

Universitat de Lleida
Departament de Medicina



Universitat de Lleida

**VALOR PRONÓSTICO EN LOS LINFOMAS NO
HODGKIN DE LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA
DE ADHESIÓN CD44 Y SU VARIANTE CD44V6, DE
LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA APOPTOSIS**

Tomás García Cerecedo

2007

Director de Tesis: Xavier Gómez i Arbonés



Xavier Gómez Arbonés, doctor en Medicina y Cirugía, y profesor de Medicina del
Departament de Medicina de la Universitat de Lleida

CERTIFICO: Que el licenciado Tomás García Cerecedo ha realizado bajo mi
dirección la tesis doctoral titulada “Valor pronóstico en los
linfomas no Hodgkin de la expresión de la molécula de adhesión
CD44 y su variante CD44v6, de la proliferación y la apoptosis”

Que el trabajo reúne la casuística, metodología, resultados
revisión bibliográfica y demás condiciones generales para
obtener conclusiones válidas para optar al título de doctor en
medicina.

Que la tesis está en condiciones de ser leída y defendida ante el
tribunal correspondiente.

Y para que así conste y tenga los efectos correspondientes, firmo el presente
certificado en Lleida a 17 de julio de 2006.



Dedicatoria

“La realidad es aquello que, cuando dejas de creer en ella, no desaparece.”

A Manuel Tomás García González, *mi padre*,
por su ejemplo y por enseñarme la verdadera realidad de las cosas.

Agradecimientos:

Al Dr. Josep Macià i Virgili por su constante estímulo y confianza en mí lo que ha supuesto un soporte fundamental para la realización de esta tesis doctoral.

Al Dr. Xavi Gómez i Arbonés director de la tesis y ayuda imprescindible para el diseño y elaboración de la tesis.

A la Universidad de Lleida que me ha facilitado la infraestructura y la ayuda necesaria para completar este proyecto de investigación.

Al Servicio de Hematología donde siempre encontré apoyo.

Al Servicio de Anatomía Patológica que me permitió el acceso a muestras y técnicas inmunohistoquímicas.

A Elisabet Talavera Ramos por su ayuda inestimable en las labores técnicas del trabajo de investigación.

A Rosina, que no sólo alimentó mi alma sino que también corrigió el trabajo final.

RESUMEN

Valor pronóstico en los linfomas no Hodgkin de la expresión de la molécula de adhesión CD44 y su variante CD44v6, de la proliferación celular y la apoptosis.

Introducción: En el estudio de los linfomas no Hodgkin, al igual que en otras enfermedades oncológicas, el conocimiento de parámetros clínico-biológicos y moleculares en el momento del diagnóstico que nos permitan predecir la evolución de la enfermedad, son de suma importancia para poder mejorar las estrategias terapéuticas establecidas. Por un lado, sabemos que una regulación defectuosa de la muerte celular programada desempeña un papel primordial en la etiología de los linfomas. De la misma forma, la proliferación celular se relaciona de forma directa con la capacidad de crecimiento de los mismos. Por otro lado, la expresión de ciertas moléculas, como la molécula de adhesión CD44 y su variante CD44v6, se ha asociado con el pronóstico en los linfomas no Hodgkin. Así, una mayor expresión de estas moléculas se podría relacionar con un peor pronóstico de la enfermedad.

Hipótesis: Valorar la correlación entre apoptosis celular con la presentación clínico-biológica de la enfermedad, así como con su evolución y el pronóstico de los pacientes con linfoma. Valorar la correlación entre ploidía y proliferación celular con la presentación clínico-biológica de la enfermedad, así como con su evolución y el pronóstico de los pacientes. Valorar la correlación entre la expresión de CD44 y CD44v6 con la presentación clínico-biológica de la enfermedad, así como con su evolución y el pronóstico de los pacientes.

Material y Métodos: Durante el periodo entre 1975 y 2000 se diagnosticaron 219 pacientes en nuestro Centro. De ellos se pudieron incluir 196 pacientes para realizar el estudio de ploidía, proliferación celular y apoptosis. Para el estudio de expresión de CD44 y CD44v6 se dispuso de 156 muestras de pacientes. El estudio de ploidía y proliferación celular se realizó por citometría de flujo. La apoptosis se analizó mediante la técnica de TUNEL. Para poner de manifiesto la expresión de la molécula de adhesión CD44 y su variante CD44v6, se realizó inmunohistoquímica utilizando anticuerpos dirigidos contra epítomos que reconocen la parte constante de CD44 y la variante CD44v6.

Resultados: En nuestro estudio pudimos observar que la apoptosis aumenta con el grado histológico ($p=0,004$) y es significativamente mayor en los linfomas extranodales ($p=0,003$). El estudio estadístico bivalente mostró una correlación entre un aumento de la apoptosis y la probabilidad de alcanzar una remisión completa tras el tratamiento ($p=0,048$). El análisis de la proliferación celular medida por la Fase S, también mostró un aumento en relación al aumento del grado histológico ($p<0,001$). El estudio estadístico bivalente mostró una correlación entre un aumento de la Fase S y la probabilidad de alcanzar una remisión completa tras el tratamiento ($p=0,001$). Este resultado se mantuvo al realizar el análisis estadístico multivariante ($p=0,004$). El análisis de la expresión de CD44 en nuestra serie de linfomas mostró que un porcentaje de positividad para este antígeno $<40\%$ sobre las células tumorales se correlacionó con una mayor probabilidad de alcanzar una remisión completa tras el tratamiento ($p=0,045$) y con una mayor supervivencia global ($p=0,041$). Estos resultados se mantuvieron al realizar el análisis estadístico multivariante ($p=0,007$ y $p=0,040$ respectivamente). También pudimos observar que ningún paciente con un estadio avanzado (III-IV) y un IPI alto o intermedio-alto (3-5) y con un porcentaje de positividad para CD44 $\geq 40\%$ sobre las células tumorales alcanzó una remisión completa con el tratamiento establecido. Ni el análisis de ploidía celular ni el análisis de la expresión de CD44v6 mostraron resultados pronósticos significativos.

Conclusión: En el estudio pronóstico de nuestra serie de pacientes con linfoma, el aumento de la apoptosis y de la Fase S se correlacionó con una mayor probabilidad de alcanzar una remisión completa de la enfermedad tras el tratamiento.

También pudimos observar que un porcentaje de positividad para CD44 $<40\%$ sobre las células tumorales se correlacionaba con una mayor probabilidad de alcanzar una remisión completa de la enfermedad y con una mayor supervivencia global.

RESUM

Valor pronòstic en els limfomes no Hodgkin de l'expressió de la molècula d'adhesió DC44 i la seva variant CD44v6, de la proliferació cel·lular i l'apoptosi

Introducció: En l'estudi dels limfomes no Hodgkin, així com a d'altres malalties oncològiques, el coneixement de paràmetres clínic-biològics i moleculars en el moment del diagnòstic que ens permetin predir l'evolució de la malaltia, són de total importància per poder millorar les estratègies terapèutiques establertes.

Per una banda, sabem que una regulació defectuosa de la mort cel·lular programada desenvolupa un paper essencial en l'etiologia dels limfomes. Així mateix, la proliferació cel·lular es relaciona de forma directa amb la capacitat de creixement dels mateixos.

Per una altra banda, l'expressió de determinades molècules, com són la molècula d'adhesió CD44 i la seva variant CD44v6, s'ha relacionat amb el pronòstic en els limfomes no Hodgkin. Així, una major expressió d'aquestes molècules s'associa amb un pronòstic pitjor de la malaltia.

Hipòtesi: Valorar la correlació entre apoptosi cel·lular amb la presentació clínic-biològica de la malaltia, així com la seva evolució i el pronòstic dels malalts amb limfoma. Valorar la correlació entre ploidia i proliferació cel·lular amb la presentació clínic-biològica de la malaltia així com amb la seva evolució i el pronòstic dels malalts. Valorar la correlació entre l'expressió de CD44 i CD44v6 amb la presentació clínic-biològica de la malaltia, així com la seva evolució i el pronòstic dels malalts.

Material i mètodes: Durant el període entre 1975 i 2000 es van diagnosticar 219 pacients al nostre Centre. De tots ells es van poder incloure 196 pacients per tal de realitzar l'estudi de la ploidia, la proliferació cel·lular i l'apoptosi. Per a l'estudi d'expressió de CD44 i CD44v6 es disposava de 156 mostres de pacients. L'estudi de ploidia i de proliferació cel·lular es va realitzar mitjançant citometria de flux. L'apoptosi es va analitzar mitjançant la tècnica de TUNEL. Per tal de posar de manifest l'expressió de la molècula d'adhesió CD44 i la seva variant CD44v6, es va realitzar immunohistoquímica utilitzant anticossos dirigits contra epítops que reconeixen la part constant de CD44 i la variant CD44v6.

Resultats: Al nostre estudi van poder observar que l'apoptosi augmenta amb el grau histològic ($p=0,004$) i és significativament major en els limfomes extranodals ($p=0,003$). L'estudi estadístic bivariant va mostrar una correlació entre l'augment de l'apoptosi i la probabilitat d'arribar a una remissió completa després del tractament ($p=0,048$). L'anàlisi de la proliferació cel·lular mesurada per la Fase S, també va mostrar un augment en la relació a l'augment del grau histològic ($p<0,001$). L'estudi estadístic va mostrar una correlació entre un augment de la Fase S i la probabilitat d'arribar a una remissió completa després del tractament ($p=0,001$). Aquest resultat es va mantenir quan es va realitzar l'anàlisi estadístic multivariant ($p=0,004$). L'anàlisi de l'expressió de CD44 a la nostra sèrie de limfomes va mostrar un percentatge de positivitat per aquest antigen $<40\%$ sobre les cèl·lules tumorals es va correlacionar amb una major probabilitat d'arribar a una remissió completa després del tractament ($p=0,045$) i amb una major supervivència global ($p=0,041$). Aquests resultats es van mantenir quan es va realitzar l'estudi estadístic multivariant ($p=0,007$ i $p=0,040$ respectivament). També van poder observar que cap pacient amb un estat avançat (III-IV) i un IPI alt o intermig-alt (3-5) i amb un percentatge de positivitat per a $CD44 \geq 40\%$ sobre les cèl·lules tumorals va arribar a una remissió completa amb el tractament establert. Ni l'anàlisi de ploidia cel·lular ni l'anàlisi de l'expressió de CD44v6 van mostrar resultats pronòstics significatius.

Conclusió: A l'estudi pronòstic de la nostra sèrie de pacients amb limfoma, l'augment de l'apoptosi i de la Fase S es va correlacionar amb una major probabilitat d'arribar a una remissió completa de la malaltia i amb una major supervivència global.

SUMMARY

Prognostic value CD44 and CD44v6 adhesion molecules expression, cellular proliferation and apoptosis in non-Hodgkin lymphomas

Introduction: In the study of non-Hodgkin lymphomas, like in other neoplastic diseases, the knowledge of clinical, biological and molecular parameters at diagnosis allows to predict the evolution of the disease. This is important to improve the standard therapies. It is known that a defective regulation of the programmed cellular death plays an important role in the etiology of non-Hodgkin lymphomas. It is also known that the cellular proliferation is related to the capacity of cellular growth. On the other hand, the expression of adhesion molecules, like CD44 and the variant CD44v6, has been involved in prognostic implications in non-Hodgkin lymphomas. Thus, a greater expression of these molecules is associated with a worse prognosis.

Hypothesis: To analyse the correlation between cellular apoptosis, ploidy and cellular proliferation with the clinical and biological presentation of the disease, and the patient's evolution and outcome in non-Hodgkin lymphomas. Analyse the correlation between expression of adhesion molecules CD44 and CD44v6 with the clinical and biological presentation of the disease, and the patient's evolution and outcome.

Material and Methods: Between 1975 and 2000, two hundred and nineteen patients were diagnosed of non-Hodgkin lymphomas in our Institution. 196 patients could be included in the study of ploidy, cellular proliferation and apoptosis. The study of expression of CD44 and CD44v6, included 156 samples of patients. The analysis of ploidy and cellular proliferation was made by flow cytometry. The apoptosis was analyzed by the TUNNEL technique. The expression of CD44 and CD44v6 adhesion molecules was made by immunohistochemistry, using antibodies against epitope that recognize the constant part of CD44 and the variant 6 of CD44.

Results: We could observe that apoptosis increases with the histologic degree ($p= 0.004$) and is significantly greater in extranodal lymphomas ($p= 0.003$). The statistical study showed a correlation between an increase of apoptosis and the probability to reach a complete remission after the treatment ($p= 0.048$). The analysis of the cellular proliferation measured by S Phase, also showed an elevation in relation to the increase of the histologic degree ($p= 0,004$)

We found in the analysis of the CD44 expression in our series, a greater complete remission after the treatment in patients with lymphoma which show CD44 expression $<40\%$ on the tumour cells ($p= 0.045$) and large overall survival ($p= 0.041$). These results also were found in multivariate statistical analysis ($p= 0.007$ and $p= 0.040$ respectively). Also we could observe that no patients with an advanced stage (III-IV) and a high or intermediate-high IPI (3-5) and a CD44 $\geq 40\%$ expression on the tumour cells reached a complete remission with the established treatment. Neither the ploidy nor CD44v6 expression showed any significant relation with prognoses.

Conclusion: In our series of patients with lymphoma, a increased apoptosis or S Phase was correlated with a greater probability of reaching a complete remission of the disease after the treatment. Also we could observe that a CD44 expression higher that 40% on the tumour cells was correlated with a greater probability of reaching a complete remission of the disease and with a greater overall survival.

**VALOR PRONÓSTICO EN LOS LINFOMAS NO
HODGKIN DE LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA
DE ADHESIÓN CD44 Y SU VARIANTE CD44V6, DE
LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA APOPTOSIS**

Tomás García Cerecedo

2007

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN	15
1.1.- BIOLOGÍA DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS	15
1.1.1.- Bases biológicas e inmunológicas en el desarrollo linfoide:	15
1.1.1.1.- Translocaciones y mutaciones que determinan la activación de un proto-oncogen. Inductores y supresores de apoptosis:	18
1.1.1.2.- Inhibidores de la apoptosis:.....	19
1.1.1.3.- Estimuladores de la apoptosis:.....	19
1.1.1.4.- Delecciones genómicas que determinan la inactivación de genes supresores:	20
1.1.1.5.- Infección tumoral por virus oncogénicos:	20
1.1.2.- Sistema de análisis masivos de información genética:	21
1.2.- EPIDEMIOLOGÍA DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS	24
1.3.- CLASIFICACIÓN DE LOS LNH HASTA LA ACTUALIDAD.	26
1.3.1.- Clasificación por estadios de los LNH:.....	31
1.4.- FACTORES PRONÓSTICOS EN LOS LNH.....	32
1.4.1.- Factores pronósticos directamente relacionados con el linfoma.....	33
1.4.2.- Factores relacionados con el paciente.....	38
1.4.3.- Factores relacionados con el tratamiento.	39
1.5.- ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y DEL CONTENIDO EN DNA CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO:	41
1.5.1.- Introducción a la citometría de flujo.....	41
1.5.2.- Estudio del contenido en DNA y fases del ciclo celular por citometría de flujo:	44
1.5.2.1.- Estudio de la aneuploidía y del ciclo celular:.....	44
1.6.- APOPTOSIS.....	46
1.6.1.- Cambios metabólicos durante la apoptosis.....	48
1.6.2.- Proliferación y apoptosis.	49
1.7.- MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA ADHESIÓN CELULAR Y HOMING.....	50
1.7.1.- Papel de las CAMs en la hematopoyesis normal.....	51
1.7.1.1.-- Cadherinas.....	51

1.7.1.2.- Superfamilia de las Inmunoglobulinas.....	51
1.7.1.3.- Integrinas.....	51
1.7.1.4.- Selectinas.....	51
1.7.1.5.- Proteoglicanos de la superficie celular.....	52
1.7.2.- Papel de las moléculas de adhesión celular (CAMs) en enfermedades malignas hematológicas.....	52
1.8.- MOLÉCULA DE HOMING CD44.....	52
1.8.1- Bases moleculares.....	52
1.8.2.- Fisiología del homing linfoide.....	54
1.8.2.1.- Tejido linfoide primario.....	55
1.8.2.2.- Tejido linfoide secundario.....	55
1.8.2.3.- Tejido linfoide terciario.....	57
1.8.3.- Expresión de CD44 en el ganglio linfático.....	57
1.8.4.- Expresión de CD44 y CD44v6 en LNH.....	58
2.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO:.....	59
3.- HIPÓTESIS.....	61
4.- OBJETIVOS.....	62
5.- MATERIAL Y METODOS.....	66
5.1.- PACIENTES Y ÁMBITO DE ESTUDIO.....	66
5.1.1.- Pacientes:.....	66
5.1.1.1.- Identificación y obtención de los datos de los pacientes:.....	66
5.1.1.2.- Criterios de inclusión:.....	66
5.1.1.3.- Serie de pacientes:.....	67
5.1.1.4.- Anonimización de la base de datos:.....	67
5.1.2.- Variables de estudio:.....	67
5.1.2.1.- Variables de identificación:.....	68
5.1.2.2.- Variables demográficas:.....	68
5.1.2.3.- Variables clínicas:.....	68
5.1.2.4.- Variables biológicas:.....	70
5.1.2.5.- Variables histológicas:.....	70
5.1.2.6.- Variables inmunohistoquímicas:.....	71
5.1.2.7.- Variables citométricas:.....	72
5.1.2.8.- Variable sobre la estrategia terapéutica y tolerancia al tratamiento:.....	73
5.1.2.9.- Variables de respuesta al tratamiento:.....	73
5.1.2.10.- Variables sobre evolución del paciente:.....	74

5.2.- Métodos y técnicas.....	75
5.2.1.- Citometría de Flujo:	75
5.2.1.1.- Obtención y tinción de la suspensión nuclear a partir de muestra parafinada:.....	75
5.2.1.2.- Controles:	76
5.2.1.3.- Lectura de las muestras:	76
5.2.1.4.- Citómetro de flujo:	77
5.2.1.5.- Alineamiento del citómetro:	78
5.2.1.6.- Lectura por el citómetro de flujo:	78
5.2.1.7.- Interpretación de los resultados de la lectura por citometría de flujo:	78
5.2.1.8.- Análisis de los histogramas del contenido en DNA mediante el programa informático:	79
5.2.1.9.- Variables del estudio por citometría de flujo:.....	79
5.2.2.- Inmunohistoquímica:	80
5.2.2.1- Apoptosis:.....	80
5.2.2.2.- Homing (CD44 y CD44v6):.....	83
5.2.3.- Base de datos y tratamiento estadístico:	89
6.- RESULTADOS	91
6.1.- Análisis Estadístico:	91
6.2.- Estudio estadístico descriptivo:	91
6.2.1.- Variables demográficas:.....	91
6.2.2.- Datos clínico biológicos al diagnóstico:.....	91
6.2.3.- Tratamiento y evolución:	92
6.3.- Estudio estadístico analítico bivalente sobre la serie de pacientes en que se ha estudiado la apoptosis y el contenido en DNA:	94
6.3.1.- Relación entre las variables demográficas y de presentación clínica del linfoma:	94
6.3.2.- Relación entre las variables demográficas y los resultados de apoptosis, fase S y aneuploidía:.....	95
6.3.3.- Relación entre las variables demográficas y la respuesta al tratamiento y evolución:.....	95
6.3.4.- Relación entre las variables de presentación clínico-biológica del linfoma entre sí:	96
6.3.5.- Relación entre las variables de presentación clínica del linfoma y los resultados de apoptosis, fase S y aneuploidía:.....	97

6.3.6.- Relación entre las variables de presentación clínico-biológica y tratamiento del linfoma:	98
6.3.7.- Relación entre las variables de presentación clínico-biológica y evolución del linfoma:	99
6.3.8.- Relación entre las variables de presentación clínico-biológica y la supervivencia:.....	100
6.3.8.- Relación entre los resultados de apoptosis, fase S y aneuploidía entre sí:	102
6.3.9.- Relación entre los resultados de apoptosis, fase S y aneuploidía y la respuesta al tratamiento y supervivencia:	102
6.4.- Estudio estadístico analítico multivariante sobre la serie de pacientes en que se ha estudiado la apoptosis y el contenido en DNA:.....	104
6.4.1.- Análisis por subgrupos y expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía:	106
6.4.1.1.- Análisis por subgrupos de IPI.....	106
6.4.1.2.- Análisis por subgrupos de estadio de presentación:	109
6.4.1.3.- Análisis por subgrupo de presentación nodal o extranodal del linfoma:	112
6.4.1.4.- Análisis por subgrupo de presentación según el grado histológico:.....	114
6.4.1.5.- Análisis por subgrupos clínicos de interés:	118
6.5.- Análisis de expresión de CD44 y CD44v6:	118
6.5.1.- Introducción:.....	118
6.5.2.- Relación entre la expresión de CD44 y CD44v6 y las variables demográficas:	120
6.5.3.- Relación entre la expresión de CD44 y CD44v6 y presentación clínico-biológica del linfoma:.....	121
6.5.4.- Relación entre la expresión de CD44 y CD44v6 y la respuesta al tratamiento:.....	123
6.5.5.- Relación entre la expresión de CD44 y CD44v6 y la supervivencia en los pacientes con linfoma:	124
6.6.- Análisis estadístico mutivariante de la expresión de CD44 y CD44v6:.....	126
6.6.1.- Análisis por subgrupos y expresión de CD44 y CD44v6:.....	128
6.6.1.1.- Análisis por subgrupos de IPI.....	128
6.6.1.2.- Análisis por subgrupos de estadio de presentación:	131

6.6.1.3.- Análisis por subgrupos de presentación Extranodal o Nodal del linfoma:	134
6.6.1.4.- Análisis por subgrupos de presentación como LDCGB	136
6.6.1.5.- Análisis por subgrupos de grado histológico:	139
6.6.1.6.- Análisis de subgrupos de interés:.....	143
6.7.- Análisis conjunto de la apoptosis, fase S, aneuploidía y expresión de CD44 y CD44v6.....	144
7.- DISCUSIÓN	145
7.1.- Introducción.....	145
7.2.- Consideraciones sobre la serie de linfomas.....	148
7.3.- Consideraciones sobre el tipo de clasificación de linfomas utilizada.	149
7.4.- Análisis estadístico descriptivo sobre la serie de linfomas.....	150
7.5.- Análisis descriptivo de la expresión de apoptosis, proliferación celular y aneuploidía en nuestra serie de linfomas.	152
7.6.- Análisis del estudio de expresión de apoptosis, proliferación celular y aneuploidía.	152
7.7.- Análisis del estudio multivariante en nuestra serie de linfomas y la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía.....	153
7.8.- Análisis de la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía estratificado en subgrupos clínicos	155
7.9.- Consideraciones previas sobre el estudio de CD44 y CD44v6.....	156
7.10.- Identificación de los linfomas difusos de célula grande B (LDCGB), subtipo histológico con especial interés clínico	158
7.11.- Análisis descriptivo de la expresión de CD44 en nuestra serie de linfomas	160
7.12.- Análisis del estudio de expresión de CD44.....	163
7.13.- Análisis del estudio de expresión de CD44v6.	166
7.14.- Análisis del estudio multivariante en nuestra serie de linfomas y la expresión de CD44.....	166
7.15.- Análisis de la expresión de CD44 estratificado en subgrupos clínicos.....	170
7.16.- Estudio de correlación entre la expresión de la apoptosis, fase S y aneuploidía y la expresión de CD44 y CD44v6.....	173
7.17.- Subgrupos clínicos de interés en el estudio de la expresión de CD44.	173
8.- RESUMEN	176

9.- CONCLUSIONES	184
10.- BIBLIOGRAFÍA	187

1.- INTRODUCCIÓN

El término de “linfoma maligno” fue originalmente introducido por Billroth en 1871 para describir neoplasias del tejido linfoide. Inicialmente los linfomas se dividieron en dos grandes grupos, la Enfermedad de Hodgkin y los linfomas no Hodgkinianos (LNH), los cuales presentaban diferencias tanto en el patrón histológico como en su comportamiento clínico.

Los LNH constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias malignas con diversidad en su origen celular linfoide, en su morfología, sus características inmunológicas, anomalías genéticas, respuesta al tratamiento y pronóstico. Su comportamiento clínico-biológico es mucho menos predecible que la Enfermedad de Hodgkin. Además, otra característica que los diferencia es su gran predilección por diseminarse a tejidos extraganglionares.¹ Sin embargo, en la última década se ha podido constatar el origen linfoide de ambas entidades.²

En los últimos 25 años se ha profundizado en el conocimiento de estas entidades debido al desarrollo en los estudios inmunológicos, citogenéticos y moleculares, que ha permitido un mejor entendimiento tanto de la historia natural y la biología de los linfomas, como el poder identificar nuevos factores pronósticos que permiten mejorar el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Todo ello ha originado que, durante este periodo, se hayan desarrollado sistemas para definir y clasificar los LNH, que en la mayoría de los casos resultaban de poca utilidad clínica y utilizaban terminología confusa.³

Para poder entender la evolución en el conocimiento de los linfomas es imprescindible estudiar sus bases biológicas y los diferentes comportamientos clínicos de sus entidades.

1.1.- BIOLOGÍA DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS

1.1.1.- Bases biológicas e inmunológicas en el desarrollo linfoide:

El conocimiento en los LNH ha evolucionado en función del avance en el entendimiento del sistema inmunológico y la biología molecular.

Los avances inmunológicos han permitido definir el desarrollo del sistema linfoide. Los anticuerpos monoclonales contra antígenos celulares permitieron identificar los diferentes estadios de diferenciación desde los progenitores hematopoyéticos. Las células B comprometidas se reconocen por la expresión del antígeno leucocitario común (CD45) y el CD19. El CD19 se expresa en todos los estadios de maduración de las células B, siendo el primer antígeno B detectable y que se pierde en el estadio de célula plasmática.⁴ Las moléculas de inmunoglobulinas son propias de las células B, y su expresión y localización es útil para definir su estadio de maduración.⁵

El progenitor linfoide pluripotencial mantiene el gen de las inmunoglobulinas en configuración germinal. Cuando el progenitor linfoide se compromete en diferenciación linfoide B, el gen de las inmunoglobulinas entra en estado de reordenamiento. Las células B inmaduras (pre-pre-B y pre-B), que están en proceso de reordenamiento del gen de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, no expresan todavía la proteína de inmunoglobulina, pero si expresan la deoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt).⁶ La expresión de Tdt define el estadio inmaduro del desarrollo linfoide de las células T y B. Durante este estadio de maduración, el antígeno común de la leucemia linfoblástica (CALLA/CD10) está presente en la superficie celular. El CD10 se expresa en la mayoría de las células B inmaduras así como en una subpoblación de células del centro folicular y células malignas derivadas del centro folicular. Una pequeña subpoblación de células pre-B, inmediatamente antes de evolucionar hacia un estadio maduro de linfocito B, coexpresan Tdt e inmunoglobulina citoplasmática. Esto no sólo define una maduración normal de la línea linfoide B, sino que también identifica un subtipo de leucemia linfoblástica aguda.⁷ Una célula B madura se define como aquella que expresa inmunoglobulina de superficie y CD20. La IgM es la primera identificada en la célula B madura. Posteriormente lo hacen la IgM y la IgD. Después de la transformación genómica, se expresa sólo una inmunoglobulina madura (IgM, IgD, IgA o IgG). Algunas células progresan y llegan a ser células productoras de inmunoglobulinas, otras acaban siendo linfocitos B memoria.⁸

La maduración de las células T transcurre de una manera similar al de las células B, expresando antígenos que definen diferentes estadios de maduración. El antígeno de célula T más precozmente reconocible es el CD7. El linfocito T, al madurar, expresa progresivamente CD2, el complejo CD3-TCR y posteriormente

CD4 y/o CD8. La célula T madura presenta todos estos antígenos, pero la expresión de CD4 y CD8 está restringida a uno de los dos tipos.

El reordenamiento del gen de las inmunoglobulinas revela clonalidad de línea B. Este reordenamiento sirve como marcador tumoral útil para determinar el compromiso de línea celular B.

El gen del "Receptor de Células T" (TCR) mostró ser el primer marcador de clonalidad aplicable a la línea T y permitió demostrar el origen T de muchas neoplasias linfoides. El TCR posibilita, además de demostrar clonalidad y compromiso con la línea T, diferenciar estadios de maduración de las células T de forma paralela como lo hace la expresión de inmunoglobulinas en las células B.^{9,10}

Sin embargo, es importante resaltar que clonalidad no tiene que ser necesariamente sinónimo de malignidad, como se puede demostrar en algunas situaciones de inmunodeficiencia o de autoinmunidad.

Tanto los linfocitos B como T expresan un amplio número de antígenos celulares que traducen diferentes funciones celulares. Con intención de organizar el creciente repertorio de antígenos, se organizó el "International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens". A través de estos "workshop", los antígenos se agrupan en clústeres de diferenciación (CD) basándose en datos bioquímicos, de inmunoprecipitación, análisis funcionales, estudios citométricos e inmunohistoquímicos. El último International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA8^o) se ha llevado a cabo recientemente en Adelaida (Australia).¹¹

De especial interés en nuestro estudio es el análisis de la expresión de un receptor de "Homing", CD44 (y una de sus variantes: CD44v6), dentro de los diferentes linfomas estudiados y que más adelante se detallará. Este receptor, el CD44, en condiciones normales es el que regula la recirculación de linfocitos desde la sangre periférica hacia los tejidos, especialmente los ganglios linfáticos, en lo que se denomina el "homing".¹²

Como ocurre en otras neoplasias, la patogénesis molecular de los linfomas incluye múltiples fases de un proceso que de forma progresiva produce una lesión genética que afecta a proto-oncogenes y a genes supresores tumorales. Al contrario que en otros cánceres, como los epiteliales, en los linfomas el

genoma de las células es relativamente estable durante la mayoría de los estadios de la enfermedad.¹³ El genoma de las células linfomatosas se suele caracterizar por unas pocas, y a veces una única, alteración cromosómica.

Los mecanismos básicos de las alteraciones moleculares en los LNH se describen a continuación.

1.1.1.1.- Translocaciones y mutaciones que determinan la activación de un proto-oncogen. Inductores y supresores de apoptosis:

Uno de los mecanismos más frecuentes de activación de un proto-oncogen es la translocación. A igual que otros tipos de neoplasias hematológicas, las translocaciones cromosómicas en los LNH son un evento recíproco y balanceado entre dos puntos cromosómicos específicos. Estas translocaciones se asocian recurrentemente y selectivamente con diferentes categorías clinicopatológicas de LNH y son representadas de forma clonal en cada caso tumoral. Estas dos características de recurrencia y selectividad de distribución, permiten un uso clínico de estas translocaciones cromosómicas como marcadores diagnósticos y de seguimiento.

La clonación molecular de los loci genéticos involucrados en las translocaciones de los LNH ha dado lugar a la identificación de un número de proto-oncogenes involucrados en la linfomagénesis. La mayoría de estos proto-oncogenes codifican proteínas nucleares pertenecientes a familias importantes de factores de transcripción. Una excepción estaría representada por el Bcl-2, un regulador de la apoptosis.

El mecanismo por el cual ocurren estas translocaciones todavía no está claro. La consecuencia común de la translocación es la desregulación en la expresión de un proto-oncogén por dos mecanismos. El primero es una desregulación homotópica, que ocurre cuando el proto-oncogén se expresa en las células normales del mismo tejido, pero su regulación cambia en el tumor. El segundo mecanismo es una desregulación heterotópica que ocurre cuando el proto-oncogen no se expresa de forma fisiológica en las células normales y la expresión se desarrolla ectópicamente debido a la translocación.¹⁴

Un ejemplo de este grupo sería:

- ras: Familia de genes que codifican la producción de oncoproteínas que intervienen en la transmisión de señales desde la membrana del núcleo. El

mecanismo típico por el que estos proto-oncogenes se transforman en oncogenes es la mutación puntual de una zona crítica, lo que determina una desregulación de su función.

- myc: Localizado en el cromosoma 8, el proto-oncogén myc codifica un factor nuclear de transcripción que interviene en la división celular. La translocación recíproca con un fragmento del cromosoma 14, en un punto cercano al promotor de una de las cadenas de inmunoglobulina, se encuentra en la práctica totalidad de los linfomas de Burkitt, de estirpe B. Otras neoplasias donde myc puede estar amplificado incluye a los carcinomas gástricos, de mama, de vejiga, de cuello uterino o de pulmón de células pequeñas, en los que dicha amplificación suele asociarse a mal pronóstico.

- abl: Este gen se encuentra en una zona frágil del cromosoma 9. Dicha zona, se puede romper, traslocándose el fragmento distal a un punto del cromosoma 22 que contiene el gen bcr (breakpoint cluster region). Esta translocación da lugar al cromosoma conocido como cromosoma Philadelphia (Phi). El híbrido abl-bcr codifica una proteína que tiene actividad tirosina kinasa y es capaz de transformar células hematopoyéticas.

1.1.1.2.- Inhibidores de la apoptosis:

- bcl-2: Cuando este gen, que normalmente se sitúa en el cromosoma 18, se transloca al cromosoma 14 en algún precursor linfoide, se sitúa cerca de un promotor de los genes de las inmunoglobulinas, lo que resulta en un aumento de su expresión en las células B. Esta alteración está presente en el 85% de los linfomas foliculares. A diferencia de todos los oncogenes previamente conocidos, el bcl-2 no induce la proliferación celular, sino que previene de la muerte celular programada o apoptosis. El gen bax, codifica una proteína (Bax) que contrarresta la acción del bcl-2. Además pueden formar homodímeros y heterodímeros, y es el balance entre estas (Bcl-2/Bcl-2, Bcl-2/Bax, Bax/Bax) el que determinaría el grado de susceptibilidad de la célula a la apoptosis.¹⁵

1.1.1.3.- Estimuladores de la apoptosis:

- p53: El producto del gen p53 se puede comportar, en determinadas circunstancias, como un inductor de la muerte celular programada. De hecho, una pérdida de la función del p53 puede inhibir la apoptosis y promover el desarrollo de tumores.

- Fas: La unión del receptor Fas a su ligando (FasL) es otra señal inductora de la apoptosis. Este receptor, una molécula de superficie relacionada con el TNF está presente en diversos tipos celulares, mientras que el FasL se expresa principalmente en las células T activadas. El mal funcionamiento de este sistema es causa de síndromes linfoproliferativos y trastornos autoinmunes.

1.1.1.4.- Delecciones genómicas que determinan la inactivación de genes

supresores: El supresor alterado más importante en el estudio de los LNH es el p53. El gen supresor tumoral p53 juega un importante papel también en la apoptosis. Su función es controlar la respuesta celular al daño en el DNA deteniendo las células en la fase G1 del ciclo celular y reparar el daño en el DNA antes de que la célula entre en la fase de síntesis y mitosis. Si el DNA dañado no puede repararse, p53 puede activar la apoptosis. La mutación se asocia con unos niveles elevados de proteína p53 mutada que inactiva estas funciones determinando una inactividad genómica y un estado hipermutable. Esto se refleja "in vitro" en la aparición de resistencias a la quimio y radioterapia y a la rápida aparición de clones resistentes. Se ha descrito la mutación del p53 involucrada en la transformación de linfomas foliculares en linfomas agresivos y en el linfoma de Burkitt.^{16,17}

Algunas delecciones específicas recurrentes se han asociado a diferentes categorías de linfomas. La más frecuente de estas delecciones afecta al brazo largo del cromosoma 13, (13q) y brazo largo del cromosoma 6, (6q). La delección del cromosoma 13(q14) representa la lesión más frecuente en la leucemia linfocítica crónica, que se observa en una considerable proporción de los casos.¹⁸

La observación que las delecciones en 6q pueden ocurrir como una única anomalía citogenética en algunos casos de LNH, y que estas delecciones se asocian a un pronóstico adverso, apoyan fuertemente la idea de que estas alteraciones tienen un papel patogénico.¹⁹

1.1.1.5.- Infección tumoral por virus oncogénicos: Se consideran un mecanismo de lesión genética ya que introducen genes virales en las células diana. Dos herpesvirus se consideran patogénicamente relevantes en relación con LNH de células B en todo el mundo: el virus de Epstein-Barr (VEB) y el herpesvirus-8 humano (HHV-8).

Además, el HTLV-1 está implicado en una categoría específica de LNH de células T que está restringido primordialmente al área del Caribe y lejano Oriente.

El VEB se identificó inicialmente en casos africanos de linfoma de Burkitt endémico. Posteriormente también se asoció a casos esporádicos de linfoma de Burkitt y linfomas asociados a SIDA. El genoma del VEB contiene genes que son transformantes para los linfocitos B (EBNA-2 y LMP-1). Se ha demostrado que el VEB es capaz de alterar significativamente el crecimiento de células B. Los linfomas infectados por VEB, por lo general muestran una única forma de VEB fusionados, lo que sugiere que las células linfomatosas representan la progenie de expansión clonal de una única célula infectada.²⁰

El HHV-8 es un herpes virus γ identificado inicialmente en tejidos de sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA y del que posteriormente se ha encontrado que infecta virtualmente al 100% de los casos de sarcoma de Kaposi, a una fracción considerable de los casos de enfermedad de Castleman multicéntricos y a todos los casos de un tipo peculiar de linfoma denominado linfoma primario de cavidades (WHO: primary effusion lymphoma).²¹

El HTLV-1 es un retrovirus humano que está reconocido como el agente etiológico de la leucemia/linfoma T del adulto (ATLL), endémica en el área del Caribe y en partes del Japón y Asia. Los estudios moleculares han puesto de manifiesto que la infección por HTLV-1 precede a la expansión clonal, corroborando así la relación causal entre el retrovirus y la ATLL.²²

1.1.2.- Sistema de análisis masivos de información genética:

Muchos LNH tienen anomalías cromosómicas. El descubrimiento de translocaciones específicas ha servido para definir ciertas entidades como el linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma del manto y linfoma anaplásico. Estas anomalías no son enteramente específicas de estas entidades, ya que aunque en menor porcentaje, pueden estar presentes en otros subtipos de LNH. Las alteraciones citogenéticas pueden ser útiles para entender la patogenia de la enfermedad, definirla (clasificación), diagnosticarla y para diseñar estrategias terapéuticas. También se utilizan para el estudio de la enfermedad mínima residual (por ejemplo, PCR para detección de t(14:18)/Bcl-2 en el seguimiento de un linfoma folicular transplantado o ciclina D₁/Bcl-1 en el linfoma del manto).

Los recientes avances en el estudio genético han llevado a desarrollar sistemas de análisis de información genética (DNA Microarray Analysis), que están abriendo un nuevo campo en el conocimiento de la biología tumoral, estableciendo nuevos marcadores moleculares que permiten identificar diferentes neoplasias y marcadores pronósticos con utilidad clínica.

Las características y el comportamiento clínico tumoral están determinados por un grupo de lesiones genéticas contenidas en las células neoplásicas. Estas lesiones genéticas alteran el patrón de expresión del RNAm en las células, y este patrón alterado sirve de “firma molecular” o “huella dactilar” del tumor. Tumores con lesiones genéticas cercanas tendrían “firmas moleculares” similares, y se podría esperar un comportamiento clínico parecido. Por todo ello, el conocimiento del perfil genético sería de utilidad para establecer relevancias clínicas y biológicas para el diseño de las clasificaciones de las neoplasias, nuevos marcadores pronósticos que permitan decisiones terapéuticas individuales en cada caso e identificar genes que son determinantes importantes en el comportamiento de los LNH.²³

Para obtener un perfil de expresión genética del tumor hay que preparar una librería de cDNA procedente del RNAm y realizar una secuenciación de clones. Esto es útil para descubrir genes pero no es práctico para determinar el perfil de una larga serie de tumores. Por ello se han desarrollado nuevos sistemas de análisis como el “Serial Analysis of Gen Expression” (SAGE), el cual incluye una complicada serie de manipulación experimental y una sustancial cantidad de DNA secuenciado para cada muestra. Son utilizadas comúnmente dos plataformas de DNA microarrays. Una consiste en una reacción en cadena de polimerasa (PCR) que amplifica productos de cDNA insertos en plásmidos. La otra plataforma de microarray contiene sondas de oligonucleótidos sintetizados “in situ” mediante un proceso llamado “photolithography”, aunque existen otros métodos de síntesis de estos oligonucleótidos.

Para cada experimento con microarray surgen miles de mediciones experimentales que hay que procesar (que incluyen mediciones de señales de fluorescencia, sustracción del “background” y normalización de datos). Una vez procesada la imagen, se debe analizar una cantidad masiva de información. Existen diferentes herramientas disponibles para detectar estructuras en el grupo de datos. La forma más común de presentación de análisis de expresión

genética es por medio de una matriz, con una lista de genes en el microarray (eje Y), enfrentado contra las muestras tumorales (eje X). Las muestras pueden ser agrupadas de acuerdo con su similitud global en el perfil de expresión genética.

Se están llevando a cabo numerosos estudios de perfiles de expresión genética en neoplasias hematológicas, como el linfoma difuso de célula grande B (LDCGB), el linfoma folicular y la leucemia linfocítica crónica B.²⁴ Utilizando una agrupación jerárquica, estas tres categorías fueron ampliamente separadas en los tres correspondientes “clusters” de acuerdo con su perfil de expresión genética global.

Los investigadores describieron que existía un grupo de genes preferentemente expresado por las células B normales del centro germinal y no presentes en los linfocitos B periféricos activados por diferentes estímulos. Cuando este grupo de genes se utilizó para diferenciar casos de LDCGB, se pudieron identificar dos grandes grupos según su perfil de expresión genética correspondiente al centro germinal o la expresión correspondiente a las células B periféricas estimuladas. Cuando Alizadeh y su grupo estudiaron la supervivencia global en las dos nuevas clases de LDCGB, encontraron que el grupo que expresaba el perfil genético del centro germinal tenía una supervivencia global significativamente mayor, y esta asociación persistía incluso en los casos con un índice pronóstico bajo (IPI < 3).

Un estudio reciente examinó la utilidad de la expresión del perfil genético en pacientes con LDCGB que recibieron quimioterapia basada en CHOP. Se identificaron dos grupos con diferencias significativas en la supervivencia y en pacientes con IPI intermedio.²⁵ La validación de estas clases descritas puede también ser correlacionada con otros parámetros biológicos independientes, así los LDCGB con perfil de expresión genética del centro germinal muestran hipermutación genética del gen de las Inmunoglobulinas pesadas. También se ha descrito que estos LDCGB con perfil de expresión genética del centro germinal muestran la translocación t(14:18).²⁶

Las perspectivas del análisis del perfil genético en neoplasias son tremendamente prometedoras para delinear los mecanismos moleculares y las “llaves” genéticas que permitan describir las diferentes propiedades biológicas fundamentales y los comportamientos clínicos entre las diferentes neoplasias.

Algunos de estos genes y sus productos, podrían ser susceptibles de intervenciones terapéuticas. Los diagnósticos moleculares comprensivos de los tumores y los tratamientos individualizados podrían ser una realidad en un futuro no tan distante.

1.2.- EPIDEMIOLOGÍA DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS

En general, la incidencia de LNH es mayor en los países desarrollados. Datos publicados en USA describen una incidencia ajustada por edad de 15,1 por 100.000 personas/año, siendo el incremento en la incidencia de los LNH en los últimos años superior al de otras neoplasias.²⁷ El porcentaje de incremento en la incidencia desde los años 70 es del 3% por año entre las mujeres y del 4% por año entre los hombres.

Las neoplasias de células B maduras suponen el 90% de las neoplasias linfoides y suponen un 4% de todos los diagnósticos de cáncer cada año en todo el mundo.²⁸

Los LNH más comunes son el LDCGB y el folicular, juntos representan más del 50% de todos los linfomas. Existe una diversa incidencia en diferentes zonas geográficas, así el linfoma folicular es más común en países desarrollados, sobre todo Norteamérica y el oeste de Europa y son infrecuentes en Sudamérica, Europa del este, África y Asia. El linfoma de Burkitt es endémico en África ecuatorial, donde es la neoplasia maligna más frecuente en la infancia, mientras que sólo supone el 1-2% en Norteamérica y el oeste de Europa.

La edad de presentación más frecuente para todos los tipos de neoplasias de células B maduras son la 6ª y 7ª década de la vida. Una excepción son el linfoma de célula grande mediastínico (con una media de edad de 37 años) y el linfoma de Burkitt (con una media de edad en adultos de 30 años). De todas las neoplasias maduras de células B, sólo el LDCGB y el linfoma de Burkitt tienen una incidencia significativa en niños.

La mayoría de este tipo de neoplasias tiene una ligera tendencia a predominar en varones (52-55%), aunque el linfoma de células del manto tiene un claro predominio en el sexo masculino (74%). En el sexo femenino, los LNH con más predominio son el folicular (58%), y sobretodo el linfoma de célula grande mediastínico (66%).

El mayor riesgo conocido de aparición de neoplasias de células B maduras son las alteraciones en el sistema inmunológico, tanto la inmunodeficiencia como las enfermedades autoinmunes. Aunque estas alteraciones del sistema inmunológico no se hayan detectado en la mayoría de los paciente con estas neoplasias, sí que se ha demostrado un aumento significativo en la incidencia de estos LNH en pacientes con inmunodeficiencias, sobre todo linfomas de célula grande B y linfomas de Burkitt.²⁹⁻³¹

Las neoplasias de células T/NK maduras son relativamente poco comunes. En un amplio estudio internacional, estas neoplasias sólo representaban el 12% de todos los LNH.³² El subtipo más común es el linfoma T periférico (3,7%) y el anaplásico (2,4%). Existe una amplia variabilidad en su distribución geográfica y racial. En general los linfomas T son más frecuentes en Asia. Uno de los principales factores de riesgo de linfomas T en Japón es el virus HTLV-1. En las regiones endémicas del suroeste de Japón la prevalencia serológica del HTLV-1 es del 8-10%. El riesgo acumulado de desarrollar durante la vida un linfoma/leucemia de células T del adulto entre los varones seropositivos es del 6,9% y entre las mujeres seropositivas del 2,9%³³ Otro factor importante en la incidencia de estas neoplasias T y NK es la predisposición racial. Los linfomas nasales y nasales tipo NK/T al igual que las leucemias agresivas T/NK son mucho más comunes en asiáticos. En Hong Kong, el linfoma nasal tipo NK/T es uno de los subtipos de LNH más común (8% de los casos), al contrario que en Europa y Norteamérica que supone menos del 1% de los linfomas. Parece que la incidencia global de estas neoplasias T/NK no ha variado en las últimas décadas, aunque no existen estudios epidemiológicos disponibles.

En cuanto a las leucemias/linfomas de células precursoras B y T, la leucemia linfoblástica ocurre preferentemente en niños menores de 6 años (75% de los casos), y el 80-85% corresponden a precursores de fenotipo B.³⁴⁻³⁶

El linfoma linfoblástico B es un tipo de linfoma poco común representando aproximadamente el 10% de todos los casos de linfomas linfoblásticos.

La afectación extranodal ha sufrido, en las últimas dos décadas, un incremento en su incidencia mucho más rápido que la enfermedad nodal. En muchos casos este incremento ha sido debido a la creciente incidencia del SIDA y su asociación con LNH; con una predilección por la afectación extranodal como el

linfoma primario de SNC, el linfoma primario de cavidades o como el linfoma plasmoblástico de cavidad oral.^{30,37,38}

La incidencia de los LNH extranodales está entre un 10-50% según las series y pueden afectar a cualquier órgano o tejido del organismo, siendo los más frecuentemente afectados el tracto gastrointestinal y la amígdala.³⁹⁻⁴⁴

1.3.- CLASIFICACIÓN DE LOS LNH HASTA LA ACTUALIDAD.

Como se dice en la editorial publicada en septiembre 1994, en la presentación de la propuesta del grupo de estudio internacional de LNH (ILSG) sobre la nueva clasificación revisada de los LNH (REAL), “nunca en patología ha existido un caos de nombres que haya confundido conceptos claros como los que se han descrito en los tumores linfoides”.⁴⁴

Esta situación todavía no ha cambiado del todo hoy en día. Esto es debido, en parte, a la expansión significativa en nuestro conocimiento y mejor entendimiento del sistema inmunológico.

El primer sistema de clasificación de los LNH fue propuesto por Gall y Mallory en 1942 que usaban términos como linfoma folicular gigante, linfosarcoma o como sarcoma de células reticulares, términos descriptivos muy imprecisos como para tener aplicación clínica.

En los años 50, Rappaport reconoce la importancia del patrón de crecimiento en algunos tipos de linfomas, introduciendo así una nueva clasificación con relevancia clínica, en la que se añade el patrón de crecimiento al tamaño celular y morfología.

En los años 70, el reconocimiento que los LNH eran tumores del sistema inmune y que derivaban de los linfocitos B y T, llevó a Lukes y Collins a desarrollar una clasificación inmunológica de los LNH, posteriormente modificada por Lennert, que, basándose en características funcionales de las líneas celulares de las que emergen las células tumorales, usó una terminología algo diferente para describirlas, lo que constituyó la clasificación de Kiel.^{190,191}

Debido a esta rápida proliferación de clasificaciones y terminologías, el National Cancer Institute (NCI) promovió en los años 80 la creación de una nueva clasificación que permitiera un mejor entendimiento de las neoplasias linfoides y

tuviera una mayor proyección clínica. Esta clasificación facilitó a los oncohematólogos clínicos la interpretación de los diferentes resultados terapéuticos obtenidos de los ensayos clínicos, representando un beneficio para el manejo de los pacientes con estas patologías. Así surgió la “Working Formulation For Clinical Usage”.¹⁹²

Esta clasificación fue ampliamente aceptada ya que ayudaba a resolver algunas controversias además de permitir una fácil traducción de otras clasificaciones utilizadas. Tal fue su aceptación y amplia su utilización que llegó a convertirse en una clasificación histopatológica en sí mismo, cosa que nunca se pretendió cuando se propuso su creación. Era una clasificación puramente morfológica, similar a la clasificación de Rappaport, no requiriendo metodología inmunológica. La gran aceptación de la “working formulation” fue debida a la gran utilidad y fácil entendimiento por los clínicos que permitía identificar grupos de pacientes y la utilización de estrategias terapéuticas adecuadas. Durante más de 15 años la “Working Formulation” ha persistido como la clasificación más aceptada. Durante este tiempo han existido numerosos avances en el entendimiento del sistema inmune y linfoide, así los patólogos comenzaban a disponer de reactivos con capacidad de identificar no sólo subpoblaciones linfoides, sino que también podían describir sus características de diferenciación y proliferación. Paralelamente ha aumentado el conocimiento de la biología molecular y de marcadores genéticos que han demostrado importantes distinciones y relaciones entre las diferentes líneas celulares linfoides y los tumores derivados de ellas.

Fue en 1994 cuando Nancy Lee Harris y 18 patólogos que constituían el “International Lymphoma Study Group” (ILSG) publicaron una excelente revisión de los LNH, donde además se describían entidades de reciente reconocimiento.^{45,46} Esta clasificación fue denominada REAL (Revised European-American classification of Lymphoid neoplasms) y organizaba las diferentes entidades descritas basándose en características como su incidencia, cualidades inmunológicas, agresividad histológica y supervivencia. Además describía nuevas entidades independientes como son: los LNH de bajo grado extranodales asociados a mucosas (MALT), los linfomas esplénicos de la zona marginal, el linfoma primario mediastínico de célula grande B, una variedad de linfomas de células T, incluido el linfoma anaplásico, el linfoma de células del manto y el linfoma B monocitoide. La Dra. Harris y sus colegas hicieron más que una revisión de los avances, metodología y entendimiento en este campo tan

dinámico; ellos propusieron una nueva clasificación y terminología. Se basaba en los principios de que una clasificación es una lista de entidades “reales”, que se definían por la combinación de características morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y clínicas. La relativa importancia de estas características variaba entre las diferentes entidades, no existiendo ninguna que resultase la “gold standard” para definir los diferentes tipos de linfomas. Para algunos tipos de LNH la morfología resultaba primordial, como el linfoma folicular y el angioinmunoblástico. Mientras otros no se podían definir sin el inmunofenotipo como el linfoma linfocítico bien diferenciado, el linfoma de células del manto o el anaplásico. Otros, sin embargo, requerían de un estudio genético para poder definir sus criterios como la translocación t(11;14) en el linfoma de células del manto, translocación t(14;18) del linfoma folicular o la translocación t(8;14) del linfoma de Burkitt. También eran importantes los datos clínicos como el sitio de presentación, nodal vs extranodal en los linfomas del área marginal, o la localización mediastínica de un linfoma de células grandes B.

El énfasis en realizar una definición “real” de las diferentes entidades linfomatosas, que puedan ser reconocidas por patólogos y tener relevancia clínica, junto con el reconocimiento de que no existe una única característica que pueda definir todas las entidades, representa un nuevo paradigma en la clasificación de los LNH.⁴⁵

Desde su inicio existieron diferentes críticas a esta clasificación, ya que a pesar de su completa y útil descripción que permitía diferenciar las distintas entidades descritas, se basaba en un punto de vista histopatológico que muchas veces no coincidía con el punto de vista del médico clínico. La duda inicial surgía si el conocimiento tan completo propuesto en esta clasificación podría ser útil para su aplicación clínica. Los datos clínicos como: incidencia, edad, lugar de afectación, curso clínico y pronóstico, resultaban muchas veces de poca utilidad clínica a la hora de diseñar una estrategia terapéutica. Otras críticas surgían del hecho de que separar los diferentes tumores según su origen a partir de células T o B no era de ayuda clínica (como había demostrado la “Working Formulation”). También se reconocía que los tumores de células plasmáticas y la enfermedad de Hodgkin, a pesar de su origen linfoide y por ello incluidas en esta clasificación, eran entidades distintas al resto de los LNH y que requerían una interpretación y manejo clínico diferente, por lo que incluirlas con el resto de los LNH resultaba confuso. La “Working Formulation” y otras clasificaciones

resultaban más útiles a los clínicos porque les permitía fácilmente identificar amplios grupos pronósticos. En la clasificación REAL no se diferenciaban claramente los grupos pronóstico. Por todo ello, esta nueva clasificación necesitaba tiempo para ser puesta en práctica y demostrar su factibilidad y reproducibilidad por patólogos menos expertos, además de ser apoyada con datos de la experiencia clínica que permitiera el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas para algunas de las diferentes entidades.

En 1997 se publicó una evaluación clínica de esta clasificación llevada a cabo por el ILSG en nueve estudios en todo el mundo y sobre más de 1400 pacientes diagnosticados entre 1988 y 1990, no tratados previamente.⁴⁶ El diagnóstico fue confirmado en 1378 casos (98,2%). El linfoma más frecuente fue el difuso de célula grande B (31%) y el folicular (22%), mientras que las nuevas entidades descritas suponían un 21% de todos los casos. El diagnóstico exacto se llevó a cabo en al menos el 85% de la mayoría de los diferentes tipos de LNH y la reproducibilidad diagnóstica fue del 85%. El inmunofenotipo ayudó a ajustar el diagnóstico entre el 10 y el 45% de los casos. En definitiva, el estudio demostró que la clasificación era realmente aplicable e identificaba clínicamente los distintos tipos de linfomas. Sin embargo, para la aplicación clínica, deberían combinarse los datos histológicos y biológicos al diagnóstico con los factores pronóstico definidos por el International Prognostic Index (IPI),⁴⁷ lo cual sería útil para poder tomar decisiones clínicas.

Desde 1995, miembros de las Sociedades Europeas y Americanas de Hematopatólogos, han venido colaborando en la creación de una nueva clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) para las enfermedades malignas hematológicas. Esta clasificación estratifica primariamente las neoplasias según su línea celular en neoplasias mieloides, neoplasias linfoides, desórdenes de células mastocíticas y neoplasias histiocíticas. Se utilizó una versión actualizada de la clasificación REAL para los LNH y sus principios se exportaron para realizar la clasificación de las neoplasias mieloides, histiocíticas y de mastocitos. Este esfuerzo incluyó un Comité de gobierno formado por 6 individuos (tres de cada Sociedad) y aunó a un total de 52 hematopatólogos de todo el mundo, así como un Comité de Consejeros Clínicos formado por 36 expertos hematólogos y oncólogos. En la actualidad, esta clasificación representa el primer consenso internacional en la clasificación de las neoplasias hematológicas, y por supuesto, el primer consenso para la

existencia de una única clasificación para los LNH universalmente aceptada, algo que no había ocurrido hasta entonces.⁴⁸⁻⁵⁰

No fue fácil alcanzar este consenso entre patólogos y especialistas clínicos como describe Harris NL,⁴⁹ donde se plantearon diferentes cuestiones, que en algunos casos requirieron de una votación a mano alzada.

A partir de 1999 se publicaron los primeros resultados de la clasificación de la OMS para las neoplasias hematológicas. La clasificación de la OMS adoptaba la clasificación REAL, y basándose en los tres años de experiencia desde la presentación de esta y la contribución de los comités creados, se propusieron diferentes cambios en la nueva clasificación de la OMS que incluían cambios en la nomenclatura, división de categorías heterogéneas y la adopción de entidades “provisionales” como “reales”.

Se establecen una serie de procesos en cada una de las entidades descritas cuyas características son las de definir la ontogenia celular tumoral, precisar las características inmunológicas de cada forma anatómico-clínica e incorporar las alteraciones citogenéticas y moleculares en la definición de cada proceso. En algunos casos, como en los linfomas MALT, aporta las implicaciones patogénicas inmunes o inducidas por gérmenes. En cada entidad perfila el grado, como criterio de diversidad celular, así como la agresividad o factor pronóstico.⁵¹

En la clasificación de la OMS, para la mayoría de las neoplasias linfoides, “el origen de la célula” representa el estadio de diferenciación de la célula tumoral que se observa en el tejido, más que la célula donde originalmente ocurrió la transformación neoplásica.

La clasificación reconoce neoplasias de células B, neoplasias de células T/NK y la enfermedad de Hodgkin. Las neoplasias de célula B y T se dividen en neoplasias de células precursoras o linfoblásticas y en neoplasias de células B y T maduras. Las neoplasias de células B y T maduras se agruparon de acuerdo con su principal presentación clínica: de predominio diseminado/leucémico, primario extranodal y enfermedad predominantemente nodal.

Tanto los LNH como las leucemias linfoides están representadas, puesto que ambas fases, sólida y circulatoria, están presentes en muchas neoplasias linfoides. La distinción entre ambas es artificial, como la leucemia linfática

crónica y el linfoma linfocítico bien diferenciado, que es simplemente una manifestación diferente de la misma neoplasia, o como el linfoma linfoblástico y la leucemia linfoblástica, o el linfoma de Burkitt y la leucemia Burkitt.

Uno de los corolarios que definen las diferentes entidades es que ni es posible ni útil separarlas con precisión de acuerdo a su grado histológico o a su agresividad clínica. El grado histológico es uno de los muchos factores pronósticos que debería ser aplicado dentro de cada entidad neoplásica. Tanto los patólogos como los clínicos deberían llegar al conocimiento de cada entidad, de su espectro morfológico y comportamiento clínico.

Los patólogos buscaron, aconsejados por los clínicos, estos cambios al igual que las soluciones que aún parecían controvertidas o problemáticas como la gradación del linfoma folicular, cómo definir el linfoma Burkitt-like, subclasificar los LNH B de célula grande y los LNH T maduros, y la deseable agrupación clínica de los LNH.

1.3.1.- Clasificación por estadios de los LNH:

El sistema de clasificación por estadios usado en los LNH se basa en el Sistema de Estadios de Ann Arbor que originalmente fue propuesto para estadiar la Enfermedad de Hodgkin, y que sin embargo se ha usado para estadiar los LNH durante más de 20 años.⁵²

Este sistema de estadiaje ha sido criticado por muchos autores dado que presenta algunas limitaciones a la hora de clasificar los LNH ya que no define ciertas características importantes como son: el tamaño tumoral (bulky), la extensión local de la enfermedad o la invasión de órganos o tejidos adyacentes, lo cual en muchos casos tiene valor pronóstico en estas entidades.⁵³⁻⁵⁵

Esto resulta más evidente en los LNH extranodales, donde las diferencias de interpretación del Sistema de Estadios de Ann Arbor puede crear confusión para las recomendaciones terapéuticas o para la comprensión de los resultados terapéuticos publicados. Por ejemplo un paciente con 2 nódulos cutáneos separados por centímetros podría ser clasificado como Estadio I o como Estadio IV, al igual que un LNH que afecte a paladar duro, seno maxilar y órbita. Por ello se han intentado desarrollar diferentes modificaciones basadas en TNM sin que hayan sido universalmente aceptadas.

Sólo en el linfoma gástrico MALT existe una clasificación ampliamente aceptada que define mejor esta enfermedad y que junto al grado histológico tiene significado pronóstico y puede determinar diferentes estrategias terapéuticas.⁵⁶⁻⁵⁸

Los LNH extranodales primarios se definen como la presentación localizada de LNH que emergen en un órgano o tejido extraganglionar, donde se estima es el sitio de origen, aunque exista afectación adenopática regional. El término implica que no hay evidencia clínica de enfermedad diseminada, lo cual distingue la enfermedad extranodal con o sin afectación linfadenopática (Est. I o II_E) de la enfermedad diseminada (Est. IV).

La terminología extranodal tiene más relevancia cuando se aplica al tejido de origen más que a la región anatómica. (ej.: LNH amigdalares, LNH de senos paranasales o LNH de tiroides más que LNH de cabeza y cuello). Existen algunos LNH como el linfoma mediastínico de célula grande B que aunque se origina en un tejido extraganglionar como es el timo se considera un LNH nodal.

En la clasificación de Ann Arbor, el anillo de Waldeyer, el timo, el bazo, el apéndice y las placas de Peyer del intestino delgado se consideran tejido linfático, por lo que no constituyen lesiones “E”, lo cual define originalmente la afectación extraganglionar. Sin embargo, muchos clínicos reconocen características clinicopatológicas específicas de los LNH primarios que afectan a estos órganos, por lo que los consideran entidades separadas.

Nosotros, en nuestro estudio, consideraremos dentro de la categoría de lesiones “E” todas las afectaciones extraganglionares, aunque como las anteriores, por definición original, no fuesen incluidas como tales.

A pesar de todas estas consideraciones, hasta que la biología de los LNH nodales y extranodales esté mejor delineada, la clasificación de Ann Arbor, suplementada por la descripción del tamaño tumoral (bulky), los lugares de afectación y la histopatología, se mantiene como el principal sistema de estadiaje en los LNH.

1.4.- FACTORES PRONÓSTICOS EN LOS LNH

La identificación de los factores pronósticos tiene como objeto adaptar la estrategia terapéutica al riesgo que el paciente presenta.

Dadas las particularidades de esta enfermedad, que sugieren entidades distintas y con diferentes grados de agresividad clínica, parece razonable adecuar a los mismos la actitud terapéutica. Además, la aparición de nuevos tratamientos con intentos curativos de la enfermedad hace crecer los esfuerzos para poder vaticinar con la máxima precisión cuál será la evolución de la enfermedad en cada caso. En definitiva, existe una preocupación creciente por investigar los factores pronósticos en el momento del diagnóstico con los elementos clínicos y biológicos disponibles en ese momento.

El primer problema es la gran cantidad de parámetros a los que se les ha atribuido valor pronóstico por lo que es preciso realizar un cribaje para seleccionar aquellos que realmente puedan tener relevancia. Así, por ejemplo, el nivel de albúmina en suero, la hipercalcemia o la presencia de anemia severa al diagnóstico no resultan relevantes desde el punto de vista de pronosticar la evolución posterior en series amplias de enfermos afectados de linfoma no LNH. Por el contrario en pacientes con linfoma de grado intermedio o alto de malignidad tiene relevancia la edad, el valor en suero de la β_2 microglobulina y posteriormente la respuesta inicial al tratamiento.⁵⁹⁻⁶⁰ Sin embargo, al intentar agrupar los distintos parámetros pronósticos pretratamiento parece razonable hacerlo de la siguiente manera: parámetros relacionados con la enfermedad propiamente dicha, parámetros dependientes del huésped de la enfermedad y su habilidad para tolerar el tratamiento y parámetros relacionados específicamente con el tratamiento a administrar.

1.4.1.- Factores pronósticos directamente relacionados con el linfoma

Parece claro en este sentido que es importante la “cantidad de tumor” en el momento del diagnóstico. Clásicamente, la manera de calcular este aspecto es la aplicación de los estadios de Ann-Arbor diseñados para la enfermedad de Hodgkin. En este contexto se buscan estrategias de tratamiento para valorar su evolución posterior.⁶¹ Pronto se observa que en un grupo de enfermos clasificados como de grado intermedio de malignidad el estadiaje de Ann-Arbor discrimina pobremente entre estadios III y IV. Además existen otros problemas añadidos, por una parte, la presencia de “bulky” tumor, valorado como tumor medido con un diámetro superior a 7 o 10 cm (según los grupos) es un claro factor adverso, muy probablemente por la dificultad de penetración de la quimioterapia. Por otra parte, la presencia de afectación de áreas extranodales

tiene también connotaciones negativas. Sobre la base de estos dos aspectos, una institución como el MD Anderson construye su propio modelo pronóstico basado en la carga tumoral por “áreas extensas” de enfermedad.⁶² Consideran un área extensa aquella área nodal o extranodal de diámetro superior a 7 cm y la presencia de afectaciones extranodales y el número de áreas afectadas. Establecen tres grados de carga tumoral baja alta e intermedia que se correlaciona con la supervivencia.

Sin embargo, el manejo con todos estos parámetros no siempre resulta aplicable en series históricas de llamados linfomas indiferenciados o histiocíticos o bien en los LNH de bajo grado.⁶³

La confirmación del esquema terapéutico CHOP como una de las mejores alternativas de tratamiento en los LNH de intermedio y alto grado de malignidad⁶⁴ así como la aparición de resultados positivos con la utilización de estrategias que incluyen trasplante de médula ósea,⁶⁵ impulsan un esfuerzo final en la búsqueda de un modelo internacional pronóstico (para la predicción del porcentaje de respuesta con el tratamiento de elección a cinco años). Así aparece el IPI, índice pronóstico internacional para el LNH. Éste se desarrolló basándose en 3273 pacientes con LNH de grado alto e intermedio de malignidad, con datos recogidos antes de recibir tratamiento.^{47,66}

Para constituir dicho índice se han tomado aquellas variables clínicas y biológicas que han resultado significativas para el pronóstico:

Edad: la edad superior a 60 años marca una inflexión en el pronóstico.

Estadio clínico-patológico: solo resultan significativos los estadios agrupados como “precoces” agrupando estadio I-II y “avanzados” agrupando III y IV.

El “performance status”, medido al diagnóstico por el ECOG agrupando un buen “performance status” como 0 y 1 vs los demás, es decir igual o superior a 2.

El valor de LDH: expresado como ratio entre el valor del paciente dividido por el valor normal máximo, estableciendo el corte en un ratio igual o inferior a 1.

El número de localizaciones extranodales cuyo corte es una o menos localizaciones extranodales vs más de una localización.

Con todo ello se establece una puntuación que es: entre 0 a 1 bajo riesgo; 2 riesgo bajo-intermedio; 3 riesgo alto-intermedio y de 4 a 5 alto riesgo. En

cualquier caso, en esta extensa revisión retrospectiva de estos grupos de riesgo, se establece claramente el límite deseado de predicción de supervivencia inferior al 50% con el tratamiento estándar y por tanto permite seleccionar candidatos a terapia alternativa.

Aunque Shipp insinúa que este modelo aplicado a LNH de grado alto e intermedio de malignidad también puede ser aplicado a LNH de bajo grado. En un trabajo posterior se demuestra perfectamente que dicho modelo es aplicable para la totalidad de los LNH.⁶⁷

El poder incluir a los bajos grados tiene un valor añadido al aparecer también nuevas estrategias para su tratamiento.⁶⁸

Por otra parte, en el modelo del IPI no se pudo incluir, por insuficiente número de pacientes, el valor de un marcador clásico en linfoproliferativos como es la β_2 -microglobulina, al que se imputa la más estrecha correlación con la masa tumoral. Aunque hay que tener presente la interferencia que puede suponer la insuficiencia renal y el hecho de que puede no normalizarse con la remisión completa del proceso (RC) e incrementarse discretamente con la recidiva, se ha constatado, en la determinación al diagnóstico, una muy buena correlación con la LDH e incluso con un nuevo y prometedor marcador tumoral, como puede ser el valor de α -TNF en suero.⁶⁹

Desde los ensayos iniciales que estudiaban el valor de la β_2 microglobulina en el manejo de los linfoproliferativos, se han realizado un número elevado de estudios demostrando su valor pronóstico, de tal manera que ha permitido incluso establecer un modelo basándose en el valor inicial de LDH y β_2 microglobulina, llegándose a realizar valoraciones tras 10 años de supervivencia.⁷⁰⁻⁷²

Directamente relacionado con el tumor, por no decir exclusivamente, están tanto su capacidad proliferativa como algunas alteraciones cromosómicas que regulan el crecimiento tumoral. En definitiva, se trata de valorar la cinética celular tumoral en el momento del diagnóstico y ver que correlación puede tener con la supervivencia o incluso con la respuesta esperable al tratamiento. Utilizando el Ki-67 como marcador de proliferación, algunos autores encuentran en el linfoma difuso de célula grande valores superiores al 60% de Ki-67, siendo un factor

estadísticamente significativo e independiente de mal pronóstico aunque no predice respuesta al tratamiento.⁷³

Por otra parte, el estudio del ciclo celular pone de manifiesto que el tiempo de transición entre las diferentes fases es muy variable en los distintos subgrupos de tipos histológicos de LNH.⁷⁴

El estudio del contenido en DNA, sobre todo la proporción de células tumorales en fase S también muestra una buena correlación con el tipo histológico y con la supervivencia. Es interesante constatar que en los LNH de célula B parece claro que un 4,5% o menos de fase S significa una mayor supervivencia, pero el conjunto de células T, no neoplásicas, también juegan un papel y si su fase S es superior al 14,5% se ha publicado una mejor supervivencia.⁷⁵

En otra experiencia con un grupo de 490 pacientes, la fase S se correlaciona de forma excelente con el grado histológico y con la supervivencia, incluso con significación independiente del IPI, excepto si los pacientes reciben tratamiento poliquimioterápico (como si éste modificara las expectativas de supervivencia).⁷⁶

Aunque la proliferación celular del linfoma ha sido exhaustivamente estudiada y para algunos tiene un papel muy importante en la valoración de la enfermedad existen actitudes críticas al respecto.⁷⁷

Nuestro grupo, en estudios previos, ha encontrado una buena correlación en el estudio retrospectivo en material parafinado, tanto con los tipos histológicos como con la supervivencia, ya sea mediante el estudio de fase S por citometría de flujo, como por estudio inmunohistoquímico con el Ac monoclonal PC10.⁷⁸⁻⁸⁰

De forma relativamente reciente, adquiere interés el estudio de la apoptosis, su correlación con la proliferación celular en los LNH. Parece bien establecido que el mecanismo por el cual el Bcl-2 reprime la apoptosis en las células linfomatosas se produce por un mecanismo de regulación del calcio en el retículo endoplásmico.⁸¹

El mayor conocimiento inmunológico y molecular de los LNH ha permitido un mejor entendimiento en su comportamiento clínico, lo que se ve reflejado en las nuevas clasificaciones de los linfomas, ampliamente comentadas y el poder identificar entidades, como el linfoma del manto, que presentaban un comportamiento agresivo y no indolente como pudiera reflejar su morfología.

Desde los años 60 se conoce la existencia de las variedades T y B de los linfocitos. Con relación a su valor pronóstico, los primeros trabajos comparativos mostraron un escaso valor pronóstico con series pequeñas de pacientes. Los trabajos más recientes, con series mayores, parecen concluir que ante un mismo tipo histológico el inmunofenotipo T confiere un peor pronóstico. Este hecho es más evidente en LNH en estadios avanzados (III y IV de Ann Arbor).⁸²⁻⁸⁴

La expresión del antígeno de histocompatibilidad HLA-DR se asocia con peor pronóstico.⁸⁵

Las moléculas de adhesión son un conjunto de glicoproteínas de membrana directamente implicadas en numerosos procesos orgánicos, entre ellos la respuesta inmune y los fenómenos de recirculación y “homing” linfocitario. Los LNH son proliferaciones linfocitarias procedentes de un determinado estadio madurativo. El análisis de las diferentes moléculas de adhesión nos ayuda a incrementar nuestros conocimientos con relación a la etiopatogenia y comportamiento de los linfomas. Se han identificado diferentes familias de moléculas de adhesión: selectinas, integrinas, superfamilias de las inmunoglobulinas y CD44.⁸⁶⁻⁸⁸

La presencia o ausencia de estas moléculas de adhesión puede repercutir en el pronóstico de los linfomas. Existen varios estudios que demuestran que la expresión de moléculas de adhesión como el CD44, se correlacionan con la capacidad de diseminación de los mismos.⁸⁹

Las alteraciones citogenéticas también influyen en el pronóstico y son útiles para identificar pacientes con diferentes expectativas pronósticas. La trisomía 12 confiere un especial mal pronóstico en la leucemia linfática crónica (LLC), mientras que las anomalías del cromosoma 13q se asocian a un buen pronóstico en la misma enfermedad. Recientemente se ha demostrado que alrededor del 50% de los casos de LLC los linfocitos muestran mutaciones somáticas de los genes de IgV_H, diferenciando dos formas de LLC, la tipo I pregerminal en la que los genes IgV_H no se hallan mutados y la tipo II, postgerminal, en la que las células se han puesto en contacto con el antígeno, experimentando mutaciones del gen IgV_H y adquiriendo memoria inmunológica. Así las formas “mutadas” tienen un pronóstico mucho mejor que las formas “no mutadas”.⁹⁰

La reciente introducción del análisis de DNA con microarrays está abriendo un importante campo en el estudio de factores pronóstico. Recientemente se ha

publicado, en el caso del LDCGB, el perfil de expresión genético de 240 pacientes. Se definieron tres subgrupos con relación al perfil genético expresado, demostrando ser un buen predictor de supervivencia después del tratamiento quimioterápico en pacientes con LDCGB.⁹¹

1.4.2.- Factores relacionados con el paciente.

Como se describió en el apartado anterior, el IPI permitió identificar grupos pronósticos en los pacientes con LNH sobre la base de la valoración de cuatro características presentes al diagnóstico, de las cuales dos únicamente están relacionadas con el paciente. Se ha podido demostrar que una edad superior a 60 años supone un punto de inflexión pronóstica en estos pacientes debido principalmente a la tolerancia a los tratamientos quimioterápicos y a las enfermedades concomitantes que limitan la indicación de diferentes esquemas terapéuticos que pueden ser demasiado agresivos en estas edades (disminuyendo así las tasas de respuestas y la supervivencia).

Otra de las características importantes reflejadas en el IPI es la situación clínica del paciente al diagnóstico, lo que se denomina el "performance status". Éste se puede evaluar por diferentes escalas, siendo la más extendida el ECOG que identifica 5 grupos de pacientes según su situación clínica:

ECOG 0: No hay evidencia clínica de enfermedad.

ECOG 1: Paciente sintomático pero capaz de efectuar su trabajo y actividades.

ECOG 2: El enfermo no puede trabajar, pero permanece menos del 50% del tiempo en cama.

ECOG 3: El paciente requiere considerable asistencia y frecuentes cuidados médicos. Permanece más del 50% del tiempo en cama.

ECOG 4: Incapacitación grave. El enfermo requiere hospitalización y tratamiento activo. Está postrado en cama.

Existe una diferencia pronóstica significativa entre pacientes con una buena situación clínica como son los ECOG 0 y 1, que además pueden ser manejados de forma ambulatoria, respecto los demás, es decir con ECOG igual o superior a 2, que generalmente requieren un ingreso hospitalario.

La presencia de síntomas constitucionales como son la pérdida de más del 10% del peso corporal, febrícula y sudoración (síntomas B), denota la presencia de una enfermedad clínicamente diseminada aunque en algunas ocasiones no se pueda demostrar en el estudio de extensión.

1.4.3.- Factores relacionados con el tratamiento.

El tratamiento clásico de los LNH se basaba en su clasificación (bajo o alto grado), en el estadio de presentación (localizado o avanzado) así como en la situación clínica del paciente. Históricamente el tratamiento de elección era con quimioterapia y/o radioterapia. De esta forma, pacientes con LNH indolentes como un linfoma folicular localizado, una actitud expectante (“watch and wait”) era una estrategia de manejo inicial aceptada que no alteraba la supervivencia del paciente. En aquellos LNH indolentes que requerían el inicio de un tratamiento para el control de los síntomas o de la progresión de la enfermedad, la quimioterapia asociada en algunas ocasiones a la radioterapia conseguía buenas respuestas, aunque no se observaban incrementos en el tiempo libre de enfermedad y las recaídas eran constantes, considerándose enfermedades incurables.⁹²

Los LNH agresivos (intermedio/alto grado) eran subsidiarios de esquemas terapéuticos con combinaciones de agentes quimioterápicos, que incluían algún antraciclínico, con lo que se conseguían tasas de curaciones entre el 30-40% en algunos casos de LNH de alto grado. El esquema terapéutico CHOP (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y prednisona), ha sido el tratamiento de primera línea de este grupo de LNH durante muchos años, sin que sus resultados fuesen mejorados por otros esquemas poliquimioterápicos con dosis más intensivas.⁹³

La elaboración de diferentes estrategias terapéuticas como es el tratamiento quimioterápico intensivo con rescate con precursores hematopoyéticos de sangre periférica (TASPE) parecen haber conseguido aumentar, no sólo las respuestas globales, sino también la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global a largo plazo en algunos grupos de pacientes. Ésto ha sido claramente demostrado en el caso de los LDCGB que mostraban al diagnóstico factores de peor pronóstico (IPI de alto/intermedio riesgo y de alto riesgo).^{94,65.}

Este procedimiento utilizado en primera línea de tratamiento, ha conseguido incrementar la tasa de remisiones completas, la supervivencia libre de

enfermedad y una supervivencia global a los 8 años significativamente superior en aquellos pacientes randomizados para recibir un tratamiento de intensificación versus una quimioterapia secuencial como consolidación a la remisión completa obtenida con el tratamiento de primera línea.⁹⁵⁻⁹⁸

También estos esquemas terapéuticos se han mostrado eficaces en el rescate de pacientes en recaída después de un tratamiento de primera línea y en aquellos pacientes en los que con la quimioterapia convencional sólo se han podido conseguir respuestas parciales.⁹⁹⁻¹⁰¹

En la última década han entrado en la escena terapéutica un nuevo grupo de fármacos, los análogos de purinas (fludarabina, deoxicofurcina y 2-clorodeoxicoadenosina), que han demostrado una gran eficacia en la mayoría de los síndromes linfoproliferativos de curso indolente. El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en su capacidad para resistir o inhibir la acción del enzima adenosín-deaminasa (ADA). Los análogos de las purinas, al incorporarse al DNA, imposibilitan su degradación por el enzima ADA, pero no su fosforilación, provocando un acúmulo progresivo de estas moléculas y sus metabolitos produciendo en último término la muerte celular. El análogo de purina más utilizado es la fludarabina que ha demostrado, en algunos síndromes linfoproliferativos como la leucemia linfática crónica, una tasa de respuestas del 31-57% en pacientes previamente tratados y del 78% en pacientes en primera línea terapéutica.¹⁰²⁻¹⁰⁴ En otros linfoproliferativos indolentes como el linfoma folicular, la combinación de fludarabina con mitoxantrone, ciclofosfamida y dexametasona en diferentes esquemas terapéuticos, ha conseguido resultados prometedores, con porcentajes de remisiones completas elevadas (de hasta el 70%), y lo que parece más importante, un alto índice de respuestas moleculares con negativización del Bcl-2 por PCR.^{105,106}

En la actualidad, el desarrollo en el conocimiento inmunológico y molecular de los linfomas, no sólo ha permitido la identificación de las diferentes entidades descritas en las clasificaciones actuales, sino también desarrollar estrategias terapéuticas innovadoras dirigidas contra marcadores específicos del linfoma o actuando a nivel del ciclo celular. Así en los últimos años han aparecido diferentes fármacos constituidos por anticuerpos monoclonales quiméricos dirigidos contra antígenos específicos linfocitarios, como el rituximab (anti-CD20) o como el campath-1H (anti-CD52). El primero en ser aprobado por la FDA en el

tratamiento de los LNH fue el rituximab, que es capaz de destruir las células CD20 positivas, expresadas en la mayoría de los LNH B, por mecanismos inmunes indirectos (lisis celular mediada por anticuerpos y por complemento) y de forma directa. Por otra parte, el rituximab es capaz de aumentar la citotoxicidad de fármacos quimioterápicos como: fludarabina, ciclofosfamida, adriamicina y cisplatino.^{107,108} Diferentes trabajos han demostrado la eficacia de la utilización del rituximab en el tratamiento de los LNH. La asociación de éste anticuerpo monoclonal con otros agentes quimioterápicos, como el CHOP, ha demostrado unos altos porcentajes de remisiones completas duraderas en linfomas indolentes, como el linfoma folicular, donde además se han descrito remisiones moleculares con negativización del bcl-2.^{109,110} Recientemente Coiffier demostró un beneficio significativo tanto en el porcentaje de respuestas completas como en la prolongación de la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global en pacientes mayores de 60 años, diagnosticados de linfoma difuso de célula grande B y tratados con CHOP más rituximab respecto a los tratados con CHOP únicamente.¹¹¹ Actualmente se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas en las que el anticuerpo monoclonal está unido a un isótopo radioactivo como el ytrio-90 en el caso del ibritumomab tiuxetan (Zevalin[®]) o al yodo-131 en el tositumomab (Bexxar[®]).

1.5.- ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y DEL CONTENIDO EN DNA CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO:

1.5.1.- Introducción a la citometría de flujo

La técnica de la citometría de flujo fue desarrollada, en la década de los años sesenta, en los Estados Unidos y Alemania como un avance importante en la investigación de la biología celular.¹¹² Pero es desde hace aproximadamente 25 años en que los recientes avances en inmunología, oncología y hematopatología, con el advenimiento de la tecnología de los anticuerpos monoclonales,¹¹³ han permitido la aplicación de la citometría de flujo a la investigación biomédica, tanto a nivel básico como clínico, de un modo generalizado.

Se define como citómetro de flujo al aparato que es capaz de medir componentes y propiedades de células y organelas celulares (partículas

biológicas) que fluyen en una suspensión celular. Los citómetros separadores o “sorters” tienen las mismas prestaciones y posibilidades que los citómetros de flujo, pero con la capacidad adicional de separar partículas selectivamente de la suspensión líquida.¹¹⁴

Los principios básicos de la citometría de flujo son sencillos.¹¹²⁻¹¹⁵ Es esencial disponer de una suspensión celular de modo que la dificultad para obtenerla es un factor limitante para el empleo de la técnica. La posibilidad de conseguir una suspensión celular individualizada varía con el tejido: la sangre y la médula ósea no necesitan casi procesamiento, el tejido linfoide precisa de una mínima disgregación mediante machacado, filtrado o pases por una jeringa con agujas de decreciente calibre, mientras que la mayor parte de los tejidos epiteliales y otros tumores sólidos necesitan una disgregación cuidadosa, usualmente con técnicas enzimáticas, seguidas de filtrado. Los tejidos pueden ser disgregados y teñidos en fresco o después de estar almacenados en congelación; también pueden ser recuperados a partir de bloques de parafina.

Las células o partículas (núcleos, organelas, cromosomas) son unidas a colorantes específicos fluorescentes que son capaces de excitarse con una fuente luminosa de alta energía.

La suspensión celular convenientemente procesada y teñida se inyecta en la cámara de flujo del citómetro de flujo que está hidrodinámicamente enfocada para que las células pasen individualmente una detrás de la otra en “fila india” a través de un punto en que estas interaccionan físicamente con un haz de luz monocromática dispersando la luz en todas las direcciones. La luz dispersada hacia adelante (llamada forward scatter a 0 grados) está relacionada con el tamaño de la célula. La que lo está a 90 grados del grado de refracción (denominada light scatter a 90 grados) está relacionada con la estructura interna y la complejidad citoplasmática.

La excitación de los fluorocromos ocurre en el punto de interacción de la célula y el haz lumínico dando como resultado la emisión de una luz de longitud de onda diferente a la inicial. Esta luz es recogida a 90 grados, siendo dirigidas las longitudes de onda seleccionadas mediante espejos (dicróicos) adecuados a detectores fotomultiplicadores, mientras que las longitudes de onda no deseadas son bloqueadas por filtros ópticos. Si se dispone de múltiples fuentes de luz, más

de un fluorocromo puede ser unido a las células permitiendo, de este modo, medidas fluorescentes simultáneas de varios parámetros en una sola célula.

Las señales eléctricas analógicas son convertidas en señales digitales y son procesadas por un ordenador con el objeto de generar histogramas correlacionando los parámetros deseados y efectuar el análisis de los mismos.

Las ventajas que proporciona la citometría de flujo frente a otros métodos que trabajan con fluorocromos incluyen la objetividad, elevada sensibilidad y velocidad de análisis, posibilidad de realizar mediciones simultáneas sobre una sola célula y separación celular en los sorters. Las desventajas y limitaciones son los altos costes de instrumentación y la incapacidad de visualizar las células que estamos analizando.

Para el estudio del contenido de DNA sobre material parafinado se utilizan técnicas de disgregación basados en el método desarrollado por Hedley en 1983.^{116,117}

Se ha constatado que sirven para gran cantidad de tejidos y para muestras archivadas con más de 10 años de antigüedad. De un 10 a un 15 % de los casos se obtienen coeficientes de variación superiores al 10 % que no permiten el análisis del ciclo celular.

Se obtienen histogramas casi idénticos si el tumor es procesado en fresco o después de parafinización lo que indica que no hay pérdida celular selectiva durante el procesamiento, además, los índices de DNA son casi idénticos y sólo se advierte una disminución del porcentaje de aneuploidías en tumores con índices de DNA muy bajos (por el aumento del coeficiente de variación de los picos).¹¹⁸ Por otra parte, la existencia de falsas aneuploidías es excepcional.¹¹⁹ Se pueden procesar y estudiar las muestras tanto con patrones internos de ploidía (hematíes de pollo) como con células no tumorales (pero en los tumores suele quedar algo de población normal residual que sirve de control de diploidía).^{120,121}

Para analizar los histogramas de DNA obtenidos a partir de muestras parafinadas o frescas hace falta el uso de software especial que permita la discriminación de ruido continuo por núcleos cortados y una aproximación matemática para el cálculo de las fases, puesto que el histograma

monoparamétrico que se obtiene presenta superposición entre las fases G0G1 y S, y entre S y G2M.¹²²⁻¹²⁶

1.5.2.- Estudio del contenido en DNA y fases del ciclo celular por citometría de flujo:

La medición del DNA ha sido una de las primeras y más empleadas aplicaciones de la citometría de flujo.^{127,115}

Las células malignas, en algunos tumores humanos, poseen frecuentemente alteraciones en el contenido de su DNA que pueden ser detectadas por citometría de flujo. El análisis del contenido en DNA y las fases del ciclo celular son útiles para el estudio de la biología celular y han demostrado tener una relación diagnóstica y pronóstica en determinadas neoplasias humanas, entre ellas los LNH.¹²⁸⁻¹³⁸

Se dispone de muchos fluorocromos que se unen específicamente a las bases del DNA. La señal fluorescente es proporcional a la unión del fluorocromo al ácido nucleico que es de tipo estequiométrico.

Los fluorocromos que se usan para la cuantificación de DNA por citometría de flujo se clasifican en función de su mecanismo de unión. Los intercalantes, como el bromuro de etidio, yoduro de propidio y naranja de acridina, se unen al material genético de doble cadena intercalándose entre las dos bases. Otros tipos son los de unión preferente a las bases adenina-timina, como DAPI, DIPI y Hoescht y por último, los de unión preferente a las bases citosina-guanina, como la mitramicina, olivomicina, y cromomicina A3.

1.5.2.1.- Estudio de la aneuploidía y del ciclo celular:

En el ciclo celular se distinguen varias fases: fase de reposo (G0), fase de síntesis proteica (G1a), síntesis de RNA (G1b), síntesis de material genético o DNA (fase S), de nuevo síntesis de proteínas (G2) y, por último, división celular (M).¹³⁹

Según el tipo y función de la célula, esta tiene más o menos actividad proliferativa y el ciclo puede variar según diversas condiciones: fármacos, radiaciones, etc.

El término aneuploidía, por citometría de flujo, significa la presencia de una población con un contenido en DNA diferente a un control de células semejantes y en igual fase del ciclo celular.¹⁴⁰

El término de aneuploidía citométrica no es semejante al de aneuploidía citogenética y la ausencia de aneuploidía por citometría de flujo no excluye presencia de alteraciones citogenéticas que no conlleven a un aumento de la cantidad total de DNA (translocaciones balanceadas, etc.).

Se define como Índice de DNA (ID) al cociente entre la moda del pico G0G1 de la población problema y la moda del pico G0G1 del control (en %). A partir de ahí, se define la siguiente terminología: diploide si ID igual 1, aneuploide si ID diferente de 1, hiperploide si ID superior a 1, hipoploide si ID inferior a 1, poliploide si ID es igual a 1.5, 2, 2.5, etc. y haploide si ID es igual a 0.5.¹⁴¹

Un problema importante en la lectura de algunas muestras es la discriminación de dobletes que interfieren y aumentan, artefactualmente, la fase de mitosis. La solución se debe buscar en el procedimiento técnico, en criterios de estandarización y en soluciones citométricas del análisis de la señal.¹²³⁻¹²⁵

Hay citómetros que pueden, mediante la señal de la altura, anchura y área del pico de fluorescencia, discriminar entre células en G2M y dos células unidas en G0G1.

Se define como criterio de aneuploidía la presencia de dos picos en canales diferentes de fluorescencia con dos poblaciones en la muestra.¹⁴⁰

Se acepta que el coeficiente de variación de la población aneuploide suele ser mayor que la euploide, de modo, que si se obtiene un histograma con dos picos y desconocemos cuál de ellos es el diploide se aceptará que se está ante la presencia de una población hiperploide o se escogerá como aneuploide el pico con un mayor coeficiente de variación. Ante un histograma dudoso se puede buscar la presencia de células en la región de G2M de la población problema dudosamente aneuploide, la existencia de proporcionalidad entre las fases de los ciclos celulares o comprobar la existencia de aneuploidía con diferentes técnicas.

Con una buena técnica y el citómetro en condiciones óptimas se pueden conseguir coeficientes de variación que permitan separar grupos de células con índices de DNA de 0,95 a 1,05; en su defecto al menos de 0,9 a 1,1, aunque,

generalmente, se obtienen mejores histogramas con muestras frescas que parafinadas.

1.6.- APOPTOSIS

Las formas avanzadas de vida no serían posibles sin un mecanismo que elimine las células individuales que ya no son necesarias, o que funcionan de manera anormal. Esta eliminación fisiológica, por tanto en ausencia de procesos patológicos como puede ser un proceso inflamatorio, se conoce como muerte celular programada o apoptosis y se produce de forma estructuralmente definida.¹⁴²⁻¹⁴⁴

La regulación defectuosa de la muerte celular programada puede desempeñar un papel en la etiología del cáncer, el SIDA, las enfermedades autoinmunes y las enfermedades degenerativas del sistema nervioso central.¹⁴⁵

La muerte celular puede ocurrir de dos maneras distintas, bien por un mecanismo de necrosis o mediante el denominado de apoptosis.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

Recientemente se ha podido reconocer que la muerte celular mediada por linfocitos T citotóxicos y por los "natural killer" muestra hallazgos de ambas formas de muerte celular.

La necrosis sería una forma patológica o accidental de producirse la muerte celular y ocurre cuando esta es expuesta a una variación muy extrema de sus condiciones fisiológicas como pueden ser una severa hipoxia o hipertermia, que producen una lesión de la membrana celular, semejante a la que en ciertas condiciones patológicas puede suceder como la acción lítica del complemento o la de ciertos virus. El proceso comenzaría por la imposibilidad de la célula de mantener su homeostasis en relación con el exterior, sobre todo en lo que hace referencia al agua y los iones. Así se producirá un cambio de forma, con hinchazón de toda la célula y de algunas organelas intracelulares, especialmente las mitocondrias. Todo ello conduce a la rotura de la membrana celular vertiéndose al exterior los contenidos intracitoplasmáticos, incluidos enzimas lisosómicos, lo que a su vez conduce a una extensa lesión tisular y una intensa respuesta inflamatoria. Durante todo este proceso es necesario recalcar que el núcleo y especialmente el patrón de cromatina nuclear, se encuentran perfectamente preservados.

Sin embargo en la apoptosis, la muerte celular ocurre bajo condiciones fisiológicas, participando la propia célula de forma activa y por ello la denominación de “suicidio” celular.¹⁴⁶ Este fenómeno lo podemos encontrar durante el recambio celular en la homeostasis de tejidos, en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, en la embriogénesis, en el desarrollo del sistema nervioso y en la atrofia de tejido dependiente del sistema endocrino.

Actualmente se reconoce que la gran mayoría de muerte celular fisiológica se produce por este mecanismo, habiéndose producido avances importantes en relativamente poco tiempo. Así conocemos que al menos dos genes pueden estar implicados en ello como son el Bcl-2 y el enzima convertidor de la interleukina 1 β .

A partir del conocimiento de estos mecanismos, la investigación se centra en conocer mejor el papel de la apoptosis dentro del tejido tumoral y su influencia en relación a la capacidad de proliferación tumoral, y su relación final en el enfermo como podría ser el pronóstico de la enfermedad o cómo desarrollar nuevos tratamientos. De la misma forma, se puede aplicar a enfermedades neurodegenerativas, SIDA y entidades autoinmunes y/o inflamatorias.

Las células que se encuentran en proceso de apoptosis muestran unos cambios característicos tanto morfológicos como bioquímicos.^{146,149}

Estos hallazgos incluyen: agregación de la cromatina nuclear, condensación y división tanto nuclear como citoplásmica con envoltura de la membrana citoplásmica intacta dando lugar a unas vesículas identificables morfológicamente y por microscopía electrónica como cuerpos apoptoicos que contienen ribosomas, mitocondrias intactas y material nuclear. In vivo este material es rápidamente reconocido y fagocitado por los macrófagos del tejido adyacente.¹⁵⁰ La eficiencia del mecanismo es tal que en la desaparición de las células apoptóticas no hay respuesta inflamatoria. In vitro los cuerpos apoptoicos sufren finalmente una lisis por lo que entonces se trataría de una “necrosis secundaria”. (Tabla: 1)

Desde el punto de vista bioquímico, el fenómeno más importante es la degradación del DNA genómico, sin otro cambio ni siquiera en la permeabilidad de la membrana celular. Es una fragmentación preláctica del DNA. Dicho proceso

requiere energía con movilización de Ca^{++} y Mg^{++} dependientes de una endonucleasa.¹⁵¹

Por electroforesis en gel de agarosa se puede distinguir un patrón de subunidades de 180 bp.

La citotoxicidad mediada por células, se puede llevar a cabo tanto por un mecanismo apoptoico poniendo en marcha la célula efectora sobre la diana una fragmentación prelítica del DNA, como por un mecanismo puramente lítico mediante moléculas como la “perforina” produciendo “poros” a nivel de la membrana, siendo los dos mecanismos no excluyentes e incluso complementarios

Tabla: 1

NECROSIS	APOPTOSIS
Cambios morfológicos	
Pérdida integridad membrana	Membrana íntegra.
Floculación de cromatina nuclear	Agregación cromatina nuclear
Hinchamiento celular y organelas	Condensación y división celular
Lisis completa celular	Formación de cuerpos apoptoicos
Desintegración de organelas celulares	Las organelas quedan intactas
Cambios bioquímicos	
No regulación homeostasis iónica	Puesta en marcha proceso con activ. enzimática
No requiere energía (proceso pasivo)	Requiere energía ATP-dependiente que prosigue a 4°C) (proc. activo se detiene a 4°C)
Digestión de DNA desordenada	Fragmentación de DNA mono y oligonucleosómica.
Fragmentación DNA post-lítica (evento tardío en muerte celular)	Fragmentación prelítica (evento precoz en la muerte celular)
Significación fisiológica	
Muerte de células en grupos	Muerte de células individuales
Provocado por alt. no fisiológicas	Inducido por estímulos fisiológicos
Respuesta inflamatoria significativa	No respuesta inflamatoria
Este enzima rompe el DNA en puntos localizados entre unidades nucleosomales generando fragmentos mono y oligonucleosomales	

1.6.1.- Cambios metabólicos durante la apoptosis.

La puesta en marcha de la apoptosis puede estar generada también por estímulos patológicos. De hecho los agentes capaces de producir necrosis celular son capaces también de inducir apoptosis. Cabe interpretar entonces la

apoptosis como una respuesta celular coordinada a estímulos nocivos que no son inmediatamente letales.

Entre los factores capaces de inducir apoptosis los más importantes son: glucocorticoides, factor de necrosis tumoral (TNF), factor transformador de crecimiento β (TGF- β), proteína HIV, gp 120 y el ligando APO-1/FAS.^{150,151}

En la mayoría de tipos celulares el inicio de la apoptosis se traduce en un aumento del calcio ionizado intracitoplasmático. Éste activaría enzimas latentes como la endonucleasa nuclear que invariablemente fija DNA y que induciría la rotura del mismo en secuencias determinadas, sin duda el inicio de los cambios que se producirán en la apoptosis; así como otras enzimas como una transglutaminasa que se une a proteínas del citoplasma, o la calpaina capaz de degradar el citoesqueleto.

La apoptosis suele necesitar energía en forma de ATP. La síntesis activa de RNA y proteínas depende del tipo de célula y del estímulo apoptótico que la desencadena.

Así, en los linfocitos, los agentes que inhiben la síntesis proteica y el RNA suelen bloquear la apoptosis, mientras los mismos compuestos la aumentan en los neutrófilos y en algunas líneas celulares leucémicas.

1.6.2.- Proliferación y apoptosis.

Sabemos que la proliferación celular está relacionada con el crecimiento de un tejido y más concretamente con el de un tumor. No sólo guarda esta lógica relación sino que además se ha demostrado su relación con la agresividad de la enfermedad tumoral y por tanto con su pronóstico. En los LNH ya se demostró que en el momento del diagnóstico, el tejido parafinado, estudiado por citometría de flujo en cuanto a contenido DNA, así como el tanto por ciento de fase S de las células tumorales se correlaciona con el tipo histológico y pronóstico de la enfermedad.

En algunos estudios experimentales de carcinogénesis se describe que la capacidad de crecimiento de un tumor respondería a una fórmula en los siguientes términos:

$$\text{Crecimiento Tumoral} = (\text{Índice proliferación}) - (\text{Apoptosis})$$

La aplicación de esta sencilla fórmula al tejido tumoral en el momento del diagnóstico, añade a la información morfológica y al inmunofenotipaje, en definitiva al diagnóstico anatomopatológico estático y limitado a la pieza en este momento, una dimensión de previsión de crecimiento. Esta información adicional para caracterizar un tumor podría ser muy útil.

De todas formas, una célula tumoral puede dividirse más lentamente incluso que las células normales, es decir tener un índice de proliferación bajo, pero el tumor sigue creciendo debido al periodo prolongado de vida de dichas células que sería debido a una alteración de la apoptosis. De ello se desprende que la apoptosis es un método eficiente de evitar la transformación maligna porque elimina las células con lesiones genéticas.¹⁴⁴

En este sentido, resulta paradójico que el mismo oncogén c-myc que estimula la división celular, también induce la apoptosis.

1.7.- MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA ADHESIÓN CELULAR Y HOMING

En cultivos de médula ósea se ha demostrado que la capa de estroma adherente formada por fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y matriz extracelular son requeridos para que se desarrolle la hematopoyesis.¹⁵²

La interacción entre las células hematopoyéticas normales y malignas con el endotelio y la matriz extracelular, es esencial para procesos fisiológicos y patológicos (migración linfocítica, "homing", curación de las heridas, inflamación, hemostasia, trombosis y metástasis celular).

Las moléculas de adhesión celular (CAMs) que median en la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular pertenecen al menos a 5 familias:

- Cadherinas
- Superfamilias de las Inmunoglobulinas
- Integrinas
- Selectinas
- Proteoglicanos de superficie celular (CD44/HCAM)

1.7.1.- Papel de las CAMs en la hematopoyesis normal.

1.7.1.1.-- Cadherinas.

Son CAMs transmembrana calcio-dependientes que mantienen y estabilizan las conexiones intercelulares, siendo una de las moléculas de adhesión más importante en la formación de asociaciones célula-célula. Existen varios subtipos bien característicos por su nivel molecular: E-cadherinas, P-cadherinas, N-cadherinas, L-CAM.¹⁵³

1.7.1.2.- Superfamilia de las Inmunoglobulinas.

Se caracterizan por la presencia de diferente número de dominios de tipo inmunoglobulina consistente en dos hojas antiparalelas de cadenas β .

La mayoría están implicadas en el reconocimiento célula-célula, e incluyen moléculas que intervienen en la inmunidad celular (HLA, TCR, etc...), desarrollo neuronal (NCAM), tráfico de leucocitos o homing (ICAM-1, ICAM-2), moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) y señales de transducción.¹⁵⁴

1.7.1.3.- Integrinas.

Están involucradas sobre todo en la adhesión célula-matriz extracelular, y algunas, como las VLA-integrinas, en la adhesión célula-célula. Se clasifican de acuerdo con su cadena β , (β_1 : VLA1-VLA6, β_2 : LFA-1, β_3 : gp IIb/IIIa,...).¹⁵⁵

1.7.1.4.- Selectinas.

Media la interacción leucocito-endotelio, uniendo ligandos expresados por células endoteliales o leucocitos.¹⁵⁶

Existen 3 miembros en este grupo:

- LECAM-1 (MEL-14/LAM-1): juega un papel principal en la regulación del tráfico de linfocitos.
- ELAM-1: expresado en células endoteliales en respuesta a un estímulo inflamatorio.
- GMP-140/PADGEM(CD62): almacenado en los gránulos α de las plaquetas y en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales. Se pueden movilizar rápidamente después de estímulos por productos de la cascada de la coagulación.

1.7.1.5.- *Proteoglicanos de la superficie celular.*

- CD44/HCAM: El CD44 es una molécula involucrada en la recirculación leucocitaria.
- Syndecan: juegan un papel importante en la regulación del comportamiento en células normales y tumorales.¹⁵⁷

1.7.2.- *Papel de las moléculas de adhesión celular (CAMs) en enfermedades malignas hematológicas.*

En los linfoproliferativos, las células malignas proliferan en lugares específicos y pueden diseminarse por vía hematológica o linfática. En particular, las células malignas pueden extravasarse del torrente circulatorio y “sembrarse” dentro de otros tejidos.

Las interacciones entre las células neoplásicas, endoteliales y la matriz extracelular son cruciales para la localización de los tumores, así como para la capacidad de abandonar su lugar de origen y adaptarse a otros microambientes en su diseminación. Como se ha descrito, múltiples vías de adhesión podrían estar involucradas en la unión de células hematopoyéticas normales o malignas a las proteínas del estroma y a células endoteliales, ambas circunstancias son cruciales para la localización y extensión de las neoplasias. Muchos trabajos han intentado correlacionar la expresión de estas moléculas con las manifestaciones clínicas para poder determinar el papel de las CAMs en la localización tumoral y metástasis.^{158,159}

1.8.- MOLÉCULA DE HOMING CD44

1.8.1- *Bases moleculares*

El CD44 recibió su nombre durante el 3^{er} International Workshop on Leucocyte Differentiation Antigens. Antes había recibido diferentes denominaciones: lymphocyte homing receptor, gp90^{HERMES}, Pgp-1, extracellular matrix receptor III (ECMR III), “hyaluronate receptor” (H-CAM) y HUTCH-1. Se trata de una glicoproteína de transmembrana involucrada en la recirculación linfoide.

La puerta de entrada de los linfocitos del torrente sanguíneo a los órganos linfoides, se ha identificado como unas vénulas especializadas en los órganos linfoides llamadas “vénulas endoteliales altas postcapilares”, (HEV). Los

linfocitos reconocen específicamente estas HEV, a las cuáles se adhieren y posteriormente migran. A este proceso se le describe como “homing”.^{12,160}

Las HEV están ampliamente distribuidas en ganglios linfáticos, conducto torácico y placas de Peyer, siendo casi son detectables en médula ósea y bazo.¹⁶¹

El tráfico de linfocitos entre varios órganos linfoides es esencial para llevar a cabo las funciones del sistema inmunológico, permitiendo al linfocito ser capaz de responder a la estimulación antigénica en cualquier lugar del organismo, así como, la distribución local de las células efectoras y de memoria en lugares distantes a los órganos linfoides.¹⁶²

El CD44 emerge como un tipo de glicoproteína integral de membrana expresada en muchas líneas celulares. La proteína de membrana tiene un dominio corto citoplasmático, un dominio transmembrana y un dominio externo, de aproximadamente 25-35 KDa, que contienen el glucosaminoglicano que se une a los receptores. La variación en la composición de los glucosaminoglicanos, parece ser “tejido-específico” y se relaciona con su papel en la adhesión celular. Además el CD44 fija colágeno y fibronectina, y ha sido identificado como un receptor de ácido hialurónico en algunos sistemas celulares. Esto permitiría, a estas células, un anidamiento en un microambiente distinto al suyo, debido a su capacidad de fijarse a uno de los componentes principales de la matriz extracelular como es el ácido hialurónico.¹⁶³

El CD44 está codificado por un único gen localizado en el brazo corto del cromosoma 11. Contiene 20 exones de los cuales los 5 primeros (s1-s5), al igual que del 16 al 20 (s16-s20) están conservado en la forma “standard” de CD44 (CD44s), que es el más ampliamente expresado. El resto de los 10 exones constituyen variantes del CD44 (v1-v10) según sufran “splicing”. Así, la expresión de la variante 6 (CD44v6), al igual que otras variantes, se ha demostrado que juega un papel importante en la diseminación de muchas enfermedades neoplásicas, como: LNH, carcinoma colorectal, melanomas, carcinomas gástricos, carcinoma de tiroides y otras neoplasias.¹⁶⁴

Los tejidos donde se expresa el CD44s son: tejido hematopoyético, epéndimo, epitelio de plexo coroideo, epitelio gástrico e intestinal, hepatocitos, páncreas endocrino, células acinares pancreáticas, glándula adrenal, túbulos proximales y

colectores renales, así como la cápsula de Bowman, epitelio de ovario germinal, células germinales testiculares, músculo estriado (cardíaco y esquelético), células de Sertoli y astrocitos.

1.8.2.- Fisiología del homing linfoide

La fisiología de la recirculación linfocitaria o “homing” está determinada por diferentes regulaciones en los mecanismos de adhesión linfoide. Así, los linfocitos tienen una habilidad especial para regular sus propiedades “adhesivas” durante su desarrollo.¹⁶²

En la distribución de los linfocitos, durante su estancia en el torrente circulatorio no se adhieren entre ellos, ni a otros elementos circulantes ni a la mayor parte del endotelio. Sin embargo, la extravasación requiere una adhesión fuerte y específica a lugares apropiados del endotelio.

Algunas subpoblaciones linfoides, como los linfocitos B del centro germinal o los linfocitos T intraepiteliales, están firmemente unidos al microambiente de su tejido. Otras subpoblaciones linfoides, como el resto de los linfocitos T, recirculan desde el torrente sanguíneo a los órganos linfoides y viceversa hacia la sangre periférica cada 12-24 horas.

Esta interacción linfo-endotelio es un elemento importante en la regulación del sistema inmune, controlando el acceso de subpoblaciones de linfocitos especializados a ciertos tejidos y determinando la respuesta inmune e inflamatoria local.

El sistema inmunológico se distribuye en tres compartimentos tisulares que son:

1º.- Tejido linfoide primario (médula ósea y timo). Lugares con capacidad de soportar la producción de linfocitos funcionalmente maduros (vírgenes o nativos) desde progenitores no funcionales.

2º.- Tejido linfoide secundario (ganglios linfáticos, placas de Peyer, bazo). Representan el sitio predominante de diferenciación linfoide. Los antígenos exógenos se presentan en un microambiente linfoide organizado y se produce la proliferación y diferenciación antígeno-dependiente de linfocitos B y T antígeno-específicos.

3º.- Tejido linfoide terciario. Tradicionalmente considerado como “extralinfoide”, puede ser interpretado como que incluye el resto del cuerpo. Representa lugares

donde los linfocitos memoria y células precursoras efectoras, pueden ser reestimuladas por antígenos, resultando una expansión clonal de esta población previamente estimulada, o donde se lleva a cabo la respuesta efectora T o B. El tejido linfoide terciario, o no tiene, o tiene poco componente linfoide, pero tras el estímulo inflamatorio, “importan” este componente.

Dentro de esta compartimentalización tisular del sistema linfoide, el papel fisiológico del homing juega un papel importante.

1.8.2.1.- Tejido linfoide primario.

Los linfocitos T, al igual que los B, se originan de la célula pluripotente hematopoyética de médula ósea (stem cell). La diferenciación posterior a linfocito T virgen ocurre en el microambiente tímico.

La mayoría de los linfocitos B y T “convencionales” que expresan receptores antigénicos, abandonan el órgano linfoide primario, requiriendo la expresión de receptores de homing para su extravasación hacia órganos linfoides secundarios, y para localizar en estos tejidos el microambiente. Desde estos tejidos migran poco o no lo hacen al órgano linfoide terciario (incluso bajo condiciones de inflamación).

Hay una excepción a este patrón, la subpoblación de linfocitos B CD5 (+), que es una población que se autorregenera y reside en peritoneo y otras cavidades. Son los responsables de la producción de una fracción de células plasmáticas secretoras de IgA (\pm 50%), localizadas en el tejido linfoide terciario, como es la lámina propia.

Otra excepción incluye a una subpoblación de linfocitos $T_{\gamma\delta}$, que se asocia a algunos lugares epiteliales (por ejemplo los linfocitos T intraepiteliales intestinales), que son independientes del timo, emigrando directamente desde la médula ósea al intestino y terminando allí su diferenciación.

1.8.2.2.- Tejido linfoide secundario.

Aunque la población memoria/efectora pueda extravasarse hacia los tejidos linfoides secundarios, estos son el principal sitio de localización de los linfocitos vírgenes o nativos. Estos órganos son lugares especializados en el acúmulo de antígenos y contienen subpoblaciones inmunes accesorias que son muy eficientes en procesar y presentar los antígenos. Los nódulos linfoides son el

punto de terminación de los conductos linfáticos aferentes que drenan linfocitos desde todos los tejidos del cuerpo, trayendo antígenos con ellos.

El bazo filtra la sangre y acumula antígenos para presentárselos a los linfocitos en la pulpa blanca.

Las placas de Peyer de la mucosa intestinal y los acúmulos linfoides organizados en el tracto respiratorio, provienen de la asociación de una mucosa epitelial única que está especializada para que pasen antígenos a través de la barrera epitelial, para su presentación en el tejido linfoide organizado.

El tejido linfoide secundario está involucrado en el reclutamiento linfoide para interactuar con los antígenos atrapados. Los ganglios y las placas de Peyer tienen, de forma fisiológica, unas vénulas postcapilares especializadas (HEV) que participan en el reclutamiento linfoide. Estas vénulas no están presentes en el bazo, donde sin embargo existe una empalizada de células epiteliales que participa en el reclutamiento linfoide en este lugar.

El tráfico de linfocitos, desde el órgano linfoide primario al secundario y entre los órganos linfoides secundarios, está cuidadosamente regulado. Una de las principales características de esta regulación es la existencia de un mecanismo de homing órgano-específico que controla el reclutamiento linfoide desde la sangre periférica y determina la capacidad (y por extensión la representación) de diferentes subpoblaciones linfoides en cada tejido linfoide secundario. Así, los linfocitos T y B nativos están dotados de los receptores de homing adecuados que les permiten acceder con eficacia a los ganglios periféricos, placas de Peyer o el bazo, al tiempo que abandonan el tejido linfoide primario.

Los linfocitos, que encuentran su antígeno específico en el tejido linfoide secundario, son activados sobreexpresando posteriormente integritas de superficie (LFA-1 y VLA) que pueden participar en una adhesión transitoria de células dispersas y componentes de la matriz extracelular en el lugar de estimulación. El efecto a largo tiempo de la estimulación antigénica es la expansión clonal y la diferenciación de linfocitos a células efectoras y células memoria, poblaciones que difieren drásticamente en sus propiedades migratorias de los linfocitos nativos. Así, los linfocitos efectoras y memoria adquieren la habilidad de migrar de forma eficiente al tejido linfoide terciario, y una vez activados, no son homogéneos en su habilidad para acceder a los ganglios periféricos o al tejido linfoide de mucosas, sino que exhiben una selectividad

pronunciada en su comportamiento homing. Algunos estudios fisiológicos sugieren que los linfocitos memoria, previamente activados, tienden a circular preferentemente hacia los tejidos linfoides en los cuales fueron activados (por ejemplo, los linfocitos activados procedentes del intestino, retornan preferentemente al intestino o ganglios intestinales).

Estas diferencias de homing expresadas en los linfocitos T y B nativos y linfocitos memoria/efectores, parece estar mediado en gran parte por una regulación diferencial de receptores de adhesión, necesitando reconocer y unirse a células endoteliales dentro de los diferentes tejidos.

1.8.2.3.- Tejido linfoide terciario

El tejido linfoide terciario mejor estudiado es el epitelio de superficie como es la piel, la mucosa gastrointestinal, respiratoria o genitourinaria. Existen dos componentes linfoides: uno ya descrito de localización intraepitelial que no requiere estímulo antigénico para su desarrollo y mantenimiento (linfocitos $T_{\gamma\sigma}$, que buscan la superficie epitelial directamente desde el órgano linfoide primario: linfocitos T intraepiteliales cutáneos, de mucosa intestinal y reproductiva), y un segundo componente que lo constituye el linfocito convencional efector/memoria.

1.8.3.- Expresión de CD44 en el ganglio linfático

La distribución del antígeno CD44 en el tejido ganglionar normal se presenta con una alta expresión en los linfocitos B del folículo primario en la zona del manto, áreas interfoliculares y en los linfocitos T del área interfolicular y paracortical, y en cambio, una ausencia y/o débil expresión en el centro germinal.¹⁶⁶ Examinando la distribución del antígeno en los diferentes subtipos linfoides, tanto las células B del manto, células plasmáticas, células dendríticas y linfocitos T e histiocitos presentan una alta expresión de CD44. Al contrario, los centroblastos y centrocitos del centro folicular y los linfocitos B monocitoides muestran una ausencia o débil expresión de CD44. Existen algunas líneas linfoides como los linfocitos B del área extrafolicular y los linfocitos B tímicos que muestran una expresión variable, generalmente intermedia, del antígeno CD44.^{165,166}

1.8.4.- Expresión de CD44 y CD44v6 en LNH

Es conocido que los linfocitos normales recirculantes expresan en su superficie la molécula CD44, la cual se ha descrito que está involucrada en el "homing" y la activación linfoide, en la hematopoyesis y en la progresión tumoral y metástasis.

Estudios clínicos en LNH han demostrado que la expresión de la forma estándar de CD44 (CD44s) se asocia con enfermedad diseminada y mortalidad relacionada con el tumor.^{167,168}

La expresión de CD44 se ha asociado con estadios III/IV en linfomas de bajo, intermedio y alto grado.^{169,170} Cuando sólo se analizaban los linfomas difusos de célula grande, se observó que más del 50% de los casos con positividad para CD44 se presentaban en un estadio avanzado, mientras que sólo un 12% de los estadios III/IV eran negativos para CD44. Drillenburg, en un trabajo sobre 276 linfomas difusos de células grandes B, observó que en los pacientes con afectación nodal localizada, la expresión de CD44 se comportaba como un buen pronosticador tanto de la supervivencia global como del tiempo libre de enfermedad.¹⁷¹

La forma variante de CD44, CD44v6, se ha visto que se expresa principalmente en LNH de alto grado y especialmente en un subgrupo con peor pronóstico¹⁷³. Estudios en roedores demostraron que esta variante confiere potencial metastásico a líneas celulares de carcinomas y linfomas^{172,173}. Todos estos datos indican que CD44 y CD44v6 son importantes mediadores en la diseminación del LNH y podrían ser utilizados como marcadores moleculares que permitieran identificar pacientes con peor pronóstico. También se podría emplear, dentro del grupo heterogéneo que suponen los LDCGB, para identificar pacientes de alto riesgo que se beneficiarían de un tratamiento más intensivo, al igual que pacientes con una baja capacidad de diseminación en los que se podría conseguir una curación con estrategias terapéuticas más conservadoras.

Algunos autores han descrito una correlación entre los niveles séricos de CD44 y la respuesta al tratamiento; se ha demostrado que los pacientes que alcanzan una remisión completa presentan niveles séricos de CD44 cercanos a los límites de la normalidad, mientras que en la enfermedad progresiva estos niveles se encuentran significativamente elevados. Por ello, los niveles séricos de CD44 podrían comportarse como un parámetro útil para monitorizar la respuesta al tratamiento.¹⁷⁴

2.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO:

Uno de los objetivos principales de los grupos de investigación en onco-hematología es explorar aquellos factores pronósticos que permitan identificar pacientes en los que nuevas estrategias terapéuticas sean de utilidad para mejorar los resultados en aquellos casos en que se prevea un comportamiento agresivo o una refractariedad al tratamiento estándar.

Nuestro grupo de investigación ha estudiado, en los últimos años, el contenido en DNA, proliferación celular y la apoptosis en pacientes diagnosticados de linfoma no Hodgkiniano con el fin de analizar su correlación con el pronóstico de la enfermedad.^{78,79,175} El interés de estos estudios radica en identificar la presencia en el momento del diagnóstico de parámetros biológicos y moleculares que nos permitan predecir el comportamiento clínico-biológico de la enfermedad, la respuesta a los tratamientos y la evolución de los pacientes.

Los resultados obtenidos mostraron una marcada asociación entre la proliferación y muerte celular de las muestras de pacientes de linfoma al diagnóstico con la evolución y pronóstico de los enfermos.

El actual proyecto, siguiendo con esta línea de investigación, además incorpora el estudio de la interacción entre las células linfocitarias normales y malignas con el endotelio y la matriz extracelular, que es esencial para los procesos fisiológicos y patológicos leucocitarios. Algunos autores han relacionado alteraciones en las vías de adhesión con la presentación y pronóstico del linfoma. CD44 es un proteoglicano de la superficie celular y es una molécula que ha demostrado estar involucrada en la recirculación leucocitaria. La expresión de CD44 y sus variantes podrían estar implicadas en la unión de células leucocitarias malignas a las proteínas del estroma y a células endoteliales, circunstancias cruciales para la localización y extensión de la neoplasia y su sensibilidad a los tratamientos.

Nosotros pensamos que la expresión del receptor de "homing", CD44, y su variante CD44v6 pueden tener relación con la localización de la enfermedad, diseminación y potencial invasivo, respuesta al tratamiento y evolución de los pacientes con linfoma.

En este trabajo de investigación se analiza el valor pronóstico de: el contenido en DNA, la proliferación celular, la apoptosis y la expresión de CD44 y CD44v6 en una serie de pacientes con linfoma desde un punto de vista multifactorial; con el objetivo de identificar pacientes en los que se prevea un comportamiento agresivo o una refractariedad al tratamiento estándar.

3.- HIPÓTESIS

Las hipótesis que nos planteamos y dan origen trabajo son:

1.- La ploidía y proliferación celular, analizada por citometría de flujo en muestras tumorales parafinadas de pacientes con linfoma no Hodgkin, presenta correlación con la presentación clínico-biológica de la enfermedad, así como con la evolución y el pronóstico de los pacientes.

2.- El estudio de la muerte celular programada, mediante la técnica del TUNEL en muestras tumorales parafinadas de pacientes con linfoma no Hodgkin, presenta correlación con la presentación clínico-biológica de la enfermedad, así como con la evolución y el pronóstico de los pacientes.

3.- La expresión de las moléculas de adhesión CD44 y CD44v6, analizadas por inmunohistoquímica en muestras tumorales parafinadas de pacientes con linfoma no Hodgkin, presenta correlación con la presentación clínico-biológica de la enfermedad y con la evolución y el pronóstico de los pacientes.

4.- La expresión de las moléculas de adhesión CD44 y CD44v6 en las células tumorales de los LNH, presenta relación con la apoptosis medida por TUNEL, y con la aneuploidía y la proliferación celular estudiada por citometría de flujo.

5.- La expresión de las moléculas de adhesión CD44 y CD44v6 en las células tumorales de los LNH, presenta relación con los factores pronósticos clásicos en los pacientes con linfoma no Hodgkin.

4.- OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son:

1.- Identificar a los pacientes con linfoma no hodgkiniano diagnosticados en nuestro Centro y recoger sus datos clínico-biológicos de presentación al diagnóstico de la enfermedad (incluidos los factores pronósticos clásicos en linfoma), así como los datos sobre el tratamiento, la evolución y el pronóstico de los pacientes.

2.- Analizar, por citometría de flujo, la aneuploidía de ADN y la proliferación celular en las muestras al diagnóstico de pacientes con linfoma, y estudiar si existen diferencias significativas, respecto a la presencia de aneuploidía o proporción de células en Fase S, entre los distintos estadios, grupos histológicos de malignidad, origen nodal o extranodal de la enfermedad, IPI, y ratios séricos de LDH y β_2 microglobulina.

3.- Estudiar si la aneuploidía de ADN o la proliferación celular se comportan como factores asociados a la respuesta al tratamiento, el riesgo de recaída, el pronóstico y la supervivencia en los pacientes con LNH.

4.- Estudiar si la aneuploidía de ADN o la proliferación celular, dentro de grupos clínicamente homogéneos de LNH (estadio, grado histológico de malignidad, IPI, u origen nodal/extranodal), se comporta como un factor asociado a la respuesta al tratamiento, riesgo de recaída o pronóstico de la enfermedad (tiempo libre de enfermedad y tiempo de supervivencia).

5.- Analizar, la apoptosis mediante la técnica del TUNEL sobre muestras parafinadas al diagnóstico de pacientes con linfoma, y estudiar si existen diferencias significativas, respecto a su expresión, entre los distintos estadios,

grupos de histológicos de malignidad, origen nodal o extranodal de la enfermedad, IPI, y ratios séricas de LDH y β_2 microglobulina.

6.- Analizar si la apoptosis se comporta como un factor asociado a la respuesta al tratamiento, riesgo de recaída, pronóstico y supervivencia de los pacientes.

7.- Analizar si existe una relación significativa entre la ploidía y el porcentaje de células en fase S con la proporción de células apoptóticas, identificadas por TUNEL en los pacientes con linfoma.

8.- Estudiar si la proporción de células en apoptosis, dentro de grupos clínicamente homogéneos de LNH (estadio, grado histológico de malignidad, IPI, u origen nodal/extranodal), se comporta como un factor asociado a la respuesta al tratamiento, riesgo de recaída o pronóstico de la enfermedad (tiempo libre de enfermedad y tiempo de supervivencia).

9.- Cuantificar la proporción de células positivas y la intensidad de expresión de células CD44 o CD44v6 en las muestras histológicas parafinadas a partir de los cuales se diagnóstico el LNH y estudiar si existen diferencias significativas entre los distintos estadios, los grupos histológicos de malignidad, y el origen nodal o extranodal de la enfermedad.

10.- Estudiar si existen diferencias significativas entre la proporción de células positivas para CD44, la intensidad de expresión de CD44 en las células neoplásicas, así como la expresión de CD44v6 entre los diferentes grupos pronósticos que proporciona el IPI, así como con cada uno de los parámetros involucrados en su cálculo, y con la dosificación de β_2 microglobulina medida en el suero en el momento del diagnóstico del linfoma.

11.- Cuantificar la proporción de células positivas para CD44, la intensidad de expresión de CD44 en las células linfomatosas y la expresión de CD44v6 en las muestras histológicas parafinadas a partir de las cuales se diagnosticó el LNH y estudiar si existen diferencias significativas entre los LDCGB y el resto de los linfomas.

12.- Estudiar si la proporción de células positivas para CD44, la intensidad de expresión de CD44 en las células linfomatosas y la expresión de CD44v6, dentro de los LDCGB, se comporta como un factor asociado a la respuesta al tratamiento, el riesgo de recaída o el pronóstico de la enfermedad (tiempo libre de enfermedad y tiempo de supervivencia).

13.- Estudiar, por citometría de flujo, el contenido en ADN y el porcentaje de células en fase S de células tumorales obtenidas a partir de tejido parafinado y analizar si existe una relación significativa con la proporción de células positivas para CD44, la intensidad de expresión de CD44 en las células linfomatosas y la expresión de CD44v6.

14.- Estudiar el porcentaje de células en apoptosis del tejido parafinado a partir del cual se diagnosticó el LNH, por el procedimiento de TUNEL, y analizar si existe una relación significativa con la proporción de células positivas y la intensidad de expresión de células CD44 o CD44v6.

15.- Estudiar si la proporción de células positivas para CD44, la intensidad de expresión de CD44 en las células linfomatosas y la expresión de CD44v6, dentro de grupos clínicamente homogéneos de LNH (estadio, grado histológico de malignidad, IPI, origen nodal/extranodal), se comporta como un factor asociado a la respuesta al tratamiento, el riesgo de recaída o el pronóstico de la enfermedad (tiempo libre de enfermedad y tiempo de supervivencia).

16.- Analizar, mediante técnicas estadísticas multivariantes, si la aneuploidía de ADN, la proliferación celular, la proporción de células en apoptosis, la expresión de CD44 y CD44v6, se comportan como factores predictores independientes respecto a la respuesta al tratamiento.

17.- Analizar, mediante técnicas estadísticas multivariantes, si la aneuploidía de ADN, la proliferación celular, la proporción de células en apoptosis, la expresión de CD44 y CD44v6 se comportan como factores pronósticos independientes respecto al tiempo libre de enfermedad y el tiempo de supervivencia.

5.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- PACIENTES Y ÁMBITO DE ESTUDIO

5.1.1.- Pacientes:

Se han incluido en el estudio los pacientes con diagnóstico de LNH efectuado en el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida desde 1975 hasta el año 2000.

5.1.1.1.- Identificación y obtención de los datos de los pacientes:

Los pacientes se han identificado a partir del registro de enfermos del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Arnau de Vilanova. El Servicio de Hematología del Hospital Universitario Arnau de Vilanova es el Servicio de referencia de la patología onco-hematológica de Lleida, y cabe señalar que la práctica totalidad de los pacientes con este diagnóstico han sido estudiados y tratados en este Servicio.

La identificación de los pacientes con LNH que podían participar en el estudio se ha obtenido de un registro codificado de diagnósticos disponible en nuestro Servicio. Este registro ha sido cotejado con el registro de codificación del Hospital y con los diagnósticos del Servicio de Anatomía Patológica, correspondientes a los diferentes tipos de LNH. Con dicha información se elaboró un listado de pacientes, con sus datos personales de filiación y el número de Historia Clínica, con objeto de identificar a los pacientes para participar en el estudio.

A partir de aquí se ha realizado una revisión de historias clínicas para seleccionar aquellos pacientes de los que se disponía de muestra de tejido linfoide tumoral obtenido en el momento del diagnóstico (es decir, para cuyo diagnóstico se realizó una biopsia de tejido además de biopsia de la médula ósea). Se realizó un nuevo listado de estos pacientes anotando el identificador de bloque anatomopatológico.

5.1.1.2.- Criterios de inclusión:

Los criterios de inclusión en el estudio ha sido los siguientes: disponer de bloque anatomopatológico suficiente para el estudio que se propone y un mínimo de

información clínica, tanto al diagnóstico, como en su tratamiento y seguimiento. Más adelante se detallan las variables del estudio.

5.1.1.3.- Serie de pacientes:

Durante el periodo de estudio se han registrado 219 pacientes de los que se dispone de todos los datos clínicos y biológicos necesarios, al igual que su información sobre respuesta al tratamiento y supervivencia.

Sin embargo, sólo en 196 pacientes se ha podido disponer de cortes histológicos suficientes para poder realizar el estudio de ploidía y proliferación celular y cuantificación de apoptosis por TUNEL.

Para el análisis de la expresión de CD44 y CD44v6 se dispuso de 156 muestras de pacientes con diagnóstico de linfoma no Hodgkin.

En este estudio todos los linfomas fueron clasificados según la “Working Formulation” para preservar un criterio unificado a la hora de valorar el comportamiento clínico de los diferentes tipos de linfomas, así como su respuesta al tratamiento y la supervivencia.

A pesar de disponer de diagnósticos histológicos de diferentes tipos de linfomas realizados durante más de 20 años hemos podido identificar pacientes con diagnóstico de LDCGB, siguiendo las recomendaciones de la clasificación de la OMS.

5.1.1.4.- Anonimización de la base de datos:

Los datos de identificación personal, han sido, al finalizar la recogida de los datos y su validación, eliminados de las bases de datos para la anonimización de la base de datos. A los pacientes se les asignó un código no relacionado con su nombre ni número de historia clínica.

5.1.2.- Variables de estudio:

Se elaboró una base de datos con los siguientes apartados y recogiendo las siguientes variables:

5.1.2.1.- Variables de identificación:

- Código de identificación: número de identificación del paciente asignado al mismo una vez validada la base de datos

5.1.2.2.- Variables demográficas:

- Edad en años en el momento del diagnóstico: variable cuantitativa que detalla la edad del paciente en el momento del diagnóstico clínico de LNH del paciente.

- Sexo: variable dicotómica que identifica el sexo del paciente, con las categorías de hombre o mujer.

5.1.2.3.- Variables clínicas:

- Fecha del diagnóstico clínico: fecha en que se inicia el estudio para alcanzar el diagnóstico de LNH del paciente. Esta variable no se utilizó en el estudio estadístico.

- Presencia de síntomas B: variable cualitativa dicotómica que recoge si el paciente tiene o no clínica constitucional que definen los síntomas B. Se ha considerado que el paciente presenta síntomas B si tiene fiebre recurrente sin causa infecciosa aparente superior a 38 °C al diagnóstico, diaforesis nocturna y pérdida de peso igual o superior al 10% del peso corporal estimado.

- Situación clínica general del paciente al diagnóstico definida por el ECOG: con la información clínica de que se dispone al diagnóstico se ha valorado, siempre por el mismo observador, la "performance status" según el ECOG. Es una variable ordinal que puede tener los valores: 0 (sin síntomas), I (síntomas sin cama lo que corresponde a manejo ambulatorio), II (síntomas que suponen un encamamiento inferior al 50%), III (síntomas que suponen un encamamiento igual o superior al 50%) y IV de ECOG (que supone un encamamiento del 100%).

- Tamaño tumoral: variable numérica que recoge la medida en centímetros del tumor de mayor tamaño ya sea a partir de la medición clínica directa del tumor como a partir de exploraciones complementarias o de la pieza histológica o quirúrgica. Esta variable no se utilizó en el estudio estadístico.

- El estadio de Ann Arbor: variable ordinal que refleja la carga y extensión tumoral del LNH. Esta variable estratifica a los pacientes en cuatro estadios: 1º Estadio I: afectación de una única región ganglionar. En el caso de enfermedad

extranodal, que esta sea única y localizada. 2º) Estadio II: afectación de más de dos regiones ganglionares al mismo lado del diafragma. En caso de enfermedad extranodal, la afectación localizada se asocia con afectación ganglionar loco-regional. 3º) Estadio III: afectación ganglionar a ambos lados del diafragma. 4º) Estadio IV: enfermedad ganglionar difusa o diseminada con afectación de un órgano o tejido extraganglionar. En caso de enfermedad extranodal, la enfermedad está diseminada con afectación a distancia.

- Estadio avanzado o precoz de Ann Arbor: El estadio de Ann Arbor se ha recodificado en una nueva variable dicotómica con dos grupos posibles: estadios precoces correspondientes a estadios I y II, y estadios avanzados correspondientes a estadios III y IV.

- Número de localizaciones con afectación extranodal: variable numérica que recoge el número de localizaciones de afectación extranodal del LNH. Esta variable no se utilizó en el estudio estadístico.

- Afectación extranodal: La variable número de localizaciones con afectación extranodal se recodificó en una variable dicotómica que recogía si el LNH debutaba como enfermedad nodal o extranodal.

- IPI: variable ordinal que estratifica los pacientes en cinco categorías que corresponden a 5 grupos pronóstico. Las categorías incluidas en el estudio del IPI son: la edad $< vs \geq$ de 60 años, el estadio de Ann-Arbor I-II vs III-IV, estado general (performance status) 0-1 vs ≥ 2 , número de áreas extraganglionares 0-1 vs ≥ 2 y LDH normal vs elevada. A cada categoría se le asigna 1 punto en caso de edad ≥ 60 años, estadio de Ann-Arbor III-IV, estado general (performance status) ≥ 2 , número de áreas extraganglionares ≥ 2 y LDH elevada. Esto permite identificar cuatro grupos de riesgo: 1º) grupo de bajo riesgo con 0-1 puntos, 2º) grupo de riesgo intermedio-bajo con 2 puntos. 3º) grupo de riesgo intermedio-alto con 3 puntos, 4º) grupo de alto riesgo con 4-5 puntos.

- Grupos de IPI: variable dicotómica surgida de la remodificación del IPI en dos categorías. IPI 0-2 cuando el paciente estaba incluido en alguno de estos valores del IPI. IPI 3-5 cuando el paciente estaba incluido en alguno de estos valores del IPI. Ésta es la variable que predominantemente se ha utilizado para el análisis estadístico.

5.1.2.4.- Variables biológicas:

Dentro de este apartado se han incluido algunas dosificaciones de parámetros biológicos realizadas al diagnóstico.

- LDH: variable cuantitativa que expresa el valor de LDH sérico como ratio entre las cifras obtenidas del paciente y el límite superior de la normalidad para nuestro laboratorio.

- β -2-microglobulina: variable cuantitativa que expresa el valor de β ₂ microglobulina sérica como ratio entre las cifras obtenidas del paciente y el límite superior de la normalidad para nuestro laboratorio.

- TNF α : variable cuantitativa que expresa el valor de TNF α sérica como ratio entre las cifras obtenidas del paciente y el límite superior de la normalidad para nuestro laboratorio. Esta variable no estaba disponible en todos los pacientes de la serie histórica. Esta variable no se utilizó en el estudio estadístico.

Al manejar una serie de enfermos de un periodo tan largo de tiempo, los valores de referencia de nuestro laboratorio han sufrido modificaciones, por lo que la ratio se ha calculado con el valor del límite superior de normalidad en el año que se practicó la determinación.

5.1.2.5.- Variables histológicas:

- Fecha de diagnóstico anatomopatológico: fecha en que se confirma el diagnóstico de LNH del paciente por histología. Esta variable no se utilizó en el estudio estadístico.

- Grado histológico: variable cualitativa que recoge el tipo histológico del linfoma según la clasificación de la "Working Formulation" y puede adoptar las categorías de: bajo grado, grado intermedio y alto grado.

- Inmunofenotipaje del LNH: variable cualitativa que recoge el inmunofenotipo del LNH obtenido por inmunohistoquímica y que puede ser B o T.

- Linfoma difuso de célula grande B (LDCG-B). Para la identificación de este subtipo histológico en nuestra serie histórica de pacientes con linfoma se siguió la recomendación de la OMS que reconoce las entidades histológicas de clasificaciones previas que se corresponderían con el diagnóstico de LDCG-B. Así, en el caso de la "Working Formulation", serían los linfomas difusos de célula grande, los linfomas inmunoblásticos de célula grande y los linfomas difusos

mixtos de célula grande y célula pequeña los que equivaldrían o serían sinónimo de LDCG-B definidos en la clasificación de la OMS.

5.1.2.6.- Variables inmunohistoquímicas:

- Estudio de la apoptosis:

Proporción de células en apoptosis: variable cuantitativa que recoge la proporción de células positivas para la expresión de apoptosis por la técnica de TUNEL. La variable que se ha empleado en el estudio ha sido la expresión del resultado de la proporción de núcleos en apoptosis por cada 1000 células linfomatosas.

Estudio de CD44:

- Porcentaje de células positivas para CD44: variable cuantitativa que recoge la proporción de células positivas para la expresión de CD44. La variable que se ha empleado en el estudio ha sido la expresión del resultado de la proporción de células CD44 positivas por cada 100 células linfomatosas.

- Proporción de células CD44 positivas superior o igual al 40%: variable dicotómica surgida de la clasificación de los pacientes en dos grupos en función de la proporción de células CD44 positivas por cada 100 células linfomatosas. Pacientes con una proporción de de células CD44 positivas entre un 0 y un 39%. Pacientes con una proporción de de células CD44 positivas entre un 40 y un 100%. El dintel del 40% de positividad para CD44 en las muestras de linfoma se estableció a partir del porcentaje de corte de máxima discriminación pronóstica de los pacientes en análisis bivariante previo al análisis estadístico definitivo de los datos de la tesis doctoral. Ésta es la variable que predominantemente se ha utilizado para el análisis estadístico.

- Intensidad de expresión para CD44: es una variable ordinal que refleja la intensidad de expresión de CD44. Para ello, cada muestra se comparó simultáneamente con su control amigdalár de tinción. Así, se consideró una tinción positiva de la muestra tumoral, si su intensidad de expresión era similar al control positivo amigdalár. Por otro lado, se consideró una tinción negativa cuando la intensidad de la muestra tumoral era similar a su control negativo amigdalár. Esta forma de analizar la intensidad de expresión de CD44 nos permitió además identificar 2 grados más de intensidad antigénica. Así, cuando la expresión de CD44 en la muestra tumoral era mayor que la observada en el

control positivo amigdalario, se consideró como positivo intenso, de la misma forma, si la intensidad de tinción tumoral era menor que la observada en el control positivo amigdalario y mayor que en el control negativo, se consideró como positivo débil.

- Grupos de intensidad de expresión CD44: variable dicotómica obtenida de la reclasificación de los pacientes en función de la intensidad de expresión de CD44 considerando dos grupos de intensidad: negativo y débil positivo vs positivo y positivo intenso. Esta es la variable que predominantemente se ha utilizado para el análisis estadístico.

- Expresión de CD44v6: variable dicotómica que clasifica los pacientes valorando la positividad vs negatividad de la tinción para dicho antígeno. No se consideró realizar una valoración del porcentaje de células teñidas ni de la intensidad de tinción.

5.1.2.7.- Variables citométricas:

- Índice de DNA: variable cuantitativa que recoge el valor del índice de DNA a partir del análisis del histograma citométrico del estudio del contenido en ADN de las muestras de los pacientes. Se define como Índice de DNA al cociente entre la moda del pico G0G1 de la población problema y la moda del pico G0G1 del control (en %).

- Presencia de aneuploidía: variable dicotómica que recoge la presencia o ausencia de población aneuploide en el estudio citométrico a partir del índice de DNA. Las muestras con índice de DNA iguales a 1,00 fueron consideradas diploides, mientras que las muestras con índice de DNA diferentes de 1,00 fueron consideradas aneuploides.

- Proliferación celular: Proporción de células en Fase S: variable cuantitativa que recoge la proporción de células en fase S identificadas a partir del análisis de los histogramas del contenido en DNA mediante un programa informático de las muestras de los pacientes. Mediante los programas informáticos para el análisis del ciclo celular a partir de los histogramas de ADN de las muestras de los pacientes se pueden distinguir varias fases: fase de reposo y fase de síntesis proteica y de RNA precoz (G0+G1), síntesis de material genético o DNA (fase S), y fase de nueva síntesis de proteínas y división celular (G2+M). Para el

estudio de la proliferación celular se ha considerado solo la proporción de células en fase S.

5.1.2.8.- Variable sobre la estrategia terapéutica y tolerancia al tratamiento:

- Tipo de tratamiento: variable cualitativa que recoge el tipo de estrategia terapéutica empleada. Los pacientes en que el diagnóstico se obtuvo de piezas quirúrgicas con una mortalidad postoperatoria que impidió adoptar una actitud terapéutica y en los que por motivos diversos, se realizó únicamente un tratamiento paliativo quimioterápico, todos ellos con una supervivencia inferior a un mes, se han excluido del estudio de respuesta al tratamiento y evolución (n=13).

En los pacientes en que el tratamiento se realizó con la intención de conseguir una remisión del LNH, la variable se ha codificado en tres categorías: poliquimioterapia con antraciclínicos, poliquimioterapia sin antraciclínicos, y cirugía con o sin radioterapia concomitante y sin quimioterapia asociada.

- Tolerancia al tratamiento: variable cualitativa que desde el punto de vista clínico global valora la toxicidad clínica y biológica del tratamiento (granulopenia, síndrome febril post-tratamiento y efectos tóxicos). Esta variable no se ha incluido en el análisis estadístico.

5.1.2.9.- Variables de respuesta al tratamiento:

- Respuesta al tratamiento: variable ordinal que valora la respuesta al tratamiento que se clasifica en:

- Remisión completa: desaparición de todos los síntomas con normalización biológica y radiológica.

- Remisión parcial: desaparición de síntomas, signos biológicos o alteraciones radiológicas pero con persistencia de alguno de ellos.

- No respuesta: la persistencia de los síntomas clínicos, biológicos y/o radiológicos.

- Obtención de remisión completa tras el tratamiento: la respuesta al tratamiento se recodificó en una nueva variable cualitativa dicotómica que clasifica a los pacientes en función de la respuesta al tratamiento en dos grupos: pacientes que consiguieron la remisión completa frente al resto de los pacientes (remisión

parcial o no respuesta). Ésta es la variable que predominantemente se ha utilizado para el análisis estadístico.

- Recaída tras el tratamiento: variable cualitativa dicotómica que clasifica a los pacientes, que consiguieron la remisión completa, en función de la posterior recidiva del linfoma. Se consideró recaída la reaparición, tras remisión completa, de nueva sintomatología o alteraciones en pruebas complementarias sugestivas de la reaparición de la enfermedad linfomatoso. Las categorías de la variable consideradas fueron presencia o ausencia de recaída.

5.1.2.10.- Variables sobre evolución del paciente:

- Estudio de la supervivencia

Tiempo de supervivencia: variable numérica que recoge el tiempo en meses desde el diagnóstico del linfoma hasta el fallecimiento del paciente, cierre del estudio o, en caso de pérdida de seguimiento o retirada del paciente del estudio, hasta la última fecha en que se dispone de información sobre el mismo.

Fallecimiento: variable cualitativa que recoge si el paciente en el momento del cierre del estudio ya ha fallecido o no por causa del linfoma. Aquellos casos en que se desconoce esta información son considerados como perdidos para el estudio de supervivencia. La variable se ha considerado en tres categorías: pacientes muertos, pacientes vivos y pacientes perdidos. Estos dos últimos, para el estudio de supervivencia, se consideran pacientes retirados con tiempos de seguimiento incompleto.

- Estudio de progresión

Para el estudio de progresión sólo se han tenido en cuenta los pacientes que consiguieron una remisión completa del linfoma tras el tratamiento. Se ha considerado una progresión de la enfermedad la aparición de recidiva.

- El tiempo libre de enfermedad: variable numérica que recoge el tiempo en meses desde la obtención de la remisión completa hasta la aparición de recidiva del linfoma. En caso de pérdida de seguimiento o retirada del paciente del estudio, sin aparición de recidiva de la enfermedad, se considera la fecha desde la obtención de la remisión completa hasta la última fecha en que se dispone de información sobre el paciente.

- Recidiva: variable cualitativa que recoge si el paciente que ha obtenido una remisión completa tras el tratamiento, en el momento del cierre del estudio ya ha presentado recidiva del linfoma. Aquellos casos que se desconoce esta información son considerados como perdidos para el estudio de progresión. La variable se ha considerado en tres categorías: pacientes en recaída, pacientes que continúan en remisión completa y pacientes perdidos. Estos dos últimos, para el estudio de progresión, se consideran pacientes retirados con tiempos de seguimiento incompleto.

5.2.- Métodos y técnicas

Con los bloques anatomopatológicos se realizan diferentes cortes. Uno de 50 μm para citometría de flujo y varios (4-5) de 5 μm de espesor que se depositan en portas para su empleo en las técnicas de inmunohistoquímica.

Los procedimientos técnicos de laboratorio que hemos utilizado en nuestro estudio se describen a continuación de forma detallada:

5.2.1.- Citometría de Flujo:

5.2.1.1.- Obtención y tinción de la suspensión nuclear a partir de muestra parafinada:

a.- Obtener secciones de tejido tumoral parafinado de 50 μm de grosor mediante un microtomo adecuado.

b.- Identificar y desparafinar las secciones (1 o 2 secciones) sumergiéndolas en tubos de cristal con 10 mililitros de xilol durante 10 minutos. Decantar y repetir el paso con otros 10 mililitros de xilol. Decantar y eliminar los restos de xilol con lavados con alcohol absoluto.

c.- Rehidratar sumergiendo sucesivamente las secciones en 5 mililitros de:

Etanol 100 %: durante 5 minutos

Etanol 95 %: durante 5 minutos

Etanol 90 %: durante 5 minutos

Etanol 70 %: durante 5 minutos

Etanol 50 %: durante 10 minutos

Agua destilada: durante un mínimo de 10 minutos.

En este punto, si es necesario, se puede parar el procedimiento durante 24 horas.

d.- Decantar el agua y disgregar las secciones mecánicamente con ayuda de unas tijeras o bisturí.

e.- Incubar con 4 mililitros de una disolución de pepsina (Pepsin, Sigma, P-7012) al 0,5 % en cloruro sódico al 0,9% en agua destilada, el pH se debe ajustar a 1,5. La incubación se realizará en baño a 37 grados y durante 30-45 minutos, realizando cada 10-15 minutos agitaciones con vórtex.

f.- Centrifugar 10 minutos a 2.000 rpm., decantar y resuspender con suero fisiológico o PBS.

g.- Filtrar con una malla de nylon de 50 μm de poro (Maisa) sobre tubos. El filtrado se realiza para remover agregados celulares y tejido insuficientemente disgregado que pudieran obstruir la cámara de flujo del citómetro.

h.- Determinar la concentración de suspensión de núcleos. Ajustar a un máximo de 20.000-30.000 células/ μl .

i.- Centrifugar, decantar e incubar el botón con 2 mililitros de solución de yoduro de propidio y RNAasa (DNA-prep Stain, Izasa-Coulter, PN 6604451). Incubar a temperatura ambiente y en oscuro durante 30-45 minutos.

j.- Leer por el citómetro de flujo.

5.2.1.2.- Controles:

Se someten a igual procedimiento secciones de ganglio no tumoral; sirven para determinar el canal de diploidía en el histograma de DNA y comprobar la calidad del histograma obtenido. Además se emplean hematíes de pollo como control adicional de ploidía (Chicken Erythrocyte Nuclei, Izasa-Coulter, PN 6604453).

5.2.1.3.- Lectura de las muestras:

La lectura de las muestras desparafinadas, disgregadas y teñidas con yoduro de propidio por el citómetro de flujo: durante el procesamiento anterior, los núcleos

han adquirido determinada cantidad de fluorocromo en proporción a su contenido en DNA. Con el citómetro de flujo vamos a medir de una manera rápida y objetiva la fluorescencia que emiten los núcleos. A partir de los histogramas obtenidos se realiza el análisis de ploidía y de las fases del ciclo celular.

5.2.1.4.- Citómetro de flujo:

Se ha empleado un EPICS PROFILE I (Izasa-Coulter) implementado con el paquete "Power Pack" (cuarto fotomultiplicador, histogramas logarítmicos de cuatro décadas, discriminador de señal de pico), lo que equivale a convertir el PROFILE I a PROFILE II (más otro fotomultiplicador).

Se ha creado un test específico para la lectura de las muestras de linfoma. Los valores por defecto del test son los siguientes:

Volumen de muestra aspirada: 190 µl.

Velocidad de inyección de la muestra: 10 µl/minuto (velocidad baja).

Presión del fluido de arrastre: 7,50 psi.

Potencia del láser: 15 mW.

Voltajes de los fotomultiplicadores: SS: 400 V, FL3: 725 V.

No hay compensación de color al trabajar con una única fluorescencia.

Parámetros seleccionados: LSS, LFS, FL3P, FL3, LFL3 (dada la configuración óptica del citómetro, la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio se recoge en el tercer fotomultiplicador).

Ventanas de adquisición: No activadas; FL3: 102-1023, FL3P: 144-1023. Resto: 0-1023.

Ganancias: FL3 =1/2 FL3P. Resto: 1.

Discriminadores: para FL3 en el canal 50.

Parada a los 50.000 eventos.

Regiones amorfas (bitmaps) de adquisición: FL3-FL3P: para discriminación de dobletes. LSS-LFS: adquisición en función de tamaño y complejidad celular.

Histogramas: cuatro histogramas: uno biparamétrico: LSS-LFS, tres monoparamétricos: FL3 (uno sin bitmaps activados, otro activando bitmap de LSS-LFS, y otro activando bitmap de LF3-FL3P. Histograma biparamétrico de FL3 y LFS para comprobar la calidad de la tinción (independencia del canal de FL3 y tamaño nuclear).

Almacén de los resultados en forma de histogramas y en modo lista en un diskette.

Los valores por defecto son modificables en función de la posición del canal de ploidía del control (que se situará alrededor del canal 175-200 en un histograma de 1024 canales), posición de las poblaciones en los citogramas y velocidad de lectura de eventos (velocidad de paso de la muestra).

5.2.1.5.- Alineamiento del citómetro:

Antes de proceder a la lectura de las muestras, se ha realizado una calibración del alineamiento del sistema, con bolas fluorescentes de látex (DNA-check, EPICS alignment fluorespheres for optical alignment of flow cytometers, Izasa-Coulter, PN 6603488).

5.2.1.6.- Lectura por el citómetro de flujo:

Una vez teñidas las muestras, estas son analizadas por citometría de flujo mediante el test definido. La adquisición de los datos se realiza tras 60 segundos de inicio de paso de muestra para que se establezca el flujo. Se adquieren aproximadamente un total de 50.000 eventos.

5.2.1.7.- Interpretación de los resultados de la lectura por citometría de flujo:

a.- Histogramas monoparamétricos del contenido en DNA: resultado de la lectura por citometría de flujo de las muestras de linfoma teñidas con yoduro de propidio se obtienen histogramas monoparamétricos con la distribución de fluorescencia proporcional al contenido en DNA de los núcleos analizados. Para la correcta cuantificación de las fases G0G1, S y G2M se ha empleado un programa informático específico para análisis del ciclo celular (MULTICYCLE, Phoenix Flow Systems, 6414566). El programa, mediante procedimientos matemáticos, es capaz de realizar la sustracción de la señal debida a núcleos cortados y permite, en el casos de existir una población aneuploide, el cálculo del índice de

DNA y las fases del ciclo celular de las células normales y del de las aneuploides.

En la lectura por citometría de flujo de las muestras, en el histograma biparamétrico de dispersión frontal y lateral de luz, se seleccionaron los eventos correspondientes a núcleos celulares; y en el histograma biparamétrico de señal fluorescente de pico y área, los eventos correspondientes a células aisladas (no dobletes ni agregados celulares). Los eventos que se encontraban en las dos regiones de selección mencionadas se representaron en un histograma de 1024 canales de fluorescencia (contenido en DNA). En cualquier caso, se adquirió parte de la señal producida por núcleos cortados para una correcta sustracción de señal producida por los mismos a lo largo de todo el histograma por los modelos matemáticos del software de análisis.

5.2.1.8.- Análisis de los histogramas del contenido en DNA mediante el programa informático:

a.- Selección de los histogramas.

b.- Identificación de la presencia de uno o más picos correspondientes a células en fase G0G1. En caso de aparecer un solo pico se considera un histograma diploide y si aparecen más de uno, un histograma con presencia de aneuploidía (dos ciclos celulares). En el caso de aneuploidía se ha considerado como pico diploide aquel más cercano al canal del control de referencia de linfocitos normales.¹⁷⁶

c.- Selección del modelo matemático para el cálculo del índice de DNA y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (fase G0G1, fase S y fase G2M). Modelo para el cálculo de la Fase S: polinomial de un grado con sustracción de núcleos cortados.

d.- El programa, por interacciones múltiples hasta obtener los valores mejor ajustados al histograma y con menor error, calcula: 1) en los histogramas diploides el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular y 2) en los histogramas con aneuploidía el índice de DNA y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular para cada una de las poblaciones (diploide y aneuploide).

5.2.1.9.- Variables del estudio por citometría de flujo:

a.- Estudio del contenido en DNA y fases del ciclo celular:

En cada caso, se han recogido las siguientes variables cuantitativas: en caso de existir un único pico de fase G0G1: se considera una muestra diploide y se recoge: 1) canal medio del pico G0G1, 2) CV del pico G0G1, 3) porcentaje de células en fase G0G1, 4) porcentaje de células en fase S, 5) canal medio del pico G2M, 6) CV del pico G2M y 7) porcentaje de células en fase G2M; 8) el índice de DNA se considera de 1,00; en caso de existir dos o más picos G0G1: se considera la presencia de aneuploidía y se recoge: 9) canal medio del pico G0G1 diploide de referencia, 10) CV del pico G0G1 diploide, 11) porcentaje de células en fase G0G1 de la población diploide, 12) porcentaje de células en fase S de la población diploide, 13) canal medio del pico G2M diploide, 14) CV del pico G2M diploide, 15) porcentaje de células en fase G2M de la población diploide, 16) canal medio del pico G0G1 aneuploide, 17) CV del pico G0G1 aneuploide, 18) porcentaje de células en fase G0G1 de la población aneuploide, 19) porcentaje de células en fase S de la población aneuploide, 20) canal medio del pico G2M aneuploide, 21) CV del pico G2M aneuploide, 22) porcentaje de células en fase G2M de la población aneuploide y, por último, el 23) índice de DNA de la muestra aneuploide.

5.2.2.- Inmunohistoquímica:

Todas las muestras han sido procesadas para su inmunofenotipaje.

Unas 60 muestras correspondientes al periodo más antiguo debían ser revisadas en cuanto a diagnóstico. Para ello, las muestras se reanalizaron por dos patólogos para establecer su diagnóstico y uniformizar los datos con el resto de la serie. Se ha empleado la clasificación de la "Working Formulation" y además se procesaron para los mismos anticuerpos monoclonales y la misma técnica, para determinar su inmunofenotipaje B o T, como el resto de la serie.

5.2.2.1- Apoptosis:

Para el estudio de la apoptosis se realizó la puesta a punto de la técnica de Sgonc aplicada a cortes histológicos de 4-5 μm sobre portas mediante el kit de "In Situ Cell Death Detection, AP"[®] Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica (cat.1684809), D-68298 Mannheim. Germany.¹⁷⁷

Principio técnico:

Se trata de detectar la muerte celular en un estadio muy precoz mediante un procedimiento de inmunohistoquímica, con un posterior análisis en un

microscopio óptico para visualizar la presencia de la reacción mediante un sustrato. El parámetro que se analiza es la detección de roturas de DNA en células fijadas y parafinadas.

Durante la apoptosis, antes de que se produzcan los cambios morfológicos que permiten reconocer el fenómeno, se producen roturas en el DNA genómico que dan lugar tanto a fragmentos de DNA de bajo peso molecular (mono y oligonucleosomas) como fragmentos de alto peso molecular, dejando hebras rotas de DNA ("nicks"). Estas se pueden identificar marcando los radicales libres 3'OH terminales, mediante una reacción enzimática, usando la terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). La TdT cataliza la polimerización de los nucleótidos con terminales 3'OH, lo cual se conoce como TUNEL (TdT mediated dUTP nick end labeling).

La fluoresceína incorporada en la reacción de TUNEL se detecta por un anticuerpo anti-fluoresceína. Este anticuerpo son fragmentos Fab, obtenidos de oveja, y conjugados con fosfatasa alcalina. Después de poner los tejidos en reacción con el sustrato, las células teñidas pueden ser leídas al microscopio óptico.

Procedemos a describir la técnica por pasos sucesivos:

a.- Desparafinado y rehidratación: Los cortes histológicos se someten a 60 °C durante 45 a 120 minutos. Posteriormente se someten a pases sucesivos por cubetas con las siguientes mezclas y en este orden:

Xilol con cuatro cambios de 7 minutos

Etanol 100 % tres cambios de cinco minutos

Etanol 80 % de 5 minutos

Etanol 70 % de 5 minutos

Etanol 50 % de 5 minutos

Agua bidestilada tres lavados de 5 minutos.

En cada cambio se agitan bien las preparaciones para obtener un buen lavado. Las extensiones procesadas en B5, una vez finalizado este proceso, deben sumergirse 2 minutos en solución de yodo al 0,5 % y otros dos minutos en solución de tiosulfato sódico al 5 %, para nuevamente lavar con agua destilada.

b.- Tratamiento enzimático: Se incuban los cortes con una solución de proteinasa K, preparada con 20 µg/ml en 10 mM Tris/ClH, pH 7,4 a 8, durante 15 minutos a 37 °C. Acto seguido se realizan dos lavados con PBS de 5 minutos.

c.- Marcaje: Secar cuidadosamente el porta alrededor de donde se encuentra el tejido o muestra a estudiar, dibujando un círculo a su alrededor con pintura laca de uñas para evitar el derramamiento de reactivo.

Preparación del reactivo TUNEL: sacar 100 µL de la botellita del kit nº 2 para controles negativos, añadiendo al resto (450 µL) las 50 µL de la botella nº 1 y está listo para usar en diez muestras y dos controles negativos. Su preparación es inmediatamente antes de su uso y se conserva en frío hasta la dispensación.

Se añaden 50 µL del TUNEL preparado a la muestra colocando encima un cubreobjeto para homogeneizar y evitar la evaporación del reactivo.

Se realiza una incubación en cámara húmeda a 37 °C durante 60 minutos y acto seguido se realiza lavado con PBS por tres veces. En este momento, el proceso, es susceptible de lectura con microscopía de fluorescencia para observar si funciona el marcaje.

d.- Secundario y revelado: Secar cuidadosamente alrededor de la zona de estudio y añadir 50 µL de Converter-AP, incluido en el kit, cubriendo como en el proceso anterior e incubando en cámara húmeda a 37 °C durante 30 minutos. El reactivo Converter está listo para ser usado teniendo la precaución de guardarlo a 4 °C una vez descongelado y se debe tener en cuenta que no puede ser congelado de nuevo.

Al sacar las muestras de la cámara húmeda, se lavan tres veces con PBS y acto seguido se añade entre 50 a 100 µL de solución de solución de substrato (Alk. Phosphatase Chromogen Kit. Fast Red Tablets. BIOMEDIA 800-341-8787, Foster City CA, USA), incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, nuevamente se realizan tres lavados con PBS y se procede a contrastar con hematoxilina acuosa de Mayer's durante 20 segundos.

El montaje final se realiza con medio de montaje acuoso: Aquatex® (Merck) y con un cubreobjeto.

Controles: En cada serie se realizan dos controles negativos de la forma indicada en la técnica y un control positivo, para el que hemos utilizado cortes de amígdala normal.

Cuantificación al microscopio: La lectura se ha realizado en un microscopio óptico Leitz, con un objetivo de inmersión en aceite de 100 aumentos, aprovechando la retícula para fotografía del ocular que mediante la regla Ernst Leitz GmbH Wetzlar® mide un campo predeterminado de 0,09mm x 0,13mm o, lo que es lo mismo, una superficie real de 0,0117 mm². En dicha superficie se cuentan los núcleos correspondientes a tejido linfomatoso negativos para apoptosis, teñidos de azul y los positivos, teñidos de rojo. Para estos últimos, en caso de duda se valora la morfología y sólo se consideran células apoptóticas si la morfología de las mismas puede corresponder a células en apoptosis. En ningún caso se valoraron tinciones citoplasmáticas o de células ajenas a la proliferación linfomatosa.

Para realizar un barrido suficiente del tejido se fijó como objetivo realizar un conteo de al menos 15.000 núcleos para cada extensión.

Todos los contajes han sido realizados y cuantificados por el mismo observador, introduciendo como control interno diez extensiones al azar contadas por dos observadores para valorar la fiabilidad del sistema. En caso de discrepancia significativa las muestras se revisaron conjuntamente por los dos observadores. La variable que se ha empleado en el estudio ha sido la expresión del resultado de la proporción de núcleos en apoptosis por cada 1000 células linfomatosas.

5.2.2.2.- Homing (CD44 y CD44v6):

Para poner de relieve la presencia de los marcadores de superficie celular que confieren las características de Homing hemos utilizado anticuerpos dirigidos contra los epítomos adecuados, tanto de CD44 como de su variante CD44v6.

Técnica. Procedemos a describir la técnica por pasos sucesivos:

a.- Desparafinado y rehidratación: Los cortes histológicos se someten a una temperatura de 60°C durante 24 horas. Posteriormente se someten a pases sucesivos por cubetas con las siguientes mezclas y en este orden:

Xilol con cuatro cambios de 7 minutos

Etanol 100 % tres cambios de 5 minutos

Etanol 80 % de 5 minutos

Etanol 70 % de 5 minutos

Etanol 50 % de 5 minutos

Agua bidestilada tres lavados de 5 minutos.

En cada cambio se agitan bien las preparaciones para obtener un buen lavado.

b.- Desmascaramiento por calor: Mientras se rehidratan los cortes preparar 2 litros de Buffer Citrato 0.01M mezclando 3.84 gr de ácido cítrico en 1.8 litros de agua bidestilada y ajustar el pH a 6. Calentar el Buffer con una olla exprés, cuando empiece la ebullición poner los cortes y tapar la olla.

Una vez llegue a la máxima potencia apagar el hornillo y esperar 3 minutos, transcurrido ese tiempo pasar la olla por debajo del grifo para eliminar el exceso de presión y poder abrirla.

Dejar que se atempere durante 20 minutos. Pasados los 20 minutos lavar los cortes en agua destilada agitando los portas y dos lavados por 5 minutos en PBS.

Secar cuidadosamente el porta alrededor de donde se encuentra el tejido o muestra a estudiar y incubar los cortes con Peróxido de Hidrogeno 3% por 5 minutos a temperatura ambiente. Lavar con PBS dos veces por 5 minutos.

c.- Marcaje:

Diluir el anticuerpo a la dilución de trabajo que, en nuestro caso, es de 1/100 para el anti-CD44 y de 1/50 para el anti-C44v6. Secar cuidadosamente el porta alrededor de donde se encuentra el tejido y depositar cuidadosamente 100µL de anticuerpo sobre el corte procurado recubrirlo en su totalidad. Dejar incubar 1 hora a temperatura ambiente.

Pasado el periodo de incubación lavar dos veces en PBS durante 5 minutos.

Secar cuidadosamente el porta alrededor de donde se encuentra el tejido y disponer 2 gotas del link biotinilado del kit LSAB♥DAKO dejar incubar 15 minutos a temperatura ambiente.

Lavar dos veces en PBS por 5 minutos y secar cuidadosamente el porta alrededor de donde se encuentra el tejido agregar 2 gotas de Estreptavidina del kit LSAB♥DAKO, dejar incubar 15 minutos a temperatura ambiente.

Lavar dos veces con PBS durante 5 minutos y secar cuidadosamente el porta alrededor de donde se encuentra el tejido.

d.- Contrastado: Preparar el cromógeno DAB y disponer 2 gotas encima del tejido dejar incubar en la cámara húmeda entre 5 y 10 minutos hasta apreciar el viraje de color. Contrastar con Hematoxilina de Mayer.

e.- Contaje: Se realiza un contaje cualitativo de la muestra debido a que el patrón de tinción de los marcadores de Homing es específico de membrana. El análisis cualitativo supone un trabajo sujeto a la valoración subjetiva del observador, por esa razón, dos observadores realizaron el contaje de las muestras de manera aislada y una vez obtenidos los resultados estos son revisados por un tercer observador.

En nuestro estudio realizamos un análisis de la expresión de CD44. Para analizar la intensidad de expresión de CD44, cada muestra se comparó simultáneamente con su control amigdalario de tinción. Así, se consideró una tinción **positiva**, de la muestra tumoral, si su intensidad de expresión era similar al control positivo amigdalario. Por otro lado, se consideró una tinción **negativa** cuando la intensidad de la muestra tumoral era similar a su control negativo amigdalario. Esta forma de analizar la intensidad de expresión de CD44 nos permitió además identificar 2 grados más de intensidad antigénica. Así, cuando la expresión de CD44 en la muestra tumoral era mayor que la observada en el control positivo amigdalario, se consideró como **positivo intenso**, de la misma forma, si la intensidad de tinción tumoral era menor que la observada en el control positivo amigdalario y mayor que en el control negativo, se consideró como **positivo débil**.

Por otro lado intentamos objetivizar lo máximo posible la interpretación de la cantidad de células positivas en cada muestra, independientemente de su intensidad de tinción. Se diseñó un registro fotográfico de las muestras tumorales sobre las que se aplicó un programa informático de tratamiento imagen, que permitió distinguir sobre la muestra tumoral aplicando una escala de grises, las zonas teñidas por el anticuerpo de las no teñidas. Posteriormente, aplicando otro

programa informático que analizaba cada píxel, pudimos calcular el porcentaje de células teñidas en cada muestra. Los resultados obtenidos se compararon con la realizada por dos observadores que calcularon el porcentaje de células teñidas contando una parte representativa de las muestras.

Creemos que este diseño de conteo “semiinformático”, permite obtener unos resultados más fidedignos cuando se analizan muestras tumorales muy heterogéneas en su composición celular y con una gran variabilidad de expresión del antígeno dentro de la misma muestra.

Además de obtener unos resultados no supeditados a la subjetividad del observador, permite un análisis más rápido y se puede registrar como archivo informático con los datos analizados, que además, son fácilmente comparables con los de otros grupos de investigación.

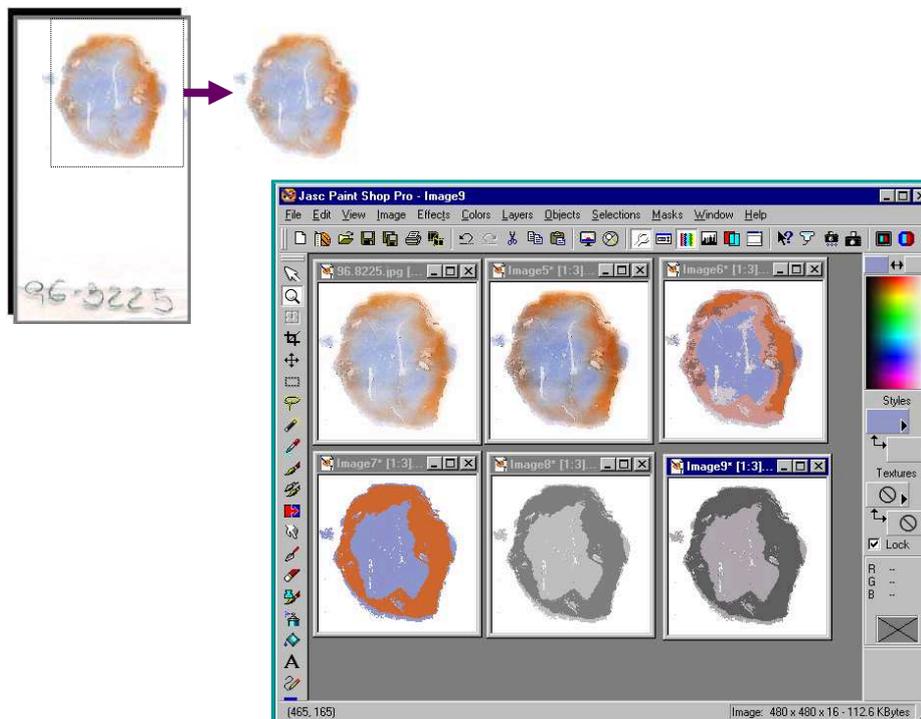
En este trabajo, los resultados obtenidos y los análisis estadísticos comparativos con las características clínicas y biológicas de los linfomas al diagnóstico, respuesta al tratamiento y evolución, se realizaron considerando dos grupos de intensidad de expresión de CD44 (negativo y débil positivo vs positivo y positivo intenso).

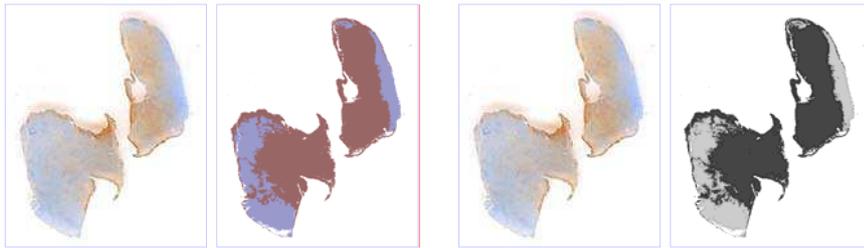
De la misma forma se consideró que el “cut off” que mejor discriminaba, a la hora de valorar el porcentaje de células que expresan CD44, fue del 40%. Así se diferencian pacientes con una expresión de CD44 \geq del 40% de las células de la muestra frente a pacientes con una expresión de CD44 $<$ del 40%.

En el análisis de expresión de CD44v6 únicamente se valoró la positividad vs negatividad de la tinción para dicho antígeno. No se consideró realizar una valoración del porcentaje de células teñidas ni de la intensidad de tinción.

El conteo de la proporción de células positivas para CD44 se realizó por parte de dos observadores que identificaron las zonas positivas y negativas para el marcaje inmunohistoquímico y la proporción que representaba la zona positiva sobre el total de la celularidad neoplásica. Con el fin de aumentar la objetividad de la variable, se empleó un sistema de conteo basado en un programa de tratamiento digital de imágenes diseñado para identificar superficies en función de escalas de grises y proporcionar mediciones sobre las distintas zonas identificadas (Scion Corporation).

Básicamente, el procedimiento empleado consiste en la digitalización de la muestra una vez teñida con CD44 y contrastada con hematoxilina. Resultado de la tinción, la muestra globalmente se tiñe con tonos azulados por la hematoxilina de Mayer, mientras que las zonas positivas se identifican por la tinción marrón de las células que expresan CD44. La muestra es digitalizada a alta resolución en color. Sobre esta imagen, se ha aplicado un filtro para aumentar el contraste y mejorar la discriminación de las zonas positivas y negativas. Posteriormente se ha realizado un procedimiento de recoloración, para convertir la imagen en color en una imagen con únicamente 16 tonos, y posteriormente, mediante reasignación manual de los colores afines, en una imagen de 3 colores, blanco en la zona donde no hay muestra, azul a partir de los tonos azulados de la celularidad negativa, y marrón a partir de la celularidad positiva con tonalidad marrón. Mediante un filtro, la imagen en 3 colores se ha reconvertido a una imagen en escala de grises, con dos tonos: un tono gris claro para la zona negativa y otro tono gris oscuro para la zona positiva. La digitalización de la muestras se ha realizado con un scanner de alta resolución y el tratamiento y retoque de las imágenes mediante el programa Paint Shop Pro (Jasc Software).





Las imágenes digitalizadas, tratadas informáticamente y convertidas en imágenes de grises se han procesado con el programa Scion Image (Scion Corporation) que permite identificar el número de píxeles (superficie) de toda la celularidad (zona con un color diferente del blanco) y el número de píxeles (superficie) de la zona con un tono más oscuro de la celularidad, mediante el establecimiento de un dintel de grises, que se corresponde con la celularidad positiva para CD44. Se asume que la superficie de una célula negativa y positiva es similar, por lo que, la razón entre la superficie de la zona CD44 positiva (zona gris oscuro) y la celularidad total (zona gris claro y gris oscuro) se corresponde a la proporción de células positivas de la muestra.



$$\frac{43999}{61053} = 72 \%$$

El resultado de la proporción obtenida por el sistema digital se ha contrastado con los resultados de los observadores. En el caso de una discrepancia inferior

al 10 por ciento, se ha consignado como variable la proporción de células CD44 positivas obtenida mediante el programa informático. En el caso de discrepancias, en la proporción de células CD44 positivas, superior a un 10 por ciento entre los observadores o con el programa, se ha procedido a revisar las muestras por los dos observadores de forma conjunta y al reanálisis para obtener un resultado de consenso, que es el que se ha recogido en la base de datos.

5.2.3.- Base de datos y tratamiento estadístico:

Recogida de datos:

Los datos referentes a las muestras analizadas se recogieron en unas hojas prediseñadas, conteniendo las variables a analizar. Se diseñaron dos hojas diferentes, una para los datos clínico-biológicos de los pacientes con linfoma, que incluía además el análisis de apoptosis, y otra hoja donde se incluyó el estudio de CD44 y CD44v6.

Las hojas de recogida de datos incluyen además información clínica y biológica considerada de interés para el diagnóstico y seguimiento posterior de los pacientes, pero que no se utilizó en el tratamiento estadístico posterior, por no constituir el objetivo principal de esta tesis.

Creación de base de datos:

Se diseñó una base de datos matricial e informatizada en la que se incluyeron los valores recogidos de cada uno de los pacientes con linfoma analizados, y que resultó de la fusión de las dos hojas de recogida de datos.

Se empleó un sistema de filas y columnas capaz de ser leído en el programa informático SPSS 12.0 para Windows. Los datos se introdujeron como dígitos alfanuméricos que en las variables cuantitativas representaban el valor de la variable y en las cualitativas una determinada categoría de las mismas.

Estudio estadístico de los resultados:

Una vez llevada a cabo la recogida de datos en las hojas diseñadas a tal fin, se procedió al procesamiento de los mismos. El empleo de uno u otro método estadístico depende del tipo de variables estudiadas y del cumplimiento de determinadas condiciones de aplicación de las pruebas. El nivel de significación se ha establecido para una $p < 0,05$.

Los métodos estadísticos utilizados más frecuentemente son los siguientes:

- Comparación de variables cualitativas y cuantitativas:

Para comparar entre dos grupos se utilizó la prueba de la t de Student, si se cumplían las condiciones de aplicación, y en caso contrario la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney. Para comparar más grupos se aplicó, si se cumplían las condiciones, el análisis de la varianza; si no se cumplían, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis.

- Comparación de variables cualitativas:

Para el estudio estadístico de la relación entre variables cualitativas se ha empleado una prueba de independencia de Chi cuadrado. Cuando los efectivos calculados eran cercanos a 5 y alguna de las variables tenía más de dos categorías se ha utilizado la prueba de Chi cuadrado con la corrección de Yates. Si los efectivos calculados eran inferiores a 5 o el número total de casos inferior a 20 en una tabla de 2x2 se ha empleado la prueba exacta de Fischer.

- Comparación de variables cuantitativas:

Para el estudio de relación entre variables cuantitativas se empleó la prueba de correlación divariada mediante el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman.

- Estudio multivariante:

Se aplicaron modelos de regresión logística múltiple para el estudio de la correlación de todas las variables que forman parte del diseño experimental.

- Estudio de series temporales:

Para el estudio de variables y series temporales se han confeccionado curvas de supervivencia según el método de Kaplan-Meier y se ha estudiado su relación con la prueba de Mantel-Haenszel.

6.- RESULTADOS

6.1.- Análisis Estadístico:

Desde 1975 hasta Octubre del 2000 han sido tratados en nuestro Servicio 219 pacientes con LNH. De ellos se dispone de todos los datos clínicos, información sobre respuesta al tratamiento y supervivencia. De la mayoría además se dispone de los datos biológicos necesarios.

Sin embargo, sólo en 196 pacientes se ha podido disponer de cortes histológicos suficientes para poder realizar el estudio de ploidía, proliferación celular y cuantificación de apoptosis por TUNEL.

6.2.- Estudio estadístico descriptivo:

6.2.1.- Variables demográficas:

La edad media de los pacientes (n=196) fue de 62,6 años y la mediana de edad fue de 65,0 años. La edad mínima fue de 15,0 y la máxima de 87,0 años.

Un 61,2 % (120) de los pacientes eran hombres y el restante 38,8% (76) eran mujeres.

La edad media de los hombres fue de 62,3 años (mínimo de 15,0 y máximo de 87,0 años), y la de las mujeres fue de 62,8 años (mínimo de 27,0 y máximo de 86,0). No hemos observado diferencias significativas entre la distribución de edad de los hombres y las mujeres ($p=0,823$)

6.2.2.- Datos clínico biológicos al diagnóstico:

De los 196 pacientes, 73 (37,3%) presentaron un linfoma de bajo grado según la WF, 63 (32,1%) un linfoma de grado intermedio, y 60 (30,6%) un linfoma de alto grado. El 86,1% (167) de los linfomas eran de inmunofenotipo B.

En 53,6% (105) de los linfomas eran de origen nodal, mientras que el 46,4% (91) fueron de origen extranodal.

Respecto al estadio de Ann Arbor, el 20,0% (39) eran estadio I, el 13,3% (26) eran estadio II, el 13,9% (27) eran estadio III, y el 52,8% (103) estaban en

estadio IV. En uno de los pacientes no se pudo completar el estadio por realizarse el diagnóstico de linfoma en la necropsia.

El tamaño medio del tumor en la serie fue de 7,6 cm de diámetro mayor.

Un 66,7% (130) de los pacientes no presentaban síntomas B en el momento del diagnóstico.

La distribución por ECOG fue siguiente: 34 (17,4%) ECOG 0, 75 (38,3%) ECOG 1, 53 (27,0%) ECOG 2, 32 (16,3%) ECOG 3, y sólo 2 pacientes presentaba un ECOG 4.

Los parámetros biológicos de ratios de LDH y β_2 microglobulina se muestran en la siguiente tabla:

	número	media	EE media	mediana	mínimo	máximo
r-LDH	196	1,197	0,074	0,795	0,06	6,91
r- β_2 -m	144	2,121	0,117	1,715	0,08	7,53

El IPI de los pacientes presentó la siguiente distribución: IPI 0: en 19 (9,7%) pacientes, IPI 1: 39 (20,0%) pacientes, IPI 2: 46 (23,6%) pacientes, IPI 3: 36 (18,5%) pacientes, IPI 4: 42 (21,5%) pacientes y IPI 5: 13 pacientes (6,7%).

De las muestras histológicas de las que se pudo realizar el estudio de apoptosis (188), se obtuvo una media de 2,92 células apoptóticas por mil células, con un error típico de la media de 0,32, una mediana de 1,41, un mínimo de 0,00 (16 casos) y un máximo de 32,60.

En 145 (76,7%) casos no se encontró anomalías (aneuploidía) en los estudio de contenido en ADN por citometría de flujo. De los 44 casos aneuploides, 4 eran tetraploides. El índice medio de ADN fue de 1,49, con un mínimo de 1,10 y un máximo de 2,09.

La fase S media de la serie global (n=189) resultó de 11,98%, con una mínimo de 1,10% y un máximo de 50,70% de células en fase S.

6.2.3.- Tratamiento y evolución:

De los 196 pacientes, en cinco pacientes el diagnóstico se obtuvo de piezas quirúrgicas con una mortalidad postoperatoria que impidió adoptar una actitud terapéutica y en ocho pacientes, por motivos diversos, se realizó únicamente un tratamiento paliativo quimioterápico. Estos 13 pacientes presentaron una

supervivencia inferior a un mes y se han excluido del estudio de respuesta al tratamiento y evolución.

Del total de 183 pacientes evaluables, 127 (69,4%) recibieron poliquimioterapia con antraciclínicos, 38 (20,8%) pacientes recibieron poliquimioterapia sin antraciclínicos, y los 18 restantes (9,8%) recibieron radioterapia y/o tratamiento quirúrgico sin quimioterapia asociada. Tras el tratamiento, 98 (53,5%) pacientes consiguieron una remisión completa, de los cuales sólo 34 (34,7% de los pacientes en remisión completa) recayeron de su linfoma. 75 (41,0%) pacientes alcanzaron una remisión parcial. El resto de pacientes, 10 en total, no presentaron una respuesta al tratamiento.

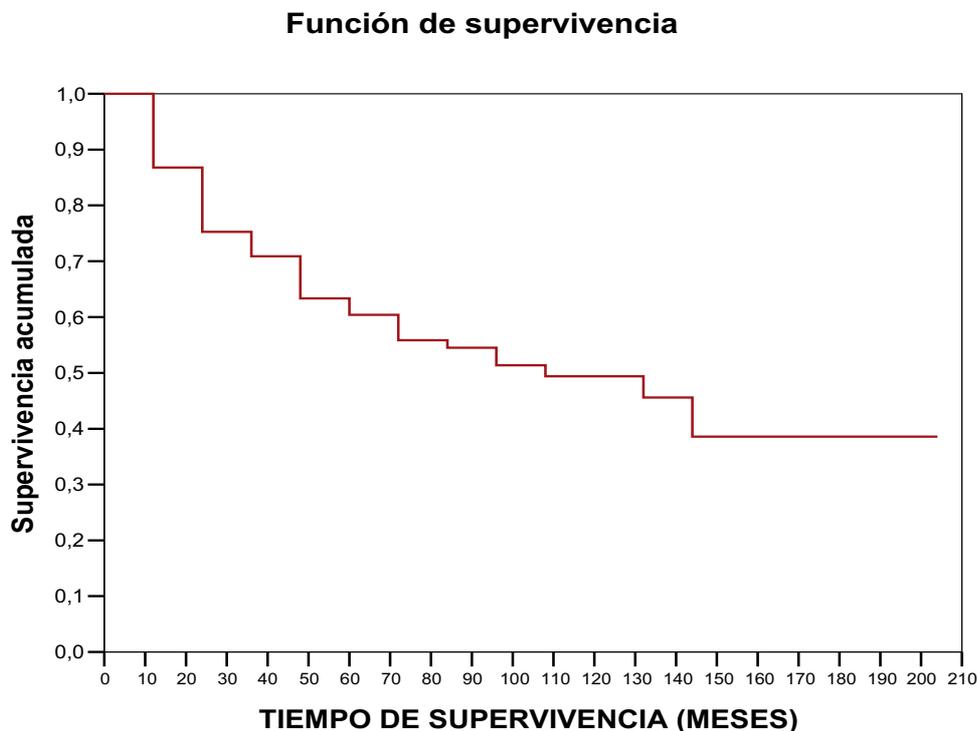
Al cierre del estudio, 82 pacientes permanecían vivos (44,8%), mientras que 69 (37,7%) pacientes habían fallecido por causas directamente relacionadas con su enfermedad. El resto, 32 pacientes, habían sido considerados como retirados. En el estudio de supervivencia no se han considerado los pacientes cuya supervivencia fue menor de un mes (n=13).

A continuación se muestra la tabla de vida del conjunto de pacientes estudiados:

Tabla de mortalidad

Momento de inicio del intervalo	Número expuesto a riesgo	Número de eventos terminales	Proporción que sobrevive	Proporción acumulada que sobrevive al final del intervalo	Densidad de probabilidad	Tasa de impacto	Error típico de tasa de impacto
0	174,000	23	,87	,87	,011	,01	,00
12	135,500	18	,87	,75	,010	,01	,00
24	103,500	6	,94	,71	,004	,00	,00
36	84,500	9	,89	,63	,006	,01	,00
48	64,500	3	,95	,60	,002	,00	,00
60	53,000	4	,92	,56	,004	,01	,00
72	42,500	1	,98	,55	,001	,00	,00
84	34,500	2	,94	,51	,003	,00	,00
96	26,000	1	,96	,49	,002	,00	,00
108	19,500	0	1,00	,49	,000	,00	,00
120	13,000	1	,92	,46	,003	,01	,01
132	6,500	1	,85	,39	,006	,01	,01
144	3,000	0	1,00	,39	,000	,00	,00
156	1,500	0	1,00	,39	,000	,00	,00
168	1,000	0	1,00	,39	,000	,00	,00
180	1,000	0	1,00	,39	,000	,00	,00
192	,500	0	1,00	,39	,000	,00	,00

El gráfico de supervivencia acumulada por intervalos anuales se muestra a continuación:



6.3.- Estudio estadístico analítico bivalente sobre la serie de pacientes en que se ha estudiado la apoptosis y el contenido en DNA:

6.3.1.- Relación entre las variables demográficas y de presentación clínica del linfoma:

Como se observa en la siguiente tabla, no hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la edad o el sexo respecto al ECOG, grado histológico, presencia de enfermedad nodal o extranodal, estadio de Ann Arbor.

		Edad		sexo			
		sujetos	media	<i>p</i>	hombre	mujer	<i>p</i>
ECOG	0	34	58,18	0,236	20	14	0,891
	1	75	63,31		46	29	
	2	53	64,68		31	22	
	3	32	61,09		22	10	
	4	2	75,00		1	1	
Grado histológico	bajo	73	64,21	0,465	43	30	0,583
	medio	63	62,14		37	26	
	alto	60	60,95		40	20	

		Edad			sexo		
		sujetos	media	p	hombre	mujer	p
LNH	Nodal	105	62,69	0,892	62	43	0,502
	Extranodal	91	62,38		58	33	
Estadio	I	39	59,90	0,466	22	17	0,814
	II	26	61,81		17	9	
	III	27	60,74		18	9	
	IV	103	64,05		62	41	
Aneuploidía	No	145	61,49	0,167	89	56	0,999
	Si	44	65,09		27	17	

6.3.2.- Relación entre las variables demográficas y los resultados de apoptosis, fase S y aneuploidía:

No se ha observado una correlación significativa entre la edad y los valores de apoptosis o proliferación celular (fase S) en las muestras histológicas de linfoma ($r = -0,093$, $p = 0,204$ y $r = -0,092$, $p = 0,206$ respectivamente). El estudio del contenido de DNA no mostró una diferencia significativa con la edad ($p = 0,167$) ni con el sexo ($p = 0,999$).

La apoptosis media en los hombres fue de 2,81 por mil y en las mujeres de 3,08. La fase S en los hombres fue de 12,13% y en las mujeres 11,50%. No hemos encontrando diferencias significativas entre hombres y mujeres respecto a las cifras de apoptosis ($p = 0,684$) y la fase S ($p = 0,649$).

6.3.3.- Relación entre las variables demográficas y la respuesta al tratamiento y evolución:

No hemos encontrado diferencias significativas entre las distribuciones de edad y sexo de los pacientes en función de la respuesta al tratamiento o recaída de su enfermedad.

		edad			sexo		
		sujetos	media	p	hombre	mujer	p
Respuesta	RC	98	60,29	0,126	61	37	0,251
	RP	75	64,63		41	34	
	NR	10	57,50		8	2	
Recaída	No	64	57,89	0,067	37	27	0,214
	Sí	34	64,79		24	10	

La supervivencia media de los hombres no es significativamente diferente a la de las mujeres (supervivencia media en hombres: 80,37 meses vs mujeres: 121,65 meses; $p=0,141$).

En nuestra serie, encontramos que la edad está significativamente relacionada con la supervivencia global de la enfermedad. A mayor edad menor supervivencia ($\text{Exp}(B)= 1,02$, $p= 0,018$, cada año aumenta el riesgo de mortalidad por la enfermedad en un 2%).

6.3.4.- Relación entre las variables de presentación clínico-biológica del linfoma entre sí:

Se ha analizado la existencia de asociación entre las distintas variables clínicas entre sí. No se ha encontrado relación entre el grado histológico y el estadio ($p= 0,310$) ni la presencia de enfermedad extranodal ($p= 0,108$).

Únicamente, se ha objetivado que los linfomas extranodales se presentan más frecuentemente en un estadio localizado que los linfomas nodales (52,8% vs 16,3%; $p< 0,001$).

El estudio de la relación entre los valores de las ratios de LDH, beta-2-micro con las variables clínicas, se muestra en la siguiente tabla:

		r-LDH			r-beta-2-micro		
		n	media	<i>p</i>	n	media	<i>p</i>
grado histológico	bajo	73	0,86	0,002	58	1,89	0,253
	medio	63	1,36		42	2,34	
	alto	60	1,43		44	2,21	
estadio	I-II	65	0,82	<0,001	51	1,40	<0,001
	III-IV	130	1,39		92	2,50	
LNH extranodal	no	105	1,30	0,138	70	2,31	0,114
	sí	91	1,08		74	1,94	
IPI	0-2	104	0,75	<0,001	79	1,61	<0,001
	3-5	91	1,70		64	2,71	

EL IPI se ha agrupado en dos categorías, IPI Bajo (IPI de puntuación 0 a 2) e IPI Alto (IPI de puntuación de 3 a 5). Como se puede observar los linfomas de mayor grado histológico, estadio avanzado de presentación e IPI alto presentan una LDH significativamente mayor. De la misma forma, una β_2 microglobulina elevada se asoció de forma significativa con la presencia al diagnóstico de un linfoma en estadio avanzado o IPI alto.

6.3.5.- Relación entre las variables de presentación clínica del linfoma y los resultados de apoptosis, fase S y aneuploidía:

En la siguiente tabla se detalla el estudio sobre la relación entre las variables clínico-biológicas y el resultado de la cuantificación de la apoptosis en las muestras de linfoma. Como se observa, hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre el grado y la presencia de enfermedad extranodal con el índice de apoptosis; la apoptosis aumenta a medida que se incrementa el grado histológico del LNH, y es superior en los LNH extranodales.

		Índice de apoptosis (por mil)			
		n	media	DS	p
Grado histológico	bajo	67	1,85	3,75	0,004
	medio	63	2,71	2,84	
	alto	58	4,39	5,70	
LNH	Nodal	103	2,09	3,43	0,003
	Extranodal	85	3,93	5,03	
Estadio	I-II	58	3,64	4,15	0,128
	III-IV	129	2,60	4,38	
Síntomas B	No	122	2,92	4,18	0,964
	Sí	65	2,94	4,63	
IPI	0-2	96	2,98	4,32	0,863
	3-5	91	2,87	4,36	

No se ha objetivado la existencia de correlación significativa entre las ratios de LDH y β_2 microglobulina con la apoptosis. Los coeficientes de correlación (y la p) han sido respectivamente: 0,006 (0,933) y -0,036 (0,675).

A continuación, se muestra el estudio sobre la relación entre las variables clínico-biológicas y el resultado de la cuantificación de la proliferación celular (porcentaje de células en fase S) en las muestras de linfoma.

En el estudio, hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre el grado de malignidad y la fase S, de modo que la fase S es superior en los LNH de alto grado.

		Proliferación celular: % Fase S			
		n	media	DS	p
Grado histológico	bajo	67	7,66	7,04	<0,001
	medio	63	11,86	8,22	
	alto	58	17,03	10,25	
LNH	Nodal	103	11,31	5,58	0,354
	Extranodal	86	12,57	8,91	
Estadio	I-II	61	12,40	9,89	0,610
	III-IV	127	11,66	9,03	
Síntomas B	No	124	11,36	9,54	0,271
	Sí	64	12,94	8,79	
IPI	0-2	100	12,25	10,12	0,581
	3-5	88	11,50	8,31	

Tampoco se ha encontrado una correlación significativa entre las ratios de LDH, β_2 microglobulina y la proporción de células en fase S. Los coeficientes de correlación (y la p) han sido 0,054 (0,459) y -0,072 (0,402) respectivamente.

La proporción de tumores aneuploides no muestra una relación estadísticamente significativa con las variables clínico-biológicas estudiadas.

No hemos encontrado ninguna relación significativa entre la cuantificación de la apoptosis, la fase S, la presencia de aneuploidía y la distribución del IPI en nuestra serie de pacientes (p= 0,863, p= 0,581 y p= 0,407 respectivamente).

6.3.6.- Relación entre las variables de presentación clínico-biológica y tratamiento del linfoma:

Como es de esperar, en nuestra serie de pacientes existe una relación entre el tipo de tratamiento administrado y la presentación del LNH en cuanto a su grado histológico, estadio y presencia de enfermedad extranodal. En este sentido, los pacientes con LNH de mayor grado histológico, estadios avanzados y enfermedad extranodal recibieron en mayor proporción combinaciones de quimioterapia que incluyó antraciclínicos.

		Tipo tratamiento		
		QT con antraciclínicos	QT sin antraciclínicos	Cirugía y/o RT sin quimioterapia
Grado histológico	bajo	33	26	11
	medio-alto	94	11	7
LNH	Nodal	62	29	6
	Extranodal	65	9	12
Estadio	I-II	39	9	15
	III-IV	88	30	3

6.3.7.- Relación entre las variables de presentación clínico-biológica y evolución del linfoma:

En el análisis de la relación entre las variables clínico-biológicas de los pacientes en el momento del diagnóstico y la respuesta al tratamiento, hemos encontrado que existe una relación estadísticamente significativa entre una mayor probabilidad de conseguir la remisión completa con el tratamiento y que el linfoma sea extranodal, se presente en estadios precoces (I-II), ausencia de síntomas B, IPI bajo.

También hemos observado que cifras más bajas de las ratios de LDH y de β_2 microglobulina se asocia de forma significativa con una mayor probabilidad de conseguir una respuesta completa.

		Respuesta al tratamiento			<i>p</i>
		Remisión completa	Remisión parcial	No respuesta	
Grado histológico	bajo	31	36	3	0,145
	medio	33	24	3	
	alto	34	15	4	
LNH	Nodal	37	54	6	<0,001
	Extranodal	61	21	4	
Estadio	I-II	55	6	1	<0,001
	III-IV	43	69	9	
Síntomas B	No	80	45	2	<0,001
	Sí	18	30	8	
ECOG	0	23	11	0	0,358
	I	41	31	3	
	II	24	21	5	
	III	10	11	2	
	IV	0	1	0	
IPI	0-2	72	30	1	<0,001
	3-5	26	45	9	

	n	LDH		n	b-2-m	
		media	<i>p</i>		media	<i>p</i>
RC	98	0,92	<0,001	77	1,82	0,017
RP	75	1,29		51	2,32	
NR	10	1,98		8	3,05	

Se ha analizado la existencia de relación entre la probabilidad de recaída del linfoma en función del grado histológico de malignidad, estadio, linfoma extranodal e IPI. Un resumen de los resultados, se muestra en la siguiente tabla:

		Recaída		<i>p</i>
		No	Sí	
Grado histológico	bajo	18	13	0,466
	medio	24	9	
	alto	22	12	
Estadio	I-II	41	14	0,030
	III-IV	23	20	
LNH extranodal	no	23	14	0,611
	sí	41	20	
IPI	0-2	49	23	0,341
	3-5	15	11	
Síntomas B	No	51	29	0,495
	Sí	13	5	
ECOG	0	18	5	0,297
	I	23	18	
	II	17	7	
	III	6	4	
	IV	0	0	

Como se muestra en la tabla, sólo se observa una relación estadísticamente significativa entre la recaída y el estadio al diagnóstico.

No hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre las ratios de LDH o β_2 microglobulina y la recaída ($p= 0,538$ y $p= 0,179$ respectivamente).

6.3.8.- Relación entre las variables de presentación clínico-biológica y la supervivencia:

En el análisis de supervivencia, se ha estudiado la relación entre las variables clínico-biológicas en el momento del diagnóstico y el pronóstico del LNH.

		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
Grado histológico	bajo	114,51	23	0,060
	medio	89,57	24	
	alto	85,47	22	
Estadio	I-II	115,51	13	<0,001
	III-IV	84,87	56	
Síntomas B	no	120,88	40	<0,001
	sí	62,69	29	

		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
ECOG	0	148,68	5	0,048
	I	91,28	29	
	II	80,95	22	
	III	68,28	13	
LNH extranodal	no	101,68	38	0,494
	sí	92,07	31	
IPI	0-2	134,25	26	<0,001
	3-5	60,41	43	

Como se puede observar, se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre una mayor supervivencia global y la presentación del linfoma en un estadio inicial, la ausencia de síntomas B, un ECOG bajo y un IPI bajo.

Tanto, la ratio de LDH, como de β_2 microglobulina presentan relación con la supervivencia en nuestra serie de pacientes ($p < 0,001$ y $p = 0,037$).

A continuación se expone el resultado del estudio de los tiempos libres de enfermedad con el grado histológico, estadio, presencia de enfermedad extranodal e IPI.

Los pacientes en estadios avanzados presentan un tiempo libre de enfermedad significativamente menores que los pacientes en estadios I-II.

		Tiempo libre enfermedad		
		t medio	muestrados/n	<i>p</i>
grado histológico	bajo	80,41	13	0,287
	medio	105,16	9	
	alto	95,01	12	
estadio	I-II	106,71	10	0,004
	III-IV	73,12	24	
LNH extranodal	no	88,34	14	0,452
	sí	94,37	20	
IPI	0-2	104,19	23	0,216
	3-5	62,34	11	

En el estudio, mediante modelos de regresión de Cox, de la relación entre los tiempos libre de enfermedad y los valores de las ratios de LDH y β_2 microglobulina, no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa. ($p = 0,406$ y $p = 0,254$ respectivamente)

6.3.8.- Relación entre los resultados de apoptosis, fase S y aneuploidía entre sí:

En el estudio inmunohistoquímico de muerte y proliferación celular, se ha analizado la existencia de correlación entre el índice de apoptosis y la proporción de células en fase S. El resultado muestra una correlación estadísticamente significativa entre las dos variables ($p= 0,004$), pero con un índice de correlación muy bajo ($r= 0,212$).

Los tumores aneuploides no presentan índices de apoptosis significativamente diferentes de los tumores diploides (2,64 vs 2,86; $p= 0,764$), sin embargo si que hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre la fase S y la aneuploidía del tumor. Los tumores aneuploides tienen una fase S significativamente superior a los diploides (15,55 vs 10,78; $p= 0,003$).

6.3.9.- Relación entre los resultados de apoptosis, fase S y aneuploidía y la respuesta al tratamiento y supervivencia:

En la serie global de pacientes con LNH, hemos observado una relación significativa entre los valores de apoptosis y de proliferación celular con la respuesta al tratamiento en lo que se refiere a alcanzar una remisión completa de la enfermedad. Dicha relación no se objetiva con la recaída.

		Apoptosis (por mil)		Fase S (%)		Aneuploidía		
		Media \pm SD	<i>p</i>	Media \pm SD	<i>p</i>	No	Sí	<i>p</i>
Resp Tto	Sí RC	3,45 \pm 4,63	0,048	13,80 \pm 10,32	0,001	70	24	0,427
	No RC	2,14 \pm 4,00		9,19 \pm 7,01		66	17	
Recaída	No	4,00 \pm 5,29	0,132	3,80 \pm 9,94	1,000	49	12	0,076
	Sí	2,48 \pm 3,01		13,80 \pm 11,15		21	12	

		Apoptosis	Fase S
Tiempo supervivencia	B	-0,032	0,001
	Exp (B)	0,968	1,001
	<i>p</i>	0,360	0,930
Tiempo libre de enfermedad	B	-0,080	< 0,001
	Exp (B)	0,923	1,000
	<i>p</i>	0,164	0,999

El estudio de supervivencia no mostró la existencia de relación entre apoptosis y proliferación celular con la supervivencia ni el tiempo libre de enfermedad de los pacientes. La presencia de aneuploidía tampoco se relacionó con el tiempo de supervivencia ($p= 0,306$) ni con el tiempo libre de enfermedad ($p= 0,252$).

En resumen, en nuestra serie de pacientes hemos objetivado que la respuesta al tratamiento presenta una asociación estadística y clínicamente significativa con variables ligadas a la presentación de la enfermedad, como son el estadio, la presencia de síntomas B, el IPI y el diagnóstico de enfermedad extranodal. En este sentido, los linfomas en estadios precoces o bien aquellos con presentación extraganglionar primaria, los pacientes con IPI bajo y los pacientes que debutan sin síntomas B presentan una mayor probabilidad de conseguir la remisión completa.

La presencia de una LDH y una β_2 microglobulina elevada en el momento del diagnóstico del linfoma se asoció de forma significativa con una menor probabilidad de alcanzar la remisión completa tras el tratamiento.

Además, tanto la apoptosis, como la proporción de células en fase S, se correlacionaron estadísticamente con la respuesta al tratamiento. Un índice de proliferación celular elevado o una apoptosis elevada se asocian con una mayor probabilidad de alcanzar una remisión completa de la enfermedad.

Tras el tratamiento, aquellos pacientes que consiguieron alcanzar una remisión completa, la presencia de un estadio avanzado del linfoma en el momento del diagnóstico, se asoció de forma significativa con una mayor probabilidad de recaída de la enfermedad.

En el estudio bivalente, el estadio, el IPI, la presencia de síntomas B y el ECOG se han mostrado como unos factores estadísticamente relacionados con la evolución de la enfermedad. En los pacientes con estadios avanzados o IPI altos, ECOG elevado o presencia de síntomas B, el tiempo de supervivencia se encuentra significativamente acortada.

Sólo el estadio mantiene su relación significativa con el tiempo libre de enfermedad.

6.4.- Estudio estadístico analítico multivariante sobre la serie de pacientes en que se ha estudiado la apoptosis y el contenido en DNA:

Con el objetivo de identificar los parámetros que se comportan como factores pronósticos independientes en la respuesta al tratamiento y la evolución de la enfermedad, se ha realizado un estudio multivariante. Hemos analizado la relación del estadio, IPI, enfermedad nodal vs extranodal, apoptosis, fase S y aneuploidía con la respuesta al tratamiento y recaída de la enfermedad, mediante modelos de regresión logística. Por otra parte, se ha estudiado la relación de dichas variables con el tiempo de supervivencia y tiempo libre de enfermedad mediante modelos de regresión de Cox.

Los resultados del estudio multivariante se muestran a continuación

Respuesta al tratamiento				
Observado	n= 170	Pronosticado		
		Sí RC	No RC	
	Sí RC	61	27	
No RC	14	68		
IC Exp(B) 95%				
Variables modelo	<i>p</i>	Exp(B)	inferior	superior
estadio	<i>< 0,001</i>	7,29	2,44	21,75
extranodal	<i>0,023</i>	0,387	0,17	0,87
IPI	<i>0,028</i>	2,59	1,11	6,06
fase S	<i>0,004</i>	1,07	1,03	1,13
Apoptosis	<i>0,209</i>			
Aneuploidía	<i>0,869</i>			

Como se muestra en la tabla, el estadio, el IPI, la presencia de enfermedad extranodal, la fase S son variables que en el estudio multivariante se mostraron como factores pronósticos independientes en relación a alcanzar una remisión completa de la enfermedad tras el tratamiento. Los resultados muestran que los pacientes que debutan con un estadio inicial, un IPI bajo, linfoma extranodal y fase S elevada presentan una mayor probabilidad de alcanzar la remisión completa con el tratamiento.

Cuando se analizó en el estudio multivariante la recaída en aquellos pacientes que alcanzaron la remisión completa, se observó que la única variable que se mostró como factor pronóstico independiente fue el estadio.

Recaída tras RC

n= 88

Observado	Pronosticado	
	Recaída	No recaída
	Recaída	11
No recaída	5	

Variables modelo	<i>p</i>	Exp(B)	IC Exp(B) 95%	
			inferior	superior
Estadio	0,031	0,236	0,063	0,879
Aneuploidía	0,172			
Extranodal	0,416			
IPI	0,211			
Apoptosis	0,087			
Fase S	0,752			

Cuando se analizó el tiempo de supervivencia global, únicamente el IPI se mostró como factor pronóstico independiente. Hay que reseñar que el estadio mostró una tendencia a comportarse como un factor pronóstico independiente ($p= 0,061$).

Tiempo de supervivencia

Variables modelo	<i>p</i>	Exp(B)	IC Exp(B) 95%	
			inferior	superior
IPI	0,015	0,473	0,259	0,863
Estadio	0,061			
Extranodal	0,699			
Apoptosis	0,283			
Aneuploidía	0,246			
Fase S	0,638			

Sólo el estadio se mostró como factor pronóstico independiente al analizar el tiempo libre de enfermedad en el estudio multivariante.

Tiempo libre de enfermedad

Variables modelo	<i>p</i>	Exp(B)	IC Exp(B) 95%	
			inferior	superior
Estadio	0,003	0,233	0,088	0,619
Apoptosis	0,085			
Extranodal	0,415			
IPI	0,134			
Aneuploidía	0,528			
Fase S	0,893			

6.4.1.- Análisis por subgrupos y expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía:

Se ha realizado un análisis de la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía en relación con la respuesta al tratamiento, recaída, supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad estratificando nuestra serie de linfomas en subgrupos por IPI, estadio, presencia de enfermedad extranodal y grado histológico al diagnóstico.

6.4.1.1.- Análisis por subgrupos de IPI:

El estudio de la respuesta al tratamiento y recaída en el subgrupo de pacientes con IPI bajo y alto en función de la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía se muestra en la siguientes tablas:

		IPI=0-2	Respuesta Tratamiento		Recaída	
			Sí RC	No RC	No	Sí
Apoptosis	N	65	30	43	22	
	Media \pm SD	3,77 \pm 4,97	1,30 \pm 1,50	4,44 \pm 5,75	2,46 \pm 2,56	
	<i>p</i>	0,009		0,130		
		IPI=3-5	Respuesta Tratamiento		Recaída	
			Sí RC	No RC	No	Sí
Apoptosis	N	26	54	15	11	
	Media \pm SD	2,65 \pm 3,62	2,61 \pm 4,81	2,75 \pm 3,53	2,51 \pm 3,90	
	<i>p</i>	0,969		0,871		

	IPI=0-2	Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Fase S	N	69	30	46	23
	Media \pm SD	13,72 \pm 2,91	8,75 \pm 7,24	4,44 \pm 5,75	2,56 \pm 2,56
	<i>p</i>	0,025		0,851	

	IPI=3-5	Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Fase S	N	25	53	15	10
	Media \pm SD	14,02 \pm 8,68	9,43 \pm 6,93	14,58 \pm 9,78	13,17 \pm 7,14
	<i>p</i>	0,014		0,698	

	IPI=0-2	Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
DNA	Sí Aneuploidía	18	3	9	9
	No Aneuploidía	51	27	37	14
	<i>p</i>	0,072		0,081	

	IPI=3-5	Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
DNA	Sí Aneuploidía	6	14	3	3
	No Aneuploidía	19	39	12	7
	<i>p</i>	0,820		0,566	

El análisis muestra la existencia de una asociación significativa entre la expresión de apoptosis y la respuesta al tratamiento en pacientes con un IPI bajo o intermedio-bajo. Así, los pacientes con éste índice pronóstico internacional y que presentan una mayor apoptosis tienen una probabilidad significativamente mayor de alcanzar una remisión completa.

Esta asociación no se encuentra en los pacientes que presentan al diagnóstico un IPI alto o intermedio-alto.

El análisis de proliferación celular, mediante el estudio de proporción de células en fase S, mostró una asociación significativa con la respuesta al tratamiento tanto en el subgrupo de pacientes con IPI bajo e intermedio-bajo, como en los pacientes con IPI alto o intermedio-alto. La presencia de una fase S elevada al diagnóstico se asoció a una mayor probabilidad de alcanzar una remisión completa en los 2 grupos de IPI.

El análisis de aneuploidía no mostró una relación con la respuesta al tratamiento en el subgrupo de IPI.

No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de recaída de la enfermedad con la expresión de apoptosis, proliferación celular o aneuploidía en el subgrupo de pacientes estratificados por el IPI.

En las siguientes tablas se muestra el análisis de la relación entre la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía con el tiempo de supervivencia y el tiempo libre de enfermedad en el subgrupo de pacientes estratificados según el IPI.

IPI=0-2		Apoptosis	Fase S
Tiempo supervivencia	B	-0,77	-0,003
	Exp (B)	0,926	0,997
	<i>p</i>	0,272	0,851
Tiempo libre de enfermedad	B	-0,120	1,179
	Exp (B)	0,903	3,352
	<i>p</i>	0,190	0,150

IPI=3-5		Apoptosis	Fase S
Tiempo supervivencia	B	0,025	0,013
	Exp (B)	1,026	1,013
	<i>p</i>	0,535	0,485
Tiempo libre de enfermedad	B	-0,040	1,770
	Exp (B)	0,961	5,812
	<i>p</i>	0,650	0,282

IPI=0-2	Tiempo supervivencia		
	t medio	muertos/n	p
Sí Aneuploidía	92,42	6/21	0,691
No Aneuploidía	134,79	20/78	

IPI=3-5	Tiempo supervivencia		
	t medio	muertos/n	p
Sí Aneuploidía	47,70	11/20	0,226
No Aneuploidía	64,52	30/58	

IPI=0-2	Tiempo libre enfermedad		
	t medio	muertos/n	p
Sí Aneuploidía	65,56	9/18	0,237
No Aneuploidía	112,42	14/51	

IPI=3-5	Tiempo libre enfermedad		
	t medio	muertos/n	p
Sí Aneuploidía	57,94	3/6	0,633
No Aneuploidía	70,51	7/19	

Los resultados del análisis de supervivencia global y tiempo libre de enfermedad no mostró asociación significativa con la expresión de apoptosis, proliferación celular o aneuploidía.

6.4.1.2.- Análisis por subgrupos de estadio de presentación:

El estudio de la respuesta al tratamiento y recaída en el subgrupo de pacientes con estadio localizado (I-II) y estadio avanzado (III-IV) al diagnóstico, en función de la expresión de la apoptosis, fase S y aneuploidía mostró los siguientes resultados:

	Estadio I-II	Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Apoptosis	N	48	7	35	13
	Media \pm SD	3,19	5,59	3,29	2,95
	p	0,155		0,753	

Estadio III-IV		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Apoptosis	N	43	77	23	20
	Media \pm SD	3,73	1,83	5,09	2,17
	<i>p</i>	0,024		0,103	

Estadio I-II		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Fase S	N	6	52	38	14
	Media \pm SD	12,47	8,40	12,65	11,99
	<i>p</i>	0,347		0,841	

Estadio II-IV		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Fase S	N	42	77	23	19
	Media \pm SD	15,45	9,25	15,70	15,13
	<i>p</i>	<0,001		0,859	

Como se puede observar en las tablas, los pacientes que presentan una enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico (estadio III-IV), la presencia de una apoptosis alta o una fase S elevada tienen una probabilidad significativamente mayor de conseguir una remisión completa de la enfermedad tras el tratamiento.

Estadio I-II		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
DNA	Sí Aneuploidía	14	1	9	5
	No Aneuploidía	38	5	29	9
	<i>p</i>	1,000		0,485	

Estadio III-IV		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
DNA	Sí Aneuploidía	10	16	3	7
	No Aneuploidía	61	32	20	12
<i>p</i>		0,702		0,143	

El análisis del contenido en DNA no mostró una relación estadística con la probabilidad de alcanzar la remisión completa ni con la recaída en el subgrupo de pacientes estratificado por el estadio.

Como se muestra en las siguientes tablas, el análisis de la relación entre la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía con el tiempo de supervivencia y el tiempo libre de enfermedad, en el subgrupo de pacientes estratificados según el estadio, no mostró ninguna asociación significativa.

Estadio I-II		Apoptosis	Fase S
Tiempo supervivencia	B	0,124	-0,006
	Exp (B)	1,133	0,994
	<i>p</i>	0,069	0,826
Tiempo libre de enfermedad	B	-0,044	-0,008
	Exp (B)	0,957	0,992
	<i>p</i>	0,652	0,744

Estadio III-IV		Apoptosis	Fase S
Tiempo supervivencia	B	-0,042	0,009
	Exp (B)	0,959	1,009
	<i>p</i>	0,316	0,522
Tiempo libre de enfermedad	B	-0,097	-0,003
	Exp (B)	0,908	0,997
	<i>p</i>	0,161	0,900

Estadio I-II	Tiempo supervivencia		
	t medio	muertos/n	<i>p</i>
Sí Aneuploidía	104,42	3/15	0,941
No Aneuploidía	116,06	9/43	

Estadio III-IV	Tiempo supervivencia		
	t medio	muertos/n	<i>p</i>
Sí Aneuploidía	53,18	14/26	0,068
No Aneuploidía	89,95	41/93	

Estadio I-II	Tiempo libre enfermedad		
	t medio	muertos/n	p
Sí Aneuploidía	79,37	5/14	0,504
No Aneuploidía	109,46	9/38	

Estadio III-IV	Tiempo libre enfermedad		
	t medio	muertos/n	p
Sí Aneuploidía	44,77	7/10	0,324
No Aneuploidía	84,41	12/32	

6.4.1.3.- Análisis por subgrupo de presentación nodal o extranodal del linfoma:

El estudio de la respuesta al tratamiento y recaída en el subgrupo de pacientes con enfermedad nodal y extranodal al diagnóstico, en función de la expresión de la apoptosis, fase S y aneuploidía mostró los siguientes resultados:

Nodal		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Apoptosis	N	36	59	22	14
	Media ± SD	2,27	1,80	2,76	1,48
	p	0,529		0,213	

Extranodal		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Apoptosis	N	55	25	36	19
	Media ± SD	4,22	2,93	4,76	3,21
	p	0,300		0,310	

Nodal		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Fase S	N	36	60	22	14
	Media ± SD	15,14	9,07	15,63	14,37
	p	0,002		0,757	

Extranodal		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Fase S	N	58	23	39	19
	Media \pm SD	12,97	9,51	12,77	13,37
	<i>p</i>	0,108		0,821	

Nodal		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
DNA	Sí Aneuploidía	9	15	4	5
	No Aneuploidía	27	46	18	9
	<i>p</i>	1,000		0,267	

Extranodal		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
DNA	Sí Aneuploidía	15	2	8	7
	No Aneuploidía	43	21	31	12
	<i>p</i>	0,130		0,213	

Ni la expresión de la apoptosis ni el contenido en DNA se asoció estadísticamente con la probabilidad de alcanzar la remisión completa tras el tratamiento en el subgrupo de pacientes según la presencia de enfermedad nodal o extranodal al diagnóstico. Tampoco se relacionaron con una mayor o menor probabilidad de recaída en este subgrupo de pacientes.

La presencia de una fase S elevada en pacientes con enfermedad nodal al diagnóstico mostró una relación significativa con una mayor probabilidad de alcanzar la remisión completa tras el tratamiento.

La fase S no se asoció con la aparición de recaída de la enfermedad en este subgrupo de pacientes.

Hemos analizado en el subgrupo de pacientes según la presencia de enfermedad nodal vs extranodal al diagnóstico la existencia de relación entre la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía y el tiempo de supervivencia y el tiempo libre de enfermedad.

Nodal		Apoptosis	Fase S
Tiempo supervivencia	B	0,020	0,009
	Exp (B)	1,021	1,009
	<i>p</i>	0,714	0,559
Tiempo libre de enfermedad	B	-0,107	-0,004
	Exp (B)	0,898	0,996
	<i>p</i>	0,364	0,881

Extranodal		Apoptosis	Fase S
Tiempo supervivencia	B	-0,060	-0,009
	Exp (B)	0,942	0,991
	<i>p</i>	0,267	0,645
Tiempo libre de enfermedad	B	-0,068	0,004
	Exp (B)	0,934	1,004
	<i>p</i>	0,295	0,866

Nodal	Tiempo supervivencia		
	t medio	muertos/n	<i>p</i>
Sí Aneuploidía	67,92	11/24	0,134
No Aneuploidía	105,69	27/72	

Extranodal	Tiempo supervivencia		
	t medio	muertos/n	<i>p</i>
Sí Aneuploidía	81,43	6/17	0,993
No Aneuploidía	92,90	23/64	

Nodal	Tiempo libre enfermedad		
	t medio	muertos/n	<i>p</i>
Sí Aneuploidía	68,15	5/9	0,751
No Aneuploidía	100,89	9/27	

Extranodal	Tiempo libre enfermedad		
	t medio	muertos/n	<i>p</i>
Sí Aneuploidía	65,85	7/15	0,184
No Aneuploidía	101,46	12/43	

Como muestran las tablas, el análisis de la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía no mostró una asociación estadísticamente significativa con la evolución de la enfermedad en este subgrupo de pacientes

6.4.1.4.- Análisis por subgrupo de presentación según el grado histológico:

El análisis de la respuesta al tratamiento y recaída en el subgrupo de pacientes según el grado histológico al diagnóstico, en función de la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía mostró los siguientes resultados:

Bajo Grado		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Apoptosis	N	26	38	14	12
	Media \pm SD	2,08	1,75	2,51	1,50
	<i>p</i>	0,740		0,450	

Grado Intermedio		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Apoptosis	N	33	27	24	9
	Media \pm SD	3,40	1,87	3,41	3,39
	<i>p</i>	0,040		0,987	

Alto Grado		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Apoptosis	N	32	19	20	12
	Media \pm SD	4,60	3,30	5,76	2,68
	<i>p</i>	0,454		0,189	

Bajo Grado		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Fase S	N	28	38	15	13
	Media \pm SD	7,93	7,65	6,16	9,97
	<i>p</i>	0,878		0,146	

Grado Intermedio		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Fase S	N	33	27	24	9
	Media \pm SD	12,97	9,46	14,11	9,94
	<i>p</i>	0,093		0,236	

Alto Grado		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Fase S	N	33	18	22	11
	Media \pm SD	19,60	12,02	19,67	21,48
	<i>p</i>	0,011		0,506	

Bajo Grado		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
DNA	Sí Aneuploidía	9	6	4	5
	No Aneuploidía	19	32	11	8
<i>p</i>		0,144		0,689	

Grado Intermedio		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
DNA	Sí Aneuploidía	8	4	5	3
	No Aneuploidía	25	23	19	6
<i>p</i>		0,364		0,651	

Alto Grado		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
DNA	Sí Aneuploidía	7	7	3	4
	No Aneuploidía	26	11	19	7
<i>p</i>		0,204		0,186	

Ni la expresión de la apoptosis ni el contenido en DNA se asoció estadísticamente con la probabilidad de alcanzar la remisión completa tras el tratamiento en el subgrupo de pacientes según el grado histológico de la enfermedad al diagnóstico. Tampoco se relacionaron con una mayor o menor probabilidad de recaída en este subgrupo de pacientes.

El resultado observado en la expresión de apoptosis en los pacientes con diagnóstico de linfoma de grado intermedio se considera un hallazgo sin valor clínico dado que no se mantiene su tendencia en el resto de pacientes con bajo o alto grado histológico.

La presencia de una fase S elevada en pacientes con linfoma de alto grado al diagnóstico mostró una relación significativa con una mayor probabilidad de alcanzar la remisión completa tras el tratamiento.

La fase S no se asoció con la aparición de recaída de la enfermedad.

Hemos analizado en el subgrupo de pacientes según el grado histológico del linfoma al diagnóstico la existencia de relación entre la expresión de apoptosis,

fase S y aneuploidía y el tiempo de supervivencia y el tiempo libre de enfermedad.

Bajo Grado		Apoptosis	Fase S
Tiempo supervivencia	B	-0,102	0,064
	Exp (B)	0,903	1,066
	<i>p</i>	0,298	0,003
Tiempo libre de enfermedad	B	-0,156	0,040
	Exp (B)	0,856	1,041
	<i>p</i>	0,196	0,145

Grado Intermedio		Apoptosis	Fase S
Tiempo supervivencia	B	-0,061	-0,026
	Exp (B)	0,941	0,974
	<i>p</i>	0,471	0,342
Tiempo libre de enfermedad	B	0,006	-0,066
	Exp (B)	1,006	0,936
	<i>p</i>	0,955	0,230

Alto Grado		Apoptosis	Fase S
Tiempo supervivencia	B	-0,034	-0,033
	Exp (B)	0,967	0,968
	<i>p</i>	0,458	0,142
Tiempo libre de enfermedad	B	-0,084	0,014
	Exp (B)	0,920	1,014
	<i>p</i>	0,292	0,625

Bajo Grado	Tiempo supervivencia		
	t medio	muertos/n	<i>p</i>
Sí Aneuploidía	75,16	5/15	
No Aneuploidía	114,39	18/51	0,588

Grado Intermedio	Tiempo supervivencia		
	t medio	muertos/n	<i>p</i>
Sí Aneuploidía	87,47	4/12	
No Aneuploidía	86,57	20/48	0,667

Alto Grado	Tiempo supervivencia		
	t medio	muertos/n	<i>p</i>
Sí Aneuploidía	30,41	8/14	
No Aneuploidía	98,89	12/37	0,152

Bajo Grado	Tiempo libre enfermedad		
	t medio	muertos/n	<i>p</i>
Sí Aneuploidía	52,10	5/9	
No Aneuploidía	80,14	8/19	0,472

Grado Intermedio	Tiempo libre enfermedad		
	t medio	muertos/n	p
Sí Aneuploidía	89,25	3/8	
No Aneuploidía	108,13	6/25	0,720

Alto Grado	Tiempo libre enfermedad		
	t medio	muertos/n	p
Sí Aneuploidía	27,29	4/7	0,366
No Aneuploidía	112,31	7/26	

Como muestran las tablas únicamente una mayor fase S se asoció de forma significativa con una mayor supervivencia global en los pacientes con linfomas de bajo grado.

6.4.1.5.- Análisis por subgrupos clínicos de interés:

Después de analizar los resultados obtenidos de la expresión de la apoptosis, fase S y aneuploidía en relación con la respuesta al tratamiento y evolución clínica posterior, tanto en la serie global de pacientes como en el análisis de pacientes estratificados según su IPI, estadio, presentación extranodal vs nodal y grado histológico al diagnóstico, hemos podido identificar un subgrupo de pacientes en los que el análisis de la proporción de células en fase S resultó de especial interés clínico. Estos pacientes presentan un linfoma nodal con datos de mal pronóstico al diagnóstico, como son un IPI elevado, un estadio avanzado y un alto grado histológico. En este subgrupo de pacientes, se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la proporción de células en fase S y alcanzar una remisión completa tras el tratamiento. Aunque en nuestra serie de pacientes con linfoma este subgrupo puede resultar reducido (n= 11), podemos observar que una fase S elevada identifica a pacientes con linfoma nodal y datos de mal pronóstico al diagnóstico que tienen más probabilidad de alcanzar una remisión completa con el tratamiento convencional.

6.5.- Análisis de expresión de CD44 y CD44v6:

Sólo en 156 de los 219 pacientes se ha podido disponer de cortes histológicos suficientes para poder realizar análisis de la expresión de CD44 y CD44v6.

6.5.1.- Introducción:

El estudio inmunohistoquímico de CD44 de las muestras parafinadas de los pacientes con linfoma ha resultado negativo en 93 casos (59,6%), en los que no

se ha objetivado ninguna célula teñida para dicho antígeno, en los restantes 63 casos (31,4%) se ha obtenido una proporción e intensidad de tinción variable de células CD44 positivas. En la siguiente tabla se muestra la distribución de porcentaje de tinción de células CD44 en las muestras histológicas y la intensidad de tinción.

Tabla de contingencia Grupo % tincion CD44 * INTENSIDAD CD44

Recuento		INTENSIDAD CD44				Total
		negativo	débil positivo	positivo	positivo intenso	
Grupo % tincion CD44	.00	93				93
	0,1-10			1	1	2
	10,1-20		1	5	1	7
	20,1-30		5	3		8
	30,1-40		8	5	2	15
	40,1-50			5	1	6
	50,1-60		2	3	5	10
	60,1-70		3	3	3	9
	70,1-80		1	1		2
	80,1-90				1	1
	90,1-100			1	2	3
Total		93	20	27	16	156

Se ha analizado la expresión de CD44 desde dos vertientes. La primera contempla la proporción de células positivas para este antígeno. En la segunda se valora la intensidad de expresión de CD44. Así, se ha considerado que existe una expresión de CD44 cuando se observa una proporción $\geq 40\%$ de células positivas para la tinción de CD44 en la muestra de linfoma. La intensidad de expresión de CD44 se consideró como dos categorías: negativo y positivo débil vs positivo y positivo intenso.

Respecto a la tinción inmunohistoquímica de CD44v6, en 139 casos (90,8%) la tinción resultó completamente negativa, y sólo en 14 muestras (9,2%) se constató una proporción variable de positividad para CD44v6. En este tipo de técnica sólo se consideró la existencia de positividad o negatividad para la tinción celular, y no se estableció una gradación en la intensidad de tinción. La distribución de la proporción de células positivas se muestra en la siguiente tabla:

CD 44v6 % POSITIVIDAD

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	.00	139	89.1	90.8	90.8
	5.00	2	1.3	1.3	92.2
	10.00	6	3.8	3.9	96.1
	20.00	1	.6	.7	96.7
	30.00	2	1.3	1.3	98.0
	60.00	1	.6	.7	98.7
	80.00	1	.6	.7	99.3
	90.00	1	.6	.7	100.0
	Total	153	98.1	100.0	
Perdidos	Sistema	3	1.9		
Total		156	100.0		

6.5.2.- Relación entre la expresión de CD44 y CD44v6 y las variables demográficas:

Se ha estudiado la relación entre la intensidad de tinción de CD44, la presencia de una proporción \geq vs $<$ del 40% de células positivas para CD44, la positividad para CD44v6 y la edad. Como se observa en la siguiente tabla, no hemos encontrado relación entre estas variables.

		Intensidad de tinción IHQ					
		CD44				CD44 v6	
		Neg./Pos. débil	Pos./Pos. intenso	CD44 < 40%	CD44 \geq 40%	negativo	positivo
edad	media	62,4	61,4	62,4	61	62,6	58,4
	SD	15,1	16,9	15,8	14,9	15,0	16,3
	mínimo	15	17	15	30	15	37
	máximo	86	87	87	80	87	84
		<i>p= 0,701</i>		<i>p= 0,647</i>		<i>p= 0,320</i>	

Tampoco se ha observado diferencias significativamente estadísticas entre la distribución de intensidad de tinción para CD44 ($p=0,402$) ni para CD44v6 ($p=0,420$) en las muestras en relación con el sexo.

		Intensidad de tinción IHQ					
		CD44				CD44 v6	
		Neg./Pos. débil	Pos./Pos. intenso	CD44 < 40%	CD44 ≥ 40%	negativo	positivo
sexo	hombre	67	30	76	21	84	10
	mujer	46	13	49	10	55	4
		<i>p</i> = 0,228		<i>p</i> = 0,476		<i>p</i> = 0,420	

6.5.3.- Relación entre la expresión de CD44 y CD44v6 y presentación clínico-biológica del linfoma:

Para realizar el análisis de la expresión de CD44 y CD44v6 en los linfomas de nuestra serie nos pareció interesante el identificar e incluir el subtipo histológico de LDCGB. El LDCGB es una entidad neoplásica introducida en la clasificación REAL y que se mantiene en la revisión realizada por la OMS. Es el linfoma no Hodgkin más común, suponiendo más del 40% de los linfomas de nuevos diagnósticos en la actualidad. Representa un grupo heterogéneo tanto desde el punto de vista morfológico, fenotípico y molecular como desde un punto de vista clínico. Para poder identificarlos en nuestra serie de linfomas se siguieron las recomendaciones de la clasificación de la OMS.⁵⁰ Ello ha permitido la valoración de resultados en este subgrupo histológico para el análisis de expresión de CD44 y CD44v6, y valorar así la posible utilidad clínica y pronóstica de su expresión.

El estudio de la relación entre las variables clínicas y biológicas de nuestra serie de LNH y la expresión de CD44 se resume en la siguiente tabla.

		Tinción de CD44					
		Neg./Pos. débil	Pos./Pos. intenso	<i>p</i>	CD44 < 40%	CD44 ≥ 40%	<i>p</i>
grado histológico	bajo	39	20	<i>p</i> = 0,002	49	10	<i>p</i> = 0,024
	medio	43	4		42	5	
	alto	31	19		34	16	
estadio	I-II	41	16	<i>p</i> = 0,835	47	10	<i>p</i> = 0,663
	III-IV	72	26		78	20	
síntomas B	no	80	30	<i>p</i> = 0,939	90	20	<i>p</i> = 0,563
	sí	33	12		35	10	

		Tinción de CD44					
		Neg./Pos. débil	Pos./Pos. intenso	<i>p</i>	CD44 < 40%	CD44 ≥ 40%	<i>p</i>
ECOG	0	23	7	0,178	26	4	0,238
	1	38	21		48	11	
	2	30	9		31	8	
	3	22	5		20	7	
	4	0	1		0	1	
LDCGB	no	74	29	0,818	85	18	0,296
	sí	39	14		40	13	
LNH extranodal	no	62	19	0,233	65	16	0,969
	sí	51	24		60	15	
IPI	0-2	61	26	0,377	72	15	0,451
	3-5	52	16		53	15	
r-LDH	n	113	43	0,239	125	31	0,772
	media	1,20	0,98		1,13	1,18	
	SD	1,06	0,83		0,99	1,07	
r-β ₂ micro	n	74	37	0,627	87	24	0,463
	media	1,92	2,04		1,92	2,12	
	SD	1,19	1,22		1,23	1,07	

Aunque se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre el grado histológico con la intensidad de expresión de CD44 y con la proporción de células que expresan CD44, esta asociación es a expensas de los linfomas de grado intermedio, no existiendo una tendencia valorable tanto en los de bajo grado como en los linfomas de alto grado. Por ello de considerarse esta asociación como un hallazgo estadístico sin significado clínico.

Respecto al estudio de la relación entre las variables clínicas y biológicas de nuestra serie de LNH y la expresión de CD44v6 se expone en la siguiente tabla. No se ha encontrado ninguna relación estadísticamente significativa entre las variables analizadas.

		Intensidad de tinción CD44v6		
		negativo	positivo	<i>p</i>
grado histológico	bajo	52	6	0,321
	medio	41	6	
	alto	46	2	
estadio	I-II	50	5	0,969
	III-IV	88	9	
síntomas B	no	96	11	0,482
	sí	42	3	

		Intensidad de tinción CD44v6		p
		negativo	positivo	
ECOG	0	27	3	0,991
	1	51	5	
	2	35	4	
	3	25	2	
	4	1	0	
LDCGB	no	91	9	0,929
	sí	48	5	
LNH extranodal	no	75	5	0,193
	sí	64	9	
IPI	0-2	76	8	0,882
	3-5	62	6	
r-LDH	n	139	14	0,590
	media	1,13	1,28	
	SD	0,98	1,35	
r-β ₂ micro	n	96	13	0,531
	media	1,95	2,18	
	SD	1,18	1,35	

6.5.4.- Relación entre la expresión de CD44 y CD44v6 y la respuesta al tratamiento:

En el análisis de la expresión de CD44 y la respuesta al tratamiento, hemos observado que los pacientes con una proporción de células CD44 positivas mayor o igual al 40% presentan un mayor riesgo de no conseguir la remisión completa tras el tratamiento (p=0,045).

Sin embargo, la intensidad de expresión de CD44 no se relaciona con la respuesta al tratamiento.

Ni la proporción de células CD44 positivas ni la intensidad de expresión de CD44 se relaciona de forma estadísticamente significativa con la recaída.

		Respuesta Tratamiento		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
% CD44	<40%	73	45	48	25
	≥40%	11	16	9	2
	p	0,045		0,288	

		Respuesta Tto		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
Intensidad CD44	Neg./Pos. débil	63	41	41	22
	Pos./Pos. intenso	21	20	16	5
<i>p</i>		0,304		0,345	

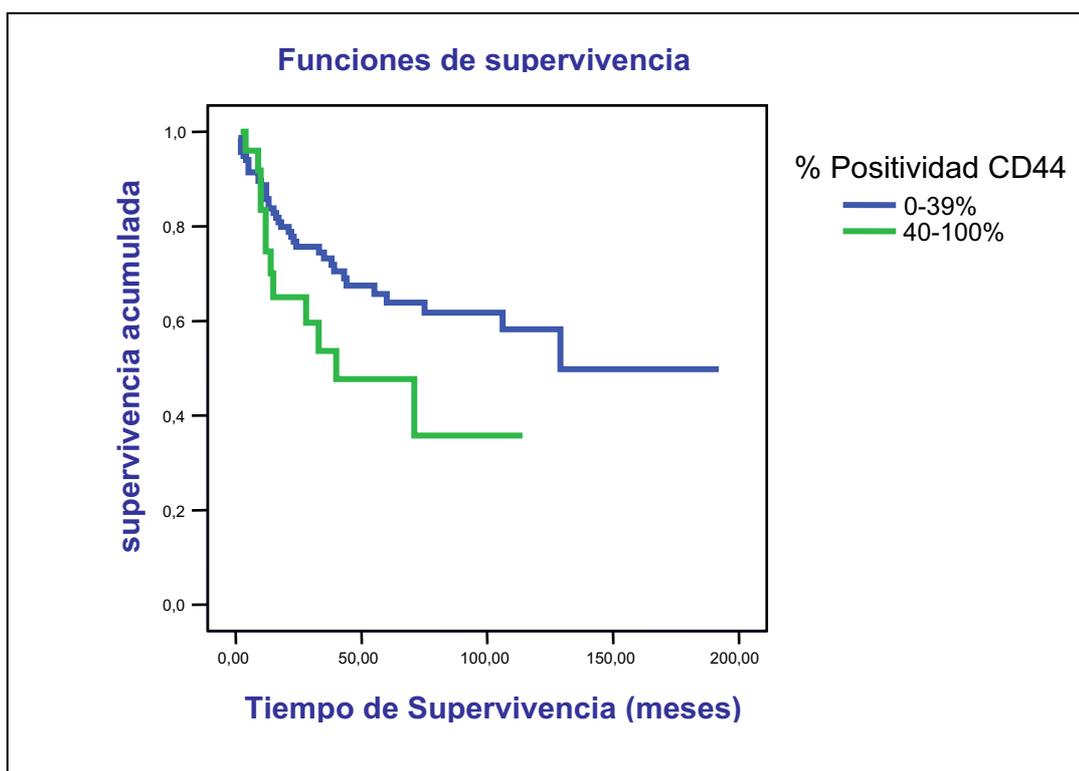
El resultado del estudio de la expresión de CD44v6 en nuestra serie de pacientes, tal y como se muestra en la siguiente tabla, no ha presentado ninguna relación estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento ni con la recaída de la enfermedad.

		Respuesta Tto		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
CD44v6	negativo	74	54	52	22
	positivo	8	6	4	4
<i>p</i>		0,962		0,256	

6.5.5.- Relación entre la expresión de CD44 y CD44v6 y la supervivencia en los pacientes con linfoma:

Hemos analizado la existencia de relación entre la expresión de CD44 y el tiempo de supervivencia y tiempo libre de enfermedad. Como se muestra en las siguientes tablas, los pacientes con una proporción de células positivas para CD44 inferior al 40% presentan una mayor supervivencia global ($p=0,041$), esta asociación no se observa al analizar el tiempo libre de enfermedad. La intensidad de expresión de CD44 no presenta ninguna asociación con el tiempo de supervivencia global ni con el tiempo libre de enfermedad.

		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	120,6	33/103	0,300
	pos/pos intenso	68,4	15/41	
%CD44	<40%	122,5	36/118	0,041
	≥40%	59,0	12/26	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i> =
CD44	neg/débil positivo	99,2	22/63	0,701
	pos/pos intenso	73,4	5/21	
%CD44	<40%	98,6	25/73	0,493
	≥40%	80,7	2/11	



La expresión de CD44v6 no muestra ninguna relación estadísticamente significativa con la evolución de los pacientes.

No hemos objetivado diferencias significativas en el tiempo de supervivencia, ni en el tiempo libre de enfermedad entre los pacientes en función de la expresión de CD44v6.

		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	114,9	43/127	0,814
	positivo	69,0	5/14	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recídas/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	104,4	22/74	0,338
	positivo	55,2	4/8	

El resumen de lo observado en el análisis de expresión de CD44 en nuestra serie de pacientes con linfomas es que una proporción de positividad para el CD44 < del 40% se asocia de forma significativa con una mayor probabilidad de alcanzar una remisión completa tras el tratamiento convencional y una mayor supervivencia global.

También hemos observado que ni la intensidad de expresión de CD44 en las muestras de linfoma ni la expresión de CD44v6 se asoció con la respuesta al tratamiento ni con los tiempos de supervivencia global ni supervivencia libre de enfermedad.

6.6.- Análisis estadístico multivariante de la expresión de CD44 y CD44v6:

Con el objetivo de identificar los parámetros que se comportan como factores pronósticos independientes en la respuesta al tratamiento y la evolución de la enfermedad, se ha realizado un estudio multivariante. Hemos analizado la relación del estadio, IPI, enfermedad nodal vs extranodal, LDCGB vs no-LDCGB y expresión de CD44 con la respuesta al tratamiento y recaída, mediante modelos de regresión logística. Por otra parte, se ha estudiado la relación de dichas variables con el tiempo de supervivencia y tiempo libre de enfermedad, mediante modelos de regresión de Cox.

Los resultados del estudio multivariante se muestran a continuación:

Respuesta al tratamiento

n= 142

		Pronosticado	
		Sí RC	No RC
Observado	Sí RC	59	23
	No RC	10	50

Variables modelo	p	Exp(B)	IC Exp(B) 95%	
			inferior	superior
estadio	0,006	2,226	1,259	3,936
extranodal	0,001	0,199	0,076	0,523
CD44 (40%)	0,007	5,224	1,586	17,205
IPI	0,003	4,359	1,660	11,445
LDCGB	0,049	0,403	0,163	0,997
Intensidad CD44	0,811			
CD44v6	0,858			

Como se muestra en la tabla, el estadio, el IPI, la presencia de enfermedad extranodal, el subtipo histológico LDCGB y la expresión de CD44 (cuando existe una proporción \geq vs $<$ del 40% de células positivas) son variables que en el estudio multivariante se mostraron como factores pronósticos independientes en relación a alcanzar una remisión completa de la enfermedad tras el tratamiento. De tal forma, los pacientes que presentan un estadio precoz de la enfermedad

en el momento del diagnóstico, así como los pacientes con un IPI bajo, la presencia de una enfermedad extranodal, el diagnóstico de LDCGB o la presencia de una proporción < 40% de células positivas para CD44 se asoció con una mayor probabilidad de alcanzar la remisión completa de la enfermedad tras el tratamiento.

Cuando se analizó en el estudio multivariante la recaída en aquellos pacientes que alcanzaron la remisión completa, se observó que las variables que se mostraron como factores pronósticos independientes fueron el estadio y el diagnóstico de LDCGB, como se muestra en la siguiente tabla. Así, los pacientes que se presentan al diagnóstico con un estadio precoz o con el diagnóstico de LDCGB tienen una probabilidad significativamente menor de recaída después de haber alcanzado la remisión completa con el tratamiento.

Recaída tras RC
n= 82

		Pronosticado	
		Recaída	No recaída
Observado	Recaída	49	7
	No recaída	14	12

Variables modelo	<i>p</i>	Exp(B)	IC Exp(B) 95%	
			inferior	superior
Estadio	0,012	1,956	1,162	3,294
LDCGB	0,018	0,254	0,082	0,794
Extranodal	0,681			
IPI	0,832			
CD44 (40%)	0,801			
Intensidad CD44	0,851			
CD44v6	0,142			

Cuando se analizó el tiempo de supervivencia global, el estudio multivariante mostró que únicamente el IPI y el porcentaje de expresión de CD44 se mostraron como factores pronósticos independientes, como se muestra en la tabla. Los pacientes que al diagnóstico se presentan con un IPI bajo o con una proporción < 40% de células positivas para CD44 se asoció con una mayor supervivencia global.

Tiempo de supervivencia n= 141				
Variables modelo	p	Exp(B)	IC Exp(B) 95%	
			inferior	superior
IPI	< 0,001	5,330	2,856	9,946
CD44 (40%)	0,040	2,003	1,034	3,880
Estadio	0,446			
LDCGB	0,400			
Extranodal	0,453			
Intensidad CD44	0,936			
CD44v6	0,857			

Únicamente el estadio se mostró como factor pronóstico independiente en el estudio multivariante al analizar el tiempo libre de enfermedad, como se muestra en las siguientes tablas.

Tiempo libre de enfermedad n= 82				
Variables modelo	p	Exp(B)	IC Exp(B) 95%	
			inferior	superior
Estadio	0,004	1,792	1,200	2,676
LDCGB	0,096			
Extranodal	0,818			
IPI	0,888			
CD44 (40%)	0,990			
Intensidad CD44	0,662			
CD44v6	0,408			

6.6.1.- Análisis por subgrupos y expresión de CD44 y CD44v6:

Se ha realizado un análisis de la expresión de CD44 y CD44v6 en relación con la respuesta al tratamiento, recaída, supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad estratificando nuestra serie de linfomas en subgrupos por IPI, estadio, presencia de enfermedad extranodal y grado histológico al diagnóstico.

6.6.1.1.- Análisis por subgrupos de IPI:

El estudio de la respuesta al tratamiento recaída en el subgrupo de IPI bajo y alto en función de la expresión de la intensidad de CD44, proporción de células positivas para CD44 y la expresión de CD44v6 mostró los siguientes resultados.

	IPI=0-2	Respuesta Tto		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
% CD44	<40%	52	19	36	16
	≥40%	11	4	9	2
	<i>p</i>	1,000		0,489	
Intensidad CD44	Negativo/débil pos	45	15	31	14
	Positivo/pos intenso	18	8	14	4
	<i>p</i> =	0,579		0,480	
CD44v6	negativo	55	20	40	15
	positivo	6	2	4	2
	<i>p</i>	1,000		1,000	

	IPI=3-5	Respuesta Tto		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
% CD44	<40%	21	26	12	9
	≥40%	0	12	<i>No hay pacientes en RC con CD44 ≥ 40%</i>	
	<i>p</i>	0,005			
Intensidad CD44	Negativo/débil pos	18	26	10	8
	Positivo/pos intenso	3	12	2	1
	<i>p</i>	0,144		1,000	
CD44v6	negativo	19	34	12	7
	positivo	2	4	0	2
	<i>p</i>	1,000		0,171	

Como se observa en las tablas, en el grupo de pacientes con un IPI en el momento del diagnóstico de 3-5 puntos, una proporción < 40% de células positivas para CD44 se asocia a una mayor probabilidad de conseguir la remisión completa con el tratamiento ($p=0,005$). De hecho, ningún paciente con una proporción $\geq 40\%$ de células positivas para CD44 alcanzó una remisión completa en nuestra serie de pacientes.

La expresión de CD44v6 no presenta ningún tipo de asociación con la respuesta al tratamiento y la evolución de los pacientes en ninguno de los grupos de IPI.

Hemos analizado en los dos subgrupos de pacientes según el IPI, como se muestra en las siguientes tablas, la existencia de relación entre la expresión de CD44 y CD44v6 con el tiempo de supervivencia y el tiempo libre de enfermedad.

IPI=0-2		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	149,8	11/60	0,317
	pos/pos intenso	84,0	5/26	
%CD44	<40%	148,1	13/71	0,512
	≥40%	85,7	3/15	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	107,7	14/45	0,940
	pos/pos intenso	76,3	4/18	
%CD44	<40%	106,7	16/52	0,692
	≥40%	80,7	2/11	

IPI=3-5		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	55,2	22/43	0,422
	pos/pos intenso	34,7	10/15	
%CD44	<40%	56,0	23/47	0,036
	≥40%	22,4	9/11	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i> =
CD44	neg/débil positivo	61,8	8/18	0,831
	pos/pos intenso	20,0	1/3	
%CD44	<40%	61,6	9/21	-
	≥40%	-	-	

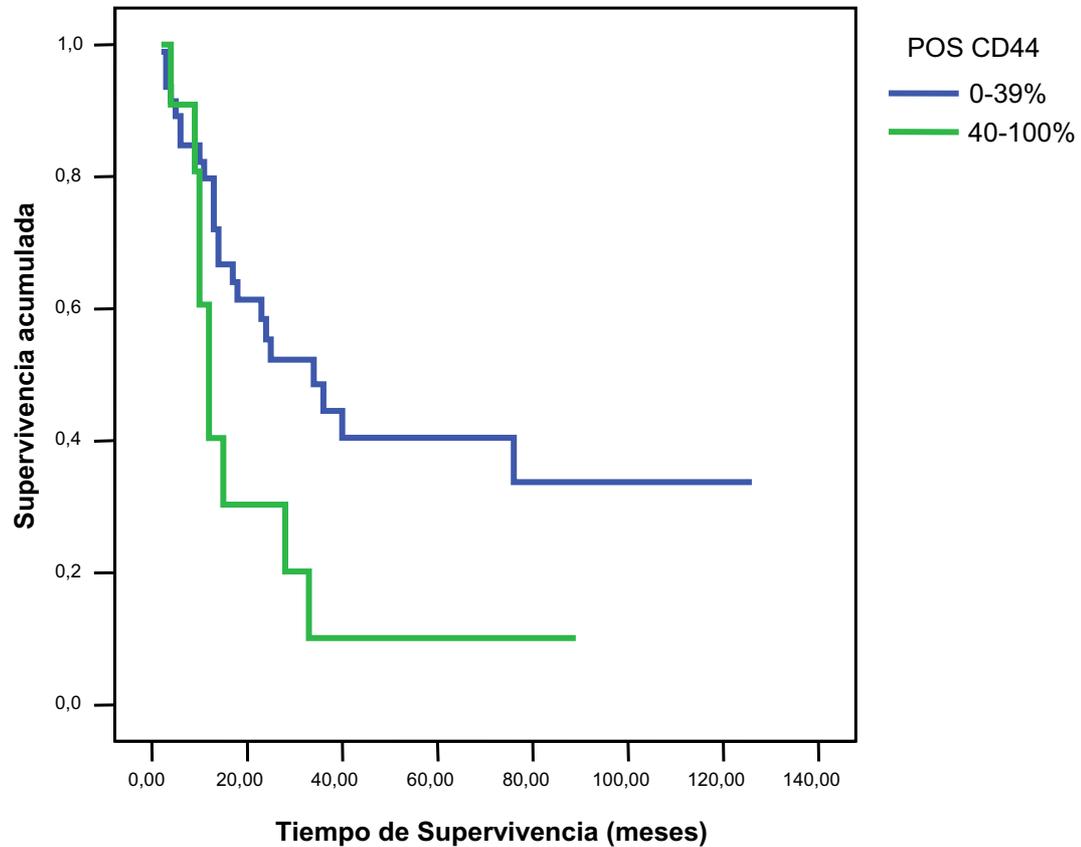
IPI=0-2		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	145,8	14/75	0,464
	positivo	79,4	2/8	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	110,0	15/55	0,619
	positivo	68,3	2/6	

IPI=3-5		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	49,6	29/52	0,825
	positivo	51,1	3/6	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	71,6	7/19	0,589
	positivo	40,5	2/2	

Hemos objetivado, que en el grupo de pacientes con IPI alto, una expresión de CD44 inferior al 40% se asocia a una mayor supervivencia global ($p=0,036$). Puesto que ningún paciente, con IPI alto y una expresión de CD44 superior al 40%, consiguió alcanzar la remisión completa, no tiene sentido el análisis del tiempo libre de enfermedad.

Funciones de supervivencia

IPI 3-5



Ni la intensidad de expresión de CD44 ni la expresión de CD44v6 presentaron asociación con los tiempos de supervivencia y tiempo libre de enfermedad.

6.6.1.2.- Análisis por subgrupos de estadio de presentación:

El estudio de la respuesta al tratamiento y recaída en el subgrupo de pacientes según se presenten con estadio localizado (I-II) o estadio avanzado (III-IV) al diagnóstico, en función de la expresión de la intensidad de CD44, proporción de células positivas para CD44 y la expresión de CD44v6 mostró los siguientes resultados.

	Estadio I-II	Respuesta Tto		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
% CD44	<40%	39	5	30	9
	≥40%	9	1	7	2
	<i>p</i>	1,000		1,000	
Intensidad CD44	Negativo/débil pos	33	5	25	8
	Positivo/pos intenso	15	1	12	3
	<i>p</i>	0,657		1,000	
CD44v6	negativo	45	6	32	9
	positivo	5	0	4	1
	<i>p</i>	1,000		1,000	

	Estadio III-IV	Respuesta Tto		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
% CD44	<40%	34	40	18	16
	≥40%	2	15	2	0
	<i>p</i>	0,009		0,492	
Intensidad CD44	Negativo/débil pos	30	36	16	14
	Positivo/pos intenso	6	19	4	2
	<i>p</i>	0,062		0,549	
CD44v6	negativo	33	48	20	13
	positivo	3	6	0	3
	<i>p</i>	0,736		0,078	

Como se puede observar en la tablas, los pacientes que presentan una enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico (estadio III-IV), una proporción < 40% de células positivas para CD44 se asocia a una mayor probabilidad de alcanzar la remisión completa con el tratamiento ($p=0,009$). Esta asociación no se mantiene al analizar la presencia de recaída.

Ni la intensidad de expresión de CD44 ni la expresión de CD44v6 presentaron ningún tipo de asociación con la respuesta al tratamiento y la evolución de los pacientes en función de su estadio al diagnóstico.

Hemos analizado en los dos subgrupos de pacientes según el estadio al diagnóstico, como se muestra en las siguientes tablas, la existencia de relación entre la expresión de CD44 o CD44v6 y el tiempo de supervivencia y tiempo libre de enfermedad.

Estadio I-II		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	123,1	6/38	0,240
	pos/pos intenso	82,9	4/16	
%CD44	<40%	122,0	7/44	0,209
	≥40%	81,5	3/10	

		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	110,2	8/33	0,864
	pos/pos intenso	80,6	3/15	
%CD44	<40%	110,5	9/39	0,820
	≥40%	78,9	2/9	

Estadio III-IV		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	98,7	27/65	0,477
	pos/pos intenso	49,7	11/25	
%CD44	<40%	101,7	29/74	0,075
	≥40%	38,3	9/16	

		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	73,4	14/30	0,981
	pos/pos intenso	19,3	2/6	
%CD44	<40%	70,4	16/34	0,523
	≥40%	-	0/2	

Estadio I-II		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	116,7	9/47	0,865
	positivo	84,2	1/5	

		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	111,2	4/41	0,844
	positivo	82,6	1/5	

Estadio III-IV		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	94,0	34/80	0,972
	positivo	60,0	4/9	

		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	81,0	13/33	0,477
	positivo	33,0	3/3	

Como se observa en las tablas, el análisis de supervivencia global y tiempo libre de enfermedad no mostró una asociación significativa con la expresión de CD44 ni de CD44v6. Únicamente cabe resaltar que los pacientes con un estadio avanzado al diagnóstico y con una proporción $\geq 40\%$ de células positivas para

CD44, muestra una tendencia relevante a presentar una peor supervivencia global ($p= 0,075$).

6.6.1.3.- Análisis por subgrupos de presentación Extranodal o Nodal del linfoma:

El estudio de la respuesta al tratamiento y recaída en el subgrupo de pacientes con enfermedad nodal y extranodal al diagnóstico, en función de la expresión de la intensidad de CD44, proporción de células positivas para CD44 y la expresión de CD44v6 mostró los siguientes resultados.

	Nodal	Respuesta Tto		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
% CD44	<40%	27	36	18	9
	≥40%	4	8	3	1
	<i>p</i>	0,751		1,000	
Intensidad CD44	Negativo/débil pos	23	35	15	8
	Positivo/pos intenso	8	9	6	2
	<i>p</i>	0,586		1,000	
CD44v6	negativo	28	41	19	9
	positivo	2	3	1	1
	<i>p</i>	1,000		1,000	

	Extranodal	Respuesta Tto		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
% CD44	<40%	46	9	30	16
	≥40%	7	8	6	1
	<i>p</i>	0,006		0,408	
Intensidad CD44	Negativo/débil pos	40	6	26	14
	Positivo/pos intenso	13	11	10	3
	<i>p</i>	0,002		0,511	
CD44v6	negativo	46	13	33	13
	positivo	6	3	3	3
	<i>p</i>	0,430		0,347	

El análisis estadístico realizado mostró que tanto una mayor intensidad de expresión de CD44 como la presencia de una proporción ≥40% de células positivas para CD44 se asoció a una menor probabilidad de alcanzar una remisión completa al tratamiento en los pacientes que debutan con un linfoma extranodal ($p= 0,002$ y $p= 0,006$ respectivamente).

Ni intensidad de expresión de CD44 ni la proporción de células positivas para CD44 se asoció a la presencia de recaída en función de su presentación nodal o extranodal.

La expresión de CD44v6 no presenta ningún tipo de asociación con la respuesta al tratamiento y la evolución de los pacientes en función de su presentación nodal o extranodal.

Hemos analizado en los dos subgrupos de pacientes según la presencia de enfermedad nodal vs extranodal al diagnóstico la existencia de relación entre la expresión de CD44 o CD44v6 y el tiempo de supervivencia y tiempo libre de enfermedad.

Nodal		Media supervivencia (meses)	muertos/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	115,2	20/57	0,830
	pos/pos intenso	61,7	6/17	
%CD44	<40%	120,6	20/63	0,123
	≥40%	46,4	6/11	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	97,2	8/23	0,985
	pos/pos intenso	57,6	2/8	
%CD44	<40%	97,2	9/27	0,944
	≥40%	46,0	1/4	

Extranodal		Media supervivencia (meses)	muertos/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	103,6	13/46	0,200
	pos/pos intenso	69,0	9/24	
%CD44	<40%	101,8	16/55	0,177
	≥40%	67,0	6/15	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	90,1	14/40	0,618
	pos/pos intenso	-	3/13	
%CD44	<40%	90,4	16/46	0,392
	≥40%	94,4	1/7	

Nodal		Media supervivencia (meses)	muertos/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	11,6	24/68	0,665
	positivo	61,1	2/5	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	95,6	9/28	0,759
	positivo	60,0	1/2	

Extranodal		Media supervivencia (meses)	mueertos/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	96,4	19/59	0,983
	positivo	72,3	3/9	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	100,6	13/46	0,264
	positivo	50,6	3/6	

Como muestra el análisis, ni la diferente expresión de CD44 ni la expresión de CD44v6 presentaron asociación con los tiempos de supervivencia y tiempo libre de enfermedad en función de la presentación nodal o extranodal del linfoma.

6.6.1.4.- Análisis por subgrupos de presentación como LDCGB

El análisis de la respuesta al tratamiento y recaída en el subgrupo de pacientes con diagnóstico histológico de LDCGB vs no LDCGB al diagnóstico, en función de la expresión de la intensidad de CD44, proporción de células positivas para CD44 y la expresión de CD44v6, mostró los siguientes resultados.

No LDCGB		Respuesta Tto		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
% CD44	<40%	47	34	27	20
	≥40%	5	10	4	1
<i>p</i>		0,078		0,673	
Intensidad CD44	Negativo/débil pos	39	29	21	18
	Positivo/pos intenso	13	15	10	3
<i>p</i>		0,329		0,142	
CD44v6	negativo	46	38	30	16
	positivo	4	5	0	4
<i>p</i>		0,728		0,021	

LDCGB		Respuesta Tto		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
% CD44	<40%	26	11	21	5
	≥40%	6	6	5	1
<i>p</i>		0,296		1,000	
Intensidad CD44	Negativo/débil pos	24	12	20	4
	Positivo/pos intenso	8	5	6	2
<i>p</i>		0,746		0,625	
CD44v6	negativo	28	16	22	6
	positivo	4	1	4	0
<i>p</i>		0,646		0,566	

En resumen, en el grupo de pacientes con presencia o no de LDCGB al diagnóstico, únicamente la positividad para CD44v6 mostró una asociación estadísticamente significativa con la aparición de recaídas en los pacientes que no se presentaban al diagnóstico como subtipo histológico de LDCGB ($p=0,021$). De hecho todos los pacientes que consiguieron una remisión completa tras el tratamiento y expresaban CD44v6, recayeron de su linfoma.

La positividad para CD44v6 no mostró asociación con alcanzar una remisión completa tras el tratamiento.

La diferente expresión de CD44 no mostró ninguna asociación con alcanzar la remisión completa o con la aparición de recaídas de la enfermedad en ninguno de los grupos.

Hemos analizado en este subgrupo de pacientes con diagnóstico de LDCGB vs no LDCGB, la existencia de relación entre la diferente expresión de CD44 o CD44v6 y el tiempo de supervivencia y tiempo libre de enfermedad.

No LDCGB		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	119,8	23/68	0,747
	pos/pos intenso	75,8	9/28	
%CD44	<40%	121,9	26/81	0,320
	≥40%	66,1	6/15	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	86,2	18/39	0,206
	pos/pos intenso	78,9	3/13	
%CD44	<40%	90,9	21/47	0,371
	≥40%	78,0	1/5	

LDCGB		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	91,0	10/35	0,192
	pos/pos intenso	29,9	6/13	
%CD44	<40%	92,3	10/37	0,055
	≥40%	45,4	6/11	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	89,1	4/24	0,103
	pos/pos intenso	28,8	2/8	
%CD44	<40%	84,7	5/26	0,641
	≥40%	81,8	1/6	

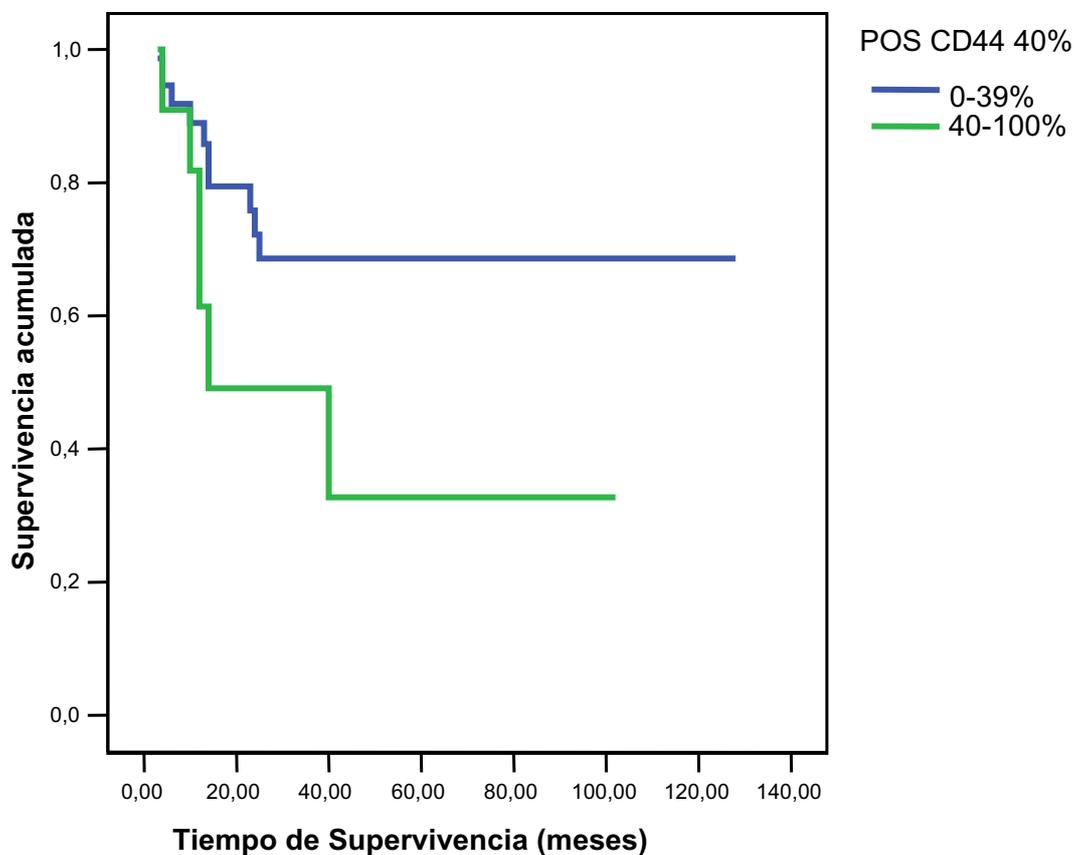
No LDCGB		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	118,7	28/84	0,274
	positivo	59,1	9/4	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recidas/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	102,0	16/46	0,019
	positivo	26,0	4/4	

LDCGB		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	81,6	15/43	0,410
	positivo	84,0	1/5	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recidas/total	<i>p</i>
CD44v6	negativo	80,7	6/28	0,338
	positivo	-	0/4	

Como se observa en el análisis, en el grupo de LDCGB, una expresión de CD44 inferior al 40% se asocia a una clara tendencia a una mayor supervivencia global ($p= 0,055$), sin mostrar una asociación con el tiempo libre de enfermedad.

Funciones de supervivencia

LDCG-B



La intensidad de expresión de CD44 no mostró asociación con la supervivencia global ni con el tiempo libre de enfermedad en ninguno de los grupos.

La positividad de expresión de CD44v6 se asoció de forma estadísticamente significativa con el tiempo libre de enfermedad en el subgrupo de pacientes que no se presentaban al diagnóstico como subtipo histológico de LDCGB ($p=0,019$). En el subgrupo de paciente con LDCGB al diagnóstico, la positividad para CD44v6 no mostró asociación con la supervivencia global ni con el tiempo libre de enfermedad.

6.6.1.5.- Análisis por subgrupos de grado histológico:

El análisis de la respuesta al tratamiento y recaída en los subgrupos de bajo, intermedio y alto grado al diagnóstico, en función de la expresión de la intensidad de CD44, proporción de células positivas para CD44 y la expresión de CD44v6 mostró los siguientes resultados.

Bajo Grado		Respuesta Tto		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
% CD44	<40%	25	22	14	11
	$\geq 40\%$	4	5	3	1
<i>p</i>		0,725		0,622	
Intensidad CD44	Negativo/débil pos	20	17	10	10
	Positivo/pos intenso	9	10	7	2
<i>p</i>		0,635		0,234	
CD44v6	negativo	27	22	17	10
	positivo	2	4	0	2
<i>p</i>		0,406		0,163	

Grado Intermedio		Respuesta Tto		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
% CD44	<40%	24	16	17	7
	$\geq 40\%$	2	2	2	0
<i>p</i>		1,000		1,000	
Intensidad CD44	Negativo/débil pos	24	16	18	6
	Positivo/pos intenso	2	2	1	1
<i>p</i>		1,000		0,474	
CD44v6	negativo	21	17	16	5
	positivo	5	1	3	2
<i>p</i>		0,375		0,588	

Alto Grado		Respuesta Tto		Recaída	
		Sí RC	No RC	No	Sí
% CD44	<40%	24	7	17	7
	≥40%	5	9	4	1
<i>p</i>		0,016		1,000	
Intensidad CD44	Negativo/débil pos	19	8	13	6
	Positivo/pos intenso	10	8	8	2
<i>p</i>		0,309		0,365	
CD44v6	negativo	21	15	19	7
	positivo	6	1	1	0
<i>p</i>		1,000		1,000	

Como muestra el análisis, los pacientes con linfoma de alto grado al diagnóstico y una proporción < 40% de células positivas para CD44 se asocia a una mayor tasa de remisión completa al tratamiento ($p= 0,016$).

En el resto de subgrupos de grado histológico, ni la diferente expresión de CD44 ni la expresión de CD44v6 presentó ningún tipo de asociación con la respuesta al tratamiento o recaída.

En los subgrupos de pacientes según el grado histológico, la diferente expresión de CD44 y CD44v6 y su relación con el tiempo de supervivencia y tiempo libre de enfermedad se muestra en las siguientes tablas.

Bajo Grado		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	127,1	11/37	0,782
	pos/pos intenso	68,6	5/19	
%CD44	<40%	126,7	13/47	0,802
	≥40%	78,9	3/9	
		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	74,5	10/	0,384
	pos/pos intenso	58,0	2/9	
%CD44	<40%	78,2	11/25	0,512
	≥40%	78	1/4	
Grado Intermedio		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	<i>p</i>
CD44	neg/débil positivo	97,5	13/40	0,092
	pos/pos intenso	26,7	3/4	
%CD44	<40%	94,1	14/40	0,633
	≥40%	53,3	2/4	

Grado Intermedio		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	p
CD44	neg/débil positivo	106,0	6/24	0,154
	pos/pos intenso	10,5	1/2	
%CD44	<40%	100,3	7/24	0,477
	≥40%	-	0/2	

Alto Grado		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	p=
CD44	neg/débil positivo	104,3	9/26	0,660
	pos/pos intenso	61,4	7/18	
%CD44	<40%	113,1	9/31	0,031
	≥40%	26,2	7/13	

		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	p=
CD44	neg/débil positivo	104,6	6/19	0,617
	pos/pos intenso	83,8	2/10	
%CD44	<40%	107,5	7/24	0,949
	≥40%	32,2	1/5	

Bajo Grado		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	p=
CD44v6	negativo	127,0	14/49	0,435
	positivo	50,2	2/6	

		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	p=
CD44v6	negativo	86,6	10/27	0,212
	positivo	38	2/2	

Grado Intermedio		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	p=
CD44v6	negativo	91,6	14/38	0,939
	positivo	70,7	2/6	

		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	p=
CD44v6	negativo	108,0	5/21	0,336
	positivo	61,5	2/5	

Alto Grado		Media supervivencia (meses)	muestrados/total	p=
CD44v6	negativo	94,7	15/40	0,882
	positivo	40,0	1/2	

		Media tiempo libre enfermedad (meses)	recaídas/total	p=
CD44v6	negativo	109,0	7/26	0,529
	positivo	-	0/1	

Como se observa en el análisis, resulta de interés el hallazgo estadísticamente significativo de que los linfomas de alto grado con una proporción < 40% de células positivas para CD44 se asocia a una mayor supervivencia global (p= 0,031). Este resultado es coherente con el descrito anteriormente en el subgrupo

6.6.1.6.- Análisis de subgrupos de interés:

Después de analizar los resultados obtenidos de la expresión de CD44 y CD44v6 en relación con la respuesta al tratamiento y evolución clínica posterior, tanto en la serie global de pacientes como en el análisis de pacientes estratificados según su IPI, estadio, presentación extranodal vs nodal y grado histológico al diagnóstico, hemos podido identificar un subgrupo de pacientes en los que la expresión de CD44 resulta de especial interés clínico. Estos pacientes presentan datos de mal pronóstico al diagnóstico, como son un IPI elevado o un estadio avanzado. En este subgrupo de pacientes, se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de CD44 y alcanzar una remisión completa tras el tratamiento. Ningún paciente de este subgrupo con una proporción de CD44 $\geq 40\%$ obtuvo una remisión completa tras el tratamiento, mientras que si la proporción de CD44 es $< 40\%$, la probabilidad de conseguir la remisión completa es de casi el 50%. Si además la presentación del linfoma es extranodal y la proporción de CD44 es $< 40\%$, la probabilidad de conseguir la remisión completa se incrementa hasta casi un 75%, mientras que si el linfoma es nodal y la proporción de CD44 es $< 40\%$, la probabilidad de conseguir la remisión completa desciende hasta sólo un 25% (ver tablas).

IPI alto + Estadio avanzado (n=54)		Respuesta Tto	
		Sí RC	No RC
% CD44	<40%	20	23
	$\geq 40\%$	0	11
	p=	0,004	

IPI alto + Estadio avanzado + Extranodal (n=23)		Respuesta Tto	
		Sí RC	No RC
% CD44	<40%	14	5
	$\geq 40\%$	0	4
	p=	0,014	

IPI alto + Estadio avanzado + Nodal (n=31)		Respuesta Tto	
		Sí RC	No RC
% CD44	<40%	6	18
	$\geq 40\%$	0	7
	p=	0,293	

6.7.- Análisis conjunto de la apoptosis, fase S, aneuploidía y expresión de CD44 y CD44v6

No se ha encontrado relación entre la intensidad de tinción de CD44 y la positividad para CD44v6 con la apoptosis, fase S o aneuploidía. Sí se observa una tendencia a que los pacientes con una proporción de células < 40% positivas para CD44 se presenten con enfermedad sin aneuploidía citométrica ($p= 0,054$).

		Intensidad de tinción CD44			
		Neg./Pos. débil	Pos./Pos. intenso	CD44 < 40%	CD44 \geq 40%
Apoptosis	n	108	40	119	29
	media	2,86	3,85	2,84	4,29
	SD	4,60	4,72	4,51	5,05
p=		0,250		0,132	
Fase S	n	111	38	120	29
	media	11,42	14,73	11,70	14,57
	SD	9,47	9,50	9,72	8,60
p=		0,065		0,148	
Aneuploidía	no	88	25	95	18
	si	23	13	25	11
p=		0,094		0,054	

		Intensidad de tinción CD44v6		p=
		negativo	positivo	
Apoptosis	n	131	14	0,492
	media	3,22	2,32	
	SD	4,89	1,55	
Fase S	n	133	14	0,709
	media	12,08	13,08	
	SD	9,43	10,19	
Aneuploidía	no	101	10	0,746
	si	32	4	

7.- DISCUSIÓN

7.1.- Introducción

La búsqueda de factores pronósticos en enfermedades oncológicas resulta fundamental en cualquier proyecto de investigación que pretenda una futura aplicación clínica además de ser un importante complemento al trabajo asistencial de un médico dedicado al diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades.

Nuestro grupo ha estudiado en los últimos años la proliferación celular (a través del contenido de DNA por citometría de flujo) y la apoptosis (técnica de TUNEL) en pacientes diagnosticados de linfomas no Hodgkin con el objetivo de demostrar su correlación con diferentes parámetros ya descritos en estas entidades y que poseen valor pronóstico.^{78,79,175}

El interés de estos estudios es poder identificar la presencia, al diagnóstico, de los parámetros biológicos y moleculares que nos permitan predecir el comportamiento clínico de la enfermedad y su sensibilidad a los tratamientos establecidos. De esta forma se podrán desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar los resultados en aquellos casos en que se prevean un comportamiento agresivo o una refractariedad al tratamiento estándar.

En el estudio de toda enfermedad oncológica una de las características más importantes es la capacidad del tumor para diseminarse. Si las metástasis no ocurrieran, la mayoría de los tumores malignos serían más controlables.

La detección precoz del tumor y establecimiento de los criterios que permitan predecir el potencial invasivo y de diseminación de la enfermedad tumoral sería de vital importancia para el manejo clínico. Así, en el momento del diagnóstico, debería realizarse una intensiva búsqueda de enfermedad diseminada en aquellas neoplasias que presentasen en el estudio biológico y molecular al diagnóstico un alto potencial de diseminación y por lo tanto un comportamiento más agresivo. De la misma forma, estos tumores probablemente deberían recibir estrategias de tratamiento diferentes a los que no demuestran esta tendencia a diseminarse.

El conocimiento de datos biológicos al diagnóstico que permitan predecir el potencial de diseminación de un tumor o un comportamiento más agresivo, serían de utilidad a la hora de diseñar diferentes estrategias terapéuticas o tratamientos más intensivos.

En el este trabajo se pretende estudiar esta capacidad de diseminación en los linfomas no Hodgkin mediante el análisis de la expresión de una molécula de adhesión como es el CD44. Como es sabido, muchos linfomas suelen diagnosticarse en estadios avanzados, como es el caso de la mayoría de los linfomas de bajo grado, mientras que otros permanecen localizados en el momento de ser diagnosticados.^{178,179}

También es conocido que una característica de los linfomas es su frecuente presentación extraganglionar, pudiendo prácticamente desarrollarse en cualquier órgano, incluso aparecer en tejidos que en condiciones normales, no incluyen tejido linfoide.

Por todo ello, además de estudiar la ploidía y proliferación celular y apoptosis en los linfomas de nuestra serie de pacientes, hemos querido analizar la expresión de una molécula de adhesión como es el CD44 y su variante CD44v6 que se les ha imputado una relación con la capacidad de diseminación tumoral, tanto en linfomas como en otros tumores.¹⁶⁹

El CD44 es una molécula de adhesión que fue inicialmente descrita como el receptor del "homing" linfocítico mediante el cual los linfocitos circulantes se podían "enganchan" en las vénulas endoteliales altas y abandonar el torrente circulatorio para alcanzar los tejidos, incluido el tejido linfático.^{12,161-165}

Más tarde, estudios sobre linfomas no Hodgkin, permitió describir que la expresión de esta molécula se asociaba con la localización del linfoma y su capacidad de afectación orgánica.^{88,168,180,181}

Algunos estudios han demostrado la correlación entre la expresión de CD44 y algunas de sus variantes como CD44v6 con la progresión tumoral y el pronóstico.^{89,182,183}

En un trabajo publicado por Reinhard Stauder, se pudo demostrar que la expresión de CD44v6 en los linfomas de alto grado es un nuevo valor pronóstico independiente que predice un comportamiento agresivo y un pronóstico desfavorable asociado con una supervivencia más corta.¹⁸³ Posteriormente otros

autores han confirmado este comportamiento en linfomas agresivos con expresión de CD44v6.^{89,172,182-187}

El Servicio de Hematología del Hospital Universitario Arnau de Vilanova es el Servicio de referencia de la patología onco-hematológica de Lleida, y la práctica totalidad de los pacientes con linfoma no Hodgkin han sido estudiados y tratados en este Servicio. Esto nos permite disponer, tanto de material histológico parafinado de la mayoría de los pacientes, como de los datos clínicos y evolución tras el tratamiento de los mismos. Nuestro grupo de investigación tiene experiencia en el estudio de la proliferación celular, contenido de DNA y expresión de apoptosis en linfomas no Hodgkin.

Creímos oportuno complementar lo realizado hasta la actualidad con el estudio de la expresión de moléculas de adhesión, como es el CD44 y su variante CD44v6, así como su relación con otros parámetros biológicos conocidos y con la evolución de los pacientes.

El objetivo de nuestro trabajo, en este sentido, es el estudio de la expresión de CD44 y CD44v6 en pacientes con linfoma no Hodgkin y su correlación con la capacidad de diseminación de los mismos, representada por el estadio al diagnóstico, el modo de presentación de la enfermedad como nodal o extranodal, así como otros parámetros clínico-biológicos clásicos de demostrado valor pronóstico como son: el IPI, el tipo histológico y los valores de LDH y β_2 microglobulina.

De la misma forma hemos actualizado los resultados de expresión de apoptosis, proliferación celular y contenido de DNA en nuestra serie de linfomas y su correlación con los parámetros clínico-biológicos clásicos.

Para poder validar nuestra serie de pacientes con linfoma y para poder determinar el valor pronóstico de los nuevos parámetros estudiados se analizó la correlación de los parámetros clínico-biológicos clásicos descritos y la expresión de los nuevos parámetros incluidos, con la evolución de la enfermedad en lo que respecta a: respuesta al tratamiento, recaída, supervivencia global y tiempo libre de enfermedad.

Hay que reseñar que al analizar la respuesta al tratamiento creímos que lo más interesante era identificar a aquellos pacientes que lograron alcanzar la remisión completa después del tratamiento. Esto es debido a que entendemos que los

factores pronósticos que logran predecir que un paciente pueda conseguir una remisión completa son de especial importancia clínica, ya que ello supone el primer paso para poder conseguir una supervivencia prolongada y por tanto la potencial curación de la enfermedad.

7.2.- Consideraciones sobre la serie de linfomas

Los resultados que se muestran en el trabajo se obtuvieron de 196 pacientes de nuestra serie de linfomas no Hodgkin. Los datos epidemiológicos, características clínicas y tipos histológicos son similares a los publicados en otras series.^{44,178,179,188-192}

En cuanto a la localización primaria del tumor, en nuestra serie la localización primaria extranodal representa un 46,4%, similar a lo publicado por otros grupos.¹⁹³

En nuestros pacientes recogimos los factores pronósticos que definen el IPI,^{47,194,195} al igual que sobre otros factores pronóstico que, aunque no están incluidos en dicho índice, tienen reconocido valor como la carga tumoral y β_2 microglobulina.^{61,70,71} También se obtuvieron resultados de supervivencia para la totalidad de pacientes diagnosticados de LNH reproducibles con los publicados por otros autores.

Los datos de presentación y el comportamiento clínico son similares a los publicados, lo que confirma que nuestra serie resultó representativa y tenía un comportamiento pronóstico similar a las publicadas con anterioridad y de modo simultáneo por otros grupos.

En cuanto al tratamiento administrado, un 69,4% de los pacientes recibieron un esquema poli quimioterápico que incluyó antraciclínicos, siendo el esquema CHOP el estándar. El 20,8% de pacientes fueron tratados con quimioterapia sin antraciclina y un 9,8% con radioterapia y/o cirugía sin quimioterapia asociada.

Al analizar la respuesta al tratamiento, se observó que un 53,5% de los pacientes con LNH obtuvieron una remisión completa; estos resultados son comparables a los obtenidos por otros grupos.^{64,65}

7.3.- Consideraciones sobre el tipo de clasificación de linfomas utilizada.

Desde que en 1994, Nancy Lee Harris y 18 patólogos que constituían el “International Lymphoma Study Group” (ILSG) publicaron la revisión Europeo-Americana de la clasificación de las neoplasias linfoides (REAL)⁴⁴ y posteriormente revisada por la OMS en una nueva publicación en el 2001,⁵⁰ la forma de entender y clasificar los linfomas ha sufrido un cambio radical. Los nuevos conocimientos inmunológicos y moleculares permitieron organizar las diferentes entidades descritas basándose en características como: incidencia, cualidades inmunológicas, agresividad histológica y supervivencia. Además describía nuevas entidades independientes como son los LNH de bajo grado extranodales asociados a mucosas (MALT), los linfomas esplénicos de la zona marginal, los linfoma primario mediastínico de célula grande B, el linfoma de células del manto, el linfoma B monocitoide y una variedad de linfomas de células T, incluido el linfoma anaplásico.

Cada entidad se definía por la combinación de características morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y clínicas. La relativa importancia de estas características variaba entre las diferentes entidades, no existiendo ninguna que resultase la “gold standard” para definir los diferentes tipos de linfomas.

Desgraciadamente en nuestra serie de linfomas no ha sido posible reproducir esta nueva clasificación de la OMS, ya que además de disponer de muestras con más de 15 años de antigüedad, los últimos linfomas incluidos son del año 2000 y, aunque se pudieron identificar algunas de las nuevas entidades descritas en la REAL como el linfoma difuso de célula grande B (LDCGB), el linfoma MALT y el linfoma de células del manto, nuestro Centro no disponía de la tecnología apropiada para poder poner en marcha una correcta reproducción de la clasificación REAL de forma rutinaria.

Por todo ello, y para seguir una uniformidad de criterio durante el estudio se decidió mantener la clasificación de la “Formulación del Trabajo” (Working Formulation)¹⁹² que era la más usada en aquel momento y de alguna forma permitía una homogeneidad en los criterios histológicos y clínicos utilizados, aún asumiendo las limitaciones de dicha clasificación.

7.4.- Análisis estadístico descriptivo sobre la serie de linfomas.

En el estudio estadístico descriptivo en nuestra serie de linfomas respecto a las variables clínico-biológicas clásicas de valor pronóstico en el estudio de linfomas como son: el grado histológico, el estadio, la afectación extranodal vs nodal, el IPI, la LDH y la β_2 microglobulina, los resultados son concordantes con lo publicado.^{178,179,189-194}

Así, en nuestra serie, ni la edad ni el sexo se relacionaron con ninguno de los parámetros descritos. Tampoco se relacionaron con la respuesta al tratamiento. Sin embargo se observó que en los pacientes de mayor edad la supervivencia global es significativamente menor que la de los pacientes jóvenes. La explicación a esta asociación estadística se debe a que muchos pacientes de mayor edad no suelen recibir tratamientos de inducción ni de rescate igual de agresivos que los pacientes jóvenes debido a la toxicidad asociada. Ello conlleva que estos pacientes presenten una menor supervivencia global.

Al analizar las diferentes variables clínico-biológicas clásicas en estudio de los linfomas tampoco se encontró diferencias con lo publicado en la bibliografía.

Los pacientes con linfomas de alto grado presentaban niveles de LDH significativamente más elevados que los de bajo grado, como era lógico esperar. También resultó coherente el que los pacientes que se presentaban con estadios localizados o IPI de bajo riesgo al diagnóstico presentasen niveles de LDH y de β_2 microglobulina significativamente más bajos.

Los linfomas extranodales se presentan más frecuentemente en estadios localizados, lo que también resulta coherente si tenemos en cuenta el comportamiento clínico de la mayoría de este tipo de linfomas. Como es sabido, los linfomas extranodales más frecuentes son los que se originan en el tracto gastrointestinal, siendo característico que no se encuentren en estadios diseminados al debut, e incluso cuando recaen, tengan una tendencia a hacerlos en el mismo tracto gastrointestinal.

En cuanto a los tratamientos realizados, los pacientes que recibieron una mayor proporción de esquemas poliquimioterápicos que incluyeran antraciclínicos fueron aquellos que presentaban al diagnóstico un alto grado de malignidad, los que se diagnosticaron en estadios avanzados y los que debutaron como linfomas extranodales.

Cuando se valoró la probabilidad de poder alcanzar una remisión completa tras el tratamiento, se observó que sólo los pacientes que se diagnosticaron en un estadio precoz, con un IPI bajo, con enfermedad de origen extranodal y ausencia de síntomas B, mostraron una asociación significativa. De la misma forma, los pacientes que al diagnóstico mostraron niveles normales o bajos de LDH y β_2 microglobulina obtuvieron una proporción significativamente mayor de remisiones completas. Estos resultados son los esperados en la evolución de los linfomas tras el tratamiento.

Igualmente, los pacientes con linfomas diagnosticados en estadios precoces recaen significativamente menos después de alcanzar la remisión completa.

El análisis de supervivencia en nuestra serie de linfomas, también confirma lo publicado,¹⁹⁴ así las mayores supervivencias globales se observaron en los pacientes con diagnóstico de linfomas en estadios precoces, los pacientes con un ECOG bajo, pacientes con ausencia de síntomas B y aquellos pacientes con un IPI bajo.

También pudimos observar que los pacientes con niveles normales o bajos de LDH y β_2 microglobulina tienen una probabilidad de supervivencia global significativamente mayor.

Al analizar el tiempo libre de enfermedad únicamente el estadio al diagnóstico mostró una correlación. Como era de esperar, los pacientes con un estadio avanzado presentan un tiempo libre de enfermedad significativamente menor dado que son también los pacientes que más probabilidad tienen de recaer.

Como se discutirá más adelante, estas variables con significación estadística a la hora de valorar la posibilidad de conseguir la remisión completa de la enfermedad tras el tratamiento o la posibilidad de no recaer, la probabilidad de una mayor supervivencia o la probabilidad de un tiempo libre de enfermedad mayor, se incluirán en el estudio multivariante para poder identificar aquellas de mayor peso específico que tengan valor pronóstico independiente.

7.5.- Análisis descriptivo de la expresión de apoptosis, proliferación celular y aneuploidía en nuestra serie de linfomas.

En nuestra serie de linfomas se confirma lo descrito previamente por nuestro grupo.¹⁷⁵ Se confirma la asociación del grado histológico con la cantidad de células en apoptosis. Hemos podido observar que a medida que aumenta el grado histológico aumenta la expresión de la apoptosis.

También se mantiene una correlación con la presentación nodal vs extranodal del linfoma. Los linfomas extranodales muestran niveles de apoptosis significativamente mayores.

La Fase S también se mostró significativamente superior en los linfomas de alto grado, ya que son linfomas con una mayor capacidad proliferativa. Como ya publicó nuestro grupo y otros autores, el porcentaje de células en fase S es capaz de discriminar los subgrupos de malignidad histológica. Los linfomas de alto grado muestran una fase S significativamente mayor que los de grado intermedio y a su vez estos de los de bajo grado.

Hemos observado que los linfomas aneuploides se presentan más frecuentemente con una fase S significativamente mayor. La mayor capacidad de proliferación de algunos linfomas se traduce en un mayor contenido en DNA de los mismos.

7.6.- Análisis del estudio de expresión de apoptosis, proliferación celular y aneuploidía.

En el análisis del estudio estadístico bivalente en relación a la probabilidad de alcanzar la remisión completa de la enfermedad tras el tratamiento hemos podido observar una relación significativa con la expresión de apoptosis y fase S. De tal forma que los pacientes que se presentan con linfomas con una apoptosis mayor o una fase S elevada tienen más probabilidades de alcanzar la remisión completa. Estos resultados corroboran los obtenidos por nuestro grupo en trabajos previos. Es lógico pensar que los linfomas que presentan un mayor "turn-over" celular son más sensibles a los tratamientos poliquimioterápicos, obteniendo mayores tasas de respuesta. Probablemente, la presencia de una apoptosis aumentada en el tejido linfomatoso traduzca una mayor susceptibilidad al tratamiento como ocurre con los linfomas con una fase S aumentada.

Sin embargo, esta asociación no se mantiene al estudiar la supervivencia global. Tampoco hemos observado una asociación con una mayor o menor probabilidad de recaer ni tampoco con un mayor o menor tiempo libre de enfermedad. La explicación a este hecho posiblemente se deba a que en la historia natural del linfoma pueden existir cambios biológicos que entren en juego y puedan interferir en la evolución clínica de los pacientes, teniendo repercusión en la supervivencia global, en la aparición o no de recaídas y por lo tanto en un diferente tiempo libre de enfermedad.

7.7.- Análisis del estudio multivariante en nuestra serie de linfomas y la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía

Con la intención de poder identificar que parámetros se comportaban como factores pronóstico independientes a la hora de valorar su capacidad para predecir la probabilidad de conseguir la remisión completa, predecir la probabilidad de recaída o para predecir una mayor o menor supervivencia global y tiempo libre de enfermedad, se diseñó un estudio multivariante donde se incluyeron sólo los parámetros que mostraron algún tipo de relación en el estudio bivariante.

También se incluyó en el modelo la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía.

Al analizar la respuesta al tratamiento definida por la probabilidad de alcanzar la remisión completa de la enfermedad, los factores pronóstico clásicos como son el estadio y el IPI mantenían su potencia estadística en el estudio multivariante, lo cual es un hecho bien establecido y nos sirve para validar nuestra serie de linfomas.^{47,194}

Al contrario que la Fase S, la apoptosis no mantiene su correlación con la capacidad para alcanzar la remisión completa que se observaba en el estudio bivariante. Entendemos que aunque esta asociación sea real, las variables: estadio, IPI y fase S, tienen un mayor potencial predictivo como factores pronósticos independientes, al ser analizadas en un modelo multivariante, desplazando el potencial predictivo de la expresión de apoptosis en los linfomas y su capacidad para alcanzar la remisión completa.

Por el contrario, parece importante resaltar que aquellos pacientes que muestran un linfoma con una proliferación elevada son más susceptibles de responder al tratamiento poliquimioterápico debido a su cinética celular y al mecanismo de acción del tratamiento que es más eficaz sobre las células tumorales en división. Esto permite eliminar más cantidad de células, y por tanto de tumor, en los linfomas con una fase S elevada.

Quizás sea más difícil de explicar que un linfoma, por el hecho de originarse en un tejido extraganglionar, presente una probabilidad significativamente mayor de alcanzar la remisión completa como se demuestra en el estudio multivariante de nuestra serie de linfomas. De todos es conocido que existen linfomas extranodales que muestran una alta tasa de remisiones completas, incluso utilizando tratamientos no quimioterápicos como es el caso de remisiones completas en linfomas gástricos tras tratamiento antibiótico. De igual forma, existen otros linfomas extranodales primarios, como los linfomas del sistema nervioso central o algunos subtipos de linfomas cutáneos, cuya respuesta al tratamiento es mucho más pobre. Por todo ello creemos que no sería correcto definir el hecho de que la presentación extraganglionar de un linfoma le confiera por sí mismo una mayor capacidad para entrar en remisión completa, sino que más bien algunas localizaciones extranodales, debidas a las características biológicas y moleculares de los linfomas que allí se desarrollan, muestran una mayor o menor facilidad para ser erradicados con el tratamiento. En nuestra serie de linfomas, cuando el origen del mismo fue extraganglionar, la localización predominante era la gastrointestinal y amigdalara, las cuales se caracterizan por una mayor tasa de respuestas.

Únicamente el estadio se mostró como una variable con significación pronóstica independiente al estudiar la probabilidad de recaída y el tiempo libre de enfermedad, lo cual resulta lógico ya que son los pacientes con linfomas que se diagnostican en estadios avanzados los que más frecuentemente recaen, a pesar de haber conseguido una remisión completa, y de la misma forma, son los pacientes en los que el tiempo que viven sin enfermedad es menor.⁶¹

Al analizar la supervivencia global en el modelo multivariante sólo el IPI, y prácticamente el estadio ($p= 0,060$), se mostraron como variables con un valor predictivo independiente.

Resulta lógico pensar, que la cantidad de fase S mostrada por los tumores pueda ser de gran utilidad al valorar la respuesta al tratamiento pero que su capacidad predictiva se pierda al estudiar la presencia de recaídas o tiempo de supervivencia global y tiempo libre de enfermedad, ya que estas características evolutivas de la enfermedad probablemente dependan de otros factores inherentes al linfoma y al paciente, y en alguna medida al tratamiento utilizado.

7.8.- Análisis de la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía estratificado en subgrupos clínicos.

Nos pareció interesante estudiar la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía estratificando los pacientes en diferentes subgrupos clínicos de interés, como son el IPI, el estadio, la presentación nodal vs extranodal y el grado histológico, y sobre ellos estudiar la respuesta al tratamiento, recaída y supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad. Esto nos podría permitir identificar pacientes en los cuales la expresión de estas variables pudiera tener una mayor utilidad clínica.

La presencia o no de aneuploidía no se mostró útil como factor pronóstico en los diferentes subgrupos de pacientes en nuestra serie de linfomas.

La expresión de apoptosis mantuvo su asociación estadística con la probabilidad de alcanzar la remisión completa de la enfermedad cuando el linfoma se presenta en un estadio avanzado o cuando el paciente al diagnóstico tiene un IPI bajo. En ambos casos, una apoptosis elevada se correlaciona con una mayor probabilidad de conseguir la remisión completa de la enfermedad. A pesar de haberse demostrado la existencia de una asociación entre la expresión de la apoptosis y la respuesta al tratamiento, definida ésta como la probabilidad de alcanzar la remisión completa de la enfermedad, como se pudo observar en el estudio bivalente, existen otras variables de mayor potencial predictivo, lo que condiciona que probablemente sólo en ciertas circunstancias la apoptosis demuestre su valor pronóstico.

Sin duda fue la fase S la variable de mayor utilidad pronóstica al estudiar los diferentes subgrupos. Como ya se comentó anteriormente, nos pareció lógica la relación estadística entre la cantidad de células en fase S en el tejido tumoral y la probabilidad de alcanzar la remisión completa de la enfermedad. El estudio de la

fase S en los diferentes subgrupos clínicos permitió identificar a pacientes con linfoma en los cuales el estudio de proliferación celular era especialmente útil para predecir la probabilidad de alcanzar la remisión completa. Estos pacientes se caracterizan por presentar al diagnóstico un linfoma nodal y datos clínico-biológicos de mal pronóstico, como son un IPI elevado, un estadio avanzado y un alto grado histológico. En este subgrupo de pacientes, que en nuestra serie pudo resultar reducido (n= 11), podemos observar que una fase S elevada identifica a pacientes con linfoma nodal y datos de mal pronóstico al diagnóstico que tienen más probabilidad de alcanzar una remisión completa con el tratamiento convencional. Dicho de otra forma, los pacientes con linfomas nodales en estadios avanzados y con histología de alto grado, si muestran una fase S baja, deberían ser subsidiarios de tratamientos quimioterápicos más agresivos o experimentales, dada la significativa baja tasa de remisiones completas que muestran.

Ninguna de las tres variables en estudio, la apoptosis, la fase S y la aneuploidía, mostró interés pronóstico al analizar las recaídas de la enfermedad, la supervivencia global y el tiempo libre de enfermedad.

7.9.- Consideraciones previas sobre el estudio de CD44 y CD44v6.

En la práctica totalidad de las publicaciones referidas en la bibliografía, la valoración de la expresión de CD44 por inmunohistoquímica sobre tejido tumoral se realizó desde un punto de vista cualitativo, valorando la intensidad de expresión de CD44, y desde un punto de vista cuantitativo, que valoraba la cantidad de células teñidas.

El análisis cualitativo supone un trabajo sujeto a la valoración subjetiva del observador.

En nuestro estudio realizamos un análisis de la expresión de CD44 diferente a lo publicado en la bibliografía, en un intento de disminuir al máximo la subjetividad del observador originada a la hora de interpretar la intensidad de expresión antigénica, aunque, como en todos los trabajos, dos observadores independientes realizaran el análisis. Para ello, al analizar la intensidad de expresión de CD44, cada muestra se comparó simultáneamente con su control amigdalario de tinción. Así, se consideró una tinción **positiva** de la muestra

tumoral, si su intensidad de expresión era similar al control positivo amigdalario. Por otro lado, se consideró una tinción **negativa** cuando la intensidad de la muestra tumoral era similar a su control negativo amigdalario. Esto nos pareció importante, ya que puede existir un “background” debido a la técnica, que podría originar interpretaciones erróneas de intensidad si no se comparase con el control negativo correspondiente a esa muestra. Además pudimos comprobar que no todos los controles negativos y positivos, en los diferentes grupos de muestras tecnicadas en diferentes momentos, tenían la misma intensidad. Creemos que esto hacía necesario comparar cada muestra tecnicada con su control amigdalario para poder obtener un resultado comparable entre las diferentes muestras tecnicadas en momentos diferentes.

Esta forma de analizar la intensidad de expresión de CD44 nos permitió además identificar dos grados más de intensidad antigénica. Así, cuando la expresión de CD44 en la muestra tumoral era mayor que la observada en el control positivo amigdalario, se consideró como **positivo intenso**, de la misma forma, si la intensidad de tinción tumoral era menor que la observada en el control positivo amigdalario y mayor que en el control negativo, se consideró como **positivo débil**.

Por otro lado, intentamos objetivizar lo máximo posible la interpretación de la cantidad de células positivas en cada muestra, independientemente de su intensidad de tinción. Como se explica en el apartado de material y métodos, se diseñó un registro fotográfico de las muestras tumorales sobre las que se aplicó un programa informático de tratamiento de imagen, que permitió distinguir, sobre la muestra tumoral aplicando una escala de grises, las zonas teñidas por el anticuerpo de las no teñidas. Posteriormente, aplicando otro programa informático que analizaba cada píxel, pudimos calcular el porcentaje de células teñidas en cada muestra. Los resultados obtenidos se compararon con la realizada por dos observadores que calcularon el porcentaje de células teñidas contando una parte representativa de las muestras.

Creemos que este diseño de conteo “semiinformático”, permite obtener unos resultados más fidedignos cuando se analizan muestras tumorales muy heterogéneas en su composición celular y con una gran variabilidad de expresión del antígeno dentro de la misma muestra.

Además de obtener unos resultados no supeditados a la subjetividad del observador, permite un análisis más rápido y se puede registrar como archivo

informático con los datos analizados, que además, son fácilmente comparables con los de otros grupos de investigación.

En este trabajo, los resultados obtenidos y los análisis estadísticos comparativos con: las características clínicas y biológicas de los linfomas al diagnóstico, la respuesta al tratamiento y la evolución, se realizaron considerando dos grupos de intensidad de expresión de CD44 (negativo y débil positivo vs positivo y positivo intenso).

De la misma forma se consideró que el “cut off” que mejor discriminaba, a la hora de valorar el porcentaje de células que expresan CD44, fue del 40%. Así se diferencian pacientes con una expresión de CD44 \geq del 40% de las células de la muestra frente a pacientes con una expresión de CD44 $<$ del 40%.

En el análisis de expresión de CD44v6 únicamente se valoró la positividad vs negatividad de la tinción para dicho antígeno. No se consideró realizar una valoración del porcentaje de células teñidas ni de la intensidad de tinción.

7.10.- Identificación de los linfomas difusos de célula grande B (LDCGB), subtipo histológico con especial interés clínico

El LDCGB es una entidad introducida en la clasificación REAL⁴⁴ y que se mantiene en la revisión realizada por la OMS.⁵⁰ Es el linfoma no Hodgkin más común, suponiendo más del 30% de todos los casos en los países occidentales. Representa un grupo heterogéneo tanto desde el punto de vista morfológico, fenotípico y molecular como desde un punto de vista clínico. Puede aparecer como una entidad “de novo” o como fruto de una transformación de un linfoma indolente.

Debido a estas peculiaridades y su diferente comportamiento clínico y pronóstico en los últimos años han aumentado el número de estudios clínicos, histopatológicos y moleculares intentando poder identificar subgrupos pronósticos, dentro de los LDCGB, que permitieran utilizar diferentes estrategias terapéuticas en función de su agresividad.⁹¹

Algunos de estos trabajos han demostrado, utilizando técnicas de microarrays e inmunohistoquímica, que la expresión de CD44 en estos linfomas puede discriminar grupos pronósticos.^{196,197}

Por todo ello nos pareció importante el intentar identificar este grupo de linfomas difusos de células grandes B de nuestra serie y analizar su comportamiento en relación a la expresión de CD44 y CD44v6. Para ello, partiendo del hecho de que están bien establecidos en la clasificación de la OMS los tipos histológicos de linfomas de otras clasificaciones previas como la “Working Formulation” que representarían o serían “sinónimos” en la actualidad de LDCGB, logramos identificar de forma teórica este subgrupo de linfomas. Los tipos histológicos de linfomas reflejados en la “Working Formulation” que equivaldrían al subtipo LDCGB serían: “diffuse large cell”, “large cell immunoblastic” y “diffuse mixed small and large cell”.⁵⁰

Aunque somos conscientes que no supone un diagnóstico absoluto de LDCGB, creemos que sí es una proximidad histológica actual y que los resultados obtenidos podrían ser extrapolables a la situación real pronóstica del LDCGB. También podrían servir de base científica para continuar estudios prospectivos en este tipo de linfomas.

En la actualidad, el estudio de los LDCGB resulta de especial importancia por tratarse del linfoma más frecuente y porque todos los autores parecen coincidir en que probablemente abarque más de un subtipo histológico con diferentes comportamientos clínicos y pronóstico.

De lo publicado en este sentido, existe una diversidad de expresión de CD44 en este tipo de linfomas, lo cual no permite diferenciarlos del resto de los linfomas.¹⁹⁸

Los estudio que analizan la expresión de CD44 dentro de los linfomas difusos de célula grande B, han permitido a algunos autores el describir subgrupos pronóstico, permitiendo diferenciar pacientes con peor pronóstico al presentar LDCGB con mayor expresión de CD44.^{89,171,199}

La mayoría de estos estudios se realizaron utilizando clasificaciones histológicas previas a la aparición de la clasificación REAL, lo cual, en nuestra opinión podría sesgar los resultados.

Recientes estudios basados en el perfil genético de este tipo de linfomas han conseguido identificar al menos dos subgrupos bien diferenciados, que muestran un pronóstico diferente. Uno de ellos mostraría un perfil genético relacionado con células del centro germinal, mientras que el otro subgrupo expresaría genes

característicos de una célula B activada. Estos dos subgrupos mostrarían un diferente pronóstico tanto en relación a la supervivencia como a las respuestas obtenidas con el tratamiento convencional basado en antraciclinas. En estos trabajos se analiza la expresión de CD44 en los LDCGB describiéndose una asociación con un peor pronóstico de la enfermedad.^{91,196,197}

7.11.- Análisis descriptivo de la expresión de CD44 en nuestra serie de linfomas

Para realizar el estudio de expresión de CD44 se incluyeron 156 pacientes, de los 219 de nuestra serie, de los que se disponía de material histológico suficiente.

Pudimos observar en nuestra serie, que las variables clínico-biológicas estudiadas al diagnóstico, como fueron el grado histológico, estadio, presencia de síntomas B, ECOG, IPI, origen extranodal, LDH y β_2 microglobulina, no mostraron ninguna asociación estadística con la expresión de CD44 en el tejido tumoral.

Algunos autores han descrito que una ausencia de expresión de CD44 o una débil intensidad del mismo es más frecuente en LNH de alto grado.

Otros autores, observaron una mayor expresión de CD44 en los linfomas difusos que en los linfomas nodulares.^{161,200}

En nuestra serie de pacientes no hemos encontrado diferencias entre el subtipo histológico y la expresión de CD44. Tampoco hemos podido identificar una expresión diferente de CD44 en los linfomas incluidos en el subtipo LDCGB, lo cual coincide con lo publicado por algunos autores.¹⁹⁸

Tampoco pudimos demostrar una correlación entre el estadio de la enfermedad al diagnóstico y la expresión de CD44. Ello es debido a que si considerásemos un modelo teórico, la capacidad de diseminación tumoral estaría condicionada por la presencia, en las células tumorales, de moléculas que les permiten abandonar su hábitat natural, desplazarse por el torrente circulatorio sanguíneo o linfático, abandonarlo en una localización lejana a su origen y poder sobrevivir en un ambiente diferente del que provienen.

El CD44 es una molécula de adhesión que ha demostrado que su expresión en células normales, al igual que en células tumorales, les confiere capacidad de recircular por el torrente circulatorio y trasladarse a otros tejidos lejanos, lo que en definitiva confiere a las células tumorales la capacidad para diseminarse. Conociendo el mecanismo de acción que desempeña esta molécula de adhesión sería lógico pensar que una alta expresión de CD44 debería asociarse con una presentación de la enfermedad en un estadio avanzado, o dicho de otra forma, que aquellos linfomas que debutan en estadios avanzados estarían compuestos por células tumorales con alta capacidad de diseminación, y por lo tanto, expresarían CD44.

Sin embargo, al igual que nosotros, otros autores que se han planteado el mismo razonamiento concluyen que la correlación entre la expresión de CD44 y el estadio es incompleta, ya que a pesar de haber encontrado una mayor expresión de CD44 en linfomas no Hodgkin diagnosticados en estadios avanzados, se observaron casos de linfomas que se presentaron en estadios avanzados y mostraron una negatividad para la expresión de CD44. De la misma forma, también observaron linfomas no Hodgkin CD44 positivos que debutaron como estadios localizados.¹⁶⁹⁻¹⁷¹

Otros autores compararon la expresión de CD44 en los linfomas diagnosticados en estadios I vs linfomas estadios II-IV.^{169,200} Aunque observaron una mayor frecuencia de expresión de CD44 en los estadios II-IV esta no llegaba a ser significativa. Nosotros no analizamos esta situación porque entendemos que se trata más de un intento de explicar un modelo teórico de comportamiento biológico que carece de utilidad pronóstica en la práctica clínica. Entendemos que en el modelo teórico de diseminación planteado seguramente participen otros factores biológicos, como son otras moléculas de adhesión o factores humorales que faciliten la angiogénesis y por tanto la capacidad de desarrollo y expansión tumoral, que en nuestro trabajo no hemos explorado.

Dadas las características funcionales ligadas a la expresión de CD44 en los leucocitos, promoviendo la capacidad de migración, al tratarse de una molécula de adhesión, uno podría esperar encontrar una asociación entre la expresión de esta molécula y la presencia de enfermedad linfomatosa extranodal. Sin embargo esto no es así. No sólo porque la bibliografía nos describa una menor expresión de CD44 en los linfomas gastrointestinales, que conforman el grupo

más frecuente de linfomas extranodales,^{169,200} sino porque existen estudios que han demostrado que no existe una diferencia significativa entre la localización nodal y extranodal de la enfermedad linfomatosa al estudiar la expresión de CD44.^{161,171,198,200} En el estudio de nuestra serie de pacientes, como lo publicado en la bibliografía, no hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre la expresión de CD44 y la presentación nodal o extranodal de la enfermedad.

Tampoco hemos encontrado una relación significativa entre la expresión de CD44 y la presencia de un IPI bajo (0-2) o alto (3-5) al diagnóstico. Es un resultado coherente dado que la expresión de CD44 tampoco se relaciona, de forma significativa, con ninguno de los parámetros que componen el Índice Pronóstico Internacional.

El valor pronóstico establecido por ambas variables es independiente uno de otro, lo que se confirma en el estudio multivariante que luego analizaremos. El IPI define, de forma indirecta, la carga tumoral presente al diagnóstico, sin embargo, la expresión de CD44 define cualidades biológicas e inmunológicas de las células tumorales, confiriéndoles mayor o menor agresividad independientemente de la cantidad de tumor presente al diagnóstico. En la literatura no se encuentran trabajos que estudien la asociación entre la expresión de CD44 y el IPI de forma genérica.

No hemos encontrado ninguna asociación significativa entre la expresión de CD44 y la determinación de LDH y β_2 microglobulina en nuestra serie. Los estudios publicados en este sentido analizan los niveles séricos de CD44 demostrando su utilidad pronóstica y su correlación con la respuesta al tratamiento pero no existiendo, en la mayoría de estos trabajos, una correlación con estas variables biológicas.^{201,202}

Como ocurre con el IPI, la expresión de CD44 y los niveles de LDH y β_2 microglobulina son variables pronósticas diferentes. Los datos biológicos de LDH y β_2 microglobulina también miden de forma indirecta la carga tumoral al diagnóstico como ocurre con el IPI. Como se describe con anterioridad, es probable que la expresión de CD44 esté más relacionada con cualidades biológicas e inmunológicas de las células tumorales.

7.12. Análisis del estudio de expresión de CD44.

En el análisis del estudio estadístico bivalente en relación a la respuesta al tratamiento hemos podido observar que la expresión de CD44 se relaciona de forma significativa con la probabilidad de alcanzar una remisión completa de la enfermedad tras el tratamiento y con la supervivencia global.

El análisis de la expresión de CD44 en nuestra serie de linfomas y la respuesta al tratamiento demostró que los pacientes con un porcentaje de positividad para este antígeno $\geq 40\%$ sobre las células tumorales se relacionaban estadísticamente con mayor riesgo de no alcanzar la remisión completa. Estos resultados se correlacionan con los publicados por algunos autores.¹⁷¹

El mayor riesgo de no responder que muestran los linfomas con un porcentaje $\geq 40\%$ de células que expresan CD44 nos resulta difícil de explicar desde el punto de vista biológico, ya que como hemos comentado no es debido a que los pacientes se encuentren al diagnóstico en un estadio avanzado o presenten un IPI desfavorable. Es probable que esta característica “de diseminación” de los linfomas con alta expresión de CD44 se ponga de manifiesto por medio de una especial capacidad de “escapar” a los tratamientos quimioterápicos y probablemente presente fenómenos cruzados de MDR (multidrug-resistant).

Recientemente se ha publicado la capacidad de CD44 para modular la muerte celular regulando la expresión del receptor de apoptosis Fas. En el modelo que describen han podido demostrar que la expresión de CD44 confiere resistencia a una serie de inductores de apoptosis en líneas celulares cancerosas. Así, la “sobre-regulación” de CD44, observada en muchas neoplasias, reduce la capacidad de Fas y otros receptores de membrana de apoptosis para activar señalizaciones de muerte celular, confiriendo así a estos tumores una resistencia a los tratamientos.²⁰⁸

Este modelo nos permitiría explicar el mecanismo biológico involucrado en la observación de una significativa menor respuesta al tratamiento en los pacientes de nuestra serie, que debutan con linfomas que muestran una mayor expresión de CD44.

Creemos que este hallazgo resulta de gran interés clínico ya que nos permite identificar al diagnóstico, pacientes que tienen menos probabilidades de

conseguir la remisión completa con el tratamiento establecido como primera línea y podrían beneficiarse de actuaciones terapéuticas alternativas.

Al igual que los resultados obtenidos en el análisis de expresión de CD44 y la probabilidad de conseguir la remisión completa de la enfermedad, los pacientes con un porcentaje de positividad para este antígeno $\geq 40\%$ sobre las células tumorales se relacionó estadísticamente con una menor supervivencia global. Estos resultados coinciden con lo publicado por algunos autores.^{171,203}

De nuevo se demuestra que el porcentaje de expresión de CD44, discrimina pacientes con linfomas con una supervivencia global significativamente menor que otros, identificando una población de pacientes con linfoma agresivo que serían subsidiarios de estrategias terapéuticas más individualizadas que las indicadas en primera línea, y probablemente más agresivas.

Estos resultados ponen de manifiesto que la expresión de CD44 en los linfomas no Hodgkinianos tiene implicaciones pronósticas. El mecanismo fisiopatológico por el cual la expresión de una molécula de adhesión, como es el CD44, se asocia con una peor respuesta al tratamiento y una menor supervivencia está todavía por aclarar. Como se discutió con anterioridad, y aunque únicamente es una conjetura, es probable que la capacidad reguladora de la expresión de CD44 sobre receptores de apoptosis en la membrana, confiriera a la enfermedad un peor pronóstico determinado por una refractariedad a los tratamientos, y por ello, una menor supervivencia.

Otro hallazgo importante en el estudio de la expresión de CD44 fue que el análisis del porcentaje de células que expresaban éste antígeno, con un “cut-off” en el 40%, resultó el más útil como variable pronóstica en el estudio de los linfomas de nuestra serie.

El estudio de la intensidad de expresión de CD44 no se mostró tan discriminativo como variable pronóstica en nuestra serie, al contrario de lo publicado por algunos autores.^{169-171,200,203}

Resulta interesante resaltar que, a pesar de que un porcentaje de positividad para CD44 $<$ del 40% sobre las células tumorales sea útil para predecir una mayor probabilidad de alcanzar la remisión completa y una mayor supervivencia global, no se relaciona de forma significativa con una menor recaída de la enfermedad y un tiempo libre de enfermedad mayor. De entrada se podría

presuponer que es el hecho de conseguir la remisión completa lo que determina, por si misma, una supervivencia global superior y no la expresión de CD44, ya que ésta no refleja que los pacientes que entran en remisión tras el tratamiento recaigan significativamente menos ni muestran un tiempo libre de enfermedad mayor. Al analizar los resultados detenidamente, creemos que esta afirmación no es del todo exacta. Resulta evidente que, en cualquier enfermedad oncológica, una supervivencia global prolongada va ligada, no sólo a conseguir una remisión completa tras el tratamiento, sino también que esta remisión sea de calidad, es decir, que resulte en una menor tasa de recaídas o en un tiempo libre de enfermedad prolongado aunque el paciente al final recaiga.

En nuestra serie de pacientes con linfoma, resultó significativo que un porcentaje de positividad para CD44 < del 40% sobre las células tumorales mostró una asociación significativa con alcanzar la remisión completa. Sin embargo, tanto los pacientes que mostraron un porcentaje < del 40% de CD44 como los que tenían un porcentaje \geq del 40% de CD44 y consiguieron una remisión completa de la enfermedad recayeron menos, lo cual implica que no exista una correlación estadística. Pero debemos reseñar que el número de pacientes con un porcentaje \geq del 40% de CD44 que alcanzaron la remisión completa fue muy bajo, sólo 11 pacientes. Este hecho probablemente cree algún sesgo al analizar las recaídas de pacientes en el grupo de CD44 \geq 40%. De forma similar al analizar el tiempo libre de enfermedad, los pacientes con linfomas que presentan un porcentaje \geq del 40% de CD44 muestran una supervivencia menor sin enfermedad, aunque no de forma significativa. Probablemente el hecho que sólo podamos analizar 11 pacientes en este grupo también determine algún tipo de interferencia estadística.

También creemos importante reseñar que al no disponer de muestras histológicas en las recaídas para analizar la expresión de CD44, no sabemos si se mantiene la correlación entre la probabilidad de alcanzar la remisión completa tras el tratamiento en aquellos pacientes con un porcentaje de positividad para CD44 < del 40% en la muestra histológica en la recaída tras la primera remisión completa. Únicamente podemos especular que aunque los pacientes recaen independientemente de la expresión de CD44, probablemente aquellos pacientes con linfomas en recaída que muestren un bajo porcentaje de expresión de CD44 podrían conseguir una segunda remisión completa de la

enfermedad con un tratamiento de rescate y por consiguiente obtener una supervivencia global mayor.

Por último, y en este sentido, hemos observado parámetros biológicos como son la expresión de apoptosis y fase S en los tumores, que se correlacionaron de forma significativa con la posibilidad de alcanzar la remisión completa y sin embargo no se tradujo en una mayor supervivencia global, lo cual sugiere que para lograr una mayor supervivencia el hecho de conseguir una remisión completa sea un factor necesario pero no el único.

7.13.- Análisis del estudio de expresión de CD44v6.

Uno de los resultados que más nos sorprendió, y a la vez nos decepcionó, en nuestro trabajo fue el resultado del análisis de expresión de CD44v6. De los 156 pacientes estudiados para la expresión de este antígeno, 139 pacientes, lo que supone el 90,8% de los casos, fueron negativos y sólo 14 pacientes, el 9,2% de los casos, mostraron alguna expresión de CD44v6. Esto se traduce en que no hemos podido obtener ninguna conclusión en los pacientes con linfomas que expresaban CD44v6. Por ello creemos que a ningún resultado del análisis obtenido se le puede dar significación estadística, dado el escaso porcentaje de pacientes que expresaron dicho antígeno.

Estos resultados sorprenden con los publicados en los cuales la expresión de CD44v6 se mostró como un factor pronóstico independiente sobre todo en los linfomas de alto grado. ^{173,183,184,186,187}

Probablemente la diversidad de técnicas y el hecho de no ser muchas de ellas cuantitativas pueden sesgar los resultados publicados.

7.14.- Análisis del estudio multivariante en nuestra serie de linfomas y la expresión de CD44.

Con la intención de poder identificar si la expresión de CD44 se comportaba como un factor pronóstico independiente a la hora de valorar su capacidad para predecir la probabilidad de conseguir la remisión completa, predecir la probabilidad de recaída o para predecir una mayor o menor supervivencia global y tiempo libre de enfermedad, se diseñó un estudio multivariante dónde se

incluyó, además de la expresión de CD44, los mismos parámetros clínico-biológicos clásicos, ya descritos previamente, que mostraron algún tipo de relación en el estudio bivalente y de los cuales alguno como el estadio y el IPI ya habían demostrado ser factores con valor pronóstico independiente.

Decidimos no incluir todos los parámetros estudiados en un único modelo estadístico multivariante dado que ello suponía la pérdida de 40 pacientes de los que se disponía de información sobre la expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía pero no se disponía de suficiente material histológico para el estudio de expresión de CD44 y CD44v6.

Por ello, para no perder potencia estadística al analizar nuestra serie global de pacientes en los que se disponía de información sobre parámetros clínico-biológicos, apoptosis, proliferación celular y aneuploidía; creímos conveniente diseñar un primer modelo de análisis estadístico descriptivo, que además incluyera el análisis estadístico bivalente y el análisis estadístico multivariante, donde se incluyeron los parámetros anteriormente descritos en relación a las variables: respuesta al tratamiento (definida como la probabilidad de alcanzar la remisión completa), presencia de recaídas, supervivencia global y tiempo libre de enfermedad. Este primer modelo estadístico incluyó a los 196 pacientes evaluables descritos con anterioridad.

El segundo modelo estadístico se diseñó con los 156 pacientes de los que se disponía de muestras histológicas para el estudio de expresión de CD44 y CD44v6. En este modelo al analizar los parámetros clínico-biológicos de los pacientes se obtuvieron los mismos resultados que en la serie global de pacientes del modelo estadístico anterior. Así, el actual modelo multivariante mantiene al estadio, el IPI y el origen extranodal del linfoma como factores pronóstico independientes, de la misma forma que se discutió con anterioridad.

La expresión de CD44 en un porcentaje $<$ vs \geq del 40% de las células tumorales se comportó como un factor pronóstico independiente a la hora de alcanzar la remisión completa tras el tratamiento. De tal forma que los linfomas con un porcentaje $<$ del 40% de células CD44 positivas presentaban una mayor probabilidad de alcanzar la remisión completa. Estos resultados se correlacionan con los publicados por algunos autores.¹⁷¹

El estudio multivariante confirma la utilidad pronóstica de la expresión de CD44 por las células linfomatosas y la probabilidad de responder a los tratamientos establecidos. En este caso, un bajo porcentaje de células linfomatosas con expresión de CD44 (< 40%) consigue predecir una mayor probabilidad de alcanzar una remisión completa independientemente de otros parámetros clásicos en el estudio de los linfomas, los cuales ya han demostrado su papel pronóstico en relación con la respuesta al tratamiento como son un estadio precoz y un IPI bajo. Estos parámetros también se comportan como factores pronósticos independientes en el estudio multivariante de nuestra serie de linfomas.

En el actual modelo de análisis estadístico multivariante, el diagnóstico de LDCGB también se mostró como un factor pronóstico independiente en relación a una mayor probabilidad de conseguir una remisión completa. Se trata sin duda de un resultado que debería analizarse con precaución. Por un lado, como ya se comentó, el diagnóstico como subtipo histológico de LDCGB, se realizó de forma teórica identificando aquellos linfomas que en la clasificación de la “Working Formulation” equivaldrían al diagnóstico de LDCGB actualmente definido por la OMS. Por lo tanto, debe tomarse como una aproximación teórica para poder demostrar su valor y debería corroborarse con un diagnóstico histológico real, lo cual en nuestra serie de linfomas no se ha podido realizar.

Por otro lado, las entidades que componen este grupo fueron tratadas, en su mayor parte con esquemas de poliquimioterapia que incluían antraciclínicos, generalmente CHOP, mientras que en el resto de entidades, no incluidas en este grupo, recibían esquemas terapéuticos menos agresivos, generalmente monoquimioterapia con alquilantes como primera línea de tratamiento. No podemos olvidar que el registro de nuestra serie de linfomas recoge pacientes hasta el año 2000, lo que supone que la mayoría de los pacientes no recibieron los nuevos esquemas terapéuticos con análogos de purinas, solos o en combinación, que han demostrado unas mayores tasas de respuestas globales y respuestas completas en los linfomas entonces denominados de bajo grado o indolentes. En nuestro centro, el tratamiento con análogos de purinas se inició en 1997 existiendo únicamente 7 pacientes, de los 156 evaluables, que recibieron esquemas terapéuticos que incluyeron análogos de purinas como primera elección terapéutica. Ninguno de los pacientes evaluables recibió

tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-CD20 (Rituximab) en primera línea de tratamiento.

El análisis de la supervivencia global mostró que la expresión de CD44 en un porcentaje $<$ vs \geq del 40% de las células tumorales se comportó como un factor pronóstico independiente. Así, los pacientes con linfomas que mostraron un porcentaje $<$ del 40% de células CD44 positivas presentaban una mayor supervivencia global, independientemente de otras características como el estadio de presentación de la enfermedad o el IPI. Estos resultados también fueron publicados por otros autores.^{170,171,203}

El análisis de los resultados del estudio multivariante de la expresión de CD44, en porcentaje, en relación a la respuesta al tratamiento y a la supervivencia global nos confirma la expresión de CD44 como parámetro biológico al diagnóstico que se comporta como factor pronóstico independiente.

La expresión de CD44 no se mostró útil en predecir una recaída de la enfermedad tras conseguir la remisión completa ni el tiempo libre de enfermedad.

Estos resultados obtenidos en el análisis multivariante ratifican los observados en el estudio estadístico bivariante en cuanto a la expresión de CD44 en un porcentaje $<$ vs \geq del 40% de las células tumorales, añadiendo a nuestro juicio, un mayor valor como parámetro pronóstico con utilidad clínica.

Como ocurrió al analizar la correlación estadística obtenida entre el diagnóstico de LDCGB y la respuesta al tratamiento, también debemos interpretar con reservas el hecho de que el diagnóstico histológico de LDCGB se muestre como factor pronóstico independiente en relación con la recaída. Según el resultado obtenido, los pacientes con diagnóstico de LDCGB recaen significativamente menos que el resto de pacientes. Dicha asociación además no se observaba en el análisis estadístico bivariante. Por todo ello no lo hemos considerado como un resultado relevante que deba tener interés clínico en el estudio de nuestra serie de pacientes con linfoma.

Hay que reseñar que el actual modelo de análisis multivariante mantiene los mismos parámetros clínico-biológicos, descritos con anterioridad en nuestra serie de pacientes con linfoma, que se mostraron como factores pronósticos independientes y que ya fueron discutidos. Así al analizar la respuesta al

tratamiento, tanto el estadio como el IPI y el origen extranodal volvieron a demostrar ser factores con capacidad pronóstica independientes.

Al analizar la supervivencia global sólo el IPI se mostró como variable con un valor predictivo independiente.

El estadio se mostró como una variable con significación pronóstica independiente al estudiar la probabilidad de recaída y tiempo libre de enfermedad.

Antes de profundizar en el estudio de subgrupos de linfomas y su comportamiento evolutivo en relación a la expresión de CD44, creemos que es importante resaltar los resultados obtenidos en el estudio multivariante. En el estudio de toda enfermedad oncológica, el poder disponer de parámetros tanto clínicos como biológicos al diagnóstico que nos permitan identificar pacientes con un peor pronóstico resulta de vital importancia para el manejo terapéutico. Dentro de estos factores pronósticos, probablemente los más importantes sean los que puedan predecir la mayor o menor probabilidad de obtener una curación, definida por una remisión completa de la enfermedad tras el tratamiento, y una mayor supervivencia. Esto permitiría diseñar esquemas terapéuticos ajustados a los diferentes grupos pronósticos con el fin, tanto de conseguir mayores tasas de curación, como de limitar toxicidades innecesarias a pacientes con mejor pronóstico. La valoración del porcentaje de células con expresión de CD44 al diagnóstico, al igual que otros parámetros clínico-biológicos ya descritos, permite identificar globalmente estos grupos pronóstico, consiguiendo predecir qué pacientes tienen menos probabilidad de conseguir una remisión completa con el tratamiento convencional, por lo tanto una menor supervivencia global, y cuales podrían beneficiarse de tratamientos alternativos más intensivos o combinaciones de nuevos fármacos que consigan “sobrepasar” la resistencia mostrada al tratamiento convencional.

7.15.- Análisis de la expresión de CD44 estratificado en subgrupos clínicos.

Al igual que en el estudio de expresión de apoptosis, fase S y aneuploidía, nos pareció interesante estudiar la expresión de CD44 estratificando los pacientes en diferentes subgrupos clínicos de interés. Como en el análisis anterior, los pacientes se estratificaron por el IPI, el estadio, la presentación nodal vs

extranodal y el grado histológico. Decidimos incluir un subgrupo clínico con pacientes con diagnóstico histológico de LDCGB. Como se realizó con anterioridad, en cada subgrupo de pacientes se analizó la respuesta al tratamiento, recaída y supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad. Esto nos podría permitir identificar pacientes en los cuales la expresión de estas variables pudiera tener una mayor utilidad clínica.

En el análisis de los subgrupos de pacientes pudimos observar que se mantenía de una forma casi constante la asociación entre la expresión de CD44, en función a un porcentaje de células $<$ vs \geq del 40%, con la respuesta al tratamiento (remisión completa) y la supervivencia global. Sin embargo, resultó interesante observar que donde mejor comportamiento pronóstico mostró la expresión de CD44 era en los pacientes que a priori se presentaron al diagnóstico con datos clínicos desfavorables. Pudimos observar que era en los pacientes con un IPI alto (3-5), un estadio avanzado (III-IV) y un subtipo histológico de alto grado en los que la expresión de CD44 resultaba de mayor utilidad pronóstica.

En algún caso, como el subgrupo estratificado por el IPI, nos llamó la atención que ningún paciente con IPI alto al diagnóstico y un porcentaje \geq del 40% de células CD44 positivas consiguió alcanzar la remisión completa.

Esto nos permitió identificar a pacientes que mostraban un mal pronóstico al diagnóstico basado en los factores clínicos clásicos que sin embargo presentaban una mayor tasa de respuestas completas y una supervivencia global más prolongada si tenían un porcentaje $<$ del 40% de células CD44 positivas. Sería este grupo de pacientes los que podrían beneficiarse del tratamiento estándar, lo que conseguiría una mayor probabilidad de curación sin provocar una toxicidad innecesaria con medidas terapéuticas más agresivas. Por el contrario, los pacientes de este grupo de mal pronóstico, con IPI alto, estadio avanzado, que mostrasen un porcentaje \geq del 40% de células CD44 positivas, en los que se demuestra una tasa de remisiones completas y una supervivencia global significativamente menor, deberían recibir esquemas terapéuticos más agresivo o tratamientos experimentales que permitieran sobrepasar la refractariedad que les caracteriza.

También nos pareció de interés observar en el subgrupo de pacientes estratificados en función del origen nodal vs extranodal de su linfoma, que la

expresión de CD44 en los pacientes con linfoma extraganglionar se asoció de forma significativa con la respuesta al tratamiento. De tal forma, tanto los pacientes que mostraron un porcentaje < del 40% de células CD44 positivas, como los que presentaban una ausencia de expresión de CD44 o una intensidad de la positividad débil del mismo, mostraron una probabilidad significativamente mayor de alcanzar la remisión completa de la enfermedad tras el tratamiento.

A pesar de que la expresión de CD44 no diferencie la enfermedad nodal vs la extranodal al diagnóstico, como se discutió con anterioridad, este hallazgo podría interpretarse de forma que la expresión de CD44 en estos subtipos de linfomas originen una respuesta diferente. En este sentido sería lógico pensar que la existencia de otras moléculas de adhesión implicadas en diferentes mecanismos fisiopatológicos, tanto en los linfocitos normales como en los linfomas, jugasen un papel crucial en el diferente comportamiento biológico.

Al estudiar las diferentes moléculas de adhesión en linfomas ganglionares y extraganglionares, se ha descrito que existe una diferente expresión de las mismas, lo que probablemente represente la existencia de diferentes características funcionales. Así, algunas moléculas de adhesión participan en el "homing" o migración de los leucocitos a los ganglios linfáticos desde la circulación, como sería el caso del CD44, mientras que otras participan más en la migración leucocitaria hacia otras localizaciones como las placas de Peyer, a membranas sinoviales y las zonas inflamatorias.^{12,204}

Estas características funcionales se traducirían en una mayor participación nodal o extranodal en los casos de tumores que presenten diferente expresión de alguna de estas moléculas de adhesión.

En esta ocasión, parece demostrarse que la presentación al diagnóstico de la enfermedad linfomatoso de forma extranodal es donde resulta más útil la expresión de CD44 como factor pronóstico que identifica pacientes con una menor probabilidad de alcanzar una remisión completa. Estos resultados no los hemos podido comparar con lo publicado en la bibliografía ya que, aunque no se ha encontrado una correlación entre la expresión de CD44 y la presentación nodal vs extranodal del linfoma, sí se ha descrito por algunos autores que dentro de los linfomas extranodales, especialmente en los linfomas gastrointestinales, una mayor expresión de CD44 se asocia con un peor pronóstico.^{161,205} Sin embargo, no se especifica en los artículos si los pacientes con diferente

expresión de CD44 presentan diferencias significativas al analizar la respuesta al tratamiento.

Algo que no debemos olvidar es que en nuestra serie de pacientes, aquellos que presentaron un linfoma extranodal al diagnóstico se trataron más frecuentemente con poliquimioterapia con antraciclínicos en comparación a los linfomas nodales, lo cual también podría suponer un sesgo a la hora de interpretar este resultado.

Por último, en el estudio de los pacientes estratificados en subgrupos clínicos, hemos observado que la capacidad pronóstica de la expresión de CD44 en relación a la respuesta al tratamiento y la supervivencia global se mantiene al analizar los linfomas según su grado histológico al diagnóstico, siendo los linfomas de alto grado los que muestran esta correlación. Así, los pacientes con diagnóstico de linfomas de alto grado con un porcentaje de expresión de CD44 \geq 40% se asociaron con una menor probabilidad de alcanzar la remisión completa tras el tratamiento.

7.16.- Estudio de correlación entre la expresión de la apoptosis, fase S y aneuploidía y la expresión de CD44 y CD44v6.

En el análisis de nuestra serie de pacientes con linfoma no hemos encontrado una correlación entre estas variables. Únicamente pudimos observar una tendencia a la relación entre la presencia de una aneuploidía citométrica y un porcentaje de expresión de CD44 \geq 40% sobre las células tumorales ($p= 0,054$). Ello probablemente traduzca que se trata de fenómenos biológicos diferentes en el comportamiento de estas enfermedades.

7.17.- Subgrupos clínicos de interés en el estudio de la expresión de CD44.

El análisis de los resultados obtenidos en el estudio de linfomas estratificados en los diferentes subgrupos clínicos nos ha permitido identificar algunos pacientes en los cuales el porcentaje de expresión de CD44 $<$ vs \geq del 40% resultó especialmente útil a la hora de valorar una mayor o menor probabilidad de alcanzar la remisión completa de la enfermedad tras el tratamiento.

La respuesta del linfoma al tratamiento es uno de los factores pronóstico más importantes a la hora de predecir la evolución de la enfermedad. El hecho de no

alcanzar una remisión completa tras el tratamiento implica una menor probabilidad de curación, aunque se utilicen tratamientos de rescate, y por tanto, una peor evolución. En estos pacientes en los que la probabilidad de alcanzar una remisión completa es significativamente menor deberían ensayarse diferentes estrategias terapéuticas ya sea con el uso de esquemas de tratamiento más intensivo o con nuevos fármacos, basados en terapias biológicas o moleculares, que puedan “sobrepasar” esta refractariedad a alcanzar la remisión completa.

Estos pacientes muestran datos de mal pronóstico al diagnóstico como son un IPI elevado (3-5) y un estadio avanzado (III-IV). Hemos observado que ningún paciente de este grupo pronóstico que mostraba un porcentaje de expresión de CD44 \geq 40% sobre las células linfomatosas consiguió una remisión completa. Por el contrario, los pacientes con los mismos datos desfavorables al diagnóstico (IPI alto y estadio avanzado), pero que sus linfomas mostraron un porcentaje de expresión de CD44 $<$ 40%, la posibilidad de alcanzar la remisión completa con el tratamiento de primera línea fue del 50%. Estos datos suponen que en este grupo de pacientes, la expresión de CD44 muestre una utilidad pronóstica muy importante de la cual podrían derivarse actuaciones terapéuticas. Parece claro, ante los resultados obtenidos en nuestra serie, que cuando los pacientes presentan al diagnóstico un IPI alto y un estadio avanzado, junto con una expresión de CD44 \geq al 40%, el tratamiento convencional de primera línea, que en nuestra serie fundamentalmente fue el esquema CHOP, debería ser sustituido por una terapia alternativa. Algunos autores recomiendan en pacientes con IPI alto o intermedio-alto y con diagnóstico histológico de LDCGB consolidar las respuestas obtenidas con un autotransplante para lograr aumentar la tasa de remisiones completas, que éstas sean mayor calidad y con ello, aumentar la tasa de curaciones.²⁰⁶

Hemos de reseñar, que en la práctica clínica actual, el uso de esquemas terapéuticos en primera línea, ya sea con poliquimioterápicos clásicos como el CHOP en el tratamiento de los linfomas agresivos o los análogos de purinas combinados en los linfomas no agresivos, combinados con anticuerpos monoclonales como el anti-CD20, han conseguido mejorar los resultados obtenidos hasta ese momento.^{111,206,207}

Creemos que es importante poder identificar, al diagnóstico, estos pacientes que demuestran esta refractariedad al tratamiento de entrada para poder utilizar estrategias terapéuticas diferenciadas. Es en estos pacientes y en estas circunstancias donde la expresión de CD44 nos muestra su mayor potencial pronosticador.

También hemos observado en este subgrupo especial de pacientes con un IPI alto y un estadio avanzado, que si la proporción de células linfomatosas positivas para CD44 es < del 40% y la enfermedad tiene un origen extraganglionar, que la probabilidad de conseguir la remisión completa se incrementa al 75%, mientras que si el linfoma es de origen nodal, aún existiendo una proporción de células linfomatosas positivas para CD44 < del 40%, la probabilidad de alcanzar la remisión completa desciende hasta sólo el 25%.

En estas situaciones, la expresión de CD44 sería de utilidad para identificar pacientes con un mejor pronóstico y una elevada probabilidad de conseguir la remisión completa con un tratamiento convencional, pudiendo así limitar la potencial toxicidad innecesaria que podría resultar si utilizásemos esquemas terapéuticos más agresivos.

8.- RESUMEN

El estudio de los linfomas ha experimentado un importante desarrollo en los últimos 5-10 años, no sólo por entender ahora las diferentes entidades que constituyen los linfomas de una forma más integral, sino también por el mayor conocimiento de su biología molecular que está permitiendo descubrir nuevos marcadores genéticos y sus expresiones proteicas que nos han servido como “firmas” de cada entidad linfomatosa en algunas ocasiones así como factores pronósticos y dianas terapéuticas en otras.

No cabe duda, que al igual que en otras enfermedades oncológicas, el conocimiento de parámetros clínicos y sobre todo biológicos y moleculares en el momento del diagnóstico que nos permitan predecir la evolución de la enfermedad, son de suma importancia para poder mejorar las estrategias terapéuticas establecidas en los casos en los que se prevea una evolución desfavorable, ya sea por una peor respuesta al tratamiento, un mayor porcentaje de recaídas del linfoma o por una menor supervivencia.

Existen parámetros clínicos que tienen una importancia pronóstica bien demostrada. Sin embargo, la aparición de nuevos tratamientos con intentos curativos, junto con los mayores conocimientos de la biología molecular en las enfermedades oncológicas, ha hecho crecer los esfuerzos en la investigación de nuevos factores pronósticos biológicos y moleculares. El avance en el conocimiento inmunológico supuso un mejor entendimiento de las neoplasias linfoides. El desarrollo de anticuerpos monoclonales frente a antígenos celulares permitió por un lado identificar diferentes estadios de diferenciación linfoide y por otro, el poder también identificar entidades linfomatosas con características clínicas y biológicas particulares en función de su expresión antigénica. La expresión de algunos de estos antígenos ha demostrado además tener implicaciones pronósticas.

Aprovechando las características inmunológicas de las células tumorales se han podido desarrollar nuevas estrategias terapéuticas basadas en el desarrollo de moléculas con especificidad hacia los antígenos expresados en la superficie de las mismas. Son anticuerpos monoclonales que utilizados como tratamiento único o combinado con quimioterapia convencional consiguen mejorar las

respuestas. Estas moléculas consiguen la destrucción de la célula neoplásica por medio de la activación del complemento o reclutando a células citotóxicas. En los últimos años se han diseñado moléculas constituidas por un anticuerpo monoclonal unido a un isótopo emisor de radiaciones que ha demostrado una mayor eficacia en la eliminación de las células tumorales. Todo ello ha conseguido aumentar tanto la supervivencia de los pacientes como la tasa de curaciones definitivas.

Los avances en el conocimiento de la biología molecular han llevado a desarrollar sistemas de análisis masivo de información genética (Microarrays) que están abriendo un nuevo campo en la investigación oncológica, estableciendo nuevos marcadores moleculares, mediante el estudio de perfiles genéticos, que permiten identificar las diferentes entidades linfomatosas de forma más precisa y el desarrollo de nuevos marcadores pronósticos que están demostrando su importancia en la práctica clínica.

En este trabajo de investigación se ha estudiado el valor pronóstico de la expresión de una molécula de adhesión, el CD44, y una de sus variantes, el CD44v6, en los linfomas no Hodgkin de nuestra serie de pacientes.

Para analizar la intensidad de expresión de CD44, cada muestra tumoral se comparó simultáneamente con su control amigdalario de tinción. Se consideró una tinción **positiva** si su intensidad de expresión era similar al control positivo amigdalario. Por otro lado, se consideró una tinción **negativa** cuando la intensidad de la muestra tumoral era similar a su control negativo amigdalario. Se pudo además identificar 2 grados más de intensidad antigénica. Cuando la expresión de CD44 en la muestra tumoral era mayor que la observada en el control positivo amigdalario, se consideró como **positivo intenso**, de la misma forma, si la intensidad de tinción tumoral era menor que la observada en el control positivo amigdalario y mayor que en el control negativo, se consideró como **positivo débil**.

Por otro lado para la interpretación de la cantidad de células positivas en cada muestra, independientemente de su intensidad de tinción, se diseñó un registro fotográfico de las muestras tumorales sobre las que se aplicó un programa informático de tratamiento imagen. Ello nos permitió distinguir sobre la muestra tumoral, aplicando una escala de grises, las zonas teñidas por el anticuerpo de las no teñidas. Posteriormente, aplicando otro programa informático que analizaba cada píxel, pudimos calcular el porcentaje de células teñidas en cada

muestra. Los resultados obtenidos se compararon con la realizada por 2 observadores que calcularon el porcentaje de células teñidas contando una parte representativa de las muestras.

Este diseño de conteo "semiinformatizado", nos permitió una mejor interpretación de los resultados sobretodo al analizar muestras tumorales muy heterogéneas en su composición celular y con una gran variabilidad de expresión del antígeno dentro de la misma muestra.

Además de obtener unos resultados no supeditados a la subjetividad del observador, permite un análisis más rápido y se puede registrar como archivo informático con los datos analizados, que además, son fácilmente comparables con los de otros grupos de investigación.

En este trabajo, los resultados obtenidos y los análisis estadísticos comparativos con las características clínicas y biológicas de los linfomas al diagnóstico, respuesta al tratamiento y evolución, se realizaron considerando 2 grupos de intensidad de expresión de CD44 (negativo y débil positivo vs positivo y positivo intenso).

De la misma forma se consideró que el "cut off" que mejor discriminaba, a la hora de valorar el porcentaje de células que expresan CD44, fue del 40%. Así se diferencian pacientes con una expresión de CD44 \geq del 40% de las células de la muestra frente a pacientes con una expresión de CD44 $<$ del 40%.

En el análisis de expresión de CD44v6 únicamente se valoró la positividad vs negatividad de la tinción para dicho antígeno. No se consideró realizar una valoración del porcentaje de células teñidas ni de la intensidad de tinción.

Siguiendo la experiencia acumulada por nuestro grupo en el estudio de la proliferación celular, aneuploidía y apoptosis en los linfomas, hemos actualizado los datos analizados en trabajos previos.

Tanto el estudio de la proliferación celular mediante el análisis de la Fase S como el estudio de la aneuploidía mediante el análisis del contenido en DNA se realizaron por citometría de flujo. Las muestras desparafinadas y disgregadas fueron teñidas con yoduro de propidio para su procesamiento. Como resultado de la lectura por citometría de flujo de las muestras de linfoma teñidas se obtuvieron histogramas monoparamétricos con la distribución de fluorescencia proporcional al contenido en DNA de los núcleos analizados. Para la correcta

cuantificación de las fases G0G1, S y G2M se ha empleado un programa informático específico capaz de realizar la sustracción de la señal debida a núcleos cortados y permite, en el casos de existir una población aneuploide, el cálculo del índice de DNA y las fases del ciclo celular de las células normales y del de las aneuploides.

La proliferación celular mediante el estudio de la fase S clásicamente ha mostrado una relación significativa con el grado histológico, de tal forma que los pacientes con linfoma de alto grado presentaban una fase S superior. Esta asociación se ha mantenido al actualizar los resultados de nuestra serie de pacientes con linfoma no Hodgkin, y resulta coherente con el hecho de que son los linfomas de alto grado los que mayor capacidad proliferativa muestran. También hemos podido constatar en los resultados analizados de nuestra serie de pacientes, que una mayor expresión de Fase S en las células linfomatosas se asocia con una mayor probabilidad de alcanzar la remisión completa con el tratamiento. También creemos que resulta coherente el hecho de que son estas células más proliferativas las que muestran más sensibilidad al tratamiento poli quimioterápico convencional debido a su cinética celular y al mecanismo de acción del tratamiento que es más eficaz sobre las células tumorales en división. Esta correlación significativa entre la proliferación celular medida por la Fase S y la probabilidad de alcanzar una remisión completa, se mantiene al analizar los resultados en un modelo multivariante. Ello nos indica que en nuestro estudio, el estudio de la Fase S se mostró como un factor pronóstico independiente en relación a conseguir una remisión completa de la enfermedad tras el tratamiento.

Estratificando los pacientes en diferentes subgrupos clínicos de interés, como son: el IPI, el estadio, la presentación nodal vs extranodal y el grado histológico, y sobre ellos estudiar la respuesta al tratamiento, hemos observado que el análisis de expresión de la Fase S permitió identificar pacientes con una mayor probabilidad de conseguir una respuesta completa al tratamiento. Este subgrupo de pacientes con linfoma nodal y datos de mal pronóstico al diagnóstico, como son un IPI elevado, un estadio avanzado y un alto grado histológico, tienen más probabilidad de alcanzar una remisión completa con el tratamiento convencional. Dicho de otra forma, los pacientes con linfomas nodales en estadios avanzados y con histología de alto grado, si muestran una fase S baja, deberían ser subsidiarios de tratamientos quimioterápicos más agresivos o experimentales, dada la significativa baja tasa de remisiones completas que muestran.

El estudio de la apoptosis se realizó mediante la técnica del TUNEL (TdT mediated dUTP nick end labeling). Durante la apoptosis, antes de que se produzcan los cambios morfológicos que permiten reconocer el fenómeno, se producen roturas en el DNA genómico que dan lugar tanto a fragmentos de DNA de bajo peso molecular (mono y oligonucleosomas) como fragmentos de alto peso molecular, dejando hebras rotas de DNA ("nicks"). Estas se pueden identificar marcando los radicales libres 3'OH terminales, mediante una reacción enzimática, usando la terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). La fluoresceína incorporada en la reacción de TUNEL se detecta por un anticuerpo anti-fluoresceína. Después de poner los tejidos en reacción con el sustrato, las células teñidas pueden ser leídas al microscopio óptico.

Trabajos previos de nuestro grupo en los que se analizaron resultados de apoptosis (por TUNEL) en pacientes con linfoma habían demostrado la presencia de una mayor apoptosis en los linfomas extranodales y de alto grado histológico. Estos datos se mantienen al actualizar los resultados de nuestra serie en el actual trabajo. También pudimos constatar que la apoptosis en pacientes que consiguieron una remisión completa era significativamente mayor. Probablemente, la presencia de una apoptosis aumentada en el tejido linfomatoso traduzca una mayor susceptibilidad al tratamiento como ocurre con los linfomas con una fase S aumentada.

Al contrario que la fase S, la apoptosis no mantiene su correlación con la capacidad para alcanzar la remisión completa que se observaba en el estudio bivariante. Ello quizás sea debido a que, a pesar de que posiblemente esta asociación sea real, la Fase S, al igual que otras variables clínico-biológicas clásicas como el estadio y el IPI, tengan un mayor potencial predictivo como factores pronósticos independientes al ser analizadas en un modelo multivariante, desplazando al potencial predictivo de la expresión de apoptosis en los linfomas y su capacidad para alcanzar la remisión completa.

Al analizar los resultados de la expresión de Fase S y apoptosis en nuestra serie de linfomas, a pesar de la correlación observada entre estas dos variables y la probabilidad de alcanzar la remisión completa con el tratamiento, esta asociación no se mantiene al analizar la recaída, tiempo libre de enfermedad y la supervivencia global. La explicación a este hecho posiblemente se deba a que en la historia natural del linfoma pueden existir cambios biológicos que entren en

juego y puedan interferir en la evolución clínica de los pacientes, teniendo repercusión en la supervivencia global, en la aparición o no de recaídas y por lo tanto en un diferente tiempo libre de enfermedad.

El análisis del estudio de la presencia de aneuploidía en nuestra serie de linfomas no ha mostrado una asociación estadística significativa de relevancia clínica o pronóstica en el actual trabajo.

Es importante que nuevos factores biológicos y moleculares nos ayuden a identificar pacientes con linfomas de peor pronóstico, en los cuales los parámetros clásicos pierden su valor.

Son en estos casos, en los que una carga tumoral similar como puede ser un mismo estadio, o un similar IPI, o niveles similares de LDH y β_2 microglobulina para un mismo tipo histológico, en los que resultarían útiles estos nuevos marcadores biológicos y moleculares, como la expresión de CD44, que nos identificarían subgrupos pronósticos sobre los que se puedan diseñar estrategias terapéuticas más eficaces que incluyen desde tratamientos más agresivos de entrada como quimioterapia a altas dosis, nuevas combinaciones terapéuticas o incluso el diseño de nuevas dianas terapéuticas que tengan como objetivo estas moléculas.

El estudio de la expresión de CD44 en nuestra serie de linfomas confirma su utilidad pronóstica al diagnóstico de la enfermedad, pudiendo identificar pacientes de especial peor pronóstico en los cuales el tratamiento convencional no consigue los resultados deseados.

Hemos observado que la mejor forma de estudiar el CD44 como factor pronóstico en los linfomas es mediante el análisis del porcentaje de células tumorales que lo expresan, no encontrando, en nuestra serie, una utilidad pronóstica remarcable en el análisis de la intensidad de la expresión de esta molécula en las células linfomatosas.

El "cut-off" del 40% para valorar el porcentaje de expresión de CD44 es el que mejor logró discriminar pacientes con linfoma y una peor evolución, tanto en lo referente a una menor probabilidad de alcanzar la remisión completa de la enfermedad como de una menor supervivencia global.

El análisis de los resultados de la expresión de CD44 en nuestra serie de pacientes con linfoma ha mostrado una asociación significativa con la respuesta

al tratamiento y con la supervivencia global. Así, los pacientes diagnosticados de linfoma no Hodgkin y que mostraron una proporción $\geq 40\%$ de células tumorales positivas para CD44 obtuvieron una respuesta significativamente menor a los tratamientos realizados. De la misma forma, en estos pacientes, la supervivencia global también fue significativamente menor. Esta correlación significativa entre la expresión de CD44, en porcentaje de células con un “cut-off” en el 40%, la probabilidad de alcanzar una remisión completa y la supervivencia global, se mantiene al analizar los resultados en un modelo multivariante.

El análisis del estudio multivariante nos permitió confirmar que la expresión de CD44, en porcentaje de células con un “cut-off” en el 40%, se mostró como parámetro pronóstico independiente en relación con alcanzar una remisión completa de la enfermedad al tratamiento y con la supervivencia global.

Cuando estudiamos la expresión de CD44 en los pacientes estratificados por el estadio, el IPI y el grado histológico, pudimos comprobar que aquellos en que la enfermedad debutó con peor pronóstico, es decir, en los pacientes que al diagnóstico mostraron un estadio avanzado (II-IV), un IPI alto (3-5) o un alto grado histológico; fue donde la expresión de CD44 mejor discriminó a un subgrupo de pacientes con especial peor pronóstico. En estos casos, la presencia de CD44 en los linfomas se tradujo en una mayor agresividad clínica de los mismos, siendo pacientes que no lograban alcanzar una remisión completa con el tratamiento convencional y que por lo tanto eran más difíciles de curar. De hecho, ningún paciente con un IPI alto (3-5) y una expresión de CD44 \geq del 40% logró alcanzar una respuesta completa con el tratamiento. En estos pacientes también se observó una supervivencia global significativamente menor.

Con estos resultados, lo más recomendable en estos pacientes es que fuesen incluidos dentro de esquemas terapéuticos diferentes, como primera línea de tratamiento, para intentar sobrepasar esta refractariedad que muestran al tratamiento convencional.

Curiosamente, los pacientes con enfermedad extranodal al diagnóstico y una proporción $< 40\%$ de células positivas para CD44 también mostraron una mayor probabilidad de alcanzar una remisión completa de la enfermedad independientemente del estadio y su IPI.

El análisis de la expresión de CD44v6 en nuestra serie de linfomas no ha mostrado una asociación estadística significativa de relevancia clínica o pronóstica en el actual trabajo.

9.- CONCLUSIONES

Las conclusiones de nuestro trabajo son las siguientes:

1.- El porcentaje de células en Fase S, analizada por citometría de flujo en muestras tumorales parafinadas de pacientes con linfoma no Hodgkin, presenta una correlación estadística y clínicamente significativa con la presentación clínica de la enfermedad, así como con la respuesta al tratamiento y la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, no se ha hallado esta asociación con el contenido en DNA.

1.1.- La Fase S aumenta con el grado histológico de malignidad.

1.2.- Una Fase S elevada, se asocia a una mayor tasa de remisiones completas, especialmente en los pacientes en estadios avanzados, con enfermedad nodal o con histología de alto grado.

1.3- Del estudio multivariante se desprende que la Fase S es un factor pronóstico independiente en relación a la consecución de una remisión completa.

1.4.- En los pacientes con linfoma de bajo grado, la presencia de una Fase S baja se asocia con una supervivencia global significativamente mayor.

2.- El estudio de la apoptosis, mediante la técnica de TUNEL en muestras tumorales parafinadas de pacientes con linfoma no Hodgkin, presenta una correlación estadística y clínicamente significativa con la presentación clínica de la enfermedad, así como con la respuesta al tratamiento.

2.1.- La apoptosis aumenta con el grado histológico de malignidad y es superior en los linfomas extranodales que en los linfomas nodales.

2.2.- Los pacientes con linfoma y que presentan una mayor apoptosis, consiguen una mayor tasa de remisiones completas, especialmente a expensas de los pacientes en estadios avanzados.

3.- La expresión de CD44, analizada por inmunohistoquímica en muestras tumorales parafinadas de pacientes con linfoma no Hodgkin, presenta correlación estadística y clínicamente significativa con la respuesta al tratamiento y la supervivencia de los pacientes. Sin embargo esta asociación no se ha objetivado con CD44v6

3.1.- Los pacientes con linfoma y expresión de CD44 < del 40% presentan una mayor tasa de respuestas completas. Del estudio multivariante se desprende que la expresión de CD44 < del 40% es un factor pronóstico independiente en relación a la consecución de una remisión completa.

3.2.- En los pacientes en estadios avanzados, con debut extranodal de la enfermedad o con histología de alto grado, la expresión de CD44 < del 40% es un excelente factor pronóstico respecto a la probabilidad de alcanzar una remisión completa con el tratamiento.

3.3.- En los pacientes con linfoma y un IPI alto (3-5), la expresión de CD44 < del 40% se asocia a una mayor probabilidad de alcanzar una respuesta completa. Ningún paciente con un IPI alto (3-5) y una expresión de CD44 \geq del 40% logró alcanzar una respuesta completa con el tratamiento.

Los pacientes con IPI alto y estadio avanzado, con una expresión de CD44 < del 40% presentan una probabilidad del 50% de alcanzar la remisión completa, a pesar del mal pronóstico clínico de la enfermedad. Este pronóstico a su vez está ligado al debut nodal o extranodal de la enfermedad. En los linfomas extranodales, con una expresión de CD44 < del 40% presentan una probabilidad del 75% de alcanzar la remisión completa, mientras que en los linfomas nodales la probabilidad es sólo del 25%.

3.4.- Los pacientes con linfoma que presentan una expresión de CD44 < del 40% muestran una supervivencia global significativamente mayor. Del estudio multivariante se desprende que la expresión de CD44 < del 40% es un factor pronóstico independiente en relación con la supervivencia global de los pacientes con linfoma.

4.- La expresión de las moléculas de adhesión CD44 y CD44v6 en las células tumorales de los LNH, no presenta relación con la apoptosis ni con la proliferación celular.

5.- La expresión de las moléculas de adhesión CD44 y CD44v6 en las células tumorales de los LNH, no presenta una clara relación con los factores pronósticos clásicos en los pacientes con linfoma no Hodgkin.

10.- BIBLIOGRAFÍA

1. Timothy C. Greiner, MD, L. Jeffrey Medeiros, M.D., and Elaine S. Jaffe, M.D. *Cancer*; 75:370-80, 1995.
2. Braüninger A, Hansmann M-L, Strickler JG, et al. Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*; 340: 1239-1247, 1999.
3. James O. Armitage, M.D. and T. Andrew Lister, M.D. *American Society of Clinical Oncology*; 338-41, 1998.
4. Nadler LM, Anderson KC, Marti LG, et al: B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal mitogen activated, and malignant B lymphocytes. *J Immunol*; 131: 244, 1983.
5. Campana D, Janossy G, Bofill M, et al: Human B cell development: Phenotypic differences of B lymphocytes in the bone marrow and peripheral lymphoid tissues. *J Immunol*; 134: 1524, 1985.
6. Desiderio S, Yancopoulos GD, Paskind M, et al: Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxynucleotidyl transferase in B cells. *Nature*; 311: 752, 1984.
7. Volger LB, Crist WB, Bockman DE, et al: Pre-B cell leukaemia: A new phenotype of childhood lymphoblastic leukaemia. *N Engl J Med*; 298: 872, 1978.
8. Black SJ, Van der Loo W, Loken MR, et al: Expression of IgD on murine lymphocytes. Loss of surface IgD indicates maturation of memory B cells. *J Exp Med*; 147: 984, 1978.
9. Waldman TA, Davis MM, Bongiovanni KF, et al: Rearrangements of genes for the antigen receptor on T cells as markers of lineage and clonality in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med*; 313: 776, 1985.
10. Aisenberg AC, Krontiris TG, Mak T, et al: Rearrangements of the gene for the beta chain of the T-cell receptor in T-cell chronic lymphocytic leukaemia and related disorders. *N Engl J Med*; 313: 529, 1985.

-
11. Proceedings of the 8th International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. December 12-16, 2004. Adelaide, Australia. Cell Immunol. 2005 Jul-Aug; 236(1-2):1-187. Epub 2005 Sep 12.
 12. Gallati n M., St John T.P., Siegelman M. and et al.: Lymphocyte homing receptors. Cell; 44: 673-680, 1986.
 13. Mitelman F. Catalog of chromosome aberrations in cancer. 4th edition. Wiley Liss, New York, 1991.
 14. Pasqualucci I and Dalla-Favera R: Molecular patogénesis of non-Hodgkin's lymphomas. ASH: 200-205, 2001.
 15. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell lines. Blood: 81(1): 151-157, 1993.
 16. Sander CA, Yano T, Clark HM and et al: p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. Blood; 82: 1994-2004, 1993.
 17. Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC and et al: p53 mutation are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. Blood; 82(2): 2289-2295, 1993.
 18. Kalachilov S, Migliazza A, Cayanis E, et al: Cloning and gen mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukaemia. Genomic 1997.
 19. Gaidano G, Hauptschein RS, Parsa NZ and et al: Deletions involving two distinct regions of 6q in B-cell non-Hodgkin lymphoma. Blood; 80(1): 1781-1787, 1992.
 20. Kieff E, Leibowitz D: Oncogenesis by herpesvirus. En: Weinberg RA ad. Oncogenes and the molecular origin of cancer. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 259-280, 1989.
 21. Carbone A, Gaidano G: HHV-8-positive body-cavity-based lymphoma: a novel lymphoma entity. Br J Haematol; 97: 515-522, 1997.
 22. Uchiyama T: Human T cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) and human diseases. Annu Rev Immunol; 15: 15-37, 1997.
 23. Chan WC: DNA microarray analysis: What can it tell us about the biology of lymphoid neoplasms?. ASH: 205-210, 2001.

-
24. Alizadeh AA, Elsen MB, Davis RE, et al: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gen expression profiling. *Nature*; 403: 503-511, 2000.
 25. Shipp M, Tamayo P, Angelo M, et al: Diffuse large B cell lymphoma outcome prediction by gen expression profiling. *Blood*; 96: 948a, 2000.
 26. Huang JZ, Sanger WC, Pickering DL, et al: CD10, Bcl-2, and sutypes of diffuse large B cell lymphoma defined by gen expression profiles. *Mod Pathol*; 14: 978a, 2001.
 27. Ries LAG, Miller BA, Hankey BF, et al (eds): SEER Cancer Statistics Review, 1973-1991: Tables and graphs, National Cancer Institute. NIH publication No. 94-2789. Bethesda, MD, US Departament of Health and Human Services, 1994.
 28. 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* 16: 2780-2795, 1998.
 29. Beral V, Peterman T, Berkelman R, Jaffe H: AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 337: 805-809, 1991.
 30. Canioni D, Jabado N, Macynntyre E and et al: Lymphoproliferative disorders in children with primary immunodeficiencies: immunological status may more predictive of the outcome than other criteria. *Histophology* 38: 146-159, 2001.
 31. Nalesnik Ma, Jaffe R, Starzl TE and et al: The pathology of posttransplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporine A-prednisone immunosuppression. *Am J Pathol* 133: 173-192, 1988.
 32. Anon: A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 89: 3909-3918, 1997.
 33. Kondo T, Kono H, Miyamoto N and et al: Age and sex-specific cumulative rate and risk of ATLL for HTLV-1 carriers. *Int J Cancer* 43: 1061-1064, 1989.

-
34. Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF, et al: SEER Cancer Statistics Review, 1973-1996. National Cancer Institute: Bethesda, MD, 1999.
 35. Sandler DP, Ross JA: Epidemiology of acute leukaemia in children and adults. *Semin Oncol* 24: 3-16, 1997.
 36. Smith MA, Reis LA, Gurney JG, et al: Cancer incidence and survival among children and adolescent: United State SEER program 1975-1995. NIH pub 99-4649. National Cancer Institute, SEER Program: Bethesda, MD, 1995.
 37. Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F and et al: Plasmoblastic lymphomas of the oral cavity: A new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood* 89(4); 1413-1420, 1997.
 38. Goedert JJ: The epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome malignancies. *Semin Oncol* 27: 390-401, 2000.
 39. Otter R, Gerrits WB, Sandt MM, et al: Primary extranodal and nodal non-Hodgkin`s lymphoma: A survey of population-based registry. *Eur. J Cancer*; 25: 1203, 1989.
 40. Sutcliffe SB, Gospodarowicz MK,: Localized extranodal lymphomas. In Keating A, Armitage J, Burnett A, et al (eds): *Hematological Oncology*. Cambridge, Cambridge University Press, pp 189-222, 1992.
 41. Freeman C, Berg JW, Cutler SJ. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer*; 29:252-260, 1972.
 42. Kevin E, Salhany MD, Giuseppe G, Pietra MD. Extranodal lymphoid disorders. *Hematopathology*. Review Article;99(4): pp 472-485, 1993.
 43. Rosenberg, S.A.: Classification of lymphoid neoplasms. *Blood*; 84(5); 1359-1360,1994.
 44. Harris N., Jaffe E., Stein H. and et al: A proposal for an International Consensus on the Classification of lymphoid Neoplasms. *Blood*; 84: 1361-1392, 1994.
 45. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J and et al: Lymphoma classification – from controversy to consensus: The REAL and WHO classification of lymphoid neoplasms. *Annals of Oncology*; 11 (suppl. 1): S3-S10, 2000.

-
46. Armitage JO: A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*; 89: 3909-3918, 1997.
 47. Shipp M.A.: Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has "high-risk" disease? *Blood*; 83:1165-1173, 1994.
 48. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al: A revised European-American Classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood*; 84(5): 1361-1392, 1994.
 49. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al: World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting – Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology*; 17(12):3835-3849, 1999.
 50. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW: World Health Organization classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. IARC press, 2001.
 51. García-Conde J, Terol M^aJ, Tormo M: Proyección terapéutica de la clasificación REAL/OMS de los síndromes linfoproliferativos crónicos. *Hematología*; 2(3):225-260, 1999.
 52. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, et al: Report of Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*; 31:1860, 1971.
 53. Beahrs OH, Henson DE, Hunter RV, et al: American joint Committee on Cancer: Manual for Staging of Cancer, 4th ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1992.
 54. Hermanek P, Henson DE, Hutter RVP,, et al: Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma. Berlin, Springer-Verlag: pp 45-46, 1993.
 55. Radaszkiewicz T, Dragosics B, Bauer P: Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue: Factors relevant to prognosis. *Gastroenterology* 102:1628, 1992.

-
56. Rohatiner A, d'Amore F, Coiffier B, et al; report on a workshop convened to discuss the pathological and staging classifications of gastrointestinal tract lymphoma. *Ann Oncol*; 5:397, 1994.
 57. D'Amore F, Brincker M, Gronbaek K, et al: Non-Hodgkin's lymphoma of the gastrointestinal tract: A population-based analysis of incidence, geographic distribution, clinicopathologic presentation features and prognosis. *J Clin Oncol*; 12:1673, 1994.
 58. Rudders RA, Ross ME, DeLellis RA. Primary extranodal lymphoma: Response to treatment and factors influencing prognosis. *Cancer*; 42:406-416, 1978.
 59. Velasquez WS, Prognostic factors in intermediate high grade lymphoma. Malignant lymphomas. Including Hodgkin disease: diagnosis, management and especial problems. Dana B. Edit. Kluwer Academic Publishers, Boston; 37-52, 1993.
 60. Diaz-Pavon, JR, Cabanillas, F: Treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Opin Oncol*; 3(5):830-837, 1991.
 61. Jagannath S., Velasquez W.S., Tucker S.L. and et al.: Tumor burden assesment and its implications for a prognostic model in advanced diffuse large-cell lymphoma. *J Clin Oncol*; 4:859-865, 1987.
 62. Fischer RI, Hubbard SM, De Vita VT: Factors predicting long-term survival in diffuse mixed, histiocytic or undifferentiated lymphoma. *Blood*; 58:45-51, 1981.
 63. Spinolo JA, Cabanillas F: Historia natural y manejo de los linfomas de bajo grado. En: Linfomas no Hodgkin. Editor: Cabanillas, F.: Monografías Clínicas en Oncología, Vol 1.: Director de la serie: Estapé, J.: Ediciones Doyma, S.A., Barcelona, 1988.
 64. Fisher R.I., Gaynor E.R., Dahlberg S. and et al.: Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*; 328: 1002-1006, 1993.
 65. Sweetman J.W., Proctor S.J., Blaise D. and et al.: High dose therapy and autologous bone marrow transplantation in first complete remission for

-
- adult patients with high-grade non-Hodgkin's lymphoma: the EBMT experience. *Ann Oncol*; 5: 155-159, 1994.
66. Armitage JO: A predictive model for aggressive non- Hodgkin's lymphoma. The International Non- Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*; 329:987-994, 1993.
67. Lopez Guillermo A, Montserrat E, Bosch F and et al.: Applicability of the International Index for aggressive lymphomas to patients with low grade lymphoma. *J Clin Oncol*; 12: 1343-1348, 1994.
68. Horning SJ, Treatment approaches to the low grade lymphomas. *Blood*; 83: 881-884, 1994.
69. Parra R., Pérez B., Macià J and et al.: Valor de la determinación de factor de necrosis tumoral (FNT) en pacientes afectos de linfoma no Hodgkin. *Sangre*; 37:414a, 1992.
70. Litam P., Swan F., Cabanillas F. and et al.: Prognostic value of serum beta-2 microglobulin in low grade lymphoma. *Ann Intern Med*; 15: 885-860, 1991.
71. Swan, F., Velasquez, W.S., Tucker, S. and et al.: A new serologic staging system for large-cell lymphomas based on initial beta-2-microglobulin and lactate dehydrogenase levels, *J Clin Oncol*; 7:1518-1527, 1989.
72. Velasquez W.S., Jagannath S., Tucker S.L. and et al.: Risk classification as the basis for clinical staging of difuse large-cell lymphoma derived from 10-year survival data. *Blood*; 74:551-557, 1989.
73. Grogan TM; Lippman SM; Spier CM and et al.: Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood*; 71: 1157-1160, 1988.
74. Brons PP; Raemaekers JM; Bogman MJ and et al.: Cell cycle kinetics in malignant lymphoma studied in vivo iododeoxyuridine administration, nuclear Ki-67 staining and flow cytometry. *Blood*; 80: 2336-2343, 1992.

-
75. Ffrench M; Magaud JP; Ffrench P and et al: Heterogeneity of neoplastic and reactive cell proliferation in non-Hodgkin's lymphomas linked to patient survival. *Am J Clin Pathol*; 101: 413-420, 1994.
 76. Joensuu H; Ristamaki R; Soderstrom KO; Jalkanen S; Effect of treatment on the prognostic value of S-phase fraction in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*; 12: 2167-2175, 1994.
 77. Tusenius KJ, Bakker PJ, van Oers MH. Measurement of proliferation indices in non Hodgkin's lymphoma is it useful? *Leuk Lymphoma*; 7:181-187, 1992.
 78. Gómez X., Macia J., Campos E. and et al: Valor diagnóstico y pronóstico del estudio por citometría de flujo del contenido en ADN y cinética celular de muestras parafinadas de linfomas. *Sangre*; 39(6): 423-428, 1994.
 79. Gómez X., Campos E., Macia J. and et al: Valor diagnóstico y pronóstico del estudio inmunohistoquímico de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en muestras parafinadas de linfomas no Hodgkinianos. *Sangre*; 40(6): 520-521, 1995.
 80. Leoncini L, Del Vecchio MT, Megha T et al.: Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol*; 142: 755-763, 1993.
 81. Lam M, Dubyak G; Chen L and et al.: Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91: 6569-6573, 1994.
 82. Gomez Codina J: Factores pronóstico en LNH. Linfomas B y T. *Biología, clínica y tratamiento*. Ed. IDEPSA; pp 152-186, 1997.
 83. Morente MM: Factores pronósticos en los linfomas no Hodgkinianos. *Quinto curso de Hematopatología*. Tortos, ICS: pp 131-152, 1998.
 84. Coiffier B, Brousse N, Peuchmaur M, et al.: Peripheral T-cell lymphomas have a worse prognosis than B-cell lymphomas: a prospective study of 361 immunophenotyped patients treated with LNH84 regimen. *Ann Oncol*;1:45-50, 1990.

-
85. Slymen DJ; Miller TP; Lippman SM and et al.: Immunobiologic factors predictive of clinical outcome in diffuse large-cell lymphoma. *J Clin Oncol*; 8: 986-993, 1990.
 86. Smith SJ.: The role of integrin-mediated cell adhesion in health and disease: integrin-based therapy in clinical medicine. *Ann Intern Med*; 15;132(4): 333-6, 2000.
 87. Timothy M Carlos and John M Harlan: Leucocyte-Endothelial adhesion molecules. *Blood*; 84(7): 2068-2101, 1994.
 88. Pals S.T., Drillenbug P., Radaszkiewicz T. and et al.: Adhesion molecules in the dissemination of non-Hodgkin's lymphomas. *Acta Haematol*; 97(1-2): 73-80, 1997.
 89. Drillenbug P and Pals ST: Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood*; 95(6): 1900-1910, 2000.
 90. Montserrat E. Leucemia linfática crónica: Presente y futuro. *Hematologica* (ed. esp.); 86, supl.1: 79-84, 2001.
 91. Rosenwald A., Wright G., Chan W.C. and et al.: The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*; 346:1937-1947, 2002.
 92. Vose JM. Current approaches to the management of non-Hodgkin's lymphoma.; *Semin Oncol*. 25:483-491.1998
 93. Shipp M, Neuberger D, Janicek M, et al: High-dose CHOP as initial therapy for patients with poor-prognosis aggressive non-Hodgkin's lymphoma: Adose-finding pilot study. *J Clin Oncol* 13:2916-2923, 1995.
 94. Coiffier B, Philip T, Burnett A, et al: Consensus conference on intensive chemotherapy plus hematopoietic stem cell transplantation in malignancies: Lyon, June 4-6, 1993. *Ann Oncol* 5:19-23, 1994.
 95. Perry A, Goldstone A: High-dose therapy for diffuse large-cell lymphoma in first remission. *Ann Oncol* 9:S9-S14, 1998 (suppl 1).
 96. International Consensus Conference on High-Dose Therapy With Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas: Report of the Jury. *J Clin Oncol*. Jan 1: 423, 1999.

-
97. Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, et al: Benefit of autologous bone marrow transplantation over sequential chemotherapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: Updated results of the prospective study LNH87-2. *J Clin Oncol* 15:1131-1137, 1997.
 98. Kessinger A: Consensus conference on high-dose therapy with hematopoietic stem cell transplantation in diffuse large-cell lymphoma: Type of cells, optimal mobilization of stem cells-positive and negative selection. *Ann Oncol* 9:S23-S30, 1998 (suppl 1).
 99. Bosly A, Sonet A, Salles G, et al: Superiority of late over early intensification in relapsing/refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma: A randomized study from the GELA: LNH RP 93. *Blood* 90:594a, 1997 (suppl 1).
 100. Vose J: High-dose chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation for relapsed or refractory diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 9:S1-S3, 1998 (suppl 1).
 101. Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, et al: High-dose therapy followed by stem cell transplantation in partial response after first-line induction therapy for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 9:S5-S8, 1998 (suppl 1).
 102. Rozman C and Montserrat E: Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*; 333: 1052-1057, 1995.
 103. Rai KR, Peterson B, Kolitz J, et al: A randomized comparison of fludarabine and chlorambucil for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia. A CALGB, SWOG, CTG/NCI-C and ECOG inter-group study. *Blood*; 88: 141 (abst 552), 1996.
 104. Esteve J, Bosch F, Montserrat E: Leucemia linfática crónica. *Ann Oncol*; Suppl 1: 40-49, 1998.
 105. Bosch F, Perales M, Cobo F, et al: Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone therapy in resistant or relapsed chronic lymphocytic leukemia or follicular lymphoma. *Blood*; 90 (suppl 1): 530a, 1997.

-
106. Marugán I, Tormo M, Terol MJ and et al: Síndromes linfoproliferativos crónicos tratados con fludarabina. Respuesta molecular y alteraciones inmunológicas. *Haematol*; 83(suppl 2): 50, 1998.
107. Chow KU, Sommerlad WD, Boehrer S and et al: Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances efficacy of cytotoxic drugs on neoplastic lymphocytes in vitro: role of cytokines, complement and caspases. *Hematol*; 87: 33-43, 2002.
108. Steve A, Chuen-Pei Ng, Bonavida B: Rituximab modifies the cisplatin-mitochondrial signalling pathway, resulting in apoptosis in cisplatin-resistant non-Hodgkin lymphomas. *Clin Cancer Res*; 8: 836-845, 2002.
109. Jäeger G, Neumeister P, Brezinschek R, Höfler G, Quehenberger F, Linkesch W, Sill H: Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as consolidation of first-line CHOP chemotherapy in patients with follicular lymphoma: a phase II study. *Eur J Haematol*; 69: 21-26, 2002.
110. Berinstein NL, Buckstein R, Imrie K, Spaner D, Mangel J, Tompkins K, Pennell N, Reis M, Pavlin P, Lima A, Couvadia A, Robinson J and Richardson P: Bcl-2 clearance: optimising outcomes in follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplantation*; 29 (suppl 1): 14-17, 2002.
111. Coiffier B, Lepage E, Brière J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*; 346: 235-242, 2002.
112. Shapiro, H.M.: *Practical Flow Cytometry*. Alan R. Liss, Inc., Nueva York, 1988.
113. Gómez Arbones, X.: *Citometría de flujo*. En: Beca I.E.I.: Beca de col·laboració amb la Secció de Medicina. Institut d'Estudis Ilerdencs, Lleida, 1990.
114. Hedley DW, Frieland ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem*; 31:1333-1335, 1983.

-
- 115.Hedley DW: Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: five years on. *Cytometry*; 10:229-241, 1989.
- 116.Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI: Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample storage, staining and internal standardization. *Cytometry*; 3:332-339, 1983.
- 117.Joensuu H, Alanen KA, Klemi PJ, Aine R: Evidence for false aneuploid peaks in flow cytometric analysis of paraffin-embedded tissue. *Cytometry*; 11:431-437, 1990.
- 118.Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI: Standardization of high-resolution flow cytometry DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. *Cytometry*; 3:328-331, 1983.
- 119.Pegg AC, Hofland I: Cell kinetic analysis of mixed populations using three-color fluorescence flow cytometry. *Cytometry*; 12:445-454, 1991.
- 120.Dean PN, Jett JH: Mathematical analysis of DNA distributions derived from the flow microfluorometry. *J Cell Biol*; 60:523-527, 1974.
- 121.Noguchi PD, Johnson JB, Browne W: Measurement of DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry*; 1(6):390-393, 1981.
- 122.Dean PN, Gray JW, Dolbeare FA: The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry. *Cytometry*; 3(2):188-195, 1982.
- 123.Bagwell CB, Mayo SW, Whetstone SD, et al: DNA histogram debris theory and compensation. *Cytometry*; 12:107-118, 1991.
- 124.Lampariello F, Sebastiani G, Cordelli E, Spanò M: Comparison of gaussian and T-distribution densities for modeling fluorescence dispersion in flow cytometric DNA histograms. *Cytometry*; 12:343-349, 1991.
- 125.Barlogie B, Spitzer G, Hart JS, et al: DNA histogram analysis of human hematopoietic cells. *Blood*; 48:245-258, 1976.
- 126.Laerum OD, Farsuna T: Clinical application of flow cytometry: a review. *Cytometry*; 2:1-13, 1981.

-
127. Carter NP, Meyer EW: Introduction to the principles of flow cytometry. En: Flow Cytometry, a practical approach. Editor: Ormerod, M.G.: IRL Press, Oxford University Press, Oxford, 1990.
128. Steen HB: Characteristics of flow cytometers. En: Flow Cytometry and Sorting. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
129. Salzman GC, Singham SB, Johnston RG and et al: Light scattering and cytometry. En: Flow Cytometry and Sorting. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
130. Sears FW, Zemansky MW: Física General. Aguilar, Madrid, 1979.
131. Hiebert RD: Electronics and signal processing. En: Flow Cytometry and Sorting. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
132. Lovett EJ, Schnitzer B, Keren DF and et al.: Application of flow cytometry to diagnostic pathology. Laboratory Investigation; 50:115-140, 1984.
133. Cameron MJ: Macintosh graphics for the Epics flow cytometer user. Cytometry; 11:916-918, 1990.
134. Pierrez J, Métézau P, Poncelet P and et al.: La Cytométrie en flux por l'étude de la cellule normale ou pathologique. MEDSI-McGraw-Hill, París, 1988.
135. Pierrez J, Guerci A: Les modélisations mathématiques. En: La Cytométrie en flux por l'étude de la cellule normale ou pathologique. MEDSI-McGraw-Hill, París, 1988.
136. Greimers R, Rongy AM, Schaaf-Lafontaine N and et al.: CUBIC: a three dimensional colored projection of Consort 30 generated trivariate flow cytometry data. Cytometry; 12:570-578, 1991.
137. Bybee A, Thomas NSB: Cell cycle regulation. Blood Reviews; 5:177-192, 1991.
138. Hiddeman W, Schumann J, Andreeff M, et al: Convention on nomenclature for DNA cytometry. Cytometry; 5:445-446, 1984.

-
139. Shackney SE, Burholt DR, Pollice AA and et al.: Discrepancies between flow cytometric and cytogenetic studies in the detection of aneuploidy in human solid tumors. *Cytometry*; 11:94-104, 1990.
140. Riley RS, Mahin EJ: Flow cytometric applications. DNA analysis. Hematological neoplasms. ASCP Workshop #9072. ASCP Weekend of Pathology. Seattle, Washington, 1989.
141. Rabinovitch PS: Multicycle. A program for DNA content and cell cycle analysis. Phoenix Flow Systems, San Diego, 1991.
142. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*; 26: 239-257, 1972.
143. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis y enfermedad. *The Lancet*; 341:1251-1254, 1993.
144. Kerr JFR, Harmon BV, Definition and Incidence of apoptosis: an historical perspective. En :Apoptosis: the molecular basis of cell death. Edited by L.David Tomei. Cold Sprig Harbor Laboratory Press. pp: 5-29, 1991.
145. Wyllie AH; Kerr JFR; Currie AR; Cell Death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*; 68:251-306. 1980
146. Duvall E, Wyllie AH: Death and the cell. *Immunol Today*; 7: 115-119, 1986.
147. Cohen JJ, Overview: Mechanisms of apoptosis. *Immunol Today*; 14: 126-130, 1993.
148. Savill J; Fadok V; Henson P and et al.: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*; 14: 131-136, 1993.
149. Duke RC; Chervenak R; Cohen JJ; Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: An early event in cell-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 80: 6361-6365, 1983.
150. Duke RC; Cohen JJ; IL-2 Addiction: Withdrawal of growth Factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Research*; 5: 289-299, 1986.

-
151. Brach MA, de Vos S, Gruss HJ and et al.: Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood*; 80: 2920-2924, 1992.
 152. Tsai S, Sieff CA, Nathan DJ: Stromal cell-associated erythropoiesis. *Blood*; 67: 1418-1426, 1986.
 153. Takeichi M: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*; 251: 1451-1455, 1991.
 154. Williams AF, Barclay AN: The immunoglobulin superfamily-Domains for cell surface recognition. *Ann Rev Immunol*; 6: 381-405, 1988.
 155. Hynes RO: Integrins: Versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell*; 69: 11-25, 1992.
 156. Bevilacqua MP, Nelson RM: Selectins. *J Clin Invest*; 91: 379-387, 1993.
 157. Hardingham TE and Fosang AJ: Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J*; 6: 861-870, 1992.
 158. Uchiyama H and Anderson KC: Cellular adhesion molecules. *Transfusion Medicine Reviews*; vol. VIII (2): 84-95, 1994.
 159. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*; 84(7): 2068-2101, 1994.
 160. Rasmussen R.A., Chin Y.H., Woodruff J.J. and et al.: Lymphocyte recognition of lymph node high endothelium. VII. Cell surface proteins involved in adhesion defined by monoclonal anti-HEBFLN (A.11) antibody. *J. Immunol*; 135: 19-24, 1985.
 161. Jalkanen S., Bargatze R., Herron L.R. and et al.: A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur J Immunol*; 16: 1195-1202, 1986.
 162. Picker L.J., Butcher E.C.: Physiological and molecular mechanism of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol*; 10: 561-591, 1992.
 163. Fried VA, Weissman IL. Cell surface molecule associated with lymphocyte homing is a ubiquitinated branched-chain glycoprotein. *Science (Wash. DC.)*; 231: 823-829, 1986.

-
164. Rudzki Z. and Jothy S.: CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *Mol Pathol*; 50(2): 57-71, (Review), 1997.
165. Möller P, Eichelmann A, Leithäuser and et al: Venular endothelium binding molecules CD44 and LECAM-1 in normal and malignant B-cell populations. A comparative study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*; 421(4): 305-13, 1992.
166. Freedman AS: Expression and function of adhesion receptors on normal B cells and B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Semin Hematol*; 30(4): 318-28, 1993.
167. Jalkanen S, Joensuu H, Klemi P. Prognostic value of lymphocyte homing receptor and S phase fraction in non-Hodgkin lymphoma. *Blood*; 75: 1549-1556, 1990.
168. Jalkanen S., Joensuu H., Söderström K. and et al.: Lymphocyte homing and clinical behavior of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Invest*; 87: 1835-1840, 1991.
169. Pals ST, Horst E, Ossekoppele G and Fidgor CG.: Expression of lymphocyte homing receptor as a mechanism of dissemination in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*; 73: 885-888, 1989.
170. Horst E., Meijer C.J., Radaszkiewicz T. and et al.: Adhesion molecules in the prognosis of diffuse large-cell lymphoma: expression of a lymphocyte homing receptor (CD44), LFA-1 (CD11a/18), and ICAM-1 (CD54). *Leukemia*; 4(8): 595-9, 1990.
171. Drilenburg P, Wielenga VJ, Kramer MH et al: CD44 expression predicts disease outcome in localized large B cell lymphoma. *Leukemia*; 13(9): 1448-55. 1999.
172. Gunthert U., Stauder R., Mayer B. and et al.: Are CD44 variant isoforms involved in human tumour progression ?. *Cancer Surv*; 24:19-42, 1995.
173. Günthert U, Hofman M, Rudy W and et al: A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cell lines. *Cell*; 65: 13-24, 1991.

-
174. Ristamäki R, Joensuu H, Salmi M, Jalkanen S: Serum CD44 in malignant lymphoma: An association with treatment response. *Blood*; 84(1): 238-243, 1994.
175. Macia J.: Estudio de la apoptosis y proliferación celular en los linfomas no Hodgkinianos. Valor diagnóstico y pronóstico. Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Lleida. Tesis doctoral. Lleida, 1996.
176. Hiddeman W, Schumann J, Andreef M, and et al: Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry*; 5: 445-446, 1984.
177. Sgonc R., et al.: Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Technical Tips*; 10:41-42, 1994
178. Greiner T., Medeiros J., Jaffe E.S.: Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer*; 75: 370-380, 1995.
179. García-Conde J., Pascual A.: Perspectiva histórica, clasificación, diagnóstico clínico y extensión de los linfomas, perspectiva e interpretación histórica. En: *Linfomas no Hodgkin*. Editor: Cabanillas, F.: *Monografías Clínicas en Oncología, Vol 1.*: Director de la serie: Estapé, J.: Ediciones Doyma, S.A., Barcelona, 1988.
180. Stauder R., Hamader S., Fasching B. and et al.: Adhesion to high endothelial venules: a model for dissemination mechanisms in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*; 82: 262-267, 1993.
181. Roos E.: Adhesion molecules in lymphoma metastasis. *Cancer Metastasis Rev*; 10(1): 33-48, 1991.
182. Ristamäki R, Joensuu H, Söderström, Jalkanen S. CD44v6 expression in non-Hodgkin's Lymphomas: an association with low histological grade and poor prognosis. *J Pathol*; 176: 259-265, 1995.
183. Stauder R., Eisterer W., Thaler J., and Gunthert U.: CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood* 85: 2885-2899, 1995.
184. Irving J., Cain G., Howard M. and et al.: The role of alternative splicing of the adhesion molecule, CD44, in lymphoid malignancy. *J Clin Pathol*; 51(10): 776-780, 1998.

-
185. Terpe H., Koopmann R., Imhof B. and Gunthert U. Expression of integrins and CD44 isoforms in non-Hodgkin's lymphomas: CD44 variant isoforms are preferentially expressed in high-grade malignant lymphomas. *J Pathol.*; 174(2): 89-100, 1994.
186. Inagaki H., Banno S., Wakita A. and et al.: Prognostic significance of CD44v6 in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol.*; 12(5): 546-52, 1999.
187. Ristamaki R., Joensuu H., Soderstrom K. and Jalkanen S.: CD44v6 expression in non-Hodgkin's lymphoma: an association with low histological grade and poor prognosis. *J Pathol.*; 176(3): 259-67, 1995.
188. Rosenberg S.A.: Non-Hodgkin's lymphomas. Selection of treatment on the basis of histologic type. *N Engl J Med*; 301: 925-928, 1981.
189. Lukes, R.J., Collins, R.D.: Immunological characterization of human malignant lymphomas. *Cancer*; 34:1488-1503, 1974.
190. Lennert, K.: Linfomas no-Hodgkin: clasificación de Kiel. Editorial Espaxs, Barcelona, 1984.
191. Stanfeld A.G., Diebold J., Kapanci Y.: Update Kiel Classification for lymphomas. *Lancet*; 1: 293-294, 1988.
192. Rosenberg, S.A., National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas, summary and description of a Working Formulation for clinical usage. *Cancer*; 42: 2112-2135, 1982.
193. Aisenberg AC. Extranodal lymphoma: presentation, natural history, and special treatment considerations in Malignant lymphoma. *Biology, natural history and treatment*. Lea & Febiger edits; 235-310. 1991.
194. Shipp MA. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*; 329: 987-994, 1993.
195. Gordon L.I., Andersen M.S., Colgan J. and et al.: Advanced Diffuse non-Hodgkin's Lymphoma. Analysis of prognostic factors by the International Index and by lactic dehydrogenase in an intergroup study. *Cancer*; 75: 865-873, 1995.

-
196. Pileri S.A., Dirnhofer S., Went P. and et al.: Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification. *Histopathology*; 41(6): 482-509, 2002.
197. Lossos I.S., Czerwinski D.K., Alizadeh A.A. and et al.: Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med.*; 350(18): 1828-37, 2004.
198. Picker L.J., Medeiros L.J., Weiss L.M. and et al: Expression of lymphocyte homing receptor antigen in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol*; 130(3): 496-504, 1998.
199. Sasaki K., Niitsu N.: Elevated serum levels of soluble CD44 variant 6 are correlated with shorter survival in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Eur j Haematol*; 65(3):195-202, 2000.
200. Fujiwara K., Yoshino T., Miyake K. and et al.: Expression of a lymphocyte adhesion molecule (CD44) in malignant lymphomas: Relevance to primary site, histological subtype and clinical stage. *Acta Med Okayama*; 47(3): 215-222, 1993.
201. Perez-Encinas M, Villamayor M., Campos A., Gonzalez S. and et al.: Tumor burden and serum level of soluble CD25, CD8, CD23, CD54 and CD44 in non-Hodgkin lymphoma. *Hematologica*; 83(8): 752-754, 1998.
202. Ristamäki R., Joensuu H., Hagberg H. and et al.: Clinical significance of circulating CD44 in non-Hodgkin's lymphoma. *Inter J Cancer*; 79(3):221-225, 1998.
203. Drilenburg P. and Pals S.: Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood*; 95: 1900-1910, 2000.
204. Möller P, Eichelmann A, Mechtersheimer G. and et al: Expression of beta 1-integrins, H-CAM (CD44) and LECAM-1 in primary gastro-intestinal B-cell lymphomas as compared to the adhesion receptor profile of the gut-associated lymphoid system, tonsil and peripheral lymph node. *Int J Cancer*; 49(6): 846-55, 1991.
205. Joensuu H, Ristamäki R, Klemi PJ and et al.: Lymphocyte homing receptor (CD44) expression is associated with poor prognosis in gastrointestinal lymphoma. *Br J Cancer*; 68: 428-432, 1993.

-
206. Milpied N, Deconinck E, Gaillard F, et al. Initial treatment of aggressive lymphoma with high dose chemotherapy and autologous stem-cell support. *N Engl J Med*; 350:1287-1295. 2004.
207. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, et al. Longterm results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*; 23:4117-4126. 2005.
208. Hauptschein RS, Sloan KE, Torella C, et al. Functional Proteomic Screen Identifies a Modulating Role for CD44 in Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Cancer Res*; 65(5):1887-1896. 2005.