; <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00506-3>

## INTRODUCTION

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common subtype of lymphoma accounting for 30–40% of all non-Hodgkin lymphomas. Central nervous system (CNS) relapse is an uncommon yet often fatal complication with a median overall survival (OS) of less than 6 months [1]. Overall, the incidence of CNS relapse in patients with DLBCL is around 2%, which is lower than with other aggressive lymphomas, such as Burkitt lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. However, the presence of certain risk factors might increase the risk of CNS relapse to 15% [2].

Models have been made to identify patients with high risk of CNS relapse. The German High-Grade non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL) recently proposed a CNS prognostic model (CNS-IPI) that includes five international prognostic index (IPI) factors and the involvement of kidney or adrenal glands. This model stratified DLBCL patients into three categories, low (0–1 risk factors), intermediate (2–3 risk factors), and high risk (4–6 risk factors) with a 2-year rate of CNS relapse of 0.6%, 3.4%, and 10.2%, respectively [3]. However, involvement of certain extranodal sites, such as testes, breast, or bone marrow also confers an increased risk, even with low CNS-IPI [4–7]. In addition, the presence of *MYC* translocation together with *BCL2* translocation has been also associated with a higher risk of CNS relapse in several retrospective series [8, 9].

Finally, the combination of cell of origin (COO) determined by gene expression profiling (GEP) and CNS-IPI has recently improved the identification of DLBCL patients with high risk of CNS relapse, showing a 2-year CNS relapse rate up to 15% in patients with activated B-cell (ABC) phenotype and high CNS-IPI [10].

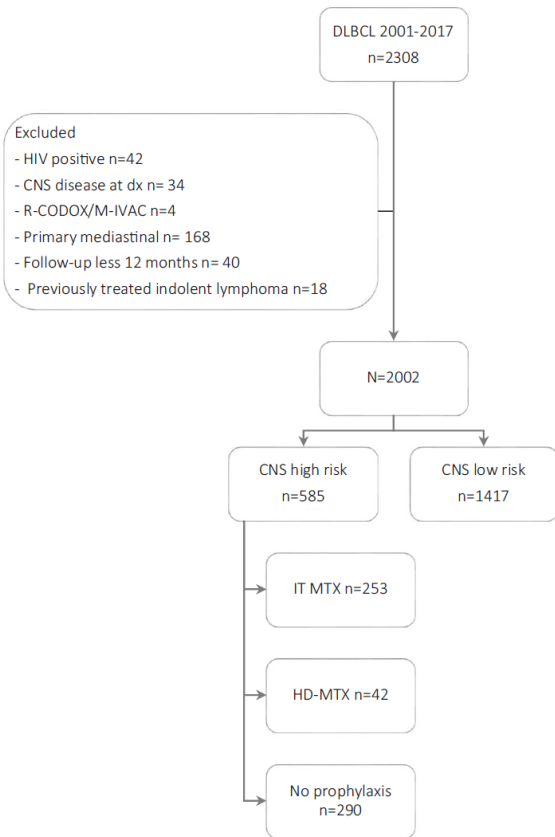
In high-risk patients, CNS prophylaxis is usually recommended, although the optimal regimen remains unclear. Some prospective and retrospective studies conducted in the rituximab era have demonstrated the lack of efficacy of intrathecal (IT) methotrexate (MTX) in patients treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) or similar regimens [2, 10–13]. High-dose intravenous methotrexate (HD-MTX) has been postulated as a possibly better option since the majority of relapses in the rituximab era occur in the brain parenchyma. However, different retrospective studies have shown conflicting results regarding its efficacy [14–19]. Finally, preliminary results from a multicenter retrospective study showed similar effectiveness of prophylactic HD-MTX and IT MTX in patients with aggressive non-Hodgkin lymphoma [20].

The purpose of this study was to evaluate the efficacy of different CNS prophylaxis regimens in preventing CNS relapse in DLBCL patients with risk factors for CNS recurrence who were treated with rituximab and chemotherapy in a single institution.

<sup>1</sup>Department of Medicine, Lymphoma Service, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA. <sup>2</sup>Department of Hematology, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Weill Cornell Department of Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA. <sup>5</sup>Department of Pathology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA. <sup>6</sup>Department of Epidemiology and Biostatistics, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA. ✉email: [anas.younes@astrazeneca.com](mailto:anas.younes@astrazeneca.com)

Received: 7 January 2021 Revised: 29 April 2021 Accepted: 10 May 2021  
Published online: 16 June 2021





**Fig. 1 Consort diagram.** DLBCL diffuse large B cell lymphoma, CNS central nervous system, IT MTX intrathecal methotrexate, HD-MTX high-dose methotrexate.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

We retrospectively reviewed the records of all newly diagnosed patients with DLBCL at Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) from 2001 to 2017, treated with frontline R-CHOP or R-CHOP-like regimens. In all cases, the pathology at diagnosis was confirmed by expert hematopathologists at MSKCC according to the World Health Organization classification of hematopoietic and lymphoid tumors. Patients with primary mediastinal B cell lymphoma, HIV positive or known CNS disease at diagnosis were excluded. Patients with history of indolent lymphoma previously treated with chemotherapy were also excluded. The Hans algorithm [21] was used to classify patients as germinal center B-cell like phenotype (GCB) or non-germinal center B-cell like (non-GCB). High risk for CNS relapse (HR-CNS) was defined by high-CNS-IPI (4–6 risk factors) or low or intermediate CNS-IPI along with testicular, breast, kidney, adrenal glands, and/or bone marrow involvement. Patients with *MYC* and *BCL2* rearrangement were also included in HR-CNS group. Patients with low or intermediate CNS-IPI and paraspinal masses, sinus, orbit or skull involvement were not considered HR-CNS.

CNS prophylaxis was administered based on physician's preference. CNS relapse was diagnosed by the presence of radiological findings, detection of lymphoma cells in the CSF and/or by brain biopsy. This study was approved by the institutional reviewed board at MSKCC.

### Statistical analysis

Competing risk analysis was used to analyze time to CNS relapse, with systemic non-CNS relapse and death without relapse as competing events. Time to event was calculated from the date of diagnosis to the date of one of the three events, relapse in the CNS, systemic relapse, or death without relapse whichever occurs first. OS from relapse was defined as the time

from relapse until death of any cause. Patients' characteristics were compared using Fisher exact test for categorical variables and Kruskal–Wallis test for continuous variables. Kaplan–Meier analysis was implemented to report survival estimates across patients and logrank test to compare groups. We applied a non-parametric analysis of competing risks and used Gray's test to compare the cumulative incidence of CNS relapse between the different groups, with death and systemic relapse as competing events. Confidence intervals for risk ratio (RR) (ratio of cumulative incidence rate at fixed time-points) were obtained using bootstrap resampling. All statistical analyses were performed in R v3.6.

## RESULTS

### Patient characteristics

We identified 2308 patients treated with R-CHOP or R-CHOP-like regimens from 2001 to 2017 at MSKCC. We excluded 306 patients for the following reasons: HIV positive,  $n = 42$ , CNS disease at diagnosis,  $n = 34$ ; primary mediastinal lymphoma,  $n = 168$ ; previously treated indolent lymphoma,  $n = 18$ ; treatment with R-CODOX/M-IVAC,  $n = 4$  and follow-up shorter than 12 months,  $n = 40$ . Finally, 2002 patients were considered and 585 (29%) were classified as HR-CNS relapse and were included in the study (Fig. 1).

Median age was 68 years (range 21–91) and 301 (51%) patients were male. The high-risk extranodal sites were: BM,  $n = 118$  (20%), kidney/adrenal,  $n = 106$  (18%); testes,  $n = 51$  (9%) and breast,  $n = 47$  (8%). One hundred and fifty-eight patients (27%) had more than two extranodal sites involved. By CNS-IPI, patients were classified as low, 10%; intermediate, 22%; and high risk, 68%. Eighteen (7%) patients had *MYC* and *BCL2* rearrangements. COO determined by Hans algorithm [21] was non-germinal center (non-GCB) in 229 (39%) patients, germinal center (GCB) in 234 (40%) patients and missing in 122 (21%).

### CNS prophylaxis

Two hundred and ninety (50%) patients received at least one administration of CNS prophylaxis: IT MTX and/or cytarabine,  $n = 253$  (87%); or HD-MTX,  $n = 42$  (13%). Among the 42 patients who received HD-MTX, 11 received concomitant IT prophylaxis. Patients' characteristics by prophylactic regimen are shown in Table 1. Patients who received prophylaxis (IT or HD-MTX) were younger ( $p < 0.001$ ) and presented with a better performance status (ECOG  $< 2$ ) ( $p = 0.002$ ) compared with patients who did not receive prophylaxis. Patients with two or more extranodal sites involvement were more likely to receive CNS prophylaxis ( $p < 0.001$ ).

The median administrations of IT prophylaxis were 4 (range 1–9), and the majority of patients received MTX alone. The dose of IT MTX and IT cytarabine was 12 and 70 mg, respectively. Patients had a median of two cycles of HD-MTX (range 1–6), at a median dose of 3500 mg/m<sup>2</sup> (range 2000–3500 mg/m<sup>2</sup>). Overall, 23 patients (55%) had HD-MTX at the end of R-CHOP-like treatment and 19 (45%) patients during R-CHOP-like treatment. Patients receiving HD-MTX were admitted to the hospital and received leucovorin rescue starting 24 h after MTX. Overall, 6 out of 42 patients (14%) developed acute renal injury (grade 3 in all cases) related to HD-MTX; two patients at the end of chemotherapy treatment and four during systemic chemotherapy treatment. All patients recovered completely and no patient required dialysis. None of the patients received further HD-MTX after developing renal injury, two patients transitioned to IT MTX, one patient received a single administration of high-dose cytarabine, and three patients did not receive further prophylactic treatment.

### CNS relapse and the effect of prophylaxis on CNS relapse

After a median follow-up of 6.8 years, 36 out of 585 patients considered HR-CNS, relapsed in the CNS with a 5-year risk of 6.5%. Fourteen (39%) patients had received prophylaxis: 12 IT and 2 HD-MTX. The risk of CNS relapse at 5 years for patients who received

**Table 1.** Patient's characteristics.

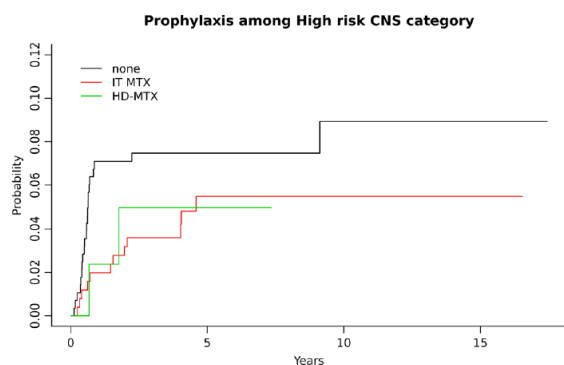
Variables	IT methotrexate n (%)	HD-methotrexate n (%)	No prophylaxis n (%)	p value
Number (n)	253 (43%)	42 (7%)	290 (50%)	
Median age (range)	64 (21–86)	63 (27–81)	72 (24–91)	<0.001
Male	142 (56)	24 (57)	135 (47)	0.07
ECOG				
0–1	160 (63)	27 (64)	142 (49)	0.002
≥2	93 (37)	15 (38)	148 (51)	
Stage				
I–II	30 (12)	4 (10)	30 (10)	0.81
III–IV	223 (88)	38 (90)	260 (90)	
Serum LDH				
Above normal	198 (78)	28 (67)	207 (71)	0.14
Missing	5 (2)	0	17 (6)	
CNS-IPI risk <sup>a</sup>				
0	10 (4)	3 (7)	12 (4)	
1	16 (6)	2 (5)	18 (6)	
2	28 (11)	4 (10)	17 (6)	
3	41 (16)	4 (9)	31 (11)	
4	107 (43)	16 (38)	157 (54)	
5	41 (16)	12 (29)	49 (17)	
6	10 (4)	1 (2)	6 (2)	
CNS-IPI risk groups <sup>a</sup>				
Low 0–1	26 (10)	5 (12)	30 (10)	0.009
Intermediate 2–3	69 (27)	8 (19)	48 (17)	
High 4–6	158 (63)	29 (69)	212 (73)	
High risk site				
Testis	39 (15)	8 (19)	4 (1)	
Breast	15 (6)	5 (12)	27 (9)	
Kidney/adrenal glands	50 (20)	12 (29)	44 (15)	
Bone marrow	63 (25)	6 (14)	49 (17)	
Extranodal sites				
>2 sites	87 (36)	14 (35)	57 (20)	<0.001
Double-hit	18 (7)	5 (12)	11 (4)	0.05
Treatment				
R-CHOP	143 (57)	32 (76)	220 (76)	<0.001
R-EPOCH	43 (17)	7 (17)	40 (14)	
R-CHOP/RICE	67 (26)	3 (7)	30 (10)	
Cell of origin				
Germinal center	104 (41)	14 (33)	116 (40)	0.15
Non-germinal center	104 (41)	23 (55)	102 (35)	
Missing	45 (18)	5 (12)	72 (25)	

IT intrathecal, MTX methotrexate, HD high-dose, ECOG Eastern Cooperative Oncology Group, LDH lactate dehydrogenase, CNS-IPI central nervous system international prognostic index, R-CHOP rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone, R-EPOCH rituximab, etoposide, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone, RICE rituximab, ifosfamide, carboplatin, etoposide.

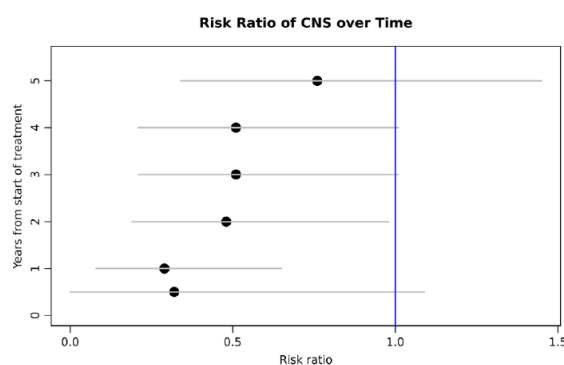
<sup>a</sup>Includes patients who were missing baseline LDH but were grouped regardless of its value.

IT, HD-MTX, or no prophylaxis was 5.5%; 5% and 7.5% ( $p = 0.34$ ), respectively (Fig. 2). The risk of CNS relapse by prophylaxis was similar when excluding patients who received concomitant HD-MTX and IT (Supplementary Fig. 1). CNS relapse risk was similar among patients who received R-CHOP, R-EPOCH, and R-CHOP/RICE ( $p = 0.12$ ) (Supplementary Fig. 2). The 5-year CNS relapse risk for patients considered low-risk CNS and not included in the study was 1.1%.

The median time to relapse since first diagnosis was 9 months (range 6–110 months). Patients who received prophylaxis, either IT or HD-MTX, relapsed later than patients who did not receive prophylaxis, with a median time to relapse of 19 months (range 7–55 months) vs. 8 months (range 6–110 months), respectively. The risk of relapse at 1 year was lower for patients who received prophylaxis compared to patients who did not receive prophylaxis 2% vs. 7.1%, RR 0.29 (95% CI; 0.08,0.66). However, over time, the



**Fig. 2** Cumulative incidence of CNS relapse rate by prophylactic strategy. IT MTX intrathecal methotrexate, HD-MTX high-dose methotrexate.



**Fig. 3** Risk ratio of CNS relapse with and without prophylaxis over time.

risk of CNS relapse became closer among prophylaxis and no-prophylaxis groups, with a 3-year risk of 3.8% vs. 7.5% (RR 0.51, CI 95%; 0.22, 1.04) and a 5-year risk of 5.6% vs. 7.5% (RR 0.76, CI 95%; 0.35, 1.50), respectively (Fig. 3).

At the time of CNS relapse, 26 (72%) patients presented with disease confined to the CNS and 10 (28%) patients had a concomitant systemic and CNS relapse. The brain parenchyma was the most common site of relapse (47%), followed by leptomeninges (30%) and both sites (23%). Sites of relapse by prophylactic treatment are detailed in Table 2.

Patients with CNS relapse ( $n = 36$ ) presented worse outcomes than patients with systemic relapse without CNS involvement ( $n = 145$ ) with a median OS of 4.9 months vs. 17.1 months, respectively ( $p = 0.003$ ) (Fig. 4).

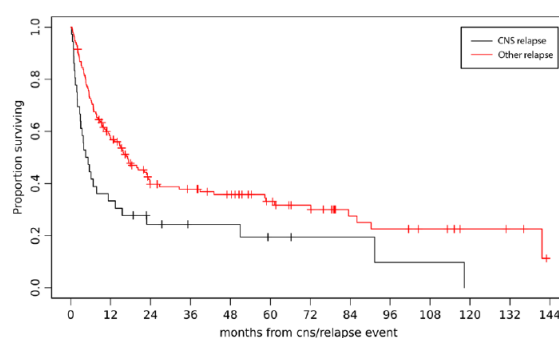
The COO determined by the Hans algorithm was available in 463 out of 585 patients, of whom 229 (49%) had a non-GCB phenotype and 234 (51%) patients had a GCB phenotype. Overall, 127 (55%) patients in the non-GCB group and 108 (46%) in the GCB group received prophylaxis. Patients with non-GCB phenotype had a higher risk of CNS relapse compared with patients with GCB subtype with a 5-year risk of 9.9% vs. 4.5%, respectively ( $p = 0.03$ ) (Fig. 5).

Finally, we performed a sub-analysis excluding patients with low or intermediate CNS-IPI and bone marrow involvement ( $n = 66$ ), since the association between bone marrow and CNS relapse is controversial. We observed a 5-year CNS relapse risk of 5.2%, 5.3%, and 7.5% for patients receiving IT and HD-MTX and no prophylaxis; respectively. Due to the low number of events in this group, we could not perform a sub-analysis to investigate the risk of CNS relapse in patients with bone marrow involvement.

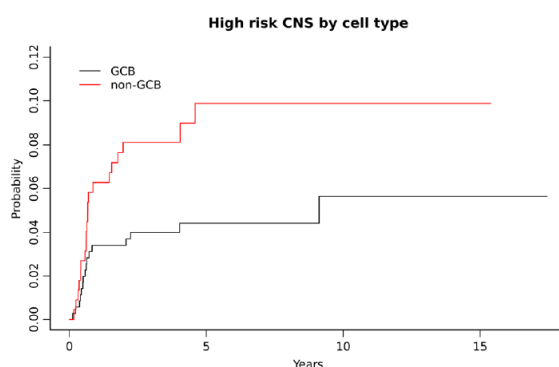
**Table 2.** Site of CNS relapse by CNS prophylaxis.

CNS prophylaxis regimen	Site of CNS relapse		
	Leptomeninges	Parenchyma	Both
IT	5 (42%)	3 (25%)	4 (33%)
HD-MTX	1 (50%)	1 (50%)	–
No prophylaxis	5 (23%)	13 (57%)	4 (18%)

CNS central nervous system, IT intrathecal, MTX methotrexate, HD high-dose.



**Fig. 4** Overall survival of patients with CNS relapse vs. other relapse.



**Fig. 5** Cumulative incidence of CNS relapse by cell of origin. GCB germinal center B-cell phenotype, non-GCB non germinal center B-cell phenotype.

## DISCUSSION

To our knowledge, this is one of the largest series analyzing the role of CNS prophylaxis exclusively in patients with high risk of CNS relapse in the modern era. According to the CNS-IPI model, we considered high-risk for CNS relapse patients with 4 to 6 risk factors. In addition, we included patients with involvement of certain extranodal sites traditionally associated with an increased risk of CNS relapse, such as testes, breast, kidney, and bone marrow [3–6], regardless the CNS-IPI; making our results more informative. We also included double-hit lymphomas that have been associated with a high risk of CNS relapse, although estimates vary widely among different studies [2, 8, 9]. Notably, 50% of the patients included in our study did not receive CNS prophylaxis. These patients tended to be older and had worse performance status than those who receive prophylaxis. Similar results were found in recent large retrospective studies [13, 19].

Consistent with recently published studies in the rituximab era, we observed a risk of CNS relapse of 6.5% at 5 years in the HR-CNS

group [13, 15, 20, 22, 23]. Furthermore, our results are similar to a recent real-world study from Sweden including 4205 patients with DLBCL, that reported a 2-year CNS risk of 8% in the high-risk patients [23]. Other investigators reported a slightly higher incidence of CNS relapse, with a 2-year risk of 10.2% [10]. The lower incidence of our study is likely due to the fact that we frequently perform brain magnetic resonance imaging in addition to a diagnostic lumbar puncture. Therefore, patients with active CNS involvement at diagnosis are promptly identified and excluded from the prophylactic strategy.

Whether CNS prophylaxis is useful in preventing CNS relapse has been addressed in several studies over the past years, including the most widely used strategy IT MTX and more recently intravenous methotrexate. The majority of the retrospective studies and post hoc analysis from prospective trials showed the lack of efficacy of IT prophylaxis in the rituximab era [10–13, 22]. In this regard, Kumar et al. using the prospectively collected National Comprehensive Cancer Network database, analyzed the risk of CNS relapse in 989 newly diagnosed DLBCL, 117 (11.8%) of whom had received prophylaxis, mostly IT MTX. They described no benefit from prophylaxis in the whole population and also in high-risk patients, though patients with involvement of kidney or adrenal glands or patients with double-hit lymphomas were not included in the high-risk group [22]. More recently, a large retrospective study including 690 patients older than 70 years of whom 271 had high-risk CNS-IPI, also described a similar rate of CNS relapse regardless the use of IT MTX prophylaxis [HR 1.34 (95% CI, 0.46–3.86)] [13]. Our series included only high-risk patients from all ages who received mostly IT MTX as prophylaxis (43%). In line with previously reported, we did not observe a clear benefit from IT MTX on preventing CNS relapse, especially after the first year of immunochemotherapy.

In recent years, the use of HD-MTX administrated mid chemotherapy cycles or after completing systemic chemotherapy was proposed as an alternative strategy to prevent CNS recurrence. The rationale is based on the observation that CNS relapses frequently involve the brain parenchyma [14–16]. This approach was initially evaluated in the pre-rituximab era by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte/Lymphoma Study Association comparing high-dose chemotherapy plus two cycles of HD-MTX vs. CHOP without CNS prophylaxis, with significant reduction in the CNS relapse risk of 0.8% vs. 2.7%, respectively [24]. In the modern era, different retrospective series had supported this evidence in patients treated with R-CHOP chemotherapy [14–16], although two recent retrospective studies have shown no clear benefit [17, 18]. More recently, preliminary results from a large retrospective series from Canada including 326 high-risk DLBCL patients, showed the lack of effectiveness of HD-MTX with a CNS relapse risk of 11.2% for patients who received HD-MTX ( $n = 115$ ) vs. 12.2% for patients who did not [19]. Consistent with these studies, our data also failed to demonstrate a clinical advantage for using the more toxic intravenous HD-MTX regimen. More recently, a multicenter retrospective study found no difference in the efficacy between intravenous HD-MTX and IT MTX prophylaxis, with a CNS relapse risk of 5% vs. 7%, respectively [20].

A multicenter retrospective Australian study analyzed 217 high-risk patients treated with: (1) R-CHOP plus IT MTX, (2) R-CHOP plus HD-MTX, or (3) dose-intensive chemotherapy plus HD-MTX. They observed a lower incidence of CNS relapse in patients receiving HD-MTX compared to IT MTX, with a 3-year CNS relapse rate of 18.4% vs. 6.9% vs. 2.3%, for groups 1, 2, and 3, respectively [16]. Notably, in this study, only 37% of patients from the IT MTX group had received rituximab as part of the induction therapy, while nearly all patients in the HD-MTX group received immunochemotherapy [16]. In our study where all patients had received immunochemotherapy, we did not detect differences in the efficacy between IT and HD-MTX, although the number of patients in the HD-MTX group was low.

Although in our series the risk of CNS relapse was similar regardless the use of prophylaxis, we found that within the first year from diagnosis the risk was higher in patients who did not receive prophylaxis compared to patients who received IT or HD-MTX with a risk of 7.1% vs. 2% vs. 2.4%, respectively. However, over time, the risk became similar between groups, raising up to 5.6% and 5.2% at 5 years in the HD-MTX and IT groups, respectively. These findings were not observed in previous studies analyzing the role of CNS prophylaxis [13, 22]. However, the median follow-up in these studies was around 2.5 years, so late relapses might have been underestimated. Our evidence suggests CNS prophylaxis might help to partially control undetected CNS disease present at diagnosis delaying the occurrence of CNS relapse, rather than preventing it. Furthermore, the use of CNS prophylaxis might not prevent from late CNS relapse in the HR-CNS population.

Finally, we noticed that the presence of non-GCB phenotype determined by immunohistochemistry confers an increased risk of CNS relapse in the HR-CNS population. These results are in accordance with a recent publication analyzing the impact of COO by GEP in 1418 patients from the GOYA phase 3 trial. In this study, the authors found that ABC or unclassified phenotype was an independent risk factor for CNS relapse, and patients with high-CNS-IPI together with an ABC phenotype had a 2-year CNS relapse rate of 15% [10]. Interestingly, although we used immunohistochemistry techniques to determine the COO phenotype, we observed similar results, suggesting that in the absence of molecular analysis, COO assessed by immunohistochemistry along with other risk factors could be useful to identify high-risk patients.

In conclusion, our study highlights the need for developing more effective CNS prophylaxis regimens than MTX. Furthermore, our data in addition to emerging data from other centers, did not demonstrate clinical advantage for using intravenous HD-MTX over traditional IT MTX. Since HD-MTX is associated with higher incidence of adverse events resulting in more delays in the administration of R-CHOP cycles, we recommend that benefit/risk assessment should be carefully considered before adopting HD-MTX for CNS prophylaxis.

## REFERENCES

1. El-Galaly TC, Cheah CY, Bendtsen MD, Nowakowski GS, Kansara R, Savage KJ, et al. Treatment strategies, outcomes and prognostic factors in 291 patients with secondary CNS involvement by diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Cancer*. 2018;93:57–68.
2. Gleeson M, Counsell N, Cunningham D, Chadwick N, Lawrie A, Hawkes EA, et al. Central nervous system relapse of diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: results of the UK NCRI R-CHOP-14 versus 21 trial. *Ann Oncol*. 2017;28:2511–6.
3. Schmitz N, Zeynalova S, Nickelsen M, Kansara R, Villa D, Sehn LH, et al. CNS international prognostic index: a risk model for CNS relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2016;34:3150–6.
4. Vitolo U, Chiappella A, Ferreri AJ, Martelli M, Baldi I, Balzarotti M, et al. First-line treatment for primary testicular diffuse large B-cell lymphoma with rituximab-CHOP, CNS prophylaxis, and contralateral testis irradiation: final results of an international phase II trial. *J Clin Oncol*. 2011;29:2766–72.
5. Hu S, Song Y, Sun X, Su L, Zhang W, Jia J, et al. Primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: Therapeutic strategies and patterns of failure. *Cancer Sci*. 2018;109:3943–52.
6. Hosein PJ, Maragulia JC, Salzberg MP, Press OW, Habermann TM, Vose JM, et al. A multicentre study of primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Br J Haematol*. 2014;165:358–63.
7. Kridel R, Telio D, Villa D, Sehn LH, Gerrie AS, Shenker T, et al. Diffuse large B-cell lymphoma with testicular involvement: outcome and risk of CNS relapse in the rituximab era. *Br J Haematol*. 2017;176:210–21.
8. Oki Y, Noorani M, Lin P, Davis RE, Neelapu SS, Ma L, et al. Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience. *Br J Haematol*. 2014;166:891–901.
9. Petrich AM, Gandhi M, Jovanovic B, Castillo JJ, Rajguru S, Yang DT, et al. Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Blood*. 2014;124:2354–61.

10. Klanova M, Sehn LH, Bence-Bruckler I, Cavallo F, Jin J, Martelli M, et al. Integration of cell of origin into the clinical CNS International Prognostic Index improves CNS relapse prediction in DLBCL. *Blood*. 2019;133:919–26.
11. Boehme V, Schmitz N, Zeynalova S, Loeffler M, Pfreundschuh M. CNS events in elderly patients with aggressive lymphoma treated with modern chemotherapy (CHOP-14) with or without rituximab: an analysis of patients treated in the RICOVER-60 trial of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Blood*. 2009;113:3896–902.
12. Schmitz N, Zeynalova S, Glass B, Kaiser U, Cavallin-Stahl E, Wolf M, et al. CNS disease in younger patients with aggressive B-cell lymphoma: an analysis of patients treated on the Mabthera International Trial and trials of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. *Ann Oncol*. 2012;23:1267–73.
13. Eyre TA, Kirkwood AA, Wolf J, Hildyard C, Mercer C, Plaschkes H, et al. Stand-alone intrathecal central nervous system (CNS) prophylaxis provide unclear benefit in reducing CNS relapse risk in elderly DLBCL patients treated with R-CHOP and is associated increased infection-related toxicity. *Br J Haematol*. 2019;187:185–94.
14. Abramson JS, Hellmann M, Barnes JA, Hammerman P, Toomey C, Takvorian T, et al. Intravenous methotrexate as central nervous system (CNS) prophylaxis is associated with a low risk of CNS recurrence in high-risk patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer*. 2010;116:4283–90.
15. Ferreri AJ, Bruno-Ventre M, Donadoni G, Ponzoni M, Citterio G, Foppoli M, et al. Risk-tailored CNS prophylaxis in a mono-institutional series of 200 patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Br J Haematol*. 2015;168:654–62.
16. Cheah CY, Herbert KE, O'Rourke K, Kennedy GA, George A, Fedele PL, et al. A multicentre retrospective comparison of central nervous system prophylaxis strategies among patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Cancer*. 2014;111:1072–9.
17. Lee K, Yoon DH, Hong JY, Kim S, Lee K, Kang EH, et al. Systemic HD-MTX for CNS prophylaxis in high-risk DLBCL patients: a prospectively collected, single-center cohort analysis. *Int J Hematol*. 2019;110:86–94.
18. Goldschmidt N, Horowitz NA, Heffes V, Darawshy F, Mashiah T, Shaulov A, et al. Addition of high-dose methotrexate to standard treatment for patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma contributes to improved freedom from progression and survival but does not prevent central nervous system relapse. *Leuk Lymphoma*. 2019;60:1890–8.
19. Puckrin R, Darsa EIH, Ghosh S, Peters A, Stewart DA. Lack of effectiveness of intravenous high-dose methotrexate for prevention of CNS relapse in patients with high-risk DLBCL: a retrospective analysis from Alberta, Canada. *Blood*. 2020;136(suppl 1):26–7.
20. Orellana-Noia VM, Reed DR, Sen JM, Barlow C, Malecek MK, Kahl BS, et al. CNS prophylaxis during front-line therapy in aggressive non-Hodgkin lymphomas: real-world outcomes and practice patterns from 19 US academic institutions. *Blood*. 2020;136(suppl 1):27–8.
21. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103:275–82.
22. Kumar A, Vanderplas A, LaCasce AS, Rodriguez MA, Crosby AL, Lepisto E, et al. Lack of benefit of central nervous system prophylaxis for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: findings from a large national database. *Cancer*. 2012;118:2944–51.
23. Harrysson S, Eloranta S, Ekberg S, Enblad G, Jerkeman M, Wahlin BE, et al. Incidence of relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) including CNS relapse in a population-based cohort of 4243 patients in Sweden. *Blood Cancer J*. 2021;11:9.
24. Tilly H, Lepage E, Coiffier B, Blanc M, Herbrecht R, Bosly A, et al. Intensive conventional chemotherapy (ACVBP regimen) compared with standard CHOP for poor-prognosis aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003;102:4284–9.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by research funding from Fundación Alfonso Martín Escudero to SB. Data from this manuscript were presented at the 61st Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, FL, December 7th–10th, 2019.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

SB and AY conceived the project, analyzed the data, and wrote the manuscript. VS analyze the data, wrote the manuscript and provide the figures. DS contributed to

analyze the data. CLB, PCC, AH, PAH, SMH, AK, MJM, AM, AN, DS, PG, PM, CNO, MLP, DS, GK, ADZ, and AD treated patients and approved the manuscript.

## COMPETING INTERESTS

AD has received personal fees from Roche, Corvus Pharmaceuticals, Physicians' Education Resource, Seattle Genetics, Peerview Institute, Oncology Specialty Group, Pharmacyclics, Celgene, Novartis, Takeda and research grants from National Cancer Institute and Roche. CLB has received grant funding from Janssen, Novartis, Epizyme, Xynomics, Bayer, BMS, and served as a consultant for Life Sci, GLG, Celgene, Seattle Genetics, Xynomics, and holds honorarium from Dava Oncology. PH receives research support from Portola, Novartis/GSK, Molecular Templates, Janssen Pharmaceuticals, and served as consultant for Karyopharm, Juno, Portola, Celgene, AstraZeneca. SH has received research funding from ADCT therapeutics, Aileron, Forty-Seven, Verastem, Kyowa Hakko Kirin, Millennium Pharmaceuticals Inc, Celgene, Trillium, Daiichi Sankyo, and consults for Astex, Affimed, Merck Sharp and Dome, Kyowa Hakko Kirin Pharma, Corvus Pharmaceuticals Inc, Celgene, Portola Pharmaceuticals, Takeda Millennium, Innate Pharma, Verastem, Miragen Therapeutics Inc, Seattle Genetics, ADCT. AK receives research funding from Abbvie Pharmaceuticals, Adaptive Biotechnologies, Pharmacyclics, Seattle Genetics, and serves on advisory board for Celgene and AstraZeneca. MLP receives honoraria from Flagship Ventures, Novartis, Evelo, Seres Therapeutics, Jazz Pharmaceuticals, Therakos, Amgen, Merck and consults for Merck and Pharmacyclics. AN receives honoraria from Janssen, Pharmacyclics, Prime Oncology, and consults for Medscape, and serves on advisory board for Janssen, and serves on the speakers' bureau for Prime Oncology, and receives research funding for Rafael Pharma and Pharmacyclics. AM receives research support from Seattle Genetics, Merck, Bristol-Myers Squibb, Incyte, and receives honorarium from Kyowa Hakko Kirin Pharma, Miragen Therapeutics, Takeda Pharmaceuticals, ADC Therapeutics, Seattle Genetics, Cell Medica, Bristol-Myers Squibb, Erytech Pharma. DS consults for InPractice Elsevier, Seattle Genetics, and is on speaker's bureau for Medical Crossfire. ADZ consults for Genentech/Roche, Gilead, Celgene, Janssen, Amgen, Novartis, Adaptive Biotechnology, Verastem, and serves on advisory board for MorphoSys, Gilead, Genentech, Abbvie, AstraZeneca, Pharmacyclics, and receives research funding from MEI Pharmaceuticals, Roche, Gilead, Beigene. AY received research support from Janssen, Curis, Merck, BMS, Syndax, Roche, and honorarium from Janssen, Abbvie, Merck, Curis, Epizyme, Roche, Takeda, and consulted for Biopath, Xynomics, Epizyme, Roche, Celgene, HCM. AY is currently an employee of AstraZeneca. The remaining authors declare no competing interests.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00506-3>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to A.Y.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021



## **5 RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS**





Los resultados de este trabajo han demostrado que el análisis del DNA tumoral circulante en el líquido cefalorraquídeo permite detectar y monitorizar la infiltración del sistema nervioso central en pacientes con linfoma B.

Los niveles de DNA tumoral circulante (ctDNA) en plasma tienen una buena correlación con la respuesta al tratamiento y el pronóstico en los pacientes con linfoma no-Hodgkin B con afectación sistémica. En los pacientes con neoplasias sólidas cerebrales, varios estudios han demostrado que la cantidad de ctDNA en el líquido cefalorraquídeo (LCR) es más abundante que en el plasma. Sin embargo, en los pacientes con linfoma cerebral, el papel del ctDNA en el LCR está todavía por determinar. Tampoco se ha investigado hasta el momento la utilidad del ctDNA para predecir la recaída en el sistema nervioso central (SNC) en los pacientes con linfoma sistémico y alto riesgo de recaída neuromeningea.

En este primer trabajo, se analizaron muestras de LCR y plasma de 19 pacientes con los siguientes diagnósticos: 6 linfomas cerebrales, 1 linfoma con afectación cerebral y sistémica concomitante, y 12 linfomas sistémicos sin evidencia de afectación neuromeningea, pero con factores de riesgo de recaída en SNC. Se secuenciaron las muestras del tumor primario de 16 de los 19 pacientes con el fin de identificar las mutaciones somáticas en el tumor. Para ello, se utilizaron técnicas de secuenciación completa del exoma (WES, del inglés *whole exome sequencing*) en 5 pacientes, y un panel de secuenciación en 11 pacientes. En los 3 pacientes restantes se había detectado previamente la mutación *MYD88* L265P en el tumor como parte de los estudios de rutina. Una vez secuenciado el tumor, se seleccionaron de 1 a 5 mutaciones para cada paciente y se diseñaron sondas *variant-specific droplet digital PCR* para cada mutación.

En las muestras recogidas al inicio del estudio, se encontró ctDNA en el LCR de todos los pacientes con linfoma y afectación cerebral única (n=6), con frecuencias alélicas (VAF, del inglés *variant allele frequency*) elevadas, con un rango de 1% a 95%. Las

técnicas estándar de citología convencional (CC) y citometría de flujo multiparamétrica (CFM) detectaron células malignas en 4 y 5 pacientes, respectivamente. En el plasma, se detectó ctDNA solamente en 2 de los 6 pacientes con linfoma cerebral, con VAFs mucho menores a las observadas en el LCR (inferiores al 5%). No se detectó ctDNA en el LCR de ninguno de los pacientes con linfoma sistémico (n=12) sin evidencia de enfermedad en el SNC, aunque en la mayoría de los pacientes sí que se encontró ctDNA en el plasma (n=10). Por último, en el paciente con afectación concomitante sistémica y cerebral, no se encontró ctDNA en el LCR, a pesar de que por CC y la CFM sí que se detectaron células malignas, y además se observó la presencia de ctDNA en el plasma.

Por otro lado, se investigó si el ctDNA podría ser útil para monitorizar la respuesta al tratamiento en los pacientes con enfermedad en el SNC. Para ello se analizaron muestras secuenciales de LCR y plasma de 5 pacientes con linfoma cerebral. Los niveles de ctDNA en el LCR se correlacionaron muy bien con la respuesta al tratamiento disminuyendo hasta hacerse indetectables en los 3 pacientes que alcanzaron respuesta completa (RC). En los 2 pacientes restantes, los niveles de ctDNA también disminuyeron inicialmente durante el tratamiento, en concordancia con los resultados obtenidos por CC y CFM, que no detectaron células malignas. Sin embargo, al finalizar el tratamiento se observó que los niveles de ctDNA aumentaban nuevamente, a pesar de que la CC y la CFM seguían sin detectar células malignas, y finalmente los 2 pacientes presentaron una progresión precoz de la enfermedad. En el plasma, por el contrario, los niveles de ctDNA en los 5 pacientes incluidos en esta parte del estudio permanecieron bajos en todo momento, con VAFs inferiores al 6%.

Por último, se estudió la correlación entre el ctDNA en el LCR con el riesgo de recaída en el SNC en los pacientes con linfoma cerebral en RC y en los pacientes con linfoma sistémico sin evidencia de infiltración neuromeningea, así como su concordancia con los resultados obtenidos con la CC y la CFM. Se detectó ctDNA en el LCR de 2 pacientes, uno con linfoma cerebral y otro con linfoma sistémico, ambos en respuesta

completa, 3 y 8 meses antes de que las técnicas convencionales detectasen y confirmasen la recaída en el SNC.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que el análisis de ctDNA en el LCR puede detectar mejor la presencia de linfoma en el SNC que el análisis del ctDNA en plasma. Además, la presencia ctDNA en el LCR tras el tratamiento puede predecir la recaída neuromeningea y puede detectar la enfermedad residual mejor que las técnicas convencionales en pacientes con linfoma cerebral y linfoma sistémico con factores de riesgo de recaída neuromeningea.

El linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) es el linfoma más frecuente y supone el 30-40% de todos los linfomas no Hodgkin. En general, los pacientes con LDCGB tienen un riesgo bajo de recaída en el SNC; sin embargo, la presencia de ciertas características clínicas y biológicas puede aumentar el riesgo de forma considerable llegando hasta el 15%. Debido al mal pronóstico asociado con las recaídas neuromeningeas, se recomienda realizar profilaxis del SNC en aquellos pacientes que presenten factores de riesgo, aunque su eficacia es controvertida y tanto el esquema como la vía de administración no están del todo establecidas.

En este trabajo se analizó la eficacia de los dos esquemas de profilaxis más utilizados en la actualidad, la quimioterapia intratecal (IT) o las dosis altas de metotrexato (MTX) endovenoso (HD-MTX). Para ello se estudiaron todos los pacientes diagnosticados de LDCGB que presentasen factores de riesgo de recaída en el SNC, y que hubiesen sido tratados con rituximab, ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona (R-CHOP), o esquemas similares a R-CHOP desde el año 2001 al 2017 en el hospital Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC). Como factores de riesgo de recaída neuromeningea se establecieron: CNS-IPI de alto riesgo (4-6 factores de riesgo), o infiltración testicular, mamaria, renal o de glándulas suprarrenales, o de la médula ósea,

independientemente del CNS-IPI. También se consideraron de alto riesgo los pacientes con reordenamientos de los genes *MYC* y *BCL2*.

En total se identificaron 2308 pacientes, de los cuales 585 se clasificaron como alto riesgo de recaída en el SNC y se incluyeron en el estudio. La mediana de edad fue de 68 años (rango 21-91) y 301 (51%) eran varones. La distribución según la afectación de órganos de alto riesgo fue la siguiente: médula ósea, 118 (20%) pacientes, riñón/glándula suprarrenal, 106 (18%); testículo, 51 (9%) y mama, 47 (8%) pacientes. Según el CNS-IPI, los pacientes se clasificaron en bajo riesgo (10%), riesgo intermedio (22%) y alto riesgo (68%). Dieciocho (7%) pacientes presentaban reordenamientos de *MYC* y *BCL2*.

Doscientos noventa y cinco (50%) pacientes recibieron profilaxis, 253 (86%) con IT (MTX con o sin citarabina) y 42 (14%) con HD-MTX. Con una mediana de seguimiento de 6.8 años, 36 de los 585 pacientes presentaron una recaída en el SNC, 14 de los cuales habían recibido profilaxis. El riesgo de recaída en el SNC fue similar en los pacientes que habían recibido profilaxis con IT o HD-MTX, y en los pacientes que no habían recibido profilaxis, con un riesgo a los 5 años del 5.5% vs. 5% vs. 7.5% ( $p=0.34$ ), respectivamente. Los pacientes que habían realizado profilaxis, tanto IT como HD-MTX, recayeron en el SNC de forma más tardía que los que no habían realizado profilaxis, con una mediana de tiempo a la recaída de 19 meses (rango 7-55 meses) vs. 8 meses (rango 6-110 meses), respectivamente. También observamos que el riesgo de recaída en el SNC durante el primer año tras finalizar la quimioterapia fue menor en los pacientes que habían recibido profilaxis, comparado con los pacientes que no la habían recibido, con un riesgo del 2% vs. 7.1%, respectivamente, y un riesgo relativo (RR) de 0.76 [95% CI, 0.08-0.66]. Sin embargo, con el paso del tiempo el riesgo de recaída se volvía similar en los dos grupos, con un riesgo a los 5 años del 5.6% en los pacientes con profilaxis, comparado con el 7.5% en los pacientes sin profilaxis, RR 0.76 [95% CI, 0.35-1.75].

Por último, observamos que los pacientes con fenotipo no centro germinal determinado por inmunohistoquímica (n=229), presentaban un riesgo más elevado de recaída en el SNC que los pacientes con fenotipo centro germinal (n=234), con un riesgo a los 5 años del 9.9% vs. 4.5%, respectivamente (p=0.03).

Por lo tanto, en base a los resultados de este segundo trabajo se puede concluir que la profilaxis del SNC con quimioterapia IT no demostró un beneficio claro en la prevención de la recaída neuromeningea en pacientes con factores de riesgo. Además, el esquema con HD-MTX tampoco demostró ser más eficaz que la profilaxis con IT, lo que pone de manifiesto la necesidad de investigar esquemas de profilaxis más eficaces.

## **6 RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN**



El diagnóstico de los linfomas con afectación del SNC es complicado en muchas ocasiones debido a la dificultad para realizar la biopsia cerebral y los riesgos asociados con el proceso quirúrgico. Además, debido a estos factores, la muestra obtenida en las biopsias realizadas suele ser escasa. Por ello, en los últimos años ha habido un gran interés en el estudio del ctDNA en el LCR y el plasma de estos pacientes y su potencial uso para complementar el diagnóstico. Hasta el momento, varios estudios han demostrado que los niveles de ctDNA en el plasma tienen una muy buena correlación con el volumen metabólico tumoral y con el pronóstico de los pacientes con linfoma B con afectación sistémica.(126, 127, 129, 130) Sin embargo, en el caso del linfoma cerebral, al igual que sucede en otras neoplasias cerebrales, diversos grupos de investigadores han observado que la cantidad de ctDNA circulante en el plasma es muy baja, y por lo tanto no sería una buena fuente para para realizar estudios de ctDNA.(121, 122, 124, 131-133) Por otro lado, varios trabajos recientes, han conseguido detectar ctDNA en el LCR de los pacientes con linfoma cerebral primario (LCP) y linfoma cerebral secundario, la mayoría a través del análisis de la mutación *MYD88* L265P, presente hasta en el 70% de estos tumores.(134-136, 138, 140)

En la primera parte de este primer trabajo, demostramos la presencia de ctDNA en el LCR al diagnóstico, en todos los pacientes con linfoma cerebral con afectación única del SNC (n=6), con VAFs entre el 5% y el 95%. Estos resultados, junto con los datos reportados en los estudios previos, sugieren que el estudio del ctDNA en el LCR sería una buena herramienta para complementar el diagnóstico e identificar mutaciones somáticas en los pacientes con linfoma cerebral.(134-136, 138, 140) Por otra parte, también observamos que la cantidad de ctDNA en el plasma era indetectable o muy baja en estos pacientes con enfermedad única en el SNC, en concordancia con los datos publicados anteriormente, confirmando que el análisis de ctDNA en plasma no sería útil para el manejo de estos enfermos.(131, 132, 136)



La respuesta al tratamiento en los pacientes con linfoma cerebral se realiza mediante pruebas de imagen junto con el análisis del LCR en los casos con afectación leptomeníngea.(103, 199) Nuestros resultados muestran que los niveles de ctDNA en el LCR presentan una buena correlación con la respuesta al tratamiento, disminuyendo de forma significativa en los casos que presentaron reducción tumoral y aumentando con la progresión de la enfermedad, lo que sugiere que la determinación de ctDNA en el LCR también podría ser útil para monitorizar la respuesta al tratamiento. De forma similar, los resultados de un estudio llevado a cabo por investigadores del hospital Memorial Sloan Kettering Cancer Center, también demostraron una buena correlación entre los niveles de ctDNA en el LCR y la respuesta al tratamiento en 9 casos con linfoma cerebral en recaída incluidos en un ensayo clínico.(138)

También observamos la persistencia de niveles elevados de ctDNA en el LCR en dos pacientes tras finalizar el tratamiento, aunque la citología convencional (CC) y la citometría de flujo multiparamétrica (CFM) en el LCR no detectaban células malignas. Finalmente, estos dos pacientes presentaron una recaída precoz de la enfermedad a nivel del SNC. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la determinación de ctDNA en el LCR también podría ser útil para detectar la presencia de enfermedad mínima residual tras el tratamiento en pacientes con enfermedad conocida en el SNC.

La recaída en el SNC en los pacientes con un linfoma sistémico se asocia con muy mal pronóstico, con una supervivencia inferior a 6 meses.(14, 155, 156, 177) Por ello, la identificación precoz de los pacientes con enfermedad en el SNC es crucial. Como se ha comentado previamente, en los pacientes con linfoma sistémico y factores de riesgo de recaída neuromeníngea, se recomienda realizar un análisis del LCR al diagnóstico que incluya CC y CFM para descartar la presencia de enfermedad a ese nivel. A pesar de que la CFM es una técnica más sensible que la CC tiene algunas limitaciones como la falta de estandarización y la disminución de la sensibilidad de la técnica en muestras

con escaso volumen.(106, 107, 175, 200) Además, la mayoría de las recaídas en el SNC se producen de forma precoz, lo que sugiere que las células tumorales podrían estar ya presentes en el LCR al diagnóstico y no ser detectadas por las técnicas convencionales. En nuestro estudio, el análisis de ctDNA en el LCR fue capaz de detectar la presencia de enfermedad neuromeningea en 1 paciente con un linfoma sistémico sin evidencia de enfermedad en el SNC al diagnóstico ni durante el tratamiento y en respuesta completa (RC), en una muestra de LCR (CC negativa y CFM negativa) obtenida 3 meses antes de que las técnicas convencionales demostrasen la recaída a nivel cerebral. De forma similar, en otro paciente con un linfoma cerebral en RC tras la quimioterapia, se observó la presencia de ctDNA en el LCR en 2 muestras con CC y CFM negativas, obtenidas 8 y 10 meses antes de que la RMN cerebral y la CFM confirmasen la recaída neuromeningea. Estos hallazgos indican que el análisis del ctDNA en el LCR podría ser más sensible que las técnicas convencionales para la detección precoz de la enfermedad neuromeningea en pacientes con linfoma sistémico con alto riesgo de recaída en SNC y en pacientes con linfoma cerebral. De forma similar, los resultados de un estudio reciente presentado en el *American Society of Hematology (ASH) Meeting* del año 2020, mostraron por medio de un análisis de clonotipos específicos del tumor, la presencia de cfDNA en el LCR de 8 de los 19 (42%) pacientes con diagnóstico de linfoma sistémico sin evidencia de afectación en el SNC. Con una mediana de seguimiento de 11 meses, 2 de estos 8 pacientes presentaron una recaída neuromeningea. Sin embargo, en los resultados preliminares presentados no se detalló si el resto de pacientes con cfDNA detectable que no recayeron a nivel del SNC recibieron algún tipo de tratamiento con fármacos con capacidad para penetrar al SNC, que explicase la ausencia de recaída.(139) En nuestro estudio, el análisis de ctDNA en el LCR no consiguió detectar enfermedad en 1 paciente con un linfoma sistémico de alto riesgo, que presentó una recaída en el SNC 9 meses después de finalizar el tratamiento de primera línea. El resto de los pacientes con linfoma sistémico en los que no se detectó ctDNA en el LCR, permanecen en RC sin evidencia de enfermedad neuromeningea.

Una de las principales limitaciones de nuestro estudio es que debido a la elevada heterogeneidad intra-tumoral existente en el LDCGB y en otros linfomas B sistémicos, no se sabe con certeza el número de mutaciones que son compartidas por el tumor primario y las células malignas presentes en otras localizaciones. De este modo, en nuestro estudio, no detectamos ctDNA en el LCR de un paciente con enfermedad conocida a nivel leptomeníngeo y sistémico, aunque sí que se identificaban mutaciones en el plasma. Cabe destacar que en este caso la muestra tumoral secuenciada correspondía al diagnóstico de la enfermedad, mientras que las muestras de LCR y plasma utilizadas para el análisis de ctDNA se obtuvieron al momento de la recaída. Asimismo, un trabajo llevado a cabo por investigadores del Memorial Sloan Kettering Cancer Center, observó que solo entre un 11% - 37% de las mutaciones identificadas en el LCR de los pacientes con linfoma cerebral en recaída, estaban también presentes en la muestra tumoral al diagnóstico, aunque este porcentaje aumentaba hasta el 60% en las mutaciones que afectaban a los genes de la vía del BCR (*MYD88*, *CD79B*, *CARD11*, *MALT1*, *PLCG2*, *TNFAIP3*).<sup>(138)</sup>

En conclusión, los resultados de este primer trabajo muestran que, en los pacientes con linfoma cerebral, el ctDNA es más abundante en el LCR que en el plasma y que los niveles del mismo presentan una buena correlación con la respuesta al tratamiento, por lo que podría ser una buena herramienta para complementar el diagnóstico y monitorizar la respuesta a la terapia. Además, también se observó que el análisis del ctDNA en el LCR permite detectar la recaída en el SNC de manera más precoz que las técnicas diagnósticas estándar, tanto en pacientes con linfoma sistémico con alto riesgo de recaída neuromeníngea como en pacientes con linfoma cerebral.

En el linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) el riesgo de recaída en el SNC es en general bajo; sin embargo, la presencia de ciertas características clínicas y biológicas aumentan el riesgo de forma significativa.(13, 14) Dado el mal pronóstico asociado con las recaídas neuromeningeas, en los pacientes considerados de alto riesgo se recomienda realizar profilaxis con fármacos con capacidad de penetrar la barrera hematoencefálica, aunque en la era de rituximab su eficacia es controvertida.(156, 165, 166, 185-188, 192-194) El segundo trabajo de esta Tesis Doctoral, tenía como objetivo evaluar la eficacia de la profilaxis del SNC con los dos esquemas más utilizados en la actualidad, la quimioterapia intratecal (IT) y las dosis altas de metotrexato endovenoso (HD-MTX), en una amplia cohorte de pacientes tratados de forma homogénea con R-CHOP o esquemas similares. Nuestros resultados muestran que la profilaxis del SNC no ofrece un beneficio claro en los pacientes con LDCGB y factores de riesgo, con un riesgo de recaída a los 5 años del 5.5% en los pacientes que recibían profilaxis IT, 5% los que recibían HD-MTX y 7.5% en los pacientes que no recibían profilaxis.

El riesgo de recaída en el SNC de los pacientes incluidos en nuestro estudio de fue del 6.5% a los 5 años, en concordancia con los resultados obtenidos en otras series retrospectivas publicadas en los últimos años.(185, 187, 188, 197, 201) Otros investigadores sin embargo, describieron un riesgo de recaída superior, alrededor del 10%, en los pacientes de alto riesgo.(14, 159) Es posible que esta diferencia sea debida a que la mayoría de los pacientes de nuestro estudio se les realizó un análisis del LCR previo a iniciar el tratamiento lo cual permitió identificar de forma precoz a los pacientes asintomáticos con enfermedad leptomenígea oculta, que fueron por lo tanto excluidos del análisis. Otra de las razones podría ser que los criterios escogidos para identificar a los pacientes de alto riesgo varían entre los diferentes estudios.(159, 185, 187, 188, 197, 201)

La eficacia de la profilaxis del SNC en los pacientes con LDCGB de alto riesgo se ha investigado en numerosos estudios a lo largo de los años. La mayoría de estos trabajos son de carácter retrospectivo, y muchos de ellos carecen de un grupo comparador, lo que representa una de sus principales limitaciones. Además, como se ha comentado anteriormente, los criterios utilizados por los diferentes investigadores para definir el grupo de pacientes de alto riesgo se han ido modificando a lo largo de los años y varían ampliamente entre los diferentes estudios. Por último, otra de las limitaciones de las series publicadas hasta ahora y también de nuestro estudio es que la administración de la profilaxis fue a criterio del médico tratante, lo cual implica que los pacientes que recibieron profilaxis podrían haber sido considerados de mayor riesgo, o por el contrario, que los pacientes con mal estado general o de edad avanzada no fuesen considerados candidatos para recibir la profilaxis.(153, 156, 159, 165, 177, 184-187) En nuestro estudio, a pesar de que el uso de la profilaxis no fue controlado, utilizamos un índice pronóstico robusto, como es el CNS-IPI para identificar con mayor precisión a los pacientes de alto riesgo. Además, incluimos también a aquellos pacientes con afectación testicular, mamaria, renal o de la médula ósea, independientemente del CNS-IPI; así como los casos con reordenamientos de *MYC* y *BCL2* y/o *BCL6*; que como se ha descrito en la introducción, también presentan un riesgo más elevado de recaída en el SNC,(60, 61, 65, 66, 68) lo que hace que nuestros resultados sean más representativos que otros estudios retrospectivos similares.

En nuestra serie, el 50% de los pacientes recibieron profilaxis neuromeningea, la mayoría de ellos con MTX IT, probablemente porque el período de inclusión del estudio es muy amplio (años 2001-2017), y esta ha sido la profilaxis más utilizada históricamente. Nuestros resultados fueron concordantes con los datos de otros estudios retrospectivos y análisis *posthoc* de estudios prospectivos, donde tampoco se observó una reducción en el número de recaídas en el SNC en los pacientes que recibían profilaxis IT comparado con los que no recibían profilaxis, lo que apoya la

hipótesis de que este tipo de profilaxis no es eficaz en la era del rituximab.(153, 156, 159, 165, 177, 184-187)

En los últimos años, dado el escaso beneficio reportado con la profilaxis IT, se ha investigado también la utilidad de la profilaxis con dosis altas de MTX administrado por vía endovenosa. Con este esquema se ha demostrado que se alcanzan concentraciones más elevadas de MTX en el LCR y en el plasma, lo que permitiría prevenir tanto las recaídas leptomeníngicas como las parenquimatosas, más frecuentes en la era de rituximab.(168, 189, 191) A pesar de que inicialmente varios estudios retrospectivos demostraron una reducción en el número de recaídas neuromeníngicas en pacientes de alto riesgo,(188, 192, 193) dos trabajos publicados en los últimos años contradicen estos resultados concluyendo que no existe un beneficio claro con este tipo de profilaxis.(194, 195) Nuestros resultados, a pesar de que el número de pacientes que habían recibido HD-MTX no fue muy elevado, tampoco muestran un menor riesgo de recaída en el grupo que recibía HD-MTX comparado con el grupo que no recibía profilaxis. Por último, un estudio reciente llevado a cabo en Canadá con 326 pacientes de los cuales un 35% habían recibido HD-MTX, mostró resultados concordantes con nuestro estudio, con un riesgo de recaída similar entre los pacientes que recibían profilaxis con HD-MTX y los que no recibían profilaxis (11% vs. 12%).(198)

Nuestros resultados tampoco muestran diferencias entre los dos esquemas de profilaxis analizados. Inicialmente, un estudio retrospectivo llevado a cabo por investigadores de Australia, mostró que los pacientes que recibían profilaxis con HD-MTX tenían un riesgo de recaída en el SNC significativamente inferior al de los pacientes que recibían profilaxis con MTX IT. Sin embargo, cabe destacar que en este estudio solo un 37% de los pacientes que recibían MTX IT, habían recibido rituximab como parte del tratamiento; mientras que casi todos los pacientes del grupo de HD-MTX habían sido tratados con inmunoterapia.(193) Otro estudio reciente tampoco observó diferencias

significativas en una amplia cohorte de pacientes tratados en 19 centros de Estados Unidos que habían recibido como profilaxis HD-MTX o quimioterapia IT, con un riesgo de recaída de 7% vs. 5%, respectivamente.(197)

En nuestro trabajo, a pesar de que el riesgo de recaída neuromeningea fue similar independientemente del uso de la profilaxis, observamos que los pacientes que recibían profilaxis presentaban recaídas más tardías que los pacientes que no la recibían. Así, el primer año tras finalizar el tratamiento, el riesgo de recaída en SNC fue del 7.1% en los casos que no habían recibido profilaxis comparado con un 2.4% y 2% en los pacientes tratados con HD-MTX y quimioterapia IT, respectivamente. Sin embargo, observamos que, con el paso de los años, el riesgo se volvía similar, siendo a los 5 años del 7.5% vs. 5.6% vs. 5.2%, en los pacientes sin profilaxis, con quimioterapia IT y HD-MTX, respectivamente. Estos resultados no se habían observado en estudios publicados anteriormente, probablemente porque la mayoría de estos trabajos tienen una mediana de seguimiento corta, de aproximadamente 2.5 años, por lo que las recaídas tardías no serían detectadas, a diferencia de nuestro estudio, donde la mediana de seguimiento fue de 6.8 años.(185, 187, 197, 198)

Una de las hipótesis que explicarían nuestros resultados es que la administración de tratamiento profiláctico con fármacos que penetran al SNC, podría eliminar parcialmente la enfermedad oculta neuromeningea, retrasando su aparición, en lugar de prevenirla de manera eficaz. Además, los resultados obtenidos en nuestro estudio también sugieren que los esquemas de profilaxis utilizados hasta ahora no serían útiles para prevenir las recaídas tardías.

Finalmente, aunque en nuestro estudio todos los pacientes incluidos fueron considerados de alto riesgo, observamos que aquellos que tenían un fenotipo no centro germinal (no-GCB) determinado por inmunohistoquímica, tenían un riesgo más elevado

de recaída en el SNC que los pacientes que tenían un fenotipo centro germinal (GCB). Estos resultados concuerdan con un trabajo reciente en el que se observó que la célula de origen tipo ABC, determinada mediante un análisis de perfil de expresión génica, era un factor de riesgo independiente de recaída en el SNC, sobre todo en el grupo de pacientes con un CNS-IPI de alto riesgo, con un riesgo de recaída a los 2 años del 15%. Así, nuestros resultados sugieren que en los casos en los que no se puedan realizar estudios moleculares para determinar la célula de origen, las técnicas de inmunohistoquímica podrían ser de ayuda para identificar a los pacientes de alto riesgo.

Por lo tanto, como conclusión de este segundo trabajo, la profilaxis con quimioterapia IT no demostró un beneficio en la prevención de la recaída neuromeningea en los pacientes con diagnóstico de LDCGB y factores de riesgo. Además, el esquema con HD-MTX no demostró ser más eficaz que la profilaxis IT. Todo ello, pone de manifiesto la necesidad de investigar esquemas de profilaxis más eficaces.



## **7 CONCLUSIONES**



Las conclusiones de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. En los linfomas con afectación cerebral única, el ctDNA fue más abundante en el LCR que en el plasma.
2. El análisis de ctDNA en el LCR mostró una buena correlación con la respuesta al tratamiento en los pacientes con linfoma cerebral.
3. El análisis de ctDNA detectó la recaída en el SNC con mayor precisión que la citometría de flujo multiparamétrica y la citología convencional.
4. La profilaxis del SNC no fue eficaz para prevenir la recaída neuromeníngea en los pacientes con LDCGB y factores de riesgo
5. El esquema de profilaxis con dosis altas de metotrexato endovenoso no demostró ser más eficaz que la profilaxis con quimioterapia intratecal



## **8 LÍNEAS DE FUTURO**

En los últimos años, la biopsia líquida ha demostrado una buena correlación con el volumen tumoral y el pronóstico de los pacientes con síndromes linfoproliferativos. Los resultados de nuestro estudio confirman que la biopsia líquida también es útil para el diagnóstico y la monitorización de la respuesta al tratamiento en los pacientes con síndromes linfoproliferativos con afectación del sistema nervioso central (SNC). Además, la biopsia líquida también demostró su utilidad para predecir la recaída neuromeníngea en los pacientes con linfoma sistémico y riesgo alto de recaída en el SNC. Este último hallazgo es especialmente significativo ya que como se observa en el segundo trabajo de esta tesis doctoral, la administración de profilaxis del SNC, no parece ser muy eficaz en la prevención de las recaídas neuromeníngeas en los pacientes con linfoma difuso de célula grande B y riesgo alto de recaída en el SNC. Por último, en base a los resultados obtenidos con los estudios que conforman esta Tesis Doctoral, nuestro grupo de investigación está desarrollando nuevos proyectos para investigar la utilidad de la biopsia líquida en el diagnóstico y la caracterización molecular en los pacientes con linfoma cerebral primario, así como su utilidad para evaluar la respuesta al tratamiento.



## **9 BIBLIOGRAFÍA**





1. Swerdlow, SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th ed. International Agency for Research on Cancer: Lyon 2016.
2. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006;107(1):265-76.
3. Anderson LA, Gadalla S, Morton LM, Landgren O, Pfeiffer R, Warren JL, et al. Population-based study of autoimmune conditions and the risk of specific lymphoid malignancies. *Int J Cancer*. 2009;125(2):398-405.
4. Beral V, Peterman T, Berkelman R, Jaffe H. AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*. 1991;337(8745):805-9.
5. Canioni D, Jabado N, MacIntyre E, Patey N, Emile JF, Brousse N. Lymphoproliferative disorders in children with primary immunodeficiencies: immunological status may be more predictive of the outcome than other criteria. *Histopathology*. 2001;38(2):146-59.
6. Brady G, MacArthur GJ, Farrell PJ. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol*. 2007;60(12):1397-402.
7. Du MQ, Bacon CM, Isaacson PG. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 and lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol*. 2007;60(12):1350-7.
8. Suzuki K, Ohshima K, Karube K, Suzumiya J, Ohga S, Ishihara S, et al. Clinicopathological states of Epstein-Barr virus-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorders (severe chronic active EBV infection) of children and young adults. *Int J Oncol*. 2004;24(5):1165-74.
9. Ratner L. Human T cell lymphotropic virus-associated leukemia/lymphoma. *Curr Opin Oncol*. 2005;17(5):469-73.
10. Ponzoni M, Ferreri AJ. Bacteria associated with marginal zone lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2017;30(1-2):32-40.
11. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997;89(11):3909-18.
12. Vose J, Armitage J, Weisenburger D, Project IT-CL. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol*. 2008;26(25):4124-30.
13. El-Galaly TC, Villa D, Michaelsen TY, Hutchings M, Mikhaeel NG, Savage KJ, et al. The number of extranodal sites assessed by PET/CT scan is a powerful predictor of CNS relapse for patients with diffuse large B-cell lymphoma: An international multicenter study of 1532 patients treated with chemoimmunotherapy. *Eur J Cancer*. 2017;75:195-203.
14. Schmitz N, Zeynalova S, Nickelsen M, Kansara R, Villa D, Sehn LH, et al. CNS International Prognostic Index: A Risk Model for CNS Relapse in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2016;34(26):3150-6.
15. Savage KJ. Secondary CNS relapse in diffuse large B-cell lymphoma: defining high-risk patients and optimization of prophylaxis strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017;2017(1):578-86.
16. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2780-95.
17. 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*. 1989;7(11):1630-6.
18. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3059-68.

19. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
20. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1937-47.
21. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-82.
22. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):200-7.
23. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, et al. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2848-56.
24. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2018;378(15):1396-407.
25. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med*. 2018;24(5):679-90.
26. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(10):3879-84.
27. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011;476(7360):298-303.
28. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2011;43(9):830-7.
29. Zhang J, Grubor V, Love CL, Banerjee A, Richards KL, Mieczkowski PA, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(4):1398-403.
30. Reddy A, Zhang J, Davis NS, Moffitt AB, Love CL, Waldrop A, et al. Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell*. 2017;171(2):481-94.e15.
31. Lenz G, Wright GW, Emre NC, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(36):13520-5.
32. Aukema SM, Kreuz M, Kohler CW, Rosolowski M, Hasenclever D, Hummel M, et al. Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma. *Haematologica*. 2014;99(4):726-35.
33. Pedersen M, Gang AO, Poulsen TS, Knudsen H, Lauritzen AF, Nielsen SL, et al. MYC translocation partner gene determines survival of patients with large B-cell lymphoma with MYC- or double-hit MYC/BCL2 translocations. *Eur J Haematol*. 2014;92(1):42-8.
34. Rosenwald A, Bens S, Advani R, Barrans S, Copie-Bergman C, Elsensohn MH, et al. Prognostic Significance of. *J Clin Oncol*. 2019;37(35):3359-68.
35. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 2005;106(9):3183-90.
36. Chapuy B, Roemer MG, Stewart C, Tan Y, Abo RP, Zhang L, et al. Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood*. 2016;127(7):869-81.

37. Caganova M, Carrisi C, Varano G, Mainoldi F, Zanardi F, Germain PL, et al. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J Clin Invest.* 2013;123(12):5009-22.
38. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2018;131(21):2307-19.
39. Lacy SE, Barrans SL, Beer PA, Painter D, Smith AG, Roman E, et al. Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report. *Blood.* 2020;135(20):1759-71.
40. Project IN-HsLPP. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1993;329(14):987-94.
41. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood.* 2007;109(5):1857-61.
42. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, Lacasce AS, Crosby-Thompson A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood.* 2014;123(6):837-42.
43. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol.* 2012;30(28):3452-9.
44. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol.* 2012;30(28):3460-7.
45. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepage G, Plantier I, Castaigne S, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood.* 2010;116(12):2040-5.
46. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;346(4):235-42.
47. Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, Pettengell R, Trnety M, Imrie K, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2006;7(5):379-91.
48. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, et al. Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol.* 2008;9(2):105-16.
49. Davies A, Cummin TE, Barrans S, Maishman T, Mamot C, Novak U, et al. Gene-expression profiling of bortezomib added to standard chemoimmunotherapy for diffuse large B-cell lymphoma (REMoDL-B): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(5):649-62.
50. Younes A, Sehn LH, Johnson P, Zinzani PL, Hong X, Zhu J, et al. Randomized Phase III Trial of Ibrutinib and Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Non-Germinal Center B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2019;37(15):1285-95.
51. Umberto V. ROBUST: First report of a phase III randomized study of Lenalidomide/R-CHOP (R-CHOP2) vs. placebo/R-CHOP in previously untreated ABC-type in diffuse large B cell lymphoma. *Hematol Oncol*2019. p. 36-7.
52. Vitolo U, Trněný M, Belada D, Burke JM, Carella AM, Chua N, et al. Obinutuzumab or Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2017;35(31):3529-37.

53. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Singh Gill D, Linch DC, Trneny M, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28(27):4184-90.
54. Glass B, Dohm AJ, Truemper LH, Pfreundschuh M, Bleckmann A, Wulf GG, et al. Refractory or relapsed aggressive B-cell lymphoma failing (R)-CHOP: an analysis of patients treated on the RICOVER-60 trial. *Ann Oncol*. 2017;28(12):3058-64.
55. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2531-44.
56. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2019;380(1):45-56.
57. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang M, Arnason J, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet*. 2020;396(10254):839-52.
58. Swerdlow SH, CE, Harris N L. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008.
59. Scott DW, King RL, Staiger AM, Ben-Neriah S, Jiang A, Horn H, et al. High-grade B-cell lymphoma with. *Blood*. 2018;131(18):2060-4.
60. Oki Y, Noorani M, Lin P, Davis RE, Neelapu SS, Ma L, et al. Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience. *Br J Haematol*. 2014;166(6):891-901.
61. Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, Takeuchi K, Koike J, Motomura S, et al. Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations. *Haematologica*. 2009;94(7):935-43.
62. Sarkozy C, Traverse-Glehen A, Coiffier B. Double-hit and double-protein-expression lymphomas: aggressive and refractory lymphomas. *Lancet Oncol*. 2015;16(15):e555-e67.
63. Le Gouill S, Talmant P, Touzeau C, Moreau A, Garand R, Juge-Morineau N, et al. The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC rearrangement. *Haematologica*. 2007;92(10):1335-42.
64. Li S, Lin P, Fayad LE, Lennon PA, Miranda RN, Yin CC, et al. B-cell lymphomas with MYC/8q24 rearrangements and IGH@BCL2/t(14;18)(q32;q21): an aggressive disease with heterogeneous histology, germinal center B-cell immunophenotype and poor outcome. *Mod Pathol*. 2012;25(1):145-56.
65. Petrich AM, Gandhi M, Jovanovic B, Castillo JJ, Rajguru S, Yang DT, et al. Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Blood*. 2014;124(15):2354-61.
66. Sun H, Savage KJ, Karsan A, Slack GW, Gascoyne RD, Toze CL, et al. Outcome of Patients With Non-Hodgkin Lymphomas With Concurrent MYC and BCL2 Rearrangements Treated With CODOX-M/IVAC With Rituximab Followed by Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15(6):341-8.
67. Savage KJ, Slack GW, Mottok A, Sehn LH, Villa D, Kansara R, et al. Impact of dual expression of MYC and BCL2 by immunohistochemistry on the risk of CNS relapse in DLBCL. *Blood*. 2016;127(18):2182-8.
68. Landsburg DJ, Falkiewicz MK, Maly J, Blum KA, Howlett C, Feldman T, et al. Outcomes of Patients With Double-Hit Lymphoma Who Achieve First Complete Remission. *J Clin Oncol*. 2017;35(20):2260-7.
69. Dunleavy K, Fanale MA, Abramson JS, Noy A, Caimi PF, Pittaluga S, et al. Dose-adjusted EPOCH-R (etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin, and rituximab) in untreated aggressive diffuse large B-cell lymphoma with MYC rearrangement: a prospective, multicentre, single-arm phase 2 study. *Lancet Haematol*. 2018;5(12):e609-e17.

70. Evrard SM, Péricart S, Grand D, Amara N, Escudié F, Gilhodes J, et al. Targeted next generation sequencing reveals high mutation frequency of. *Haematologica*. 2019;104(4):e154-e7.
71. Cucco F, Barrans S, Sha C, Clipson A, Crouch S, Dobson R, et al. Distinct genetic changes reveal evolutionary history and heterogeneous molecular grade of DLBCL with MYC/BCL2 double-hit. *Leukemia*. 2020;34(5):1329-41.
72. Momose S, Weißbach S, Pischmarov J, Nedeva T, Bach E, Rudelius M, et al. The diagnostic gray zone between Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma is also a gray zone of the mutational spectrum. *Leukemia*. 2015;29(8):1789-91.
73. Gebauer N, Bernard V, Feller AC, Merz H. ID3 mutations are recurrent events in double-hit B-cell lymphomas. *Anticancer Res*. 2013;33(11):4771-8.
74. Bouska A, Bi C, Lone W, Zhang W, Kedwaii A, Heavican T, et al. Adult high-grade B-cell lymphoma with Burkitt lymphoma signature: genomic features and potential therapeutic targets. *Blood*. 2017;130(16):1819-31.
75. Howlett C, Snedecor SJ, Landsburg DJ, Svoboda J, Chong EA, Schuster SJ, et al. Front-line, dose-escalated immunochemotherapy is associated with a significant progression-free survival advantage in patients with double-hit lymphomas: a systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol*. 2015;170(4):504-14.
76. Cohen JB, Geyer SM, Lozanski G, Zhao W, Heerema NA, Hall NC, et al. Complete response to induction therapy in patients with Myc-positive and double-hit non-Hodgkin lymphoma is associated with prolonged progression-free survival. *Cancer*. 2014;120(11):1677-85.
77. Rosenwald A, Bens S, Advani R, Barrans S, Copie-Bergman C, Elsensohn MH, et al. Prognostic Significance of MYC Rearrangement and Translocation Partner in Diffuse Large B Cell Lymphoma: A Study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol*. 2019;37(35):3359-68.
78. Sesques P, Johnson NA. Approach to the diagnosis and treatment of high-grade B-cell lymphomas with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements. *Blood*. 2017;129(3):280-8.
79. Friedberg JW. How I treat double-hit lymphoma. *Blood*. 2017;130(5):590-6.
80. Castillo JJ, Winer ES, Olszewski AJ. Population-based prognostic factors for survival in patients with Burkitt lymphoma: an analysis from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*. 2013;119(20):3672-9.
81. Ribera JM, García O, Grande C, Esteve J, Oriol A, Bergua J, et al. Dose-intensive chemotherapy including rituximab in Burkitt's leukemia or lymphoma regardless of human immunodeficiency virus infection status: final results of a phase 2 study (Burkimab). *Cancer*. 2013;119(9):1660-8.
82. Roschewski M, Dunleavy K, Abramson JS, Powell BL, Link BK, Patel P, et al. Multicenter Study of Risk-Adapted Therapy With Dose-Adjusted EPOCH-R in Adults With Untreated Burkitt Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2020;38(22):2519-29.
83. Zayac AS, Evens AM, Danilov A, Smith SD, Jagadeesh D, Leslie LA, et al. Outcomes of Burkitt lymphoma with central nervous system involvement: evidence from a large multi-center cohort study. *Haematologica*. 2021.
84. Sariban E, Edwards B, Janus C, Magrath I. Central nervous system involvement in American Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol*. 1983;1(11):677-81.
85. Hoelzer D, Walewski J, Döhner H, Viardot A, Hiddemann W, Spiekermann K, et al. Improved outcome of adult Burkitt lymphoma/leukemia with rituximab and chemotherapy: report of a large prospective multicenter trial. *Blood*. 2014;124(26):3870-9.
86. Noy A, Lee JY, Cesarman E, Ambinder R, Baiocchi R, Reid E, et al. AMC 048: modified CODOX-M/IVAC-rituximab is safe and effective for HIV-associated Burkitt lymphoma. *Blood*. 2015;126(2):160-6.
87. Zhu KY, Song KW, Connors JM, Leitch H, Barnett MJ, Ramadan K, et al. Excellent real-world outcomes of adults with Burkitt lymphoma treated with CODOX-M/IVAC plus or minus rituximab. *Br J Haematol*. 2018;181(6):782-90.

88. Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2431-42.
89. Love C, Sun Z, Jima D, Li G, Zhang J, Miles R, et al. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat Genet*. 2012;44(12):1321-5.
90. Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, Jhavar S, Xiao W, Zhang M, et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature*. 2012;490(7418):116-20.
91. Richter J, Schlesner M, Hoffmann S, Kreuz M, Leich E, Burkhardt B, et al. Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet*. 2012;44(12):1316-20.
92. Costa LJ, Xavier AC, Wahlquist AE, Hill EG. Trends in survival of patients with Burkitt lymphoma/leukemia in the USA: an analysis of 3691 cases. *Blood*. 2013;121(24):4861-6.
93. Evens AM, Danilov AV, Jagadeesh D, Sperling AL, Kim SH, Vaca RA, et al. Burkitt Lymphoma in the Modern Era: Real World Outcomes and Prognostication Across 30 US Cancer Centers. *Blood*. 2020.
94. Olszewski AJ, Jakobsen LH, Collins GP, Cwynarski K, Bachanova V, Blum KA, et al. Burkitt Lymphoma International Prognostic Index. *J Clin Oncol*. 2021:JCO2003288.
95. Thomas DA, Faderl S, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Cortes J, Garcia-Manero G, et al. Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2006;106(7):1569-80.
96. Mead GM, Barrans SL, Qian W, Walewski J, Radford JA, Wolf M, et al. A prospective clinicopathologic study of dose-modified CODOX-M/IVAC in patients with sporadic Burkitt lymphoma defined using cytogenetic and immunophenotypic criteria (MRC/NCRI LY10 trial). *Blood*. 2008;112(6):2248-60.
97. Ribrag V, Koscielny S, Bosq J, Leguay T, Casasnovas O, Fornecker LM, et al. Rituximab and dose-dense chemotherapy for adults with Burkitt's lymphoma: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2016;387(10036):2402-11.
98. Dunleavy K, Pittaluga S, Shovlin M, Steinberg SM, Cole D, Grant C, et al. Low-intensity therapy in adults with Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med*. 2013;369(20):1915-25.
99. Short NJ, Kantarjian HM, Ko H, Khoury JD, Ravandi F, Thomas DA, et al. Outcomes of adults with relapsed or refractory Burkitt and high-grade B-cell leukemia/lymphoma. *Am J Hematol*. 2017;92(6):E114-E7.
100. Villano JL, Koshy M, Shaikh H, Dolecek TA, McCarthy BJ. Age, gender, and racial differences in incidence and survival in primary CNS lymphoma. *Br J Cancer*. 2011;105(9):1414-8.
101. Coté TR, Manns A, Hardy CR, Yellin FJ, Hartge P. Epidemiology of brain lymphoma among people with or without acquired immunodeficiency syndrome. AIDS/Cancer Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(10):675-9.
102. Josephson SA, Papanastassiou AM, Berger MS, Barbaro NM, McDermott MW, Hilton JF, et al. The diagnostic utility of brain biopsy procedures in patients with rapidly deteriorating neurological conditions or dementia. *J Neurosurg*. 2007;106(1):72-5.
103. Fischer L, Martus P, Weller M, Klasen HA, Rohden B, Röth A, et al. Meningeal dissemination in primary CNS lymphoma: prospective evaluation of 282 patients. *Neurology*. 2008;71(14):1102-8.
104. Küker W, Nägele T, Korfel A, Heckl S, Thiel E, Bamberg M, et al. Primary central nervous system lymphomas (PCNSL): MRI features at presentation in 100 patients. *J Neurooncol*. 2005;72(2):169-77.
105. Han CH, Batchelor TT. Diagnosis and management of primary central nervous system lymphoma. *Cancer*. 2017;123(22):4314-24.
106. Quijano S, López A, Manuel Sancho J, Panizo C, Debén G, Castilla C, et al. Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol*. 2009;27(9):1462-9.

107. Wilson WH, Bromberg JE, Stetler-Stevenson M, Steinberg SM, Martin-Martin L, Muñiz C, et al. Detection and outcome of occult leptomeningeal disease in diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Haematologica*. 2014;99(7):1228-35.
108. Nayyar N, White MD, Gill CM, Lastrapes M, Bertalan M, Kaplan A, et al. L265P mutation and. *Blood Adv*. 2019;3(3):375-83.
109. Braggio E, Van Wier S, Ojha J, McPhail E, Asmann YW, Egan J, et al. Genome-Wide Analysis Uncovers Novel Recurrent Alterations in Primary Central Nervous System Lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2015;21(17):3986-94.
110. Bruno A, Boisselier B, Labreche K, Marie Y, Polivka M, Jouvet A, et al. Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget*. 2014;5(13):5065-75.
111. Gonzalez-Aguilar A, Idbah A, Boisselier B, Habbita N, Rossetto M, Laurence A, et al. Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2012;18(19):5203-11.
112. Roy S, Josephson SA, Fridlyand J, Karch J, Kadoch C, Karrim J, et al. Protein biomarker identification in the CSF of patients with CNS lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008;26(1):96-105.
113. Sasayama T, Nakamizo S, Nishihara M, Kawamura A, Tanaka H, Mizukawa K, et al. Cerebrospinal fluid interleukin-10 is a potentially useful biomarker in immunocompetent primary central nervous system lymphoma (PCNSL). *Neuro Oncol*. 2012;14(3):368-80.
114. Rubenstein JL, Wong VS, Kadoch C, Gao HX, Barajas R, Chen L, et al. CXCL13 plus interleukin 10 is highly specific for the diagnosis of CNS lymphoma. *Blood*. 2013;121(23):4740-8.
115. Mabray MC, Barajas RF, Villanueva-Meyer JE, Zhang CA, Valles FE, Rubenstein JL, et al. The Combined Performance of ADC, CSF CXC Chemokine Ligand 13, and CSF Interleukin 10 in the Diagnosis of Central Nervous System Lymphoma. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016;37(1):74-9.
116. Sasagawa Y, Akai T, Tachibana O, Iizuka H. Diagnostic value of interleukin-10 in cerebrospinal fluid for diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *J Neurooncol*. 2015;121(1):177-83.
117. Song Y, Zhang W, Zhang L, Wu W, Zhang Y, Han X, et al. Cerebrospinal Fluid IL-10 and IL-10/IL-6 as Accurate Diagnostic Biomarkers for Primary Central Nervous System Large B-cell Lymphoma. *Sci Rep*. 2016;6:38671.
118. Muñiz C, Martín-Martín L, López A, Sánchez-González B, Salar A, Almeida J, et al. Contribution of cerebrospinal fluid sCD19 levels to the detection of CNS lymphoma and its impact on disease outcome. *Blood*. 2014;123(12):1864-9.
119. Murase S, Saio M, Takenaka K, Shinoda J, Nishimura Y, Sakai N, et al. Increased levels of CSF soluble CD27 in patients with primary central nervous system lymphoma. *Cancer Lett*. 1998;132(1-2):181-6.
120. Baraniskin A, Kuhnhen J, Schlegel U, Chan A, Deckert M, Gold R, et al. Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as marker for primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Blood*. 2011;117(11):3140-6.
121. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, Weigelt B, Martínez-Ricarte F, Torrejon D, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun*. 2015;6:8839.
122. Pentsova EI, Shah RH, Tang J, Boire A, You D, Briggs S, et al. Evaluating Cancer of the Central Nervous System Through Next-Generation Sequencing of Cerebrospinal Fluid. *J Clin Oncol*. 2016;34(20):2404-15.
123. Momtaz P, Pentsova E, Abdel-Wahab O, Diamond E, Hyman D, Merghoub T, et al. Quantification of tumor-derived cell free DNA(cfDNA) by digital PCR (DigPCR) in cerebrospinal fluid of patients with BRAFV600 mutated malignancies. *Oncotarget*. 2016;7(51):85430-6.
124. Martínez-Ricarte F, Mayor R, Martínez-Sáez E, Rubio-Pérez C, Pineda E, Cordero E, et al. Molecular Diagnosis of Diffuse Gliomas through Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA from Cerebrospinal Fluid. *Clin Cancer Res*. 2018;24(12):2812-9.



125. Escudero L, Llorca A, Arias A, Diaz-Navarro A, Martínez-Ricarte F, Rubio-Perez C, et al. Circulating tumour DNA from the cerebrospinal fluid allows the characterisation and monitoring of medulloblastoma. *Nat Commun.* 2020;11(1):5376.
126. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, Moorhead M, Pepin F, Kong K, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol.* 2015;16(5):541-9.
127. Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, Soo J, Craig AFM, Esfahani MS, et al. Circulating Tumor DNA Measurements As Early Outcome Predictors in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2018;36(28):2845-53.
128. Bohers E, Viailly PJ, Becker S, Marchand V, Ruminy P, Maingonnat C, et al. Non-invasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by cell-free DNA high-throughput targeted sequencing: analysis of a prospective cohort. *Blood Cancer J.* 2018;8(8):74.
129. Spina V, Brusca A, Cuccaro A, Martini M, Di Trani M, Forestieri G, et al. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2018;131(22):2413-25.
130. Delfau-Larue MH, van der Gucht A, Dupuis J, Jais JP, Nel I, Beldi-Ferchiou A, et al. Total metabolic tumor volume, circulating tumor cells, cell-free DNA: distinct prognostic value in follicular lymphoma. *Blood Adv.* 2018;2(7):807-16.
131. Hattori K, Sakata-Yanagimoto M, Suehara Y, Yokoyama Y, Kato T, Kurita N, et al. Clinical significance of disease-specific MYD88 mutations in circulating DNA in primary central nervous system lymphoma. *Cancer Sci.* 2018;109(1):225-30.
132. Fontanilles M, Marguet F, Bohers É, Viailly PJ, Dubois S, Bertrand P, et al. Non-invasive detection of somatic mutations using next-generation sequencing in primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget.* 2017;8(29):48157-68.
133. Montesinos-Rongen M, Brunn A, Tuchscherer A, Borchmann P, Schorb E, Kasenda B, et al. Analysis of Driver Mutational Hot Spots in Blood-Derived Cell-Free DNA of Patients with Primary Central Nervous System Lymphoma Obtained before Intracerebral Biopsy. *J Mol Diagn.* 2020;22(10):1300-7.
134. Hiemcke-Jiwa LS, Minnema MC, Radersma-van Loon JH, Jiwa NM, de Boer M, Leguit RJ, et al. The use of droplet digital PCR in liquid biopsies: A highly sensitive technique for MYD88 p.(L265P) detection in cerebrospinal fluid. *Hematol Oncol.* 2018;36(2):429-35.
135. Rimelen V, Ahle G, Pencreach E, Zinniger N, Debliquis A, Zalmai L, et al. Tumor cell-free DNA detection in CSF for primary CNS lymphoma diagnosis. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):43.
136. Hiemcke-Jiwa LS, Leguit RJ, Snijders TJ, Bromberg JEC, Nierkens S, Jiwa NM, et al. MYD88 p.(L265P) detection on cell-free DNA in liquid biopsies of patients with primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol.* 2019;185(5):974-7.
137. Hickmann AK, Frick M, Hadaschik D, Battke F, Bittl M, Ganslandt O, et al. Molecular tumor analysis and liquid biopsy: a feasibility investigation analyzing circulating tumor DNA in patients with central nervous system lymphomas. *BMC Cancer.* 2019;19(1):192.
138. Grommes C, Tang SS, Wolfe J, Kaley TJ, Daras M, Pentsova EI, et al. Phase 1b trial of an ibrutinib-based combination therapy in recurrent/refractory CNS lymphoma. *Blood.* 2019;133(5):436-45.
139. AJ O. Cerebrospinal fluid (CSF) analysis of tumor-specific cell-free DNA (cfDNA) as a diagnostic and prognostic tool for central nervous system (CNS) invasion in lymphoma. *Blood* 2020.
140. Zorofchian S, Lu G, Zhu JJ, Duose DY, Windham J, Esquenazi Y, et al. Detection of the. *Front Oncol.* 2018;8:382.
141. Ferreri AJ, Blay JY, Reni M, Pasini F, Spina M, Ambrosetti A, et al. Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: the International Extranodal Lymphoma Study Group experience. *J Clin Oncol.* 2003;21(2):266-72.

142. Abrey LE, Ben-Porat L, Panageas KS, Yahalom J, Berkey B, Curran W, et al. Primary central nervous system lymphoma: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center prognostic model. *J Clin Oncol*. 2006;24(36):5711-5.
143. Nelson DF, Martz KL, Bonner H, Nelson JS, Newall J, Kerman HD, et al. Non-Hodgkin's lymphoma of the brain: can high dose, large volume radiation therapy improve survival? Report on a prospective trial by the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG): RTOG 8315. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992;23(1):9-17.
144. Ferreri AJ, Cwynarski K, Pulczynski E, Ponzoni M, Deckert M, Politi LS, et al. Chemoimmunotherapy with methotrexate, cytarabine, thiotepa, and rituximab (MATRix regimen) in patients with primary CNS lymphoma: results of the first randomisation of the International Extranodal Lymphoma Study Group-32 (IELSG32) phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 2016;3(5):e217-27.
145. Ferreri AJM, Cwynarski K, Pulczynski E, Fox CP, Schorb E, La Rosée P, et al. Whole-brain radiotherapy or autologous stem-cell transplantation as consolidation strategies after high-dose methotrexate-based chemoimmunotherapy in patients with primary CNS lymphoma: results of the second randomisation of the International Extranodal Lymphoma Study Group-32 phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 2017;4(11):e510-e23.
146. Mercadal S. Guía terapéutica GELTAMO para el tratamiento del linfoma cerebral primario en el paciente no inmunodeprimido. 2019.
147. Kasenda B, Ferreri AJ, Marturano E, Forst D, Bromberg J, Ghesquieres H, et al. First-line treatment and outcome of elderly patients with primary central nervous system lymphoma (PCNSL)--a systematic review and individual patient data meta-analysis. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1305-13.
148. Hottinger AF, DeAngelis LM, Yahalom J, Abrey LE. Salvage whole brain radiotherapy for recurrent or refractory primary CNS lymphoma. *Neurology*. 2007;69(11):1178-82.
149. Rubenstein JL, Geng H, Fraser EJ, Formaker P, Chen L, Sharma J, et al. Phase 1 investigation of lenalidomide/rituximab plus outcomes of lenalidomide maintenance in relapsed CNS lymphoma. *Blood Adv*. 2018;2(13):1595-607.
150. Soussain C, Choquet S, Blonski M, Leclercq D, Houillier C, Rezai K, et al. Ibrutinib monotherapy for relapse or refractory primary CNS lymphoma and primary vitreoretinal lymphoma: Final analysis of the phase II 'proof-of-concept' iLOC study by the Lymphoma study association (LYSA) and the French oculo-cerebral lymphoma (LOC) network. *Eur J Cancer*. 2019;117:121-30.
151. Ghesquieres H, Chevrier M, Laadhari M, Chinot O, Choquet S, Moluçon-Chabrot C, et al. Lenalidomide in combination with intravenous rituximab (REVRI) in relapsed/refractory primary CNS lymphoma or primary intraocular lymphoma: a multicenter prospective 'proof of concept' phase II study of the French Oculo-Cerebral lymphoma (LOC) Network and the Lymphoma Study Association (LYSA)†. *Ann Oncol*. 2019;30(4):621-8.
152. Tun HW, Johnston PB, DeAngelis LM, Atherton PJ, Pederson LD, Koenig PA, et al. Phase 1 study of pomalidomide and dexamethasone for relapsed/refractory primary CNS or vitreoretinal lymphoma. *Blood*. 2018;132(21):2240-8.
153. Boehme V, Schmitz N, Zeynalova S, Loeffler M, Pfreundschuh M. CNS events in elderly patients with aggressive lymphoma treated with modern chemotherapy (CHOP-14) with or without rituximab: an analysis of patients treated in the RICOVER-60 trial of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Blood*. 2009;113(17):3896-902.
154. Hollender A, Kvaloy S, Lote K, Nome O, Holte H. Prognostic factors in 140 adult patients with non-Hodgkin's lymphoma with systemic central nervous system (CNS) involvement. A single centre analysis. *Eur J Cancer*. 2000;36(14):1762-8.
155. El-Galaly TC, Cheah CY, Bendtsen MD, Nowakowski GS, Kansara R, Savage KJ, et al. Treatment strategies, outcomes and prognostic factors in 291 patients with secondary CNS involvement by diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Cancer*. 2018;93:57-68.

156. Gleeson M, Counsell N, Cunningham D, Chadwick N, Lawrie A, Hawkes EA, et al. Central nervous system relapse of diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: results of the UK NCRI R-CHOP-14 versus 21 trial. *Ann Oncol*. 2017;28(10):2511-6.
157. Cheah CY, George A, Giné E, Chiappella A, Kluin-Nelemans HC, Jurczak W, et al. Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma: clinical features, prognostic factors and outcomes from the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Ann Oncol*. 2013;24(8):2119-23.
158. Simon L, Fitsiori A, Lemal R, Dupuis J, Carpentier B, Boudin L, et al. Bing-Neel syndrome, a rare complication of Waldenström macroglobulinemia: analysis of 44 cases and review of the literature. A study on behalf of the French Innovative Leukemia Organization (FILO). *Haematologica*. 2015;100(12):1587-94.
159. Klanova M, Sehn LH, Bence-Bruckler I, Cavallo F, Jin J, Martelli M, et al. Integration of cell of origin into the clinical CNS International Prognostic Index improves CNS relapse prediction in DLBCL. *Blood*. 2019;133(9):919-26.
160. Zucca E, Conconi A, Mughal TI, Sarris AH, Seymour JF, Vitolo U, et al. Patterns of outcome and prognostic factors in primary large-cell lymphoma of the testis in a survey by the International Extranodal Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*. 2003;21(1):20-7.
161. Kridel R, Telio D, Villa D, Sehn LH, Gerrie AS, Shenkier T, et al. Diffuse large B-cell lymphoma with testicular involvement: outcome and risk of CNS relapse in the rituximab era. *Br J Haematol*. 2017;176(2):210-21.
162. Vitolo U, Chiappella A, Ferreri AJ, Martelli M, Baldi I, Balzarotti M, et al. First-line treatment for primary testicular diffuse large B-cell lymphoma with rituximab-CHOP, CNS prophylaxis, and contralateral testis irradiation: final results of an international phase II trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(20):2766-72.
163. Yhim HY, Kim JS, Kang HJ, Kim SJ, Kim WS, Choi CW, et al. Matched-pair analysis comparing the outcomes of primary breast and nodal diffuse large B-cell lymphoma in patients treated with rituximab plus chemotherapy. *Int J Cancer*. 2012;131(1):235-43.
164. Hosein PJ, Maragulia JC, Salzberg MP, Press OW, Habermann TM, Vose JM, et al. A multicentre study of primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Br J Haematol*. 2014;165(3):358-63.
165. Tai WM, Chung J, Tang PL, Koo YX, Hou X, Tay KW, et al. Central nervous system (CNS) relapse in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL): pre- and post-rituximab. *Ann Hematol*. 2011;90(7):809-18.
166. Villa D, Connors JM, Sehn LH, Gascoyne RD, Savage KJ. Diffuse large B-cell lymphoma with involvement of the kidney: outcome and risk of central nervous system relapse. *Haematologica*. 2011;96(7):1002-7.
167. Lee KW, Yi J, Choi IS, Kim JH, Bang SM, Kim DW, et al. Risk factors for poor treatment outcome and central nervous system relapse in diffuse large B-cell lymphoma with bone marrow involvement. *Ann Hematol*. 2009;88(9):829-38.
168. Zhang J, Chen B, Xu X. Impact of rituximab on incidence of and risk factors for central nervous system relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(3):509-14.
169. El-Galaly TC, Cheah CY, Hutchings M, Mikhaeel NG, Savage KJ, Sehn LH, et al. Uterine, but not ovarian, female reproductive organ involvement at presentation by diffuse large B-cell lymphoma is associated with poor outcomes and a high frequency of secondary CNS involvement. *Br J Haematol*. 2016;175(5):876-83.
170. Yamaguchi M, Nakamura N, Suzuki R, Kagami Y, Okamoto M, Ichinohasama R, et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: results of a detailed clinicopathological review in 120 patients. *Haematologica*. 2008;93(8):1195-202.
171. Hu S, Song Y, Sun X, Su L, Zhang W, Jia J, et al. Primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: Therapeutic strategies and patterns of failure. *Cancer Sci*. 2018;109(12):3943-52.

172. Freilich RJ, Krol G, DeAngelis LM. Neuroimaging and cerebrospinal fluid cytology in the diagnosis of leptomeningeal metastasis. *Ann Neurol.* 1995;38(1):51-7.
173. Glantz MJ, Cole BF, Glantz LK, Cobb J, Mills P, Lekos A, et al. Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer: minimizing false-negative results. *Cancer.* 1998;82(4):733-9.
174. Glass JP, Melamed M, Chernik NL, Posner JB. Malignant cells in cerebrospinal fluid (CSF): the meaning of a positive CSF cytology. *Neurology.* 1979;29(10):1369-75.
175. Hegde U, Filie A, Little RF, Janik JE, Grant N, Steinberg SM, et al. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood.* 2005;105(2):496-502.
176. Peñalver FJ, Sancho JM, de la Fuente A, Olave MT, Martín A, Panizo C, et al. Guidelines for diagnosis, prevention and management of central nervous system involvement in diffuse large B-cell lymphoma patients by the Spanish Lymphoma Group (GELTAMO). *Haematologica.* 2017;102(2):235-45.
177. Schmitz N, Zeynalova S, Glass B, Kaiser U, Cavallin-Stahl E, Wolf M, et al. CNS disease in younger patients with aggressive B-cell lymphoma: an analysis of patients treated on the Mabthera International Trial and trials of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. *Ann Oncol.* 2012;23(5):1267-73.
178. Walburn T, Grover NS, Shen CJ, Ranganathan R, Dittus C, Beaven AW, et al. Consolidative or palliative whole brain radiation for secondary CNS diffuse large B-Cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2020:1-8.
179. Arellano-Rodrigo E, López-Guillermo A, Bessell EM, Nomdedeu B, Montserrat E, Graus F. Salvage treatment with etoposide (VP-16), ifosfamide and cytarabine (Ara-C) for patients with recurrent primary central nervous system lymphoma. *Eur J Haematol.* 2003;70(4):219-24.
180. Korfel A, Elter T, Thiel E, Hänel M, Möhle R, Schroers R, et al. Phase II study of central nervous system (CNS)-directed chemotherapy including high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation for CNS relapse of aggressive lymphomas. *Haematologica.* 2013;98(3):364-70.
181. Ferreri AJ, Donadoni G, Cabras MG, Patti C, Mian M, Zambello R, et al. High Doses of Antimetabolites Followed by High-Dose Sequential Chemoimmunotherapy and Autologous Stem-Cell Transplantation in Patients With Systemic B-Cell Lymphoma and Secondary CNS Involvement: Final Results of a Multicenter Phase II Trial. *J Clin Oncol.* 2015;33(33):3903-10.
182. Frigault MJ, Dietrich J, Martinez-Lage M, Leick M, Choi BD, DeFilipp Z, et al. Tisagenlecleucel CAR T-cell therapy in secondary CNS lymphoma. *Blood.* 2019;134(11):860-6.
183. Cortes J, O'Brien SM, Pierce S, Keating MJ, Freireich EJ, Kantarjian HM. The value of high-dose systemic chemotherapy and intrathecal therapy for central nervous system prophylaxis in different risk groups of adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1995;86(6):2091-7.
184. Villa D, Connors JM, Shenkier TN, Gascoyne RD, Sehn LH, Savage KJ. Incidence and risk factors for central nervous system relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma: the impact of the addition of rituximab to CHOP chemotherapy. *Ann Oncol.* 2010;21(5):1046-52.
185. Kumar A, Vanderplas A, LaCasce AS, Rodriguez MA, Crosby AL, Lepisto E, et al. Lack of benefit of central nervous system prophylaxis for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: findings from a large national database. *Cancer.* 2012;118(11):2944-51.
186. Tomita N, Takasaki H, Ishiyama Y, Kishimoto K, Ishibashi D, Koyama S, et al. Intrathecal methotrexate prophylaxis and central nervous system relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma following rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(3):725-9.
187. Eyre TA, Kirkwood AA, Wolf J, Hildyard C, Mercer C, Plaschkes H, et al. Stand-alone intrathecal central nervous system (CNS) prophylaxis provide unclear benefit in reducing CNS relapse risk in elderly DLBCL patients treated with R-CHOP and is associated increased infection-related toxicity. *Br J Haematol.* 2019.

188. Ferreri AJ, Bruno-Ventre M, Donadoni G, Ponzoni M, Citterio G, Foppoli M, et al. Risk-tailored CNS prophylaxis in a mono-institutional series of 200 patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Br J Haematol.* 2015;168(5):654-62.
189. Kansara R, Villa D, Gerrie AS, Klasa R, Shenkier T, Scott DW, et al. Site of central nervous system (CNS) relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by the CNS-IPI risk model. *Br J Haematol.* 2017;179(3):508-10.
190. Hill QA, Owen RG. CNS prophylaxis in lymphoma: who to target and what therapy to use. *Blood Rev.* 2006;20(6):319-32.
191. Glantz MJ, Cole BF, Recht L, Akerley W, Mills P, Saris S, et al. High-dose intravenous methotrexate for patients with nonleukemic leptomeningeal cancer: is intrathecal chemotherapy necessary? *J Clin Oncol.* 1998;16(4):1561-7.
192. Abramson JS, Hellmann M, Barnes JA, Hammerman P, Toomey C, Takvorian T, et al. Intravenous methotrexate as central nervous system (CNS) prophylaxis is associated with a low risk of CNS recurrence in high-risk patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer.* 2010;116(18):4283-90.
193. Cheah CY, Herbert KE, O'Rourke K, Kennedy GA, George A, Fedele PL, et al. A multicentre retrospective comparison of central nervous system prophylaxis strategies among patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Cancer.* 2014;111(6):1072-9.
194. Lee K, Yoon DH, Hong JY, Kim S, Kang EH, Huh J, et al. Systemic HD-MTX for CNS prophylaxis in high-risk DLBCL patients: a prospectively collected, single-center cohort analysis. *Int J Hematol.* 2019;110(1):86-94.
195. Goldschmidt N, Horowitz NA, Heffes V, Darawshy F, Mashiach T, Shaulov A, et al. Addition of high-dose methotrexate to standard treatment for patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma contributes to improved freedom from progression and survival but does not prevent central nervous system relapse. *Leuk Lymphoma.* 2019;60(8):1890-8.
196. Wilson MR, Eyre TA, Martinez-Calle N, Ahearne M, Parsons KE, Preston G, et al. Timing of high-dose methotrexate CNS prophylaxis in DLBCL: an analysis of toxicity and impact on R-CHOP delivery. *Blood Adv.* 2020;4(15):3586-93.
197. V.M O-N. CNS prophylaxis during front-line therapy in aggressive non-Hodgkin lymphomas: Real-world outcomes and practice patterns from 19 US academic institutions. *Blood2020.* p. 27-8.
198. R P. Lack of effectiveness of intravenous high-dose methotrexate for prevention of CNS relapse in patients with high-risk DLBCL: a retrospective analysis from Alberta, Canada. *Blood2020.* p. 26-7.
199. Grommes C, Rubenstein JL, DeAngelis LM, Ferreri AJM, Batchelor TT. Comprehensive Approach to Diagnosis and Treatment of Newly Diagnosed Primary CNS Lymphoma. *Neuro Oncol.* 2018.
200. Canovi S, Campioli D. Accuracy of flow cytometry and cytomorphology for the diagnosis of meningeal involvement in lymphoid neoplasms: A systematic review. *Diagn Cytopathol.* 2016;44(10):841-56.
201. Harrysson S, Eloranta S, Ekberg S, Enblad G, Jerkeman M, Wahlin BE, et al. Incidence of relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) including CNS relapse in a population-based cohort of 4243 patients in Sweden. *Blood Cancer J.* 2021;11(1):9.