

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“CLASIFICACIÓN DE LOS LINFOMAS NO HODGKIN
DIFUSOS DE CÉLULAS GRANDES B EN BASE AL
ALGORITMO DE HANS Y AL ESTADO DE MYC Y BCL-2
POR ESTUDIOS DE IHQ Y FISH”**

Por

DR. LUIS ARTURO ACOSTA CALDERÓN

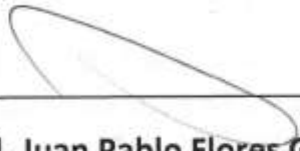
**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA
EN ANATOMÍA PATOLÓGICA**

FEBRERO 2019

FEBRERO 2019

**"CLASIFICACIÓN DE LOS LINFOMAS NO HODGKIN DIFUSOS DE
CÉLULAS GRANDES B EN BASE AL ALGORITMO DE HANS Y AL
ESTADO DE MYC Y BCL-2 POR ESTUDIOS DE IHQ Y FISH"**

Aprobación de la tesis:



Dr. Med. Juan Pablo Flores Gutiérrez
Director de la Tesis y Coordinador de Investigación del Servicio
de Anatomía Patológica y Citopatología



Dra. Med. Oralia Barboza Quintana
Co-Director de la Tesis y Jefa del Servicio de Anatomía
Patológica y Citopatología



Dra. Natalia Vilches Cisneros
Coordinadora de Enseñanza del Servicio de Anatomía
Patológica y Citopatología



Dr. Med Felipe Arturo Morales Martínez

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO I:

1. RESUMEN.....	6
-----------------	---

CAPITULO II:

2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1 CD 10, BCL-6 Y MUM-1 COMO MARCADORES DE IHQ.....	7
2.2 CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS LINFOMAS DE CÉLULAS GRANDES B.....	8
2.3 IMPORTANCIA DE LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR.....	10
2.4 LINFOMAS B DE ALTO GRADO.....	10
2.5 LINFOMAS DOBLE EXPRESORES.....	13
2.6 USO DE INUMOHISTOQUÍMICA PARA DETECCIÓN DE PROBABLES LINFOMAS B DE ALTO GRADO.....	13

CAPITULO III:

3. JUSTIFICACIÓN.....	15
-----------------------	----

CAPITULO IV:

4. OBJETIVO.....	16
4.1 OBJETIVO SECUNDARIO.....	16

CAPITULO V:

5. HIPÓTESIS.....	17
5.1 HIPÓTESIS NULA.....	17

CAPITULO VI:

6. MATERIAL Y METODOS.....	18
6.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	18
6.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	18
6.4 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	19
6.5 METODOLOGÍA DEL ESTUDIO.....	19

CAPITULO VII

7. RESULTADOS.....	23
--------------------	----

CAPITULO VIII

8. DISCUSIÓN.....	33
-------------------	----

CAPITULO IX

9. CONCLUSIONES.....	36
----------------------	----

CAPITULO X

10. BIBLIOGRAFÍA.....	37
-----------------------	----

CAPITULO XI

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	46
---------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

LNH: Linfoma No Hodgkin

LBDCG: Linfoma B de células grandes

FISH: Hibridación fluorescente in situ

LBDCG NOS: Linfoma B de células grandes “Not Otherwise Specified”

R-CHOP: rituximab, ciclofosfamida, clorhidrato de doxorubicina (hidroxidaunorubicina), sulfato de vincristina (Oncovin) y prednisona

R-ECHOP: rituximab, etopósido, „ciclofosfamida, clorhidrato de doxorubicina (hidroxidaunorubicina), sulfato de vincristina (Oncovin) y prednisona

CAPITULO I

1. RESUMEN

Luis Arturo Acosta Calderón

Fecha de graduación: Febrero, 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: CLASIFICACIÓN DE LOS LINFOMAS NO HODGKIN DIFUSOS DE CÉLULAS GRANDES B EN BASE AL ALGORITMO DE HANS Y AL ESTADO DE MYC Y BCL-2 POR ESTUDIOS DE IHQ Y FISH

Número de páginas: 45

Candidato para obtener el grado de especialista en Anatomía Patológica

Área de estudio: Anatomía Patológica

Propósito y Método del estudio: El linfoma B Difuso de Células Grandes (LBDCG) es el linfoma más frecuente a nivel mundial, estos pueden ser clasificados molecularmente (derivado del centro germinal y post germinal) utilizando marcadores de inmunohistoquímica para CD 10, BCL-6 y MUM-1, además es posible buscar el estado doble receptor (positividad para inmunohistoquímica para BCL-2 y MYC) y los rearrreglos de BCL-2 y/o BCL-6 con MYC mediante técnica de FISH, todo esto con impacto pronóstico en la sobrevida del paciente. En el presente trabajo se estudiaron 80 casos de linfomas B de células grandes, realizando su clasificación molecular, buscando el estado doble receptor, aquellos casos que resultaron doble receptor fueron sometidos a búsqueda de los rearrreglos de BCL-2, BCL-6 y MYC, mediante estudios de FISH

Contribuciones y conclusiones: Los casos fueron clasificados según el algoritmo de Hans, se lograron identificar 19 casos de linfomas doble expresores y 5 linfomas B de alto grado, este estudio demuestra que es posible realizar la clasificación molecular solo usando MUM-1, CD 10 y BCL-6, la base de datos obtenida en este trabajo puede ser utilizada en el futuro para nuevas investigaciones

CAPITULO II

2. INTRODUCCIÓN

El Linfoma No-Hodgkin (LNH) es una neoplasia del linaje linfoide, que el cual entre las neoplasias malignas ocupa el décimo lugar de incidencia a nivel mundial y se estima que para el 2020 aumente un 20%. En México el LNH representa la novena neoplasia maligna en incidencia y la décima en mortalidad. Entre los LNH el Linfoma B Difuso de Células Grandes (LBDCG) es el linfoma más frecuente a nivel mundial (3) con una supervivencia a 5 años de aproximadamente 30 al 80% (11). Se presenta como una neoplasia heterogénea y clínicamente agresiva con variantes morfológicas y características genéticas diversas. Estas neoplasias pueden presentarse como tumor primario en ganglio (nodal) en el 68.4% de los casos y extranodal en el 31.6%(11).

2.1- CD 10, BCL-6 Y MUM-1 COMO MARCADORES DE IHQ

El CD 10 es una glicoproteína de superficie con actividad de endopeptidasa neutra (60,61), se expresa en una variedad de células hematolinfoides, incluyendo precursores linfoides, linfocitos B del centro germinal y los granulocitos (62,63). Aunque el CD 10 no es específico de linaje, es un marcador útil debido a que es expresado en la gran mayoría de los linfomas del centro folicular, en linfomas de Burkitt y un subconjunto de linfomas difusos de células grandes B. El CD 10 puede ser detectado mediante citometría de flujo multiparámetro con una sensibilidad del 98% y especificidad del 95% para linfomas foliculares de bajo grado contra algún otro tipo de linfoma de células pequeñas (64). Existen marcadores de inmunohistoquímica para CD 10 que pueden ser utilizados en tejido fijado en parafina, Xu et al. compararon la expresión de CD 10 mediante citometría de flujo y análisis de inmunohistoquímica en casos de linfomas difusos de células grandes B, encontrando que el marcador de inmunohistoquímica tiene una sensibilidad del 75% (65).

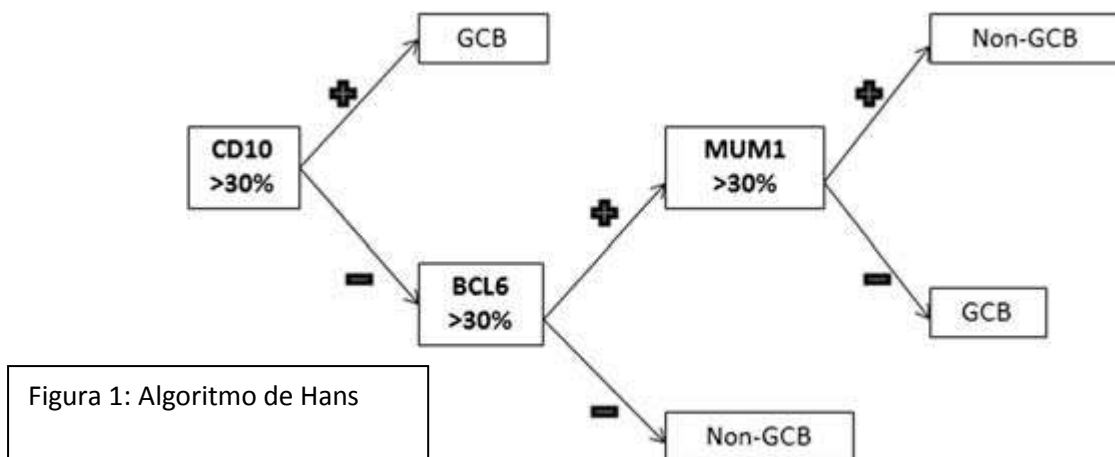
MUM-1 es un miembro de la familia de los interferones reguladores de los factores de transcripción específico de linfocitos (67), el interés de la molécula surgió al evidenciar que la pérdida de función de MUM1 resulta en la ausencia de células linfoides y de células plasmáticas secretoras IgG (68), después de varios estudios (69) se llegó a la conclusión de que quizás la expresión de MUM-1 denote el paso final en la diferenciación de la célula del centro germinal, este reacciona con la mayoría de los LBDCG que además frecuentemente expresan BCL-6, lo que sugiere que una gran fracción de estas entidades pueden estar relacionadas a las fases tardías de la maduración de las células B (69).

El gen de BCL-6 localizado en el cromosoma 3q27 codifica una proteína de unión con actividad transcripcional represora que parece estar involucrada en la supresión del crecimiento (73), en los tejidos linfoides, BCL-6 se expresa en las células B del centro germinal en los folículos secundarios tanto en la zona oscura (rica en centroblastos) y la zona clara (rica en centrocitos) (74). Algunos autores han sugerido que la expresión de BCL-6 mediante estudios de inmunohistoquímica es un factor pronóstico en los LBDCG pero otros han contradicho esto (75,76,77). En un estudio realizado por Colomo et al. (78), BCL-6 fue expresado en 91% de los casos de LBDCG (23% solo BCL-6 y 49% con otros marcadores), el grupo de pacientes con expresión restringida de BCL-6 se presentaron con un estadio más temprano, un índice internacional de pronóstico de bajo riesgo y valores normales de DHL, sin embargo, aunque este grupo de pacientes tiene la tasa de sobrevida más alta, la diferencia no alcanzó a ser estadísticamente significativa. En una revisión realizada por Mahmoud, H. M., & El-Sakhawy (79) indican que en general los casos con positividad para BCL-6 tienen mejor pronóstico.

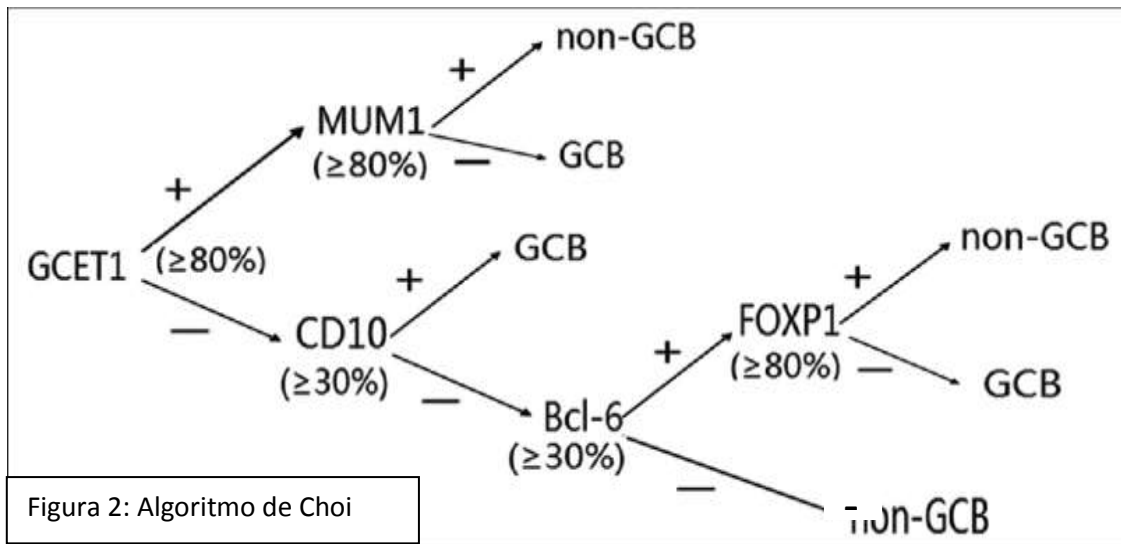
2.2 CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS LINFOMAS DE CÉLULAS GRANDES B

Mediante los perfiles de expresión génica los LBDCG pueden ser clasificados en subtipos biológicos con impacto pronóstico basados en la célula de origen, siendo el perfil de célula B activada (post-germinal) asociado con peor pronóstico a comparación del subtipo de tipo centro germinal, sin embargo, debido a que los perfiles de expresión génica no son posibles de realizar en tejido incluido en parafina y además requieren tejido fresco, se han usado algoritmos con marcadores de inmunohistoquímica para determinar su célula de origen, siendo los

resultados de estos algoritmos variables (2). Hans et. al. elaboraron un algoritmo para determinar el perfil de célula B activada y el perfil de centro germinal, usando 3 marcadores de inmunohistoquímica para CD 10, BCL-6 y MUM-1, al ser comparados con los microarreglos de cDNA, el panel de inmunohistoquímica reprodujo los resultados de la expresión genética en 71% de los linfomas de centro germinal y 88% de los linfomas de tipo célula B activada, siendo este el primero estudio que correlacionó la subclasificación por la expresión génica con la subclasificación mediante la expresión de proteínas en el LBDCG B (25), el algoritmo se muestra en la figura 1.



Posteriormente Choi et al. mencionan que los resultados de varias investigaciones muestran que la concordancia entre los perfiles de expresión génica y el algoritmo de Hans es de aproximadamente del 70%, y postulan que estos resultados son probablemente secundarios a la identificación subóptima de casos del centro germinal debido a un número insuficiente de marcadores de inmunohistoquímica específicos para el centro germinal, por lo que desarrollan un algoritmo usando 5 marcadores de inmunohistoquímica: GCET, MUM-1, CD 10, BCL-6 monoclonal, FOXP-1, encontrando una correlación con los perfiles de expresión génica del 93% mientras que el diagrama de Hans de 86%, dicho diagrama se presenta en la figura 2. (66). Además de lo anterior también mencionan que al evaluar el CD 10 como marcador aislado, usando un punto de corte de >20% de positividad para el marcador de inmunohistoquímica, se obtiene una sensibilidad del 60% y una especificidad del 95% para determinar el inmunofenotipo de centro germinal en los LBDCG (66), mientras que para MUM-1 al usar un punto de corte del 70%, se obtiene una sensibilidad del 58% y especificidad del 94% para el inmunofenotipo de célula B activada (66).



2.3.- IMPORTANCIA DE LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR

La clasificación de los LBDCG en derivado del centro germinal o post germinal tiene impacto pronóstico, los casos derivados del centro germinal se considera tienen mejor pronóstico que los post germinales, en la era del rituximab la sobrevida a 5 años para los casos del centro germinal es del 87-92% a comparación de 44% para aquellos post germinales (66,80). Esta clasificación molecular fue incluida en el 2008 por la OMS, la cual reconoció los sub-grupos del centro germinal y postgerminal basado en el algoritmo de Hans, sin embargo, como los perfiles de expresión génica no se encontraban como una prueba clínica de rutina, y como había problemas en la reproducibilidad y confiabilidad en los algoritmos de inmunohistoquímica, esta clasificación molecular se consideraba opcional en la clasificación del 2008 (81), sin embargo, el mejor entendimiento en la patogénesis de estos 2 subgrupos ha llevado a la investigación de terapias más específicas para mitigar el peor pronóstico en aquellos casos clasificados como post-germinales que se reporta en la mayoría de los estudios, hay ensayos prospectivos en curso para determinar si estas terapias deberían ser incorporadas a la práctica clínica (82), por esta razón la clasificación revisada de 2017 requiere la identificación de estos 2 subtipos, siendo que los perfiles de expresión génica aún no son una prueba clínica de rutina, el uso de los algoritmos de inmunohistoquímica se considera aceptable (81).

2.4.- LINFOMAS B DE ALTO GRADO

Kanungo y colaboradores (1), definieron un subgrupo de linfomas a los que nombraron “linfomas doble hit”, los cuales muestran rearrreglos concurrentes entre IGH-BCL-2 y/o BCL-6, y MYC, estos se caracterizan por ser clínicamente agresivos, presentar cariotipos complejos, así como un amplio espectro morfológico e inmunofenotípico que se sobrepone con el linfoma de Burkitt, linfoma de células grandes B y ocasionalmente con linfomas linfoblasticos de tipo B (3), siendo la mayoría diagnosticados inicialmente como “linfoma no clasificable con caracteres entre linfoma difuso de células grandes B y linfoma de Burkitt” (26). Las 2 translocaciones más comunes son las que involucran el gen BCL-2 y el gen MYC, la translocación t (14; 18) (q32; q21) yuxtapone BCL-2 en 18q21 con el gen de inmunoglobulinas de cadenas pesadas en 14q32 resultando en la sobreexpresión de BCL-2 siendo esta translocación característica del linfoma folicular, pero que también se puede presentar en 20-30% de los linfomas difusos de células grandes B de novo. Las translocaciones que involucra a MYC incluyen t(8,14)(q24;q32), t (2,8)(p12;q24) y t(8;22)(q24;q11), las cuales yuxtaponen al gen MYC en 8q24 con los genes para inmunoglobulina de cadenas pesadas, gen Kappa y gen Lambda, respectivamente, siendo el resultado final la sobreexpresión de MYC (5). Si bien la translocación de MYC es característica del linfoma de Burkitt, esta no es específica, debido a que puede ocurrir en el 5-10% de los linfomas difusos de células grandes B, y hasta en el 50% de los linfomas B de alto grado (6,7), los linfomas con rearrreglos del gen MYC tienen peor pronóstico y presentan pobre respuesta al tratamiento con R-CHOP (8,9,10,11).

En 2011 Sietse M. Aukema et, al. (83) realizaron una revisión de la literatura y artículos publicados al momento, en su artículo mencionan que la mayoría de los linfomas doble hit muestran el rearrreglo BCL-2/MYC, pero también hay una menor proporción que presentan el rearrreglo BCL-6/MYC, al momento la mayoría de los estudios se centraban en los linfomas con rearrreglo de BCL-2/MYC y poco se podía concluir de los linfomas BCL-6/MYC y de hecho se describen los linfomas triple hit con rearrreglo BCL-2/BCL-6/MYC, englobando la definición de linfomas doble hit y triple hit como aquellos “caracterizados por una translocación cromosomal recurrente en combinación con un punto de

quiebre en MYC/8q24”, la mayoría tiene una combinación BCL-2/MYC y la mayoría de los linfomas BCL-6/MYC representan linfomas triple hit BCL-2/BCL-6/MYC.

Desde el punto de vista inmunofenotípico, los linfomas doble hit expresan antígenos de célula B, siendo que el 64-100% (la mayoría de los estudios >80%) presenta un inmunofenotipo de tipo centro germinal a comparación del inmunofenotipo de célula B activada (10, 31, 32, 33, 34, 35, 37,46,47,48, 49) . Los linfomas doble hit BCL-6 positivos son similares en varias formas a los linfomas doble hit BCL-2 positivos excepto que tienden a ser CD 10 negativos (36% vs 10%) y MUM-1 positivos (75% vs 18%), además infrecuentemente expresan BCL-2 (22% vs 92%) y pueden llegar a tener menor complejidad citogenética (50).

El diagnóstico puede ser confirmado mediante la técnica de FISH ya sea en tejido fijado en parafina, extendidos, improntas por toque y células frescas en interfase o metafase, la reproducibilidad es muy alta con concordancia entre 2 observadores mayor del 98% (44,45).

En la clasificación de 2017 de los tumores hematopoyéticos y tejidos linfoides de la OMS, los linfomas doble y triple hit quedan agrupados bajo el nombre de “linfomas B de alto grado” (72), reconociendo los linfomas de alto grado con rearrreglos de MYC BCL-2 y/o BCL-6, mencionando además, que debido a que estos linfomas pueden ser indistinguibles de los LBDCG, el estado doble/triple hit debería ser investigado en todos los casos de LBDCG NOS, usando citogenética o estudios moleculares, que por definición deben contar con un rearrreglo en MYC (8q24.2), 65% de las veces yuxtapuesto a uno de los genes de IG (IGH), en adición todos contienen un rearrreglo de BCL-2 en 18q21.3 o BCL-6 en 3q27.3.

Los linfomas B de alto grado muestran respuesta completa relativamente baja con la terapia R-CHOP con sobrevida media de 4.5 a 18.5 meses (72), por lo que se han propuesto terapias de inducción más intensivas, la terapia con dosis ajustada de rituximab más etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida y doxorubicina (R-ECHOP) tiene mayor respuesta completa a comparación de R-CHOP, aun así 20-30% de los pacientes presentan enfermedad primaria refractaria por lo que es necesaria realizar ensayos clínicos con prueba de nuevas terapias (70).

2.5.- LINFOMAS DOBLE EXPRESORES

Los LBDCG que expresan por inmunohistoquímica MYC y BCL-2 son llamados linfomas doble expresores o doble proteína y están asociados con parámetros clínicos de mayor agresividad, tienen frecuentemente factores independientes de mal pronóstico comparados con otros tipos de linfomas difusos de células grandes B, aunque no son tan agresivos como un linfoma doble hit (35, 37, 55, 56), hay que reconocer además que un linfoma doble proteína no es lo mismo que un linfoma doble hit, aunque 80-90% de los linfomas doble hit resultan ser doble proteína (35, 37), Hasta 19-34% de los linfomas difusos de células grandes B (34, 37, 49, 57) y 20% de los casos de linfomas no clasificables con caracteres entre linfoma difuso de células grandes B y linfoma de Burkitt (58) han sido reportados con linfomas doble proteína, y a diferencia de los linfomas doble hit que se han relacionado con un fenotipo de centro germinal, los linfomas doble proteína presentan un fenotipo de tipo célula B activada hasta en el 60% de los casos (14, 35, 37).

La mayoría de los estudios toman un punto de corte del 40% para tomar como positivo un estudio de inmunohistoquímica para MYC, los puntos de corte para BCL-2 han sido desde 10% a 70%, la mayoría requiriendo al menos 50% de positividad (14, 15, 34, 35, 37, 59)

La importancia en reconocer los linfomas doble expresores radica en que varios estudios han mostrado que estos linfomas tienen pobre pronóstico después de la quimioterapia estándar o después de la quimioterapia de alta dosis con trasplante autólogo de células hematopoyéticas (70,71).

2.6.- USO DE INUMOHISTOQUÍMICA PARA DETECCIÓN DE PROBABLES LINFOMAS B DE ALTO GRADO

Los estudios de inmunohistoquímica se han propuesto como estudios de tamizaje costo-efectivos para disminuir el número de estudios de FISH usados para detectar linfomas doble hit, muchos han buscado estos linfomas sólo cuando se trata de un linfoma de Burkitt o cuando un linfoma de células grandes B tienen un índice de proliferación muy alto basado en el porcentaje de positividad de Ki67%, pero ambas estrategias

van a pasar por alto una minoría de casos (28). Algunos casos morfológicamente semejan algún otro tipo de linfoma difuso de células grandes B y muchos tienen índice de proliferación menor del <90% y algunos aún mucho menos. Con un punto de corte de >90% la sensibilidad para detectar los linfomas doble hit es sólo de 0.54 y usando >75% sólo aumenta hasta 0.77 (51). Otra serie que buscaba solamente linfomas doble hit de tipo linfoma difuso de células grandes B encontró que sólo 7% de los linfomas doble hit presentaban un Ki 67>90% (14) . Hablando del uso de MYC por inmunohistoquímica se ha reportado que una positividad mayor del 70% tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 93% para el “break” de MYC (13), otro estudio reportó que su máxima sensibilidad/especificidad fue lograda usando un punto de corte de >95%, con una sensibilidad del 91% pero solo una especificidad del 36% con valor predictivo positivo del 60% (16). Hay diversos reportes que evalúan la relación entre la presencia del rearrreglo MYC y la expresión del mismo con marcadores de inmunohistoquímica: uno de estos encontró que 41% de sus casos con rearrreglo del gen MYC mostraron una positividad celular menor del 50% para el marcador de inmunohistoquímica para MYC (31), otro reporta <40% de positividad en 29% casos de linfoma doble hit (14) y un último reporte menciona menos de <30% de positividad en 17% de sus casos con rearrreglo de MYC (34) . Otro estudio en donde 31% de sus casos con rearrreglo para MYC presentaron baja positividad para MYC por inmunohistoquímica sugiere que el estudio de FISH sólo debería ser omitido si hay menos de 20% de células positivas para MYC con sensibilidad del 92.3% (15). Se ha reportado una concordancia entre 3 patólogos del 94% en la valoración de inmunohistoquímica para MYC, considerando que existe poca variación por diferentes técnicas de fijación y técnicas en diferentes institutos (14). Bajo esta evidencia algunos sugieren que el tamizaje sea realizado en casos de linfoma de Burkitt o en casos con diagnóstico de linfoma no hodgkin difuso de células grandes B del centro germinal (52), otros recomiendan hacer tamizaje en búsqueda para rearrreglos de MYC a todos los casos de linfomas difusos de células grandes B y linfomas de Burkitt (46,53) e incluso realizar FISH para BCL-2 y MYC a todos los casos nuevos de linfoma difuso de células grandes B (54). Actualmente la OMS recomienda realizar estudios de FISH a todos los casos de nuevo diagnóstico de linfoma difuso de células grandes B en busca de los rearrreglos BCL-2/BCL-6/MYC, sin embargo, menciona en uno de sus párrafos que algunos autores sugieren realizar los estudios de FISH solo en casos en que MYC sea positivo por inmunohistoquímica en 30% a 40% de las células tumorales (72).

CAPITULO III

3. JUSTIFICACIÓN

En México no se ha realizado ningún trabajo que clasifique a los LNH de tipo LBDCG según el algoritmo de HANS, estado doble receptor, y la presencia de rearrreglos Myc, BCL-2/BCL-6

CAPÍTULO IV

4. OBJETIVO

Clasificar los linfomas B de células grandes diagnosticados en nuestro servicio en base al algoritmo de Hans en el período de tiempo de enero 2013 a junio 2016

4.1 OBJETIVO SECUNDARIO

Conocer cuántos DLBC diagnosticados en el período de tiempo de enero 2013 a junio 2016 resultan ser linfomas doble expresores y de estos cuantos resultan tener rearrreglos de MYC con BCL-2 y/o BCL-6

CAPÍTULO V

5. HIPÓTESIS

Todos los linfomas de células grandes B pueden ser clasificados según el algoritmo de Hans en nuestro servicio

5.1 HIPÓTESIS NULA

Los linfomas de células grandes B no pueden ser clasificados según el algoritmo de Hans en nuestro servicio

CAPÍTULO VI

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se realizó una búsqueda retrospectiva de casos con diagnóstico de LBDCG desde el 1ero de enero 2013 al 1ero junio 2016 del servicio de anatomía patológica y citopatología del hospital universitario Dr. José Eleuterio González, usando como motor de búsqueda el sistema Pathox (TesiUpDate). La población de estudio son todos los casos resultantes de la base de datos.

6.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Todos los casos con diagnóstico de histológico de linfoma B de células grandes que cuenten con los bloques de parafina

6.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Todos los casos con diagnóstico de histológico de linfoma B de células grandes que NO cuenten con los bloques de parafina

6.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Todos los casos con diagnóstico de histológico de linfoma B de células grandes que en los que el bloque de parafina no cuenta con suficiente material o se encuentre en mal estado

6.4. DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD Y DE RESGUARDO DE MATERIAL

En ningún momento de la investigación fueron utilizadas las identificaciones de los pacientes, solo se usó el número de registro otorgado por parte del departamento de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Dr. José Eleuterio González, de igual forma no se afectó el material de los pacientes, de forma que estos podrán ser utilizados de nuevo, en caso de que se requieran estudios complementarios que influyan en el pronóstico o tratamiento del paciente.

6.5 METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

Se realizó una base de datos en donde se documentó el registro usado en nuestro servicio, el sexo del paciente, la edad, el diagnóstico original, los marcadores de inmunohistoquímica además de los comentarios y notas de cada caso. Se buscó intencionadamente si se realizó el algoritmo de Hans a los casos y si quedo documentado en cada caso la clasificación molecular, en base a esto a cada caso le fue asignada una de las siguientes categorías:

- Casos clasificados como derivados del centro germinal
- Casos clasificados como post germinales
- Casos donde no se especifica la clasificación y/o no cuenta con panel de Hans completo y/o que no se realizó ningún marcador para la clasificación de Hans
- Caso clasificados como alto grado y/o parecido Burkitt y/o parecido a linfoblástico
- Casos que fueron catalogados como no clasificables

- 1 caso que fue catalogado como compuesto (folicular/difuso)

Posteriormente se obtuvieron los bloques y laminillas de todos los casos, en caso de que no se contase con las laminillas de algún caso se realizaron nuevos cortes a los bloques de parafina de los mismos

Un patólogo quirúrgico revisó todas la laminillas, seleccionó un área representativa de donde se obtuvo un cilindro de tejido de 2 mm, con los que se realizaron 10 histoarreglos por medio de la plataforma automatizada TMA Master II (3D Histech), usando una muestra de rabdiomiosarcoma de 2mm como tejido guía.

Los histoarreglos fueron teñidos con la técnica de Hematoxilina y Eosina para corroborar que el área muestreada fuese representativa del tumor, se realizaron marcadores de inmunohistoquímica para la expresión de CD10, MUM-1, KI67, BCL-2, C-MYC y BCL6 usando la plataforma automatizada Ventana Benchmark XT, con las clonas mencionadas en la tabla 1.

Anticuerpo	Tipo	Clona	Fuente	Dilución
CD10	Monoclonal	56C6	Dako Denmark A/S	1:100
BCL6	Monoclonal	PG-B6p	Dako Denmark A/S	1:100
Ki67	Monoclonal	MIB-1	Dako Denmark A/S	1:500
MUM1	Monoclonal	MUM1p	Dako Denmark A/S	1:500
BCL-2	Policlonal	Ab 59348	Abcam England A/S	1:100
C-MYC	Monoclonal	Y69	Abcam England A/S	1:100

Tabla 1: Marcadores de innuhistroquímica
que fueron usados en este estudio.

Para la interpretación de los resultados de inmunohistoquímica Se tomaron como porcentajes de positividad los valores descritos en el algoritmo de Hans, además de lo descrito en la OMS para BCL-2 y MYC

- **CD 10:** 30% de positividad en las células tumorales
- **BCL-6:** 30% de positividad en las células tumorales
- **MUM-1:** 30% de positividad en las células tumorales
- **C-MYC:** 40% de positividad en las células tumorales
- **BCL-2:** 50% de positividad en las células tumorales
- Además se reportó el valor de Ki67 en porcentaje para cada caso

A cada caso en particular se le otorgó la clasificación molecular según el algoritmo de Hans de la siguiente manera

- **Centro germinal:** casos que resulten ser CD 10 (+) o casos que resulten CD 10 (-), MUM-1 (-) pero BCL-6 (+)
- **Post germinal:** aquellos casos que resulten CD 10 (-) y MUM-1 (+) o aquellos casos que resulten CD 10 (-), BCL-6 (-) y MUM-1 (+), o aquellos casos que resulten CD 10 (-) , BCL-6(-) y MUM-1 (-)
- **No valorables:** Casos en los que no fue posible interpretar el CD 10, casos en que CD 10 fue negativo pero no fue posible interpretar MUM-1, casos en que CD 10 fue negativo y además MUM-1 negativo pero no fue posible interpretar BCL-6.

Además se especifica para cada caso si resultó ser doble expesor o no. Se revisaron las laminillas de los casos clasificados como doble expresores, el mismo patólogo quirúrgico seleccionó otra área representativa del tumor, de los casos que aún contasen con el bloque de parafina y con suficiente material en el mismo se obtuvo otro cilindro de tejido de 2mm del cual se realizó un histoarreglo en donde se incluyeron todos los casos de linfomas doble proteína que aún contasen con material, por medio de la plataforma automatizada TMA Master II (3D Histech), usando una muestra de adenocarcinoma de colon de 2mm como tejido guía

A este bloque se le realizó Hibridación fluorescente in situ (FISH) con el protocolo del servicio de anatomía patológica y citología según los lineamientos del manual de operaciones usando las siguientes sondas:

- LSI BCL-6 (ABR) dual color break apart probe
- LSI BCL-2 dual color break apart rearrangement probe
- LSI MYC dual color break apart rearrangement probe

Se tomó como positividad para las pruebas de FISH una positividad de más del 15% de los núcleos con señales separadas (patrón Split). Los casos positivos para el rearrreglo BCL-2 y/o BCL-6 con MYC fueron asignados como "Linfomas B de alto grado".

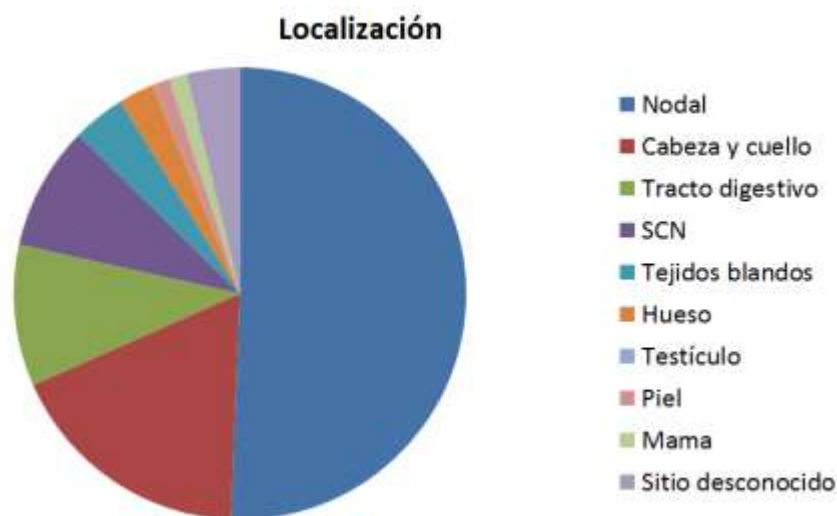
Se analizaron los resultados, dividiendo los casos por localización como nodales o extranodales, se clasificaron los casos como derivados del centro germinal, post germinales, y no valorables (según los criterios antes mencionados) además de un caso que fue reclasificado como folicular, se comparó la clasificación original de los casos antes del estudio y posterior al estudio, finalmente se identificaron los casos doble proteína y aquellos positivos para rearrreglos BCL-2y/o BCL-6 con MYC fueron clasificados como linfomas B de alto grado

CAPÍTULO VII

7. RESULTADOS

Se obtuvieron 83 casos diagnosticados como linfomas de células grandes B de la base de datos de nuestro servicio en el período del 1 ero de enero de 2013 a 1ero de junio de 2016, 3 casos fueron excluidos debido a que 2 de ellos se trataban de linfomas no Hodgkin foliculares de alto grado y uno de ellos de un linfoma de Burkitt, por lo que la población de estudio es de 80 casos. El rango de edad de los 80 casos fue de 11 a 92 años con una edad promedio de 58.75 años, 41 pacientes masculinos y 39 femeninos con una relación hombre:mujer de 1.05:1.

Al dividirlos por localización 40 casos fueron nodales y 40 extranodales, correspondiendo cada uno al 50% del total de los casos (Gráfica 1)



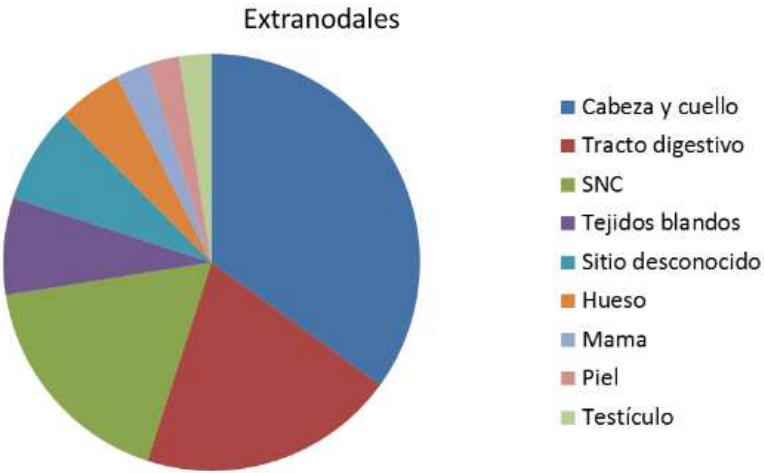
Gráfica 1 : Localización de los 80 casos (nodales y extranodales)

De los 40 casos extranodales, la localización más frecuente fue la región de cabeza y cuello con 14 casos representando 35% de los casos extranodales y 14% del total de los casos, a su vez el sitio más común en cabeza y cuello fue en la amígdala con 8 casos que equivalen al 57.14% de los casos de cabeza y cuello, 20% de los casos extranodales y 10% del total de los 80 casos. El resto de la localización de los linfomas

extranodales se muestra en la tabla 2 y en la gráfica 2, también se muestra la localización de los linfomas de cabeza y cuello en la tabla 3 y la gráfica 3

	Casos	Porcentaje de casos extranodales	Porcentaje del total de casos
Cabeza y cuello	14	35%	17.5%
Tracto digestivo	8	20%	10%
SNC	7	17.5%	8.75%
Tejidos blandos	3	7.5%	3.75%
Hueso	2	5%	2.5%
Piel	1	2.5%	1.25%
Mama	1	2.5%	1.25%
Testículo	1	2.5%	1.25%
Sitio desconocido	3	7.5%	3.75%

Tabla2 : Localización de los linfomas de células grandes B extranodales



Gráfica 2: Localización de los linfomas de células grandes B extranodales

Casos cabeza y cuello	Número	Porcentaje de cabeza y cuello	Porcentaje de casos extranodales	Porcentaje del total de casos
Amígdala	8	57.14%	20%	10%
Parótida	2	14.28%	5%	2.5%
Fosa Nasal	1	7.14%	2.5%	1.25%
Orofaringe	1	7.14%	2.5%	1.25%
Paladar blando	1	7.14%	2.5%	1.25%
Tejidos blandos cuello	1	7.14%	2.5%	1.25%

Tabla 3 : Localización de los linfomas de células grandes B extranodales en cabeza y cuello

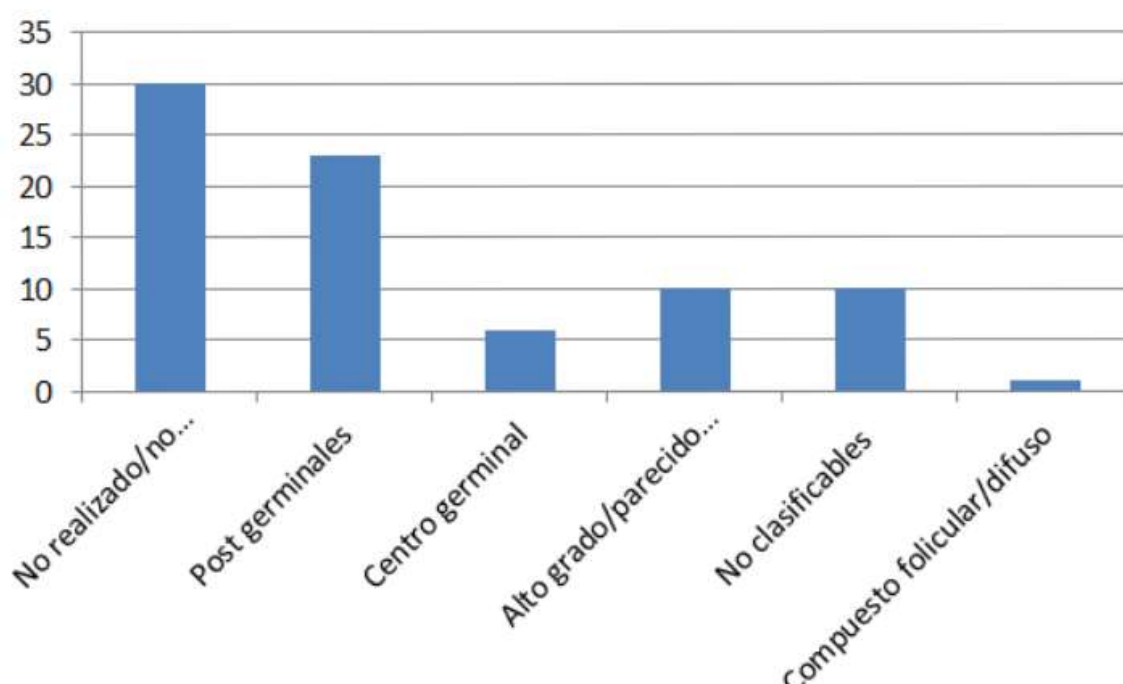


Gráfica 3 : Localización de los linfomas de células grandes B extranodales en cabeza y cuello

Antes de este estudio 39 casos (48.75% del total) de los 80 casos contaba originalmente con una clasificación según el algoritmo de Hans (germinales, post germinales y no clasificables). Al analizar el diagnóstico original junto con las notas y comentarios, los 80 casos se catalogaron de la siguiente forma:

- En 30 casos (37.5% del total) no se realizó el algoritmo de Hans, o no fue especificado en el diagnóstico o no se realizó el algoritmo de forma completa
- 6 casos (7.5% del total) fueron clasificados como derivados del centro germinal
- 23 casos (28.75% del total) fueron clasificados como post germinales
- 10 casos (12.5% del total) fueron clasificados como alto grado/parecido a Burkitt/parecido a linfoblástico
- 10 casos (12.5% del total) fueron catalogados como no clasificables
- 1 caso (1.25% del total) fue clasificado como compuesto (folicular/difuso)

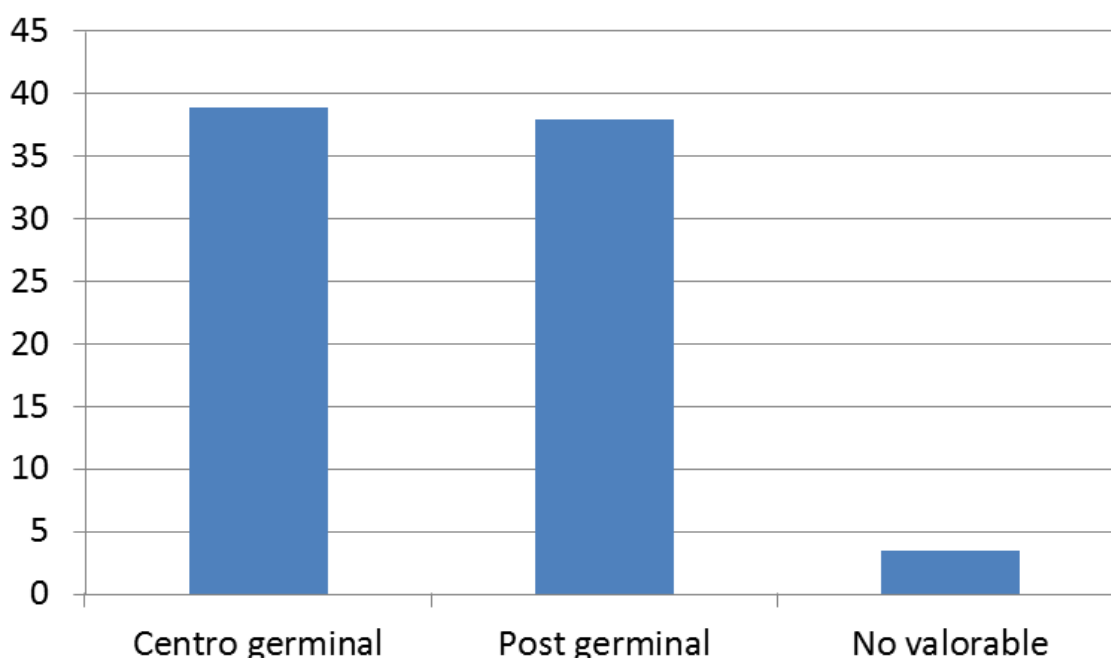
Estos resultados de la clasificación antes del estudio se pueden apreciar en la gráfica 4



Gráfica 4 : Clasificación de los 80 casos antes del estudio

Al analizar los resultados de inmunohistoquímica realizados a los histoarreglos y clasificar los casos según el algoritmo de Hans, encontramos que 39 casos (48.75% del total) corresponden a casos derivados del centro germinal , otros 38 (47.5% del total) son postgerminales, en 3 casos (3.75% del total) no se pudo evaluar el

algoritmo de Hans debido a que no fue posible interpretar el CD 10 , y estos casos no contaban con suficiente tejido para volver a realizar el marcador de inmunohistoquímica. Los resultados de la clasificación después del estudio se pueden apreciar en la gráfica 5



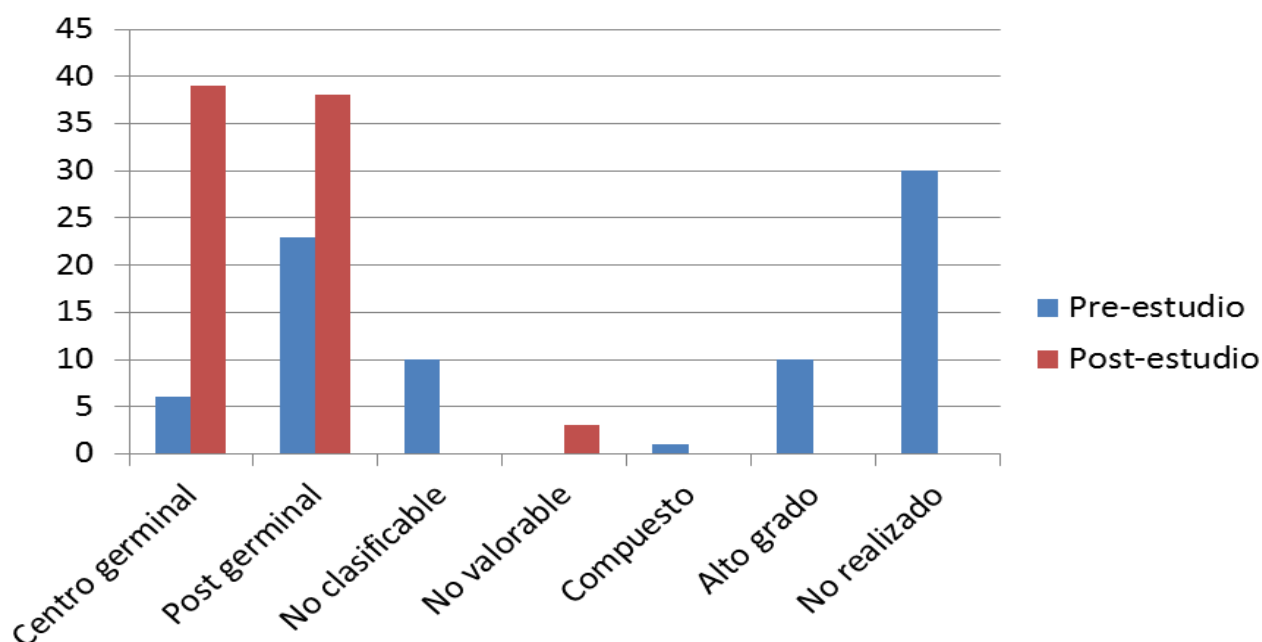
Gráfica 5 : Clasificación de los 80 casos después del estudio

De los 39 casos que originalmente contaban con una clasificación según el algoritmo de Hans, la clasificación fue cambiada en 16 de estos casos (41.02% de los casos que originalmente contaban con clasificación de Hans). Al analizar las categorías de clasificación antes del estudio, observamos lo siguiente:

- De los 30 casos en los que no se realizó el algoritmo de Hans, o no fue especificado en el diagnóstico o no se realizó el algoritmo de forma completa, 19 casos fueron clasificados como germinales (63.3% de estos casos), 10 como post germinales (33.3% de estos casos) y uno de ellos no fue valorable (3.3%) que no fue posible interpretar el CD 10 , por lo que en 96.6% de los casos de esta categoría fue posible clasificarlos según el algoritmo de Hans.

- De los 23 casos clasificados originalmente como post germinales, la clasificación se conservó en 17 casos (73.91% de estos casos), sin embargo 6 casos fueron reclasificados como derivados del centro germinal (26.08% de estos casos), ningún caso fue no valorable.
- De los 6 casos clasificados originalmente como derivados del centro germinal, 5 casos conservaron la clasificación original (83.4% de estos casos), 1 solo caso fue reclasificado como post germinal (16.6% de estos casos), ningún caso fue no valorable.
- De los 10 casos que originalmente se catalogaron como no clasificables, 4 de ellos fueron clasificados como derivados del centro germinal (40% de estos casos) y 5 fueron clasificados como post germinales (50% de estos casos), 1 caso fue no valorable por las razones ya antes comentadas. El 90% de estos casos que originalmente fueron catalogados como no clasificables se les pudo asignar una clasificación según el algoritmo de Hans
- De los 10 casos catalogados originalmente como linfoma B de alto grado/parecido a Burkitt/parecido a linfoblástico, 4 fueron clasificados como derivados del centro germinal (40% de estos casos), 5 como post germinales (50% de estos casos), 1 caso fue no valorable (10% de estos casos) por las razones antes comentadas.
- El único caso que originalmente fue diagnosticado como compuesto (linfoma no Hodgkin de tipo folicular/linfoma de células grandes B), fue rediagnosticado y reclasificado como un linfoma de células grandes B derivado del centro germinal

La gráfica 6 muestra la comparación de la clasificación antes y después de este estudio.



Gráfica 6 : Clasificación de los 80 casos antes y después del estudio

Al valorar el estado doble expresor, se encontró que de los 80 casos en este estudio, 19 fueron positivos tanto para BCL-2 y C-MYC (figura 1) por inmunohistoquímica, representando el 23.75% del total, el rango de edad de estos pacientes fue de 27 a 84 años con un promedio de edad de 61.42 años, 9 pacientes son hombres y 10 son mujeres, con una relación hombre:mujer de 1:1.1. 6 casos fueron nodales (31.57%) y 13 extranodales (68.43%), 10 casos fueron clasificados en este estudio como derivados del centro germinal (52.63%) y 8 como post germinales (42.10%), un caso (5.26%) no fue valorable para clasificarlo según el algoritmo de Hans. También es importante recalcar que de los 10 casos originalmente diagnosticados como linfoma B de alto grado/parecido a Burkitt/ parecido a linfoblástico, solo 1 caso resultó ser doble expresor, sin embargo fue negativo para los rearrreglos de BCL-2, BCL-6 y MYC (véase mas adelante).

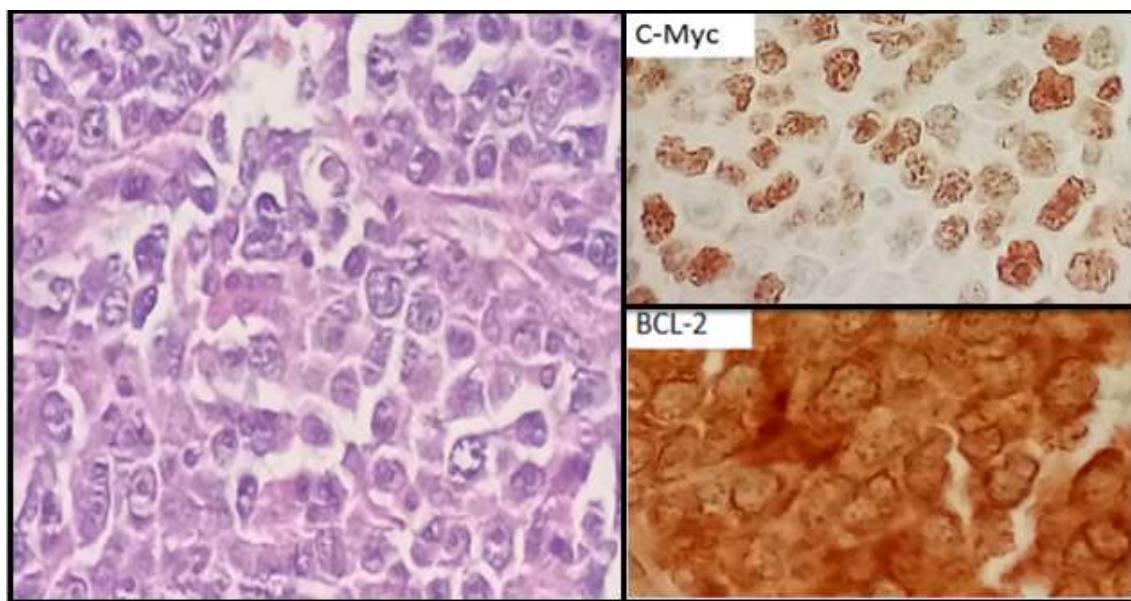


Figura 1 : Linfoma B doble expresor, se muestra la tinción de HyE, además de la positividad para C-MYC y BCL-2

La tabla 4 resume las características encontrados en los 19 linfomas que resultaron ser doble expresores, además de mostrar los marcadores de inmunohistoquímica que resultaron positivos, el porcentaje de Ki67 y la clasificación de Hans que fue asignada en este estudio.

Edad	Sexo	Localización	CD 10	MUM-1	BCL-6	BCL-2	C-MYC	Ki67	HANS
50	M	Ganglio linfático	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	90%	Postgerminal
84	F	Ganglio linfático	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	60%	Germinal
63	F	Ganglio linfático	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	90%	Germinal
77	M	Ganglio linfático	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	90%	Postgerminal
60	F	Ganglio linfático	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	60%	Postgerminal
61	F	Ganglio linfático	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	60%	Germinal
37	M	SNC	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	70%	Germinal
83	M	SNC	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	70%	Postgerminal
47	M	Tejidos blandos pare	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	30%	Germinal
36	M	Estómago	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	90%	Germinal
81	M	Testículo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	70%	Postgerminal
61	F	Parótida	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	70%	Germinal
80	F	Piel de tronco	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	90%	Post germinal
48	M	Extranodal, sitio des	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	80%	Post germinal
61	F	Tejidos blandos de c	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	90%	Germinal
62	F	Orofaringe	NA	NA	Positivo	Positivo	Positivo	80%	No valorable
74	M	Fosa nasal	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	30%	Germinal
27	F	Paladar blando	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	50%	Postgerminal
75	F	Amígdala	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	80%	Germinal

Tabla4 : Características de los 19 linfomas doble expresores

De estos 19 casos catalogados como doble expresores, se pudo volver a conseguir el bloque de parafina a 15 de ellos los cuales fueron sometidos a estudios de FISH, se lograron identificar 5 linfomas de alto grado (33.3% de los 15 casos evaluables) , en 2 casos el tejido obtenido para el histoarreglos se perdió en el proceso (13.3% de los 15 casos evuables). De los 5 linfomas B de alto grado, el rango de edad fue de 27 a 62 años con un promedio de 47.2 años, 2 de ellos con localización nodal y 3 extranodales, en el estudio 3 de estos 5 linfomas B de alto grado fueron clasificados como post germinales según el algoritmo de Hans , un caso como derivado del centro germinal, y en un caso no fue posible valorar el algoritmo de Hans. Se muestran imágenes representativa del linfoma B de alto grado que resultó ser triple hit en la figura 2.

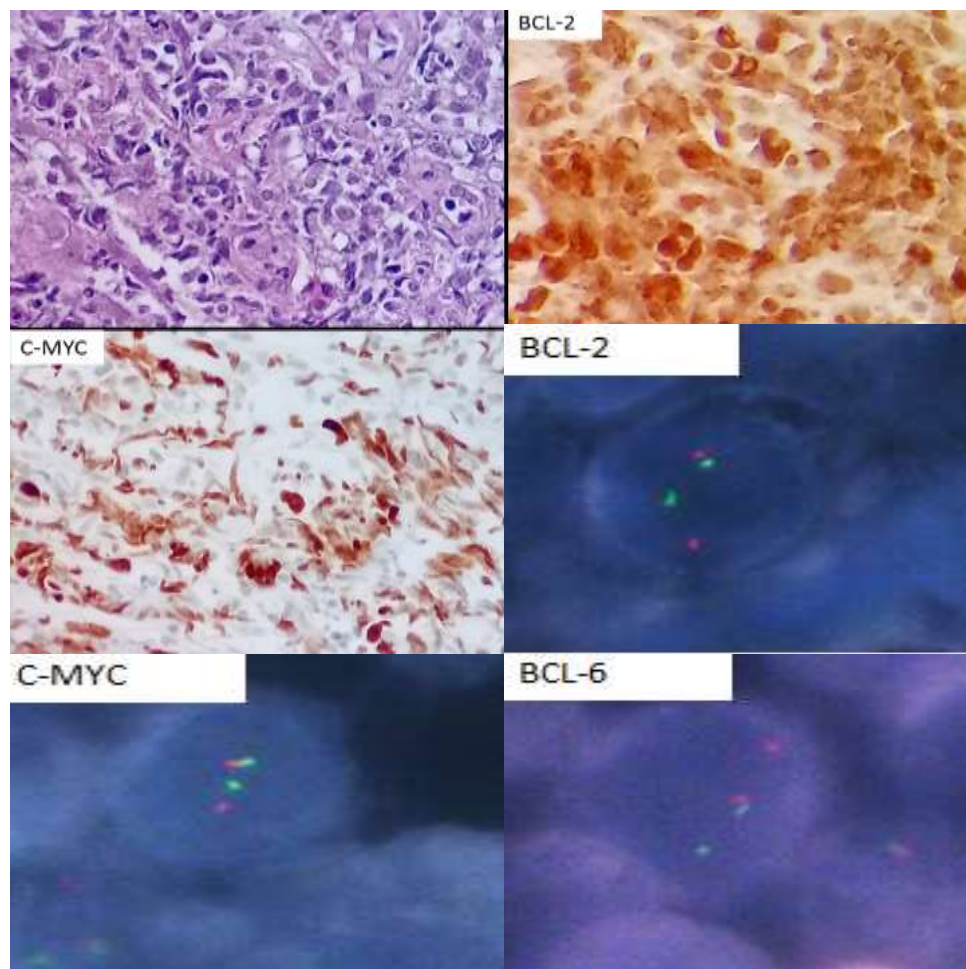


Figura 2: Linfoma B de alto grado, se muestra la tinción de HyE además de los marcadores para BCL-2, C-MYC y Ki67, también se muestra la positividad para los rearreglos de BCL-2, C-MYC y BCL-6 por FISH

Los 5 linfomas B de alto grado identificados en este estudio corresponden al 6.25% de los 80 casos analizados en este caso, 3 de ellos mostraron rearreglo de BCL-2 con MYC, 1 caso mostró rearreglo de BCL-6 con MYC y un caso mostró rearreglo de BCL-2/BCL-6 y MYC, la tabla 5 resume las características de los 15 linfomas doble expresores que fue posible evaluar.

Edad	Sexo	Localización	CD 10	MUM-1	BCL-6	BCL-2	C-MYC	KI67	HANS	Rearreglo BCL-2	Rearreglo BCL-6	Rearreglo C- Myc	Doble	Triple
50	M	Ganglio linfático	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	90%	Postgerminal	Positivo	Negativo	Positivo	SI	NO
60	F	Ganglio linfático	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	60%	Postgerminal	Positivo	Negativo	Positivo	SI	NO
37	M	SNC	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	70%	Germinal	Positivo	Negativo	Positivo	SI	NO
62	F	Orofaringe	NA	NA	Positivo	Positivo	Positivo	80%	No valorable	Negativo	Positivo	Positivo	NO	SI
27	F	Paladar blando	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	50%	Postgerminal	Positivo	Negativo	Positivo	SI	No
84	F	Ganglio linfático	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	60%	Germinal	Negativo	Negativo	Positivo	No	No
63	F	Ganglio linfático	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	90%	Germinal	Negativo	Negativo	Positivo	No	No
47	M	Tejidos blandos pared abdominal	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	30%	Germinal	Positivo	Negativo	Negativo	No	No
36	M	Estómago	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	90%	Germinal	Positivo	Negativo	Negativo	NO	NO
81	M	Testículo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	70%	Postgerminal	Negativo	Negativo	Negativo	No	No
61	F	Parótida	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	70%	Germinal	Negativo	Negativo	Negativo	No	No
80	F	Piel de tronco	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	90%	Post germinal	No realizado	No realizado	No realizado	No	No
61	F	Tejidos blandos de cuello	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	90%	Germinal	Perdido	Perdido	Perdido	NV	NV
74	M	Fosa nasal	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	30%	Germinal	Perdido	Positivo	Perdido	NV	NV
75	F	Amígdala	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	80%	Germinal	Negativo	Negativo	Negativo	NO	NO

Tabla5 : Características de los 15 linfomas doble expresores evuables con estudios de FISH y cuales resultaron ser linfomas B de alto grado

CAPÍTULO VIII

8. DISCUSIÓN

El diagnóstico de LBDCG es primordialmente morfológico, con confirmación inmunofenotípica de su estirpe B, en este estudio 40 casos (50%) resultaron ser nodales y la otra mitad (40 casos) extranodales, siendo el sitio extranodal más común la región de cabeza y cuello (14 casos que representan el 35% de los casos extranodales), estos resultados son similares a los reportados en la literatura en donde se menciona que aproximadamente 40% de los casos se presentan de forma extranodal, sin embargo, el sitio más común de presentación según la literatura es el tracto gastrointestinal (84), en nuestro estudio el tracto gastrointestinal fue el segundo sitio más común de presentación extranodal (8 casos que representan el 20% de los casos extranodales),

Si bien en nuestro servicio no será posible clasificar todos los subtipos histológicos específicos reconocidos por la OMS, todos los diagnósticos de linfoma B con células grandes (ya sea en ganglio, extranodal y trucut) deberían ser sometidos al algoritmo de Hans, de hecho en la actualización de la clasificación de la OMS del 2016 se menciona que la clasificación según la célula de origen (centro germinal o post germinal) debería ser incluida en el reporte patológico (84).

Un panel de inmunohistoquímica en base a CD 10, MUM-1 y BCL-6 es suficiente para realizar la clasificación molecular de todos los casos de linfomas B de células grandes (siempre y cuando se tenga suficiente tejido disponible), de esta forma en este estudio fue posible realizar la clasificación molecular en todos los casos (excepto 3 casos en que no fue posible interpretar el CD 10), además se identificaron 39 casos que originalmente contaban con una clasificación según el algoritmo de Hans, al realizar el estudio, la clasificación fue modificada en 16 casos (41.02% de los casos que originalmente contaban con clasificación de Hans). de estos 39 casos, esta discrepancia puede ser debida a que varios casos clasificados según Hans no contaban originalmente con CD 10 en el panel

de interpretación, de hecho en solo 35 de los 80 casos de este estudio (43.75%) se realizó CD 10 desde el principio, siendo que CD 10 es el marcador que debe ser evaluado al principio del algoritmo.

Se identificaron 19 casos que resultaron ser doble expresores (23.75% del total de casos), el cual es similar al porcentaje reportado en la literatura (19-34%) (11, 35, 37,59), la actualización de la OMS del 2016 hace énfasis en el factor pronóstico adverso en los casos que expresan MYC y BCL-2 por estudios de inmunohistoquímica (84), de hecho son varios los estudios que han mostrado que los linfomas doble expresores tiene pobre pronóstico después de la quimioterapia estándar o después de la quimioterapia de alta dosis con trasplante autólogo de células hematopoyéticas (71,85) , por esto creemos que posterior a la clasificación molecular según el algoritmo de Hans, debería buscarse el estado doble expesor en todos los linfomas B de células grandes.

Se buscó la presencia de los rearrreglos de MYC, BCL-2 y/o BCL-6 con técnica de FISH de 15 linfomas doble expresores, de estos 5 resultaron ser linfomas B de alto grado (4 doble hit y un triple hit) que representan el 33.3% del total de los 15 linfomas doble expresores evaluados y 6.25% de los 80 casos incluidos en este estudio, solo 1 caso de los 10 casos originalmente catalogados como alto grado resultó ser doble proteína, sin embargo fue negativo para rearrreglos de BCL-2 y/o BCL-6 con MYC, estos resultados son similares a los descritos por la actualización de la OMS 2016, donde mencionan que aproximadamente 4-8% de los DLBCL son "B de alto grado" , sin embargo, la OMS solo menciona que la mayoría de los linfomas Doble hit son doble expresores y que la mayoría de los doble expresores no son doble hit, pero no ofrece una relación en porcentaje y estadística entre estas 2 entidades (72, 85), además la clasificación actual de la OMS requiere que todos los casos de DLBC de nuevo diagnóstico sean sometidos a estudio de FISH en búsqueda de los rearrreglos de MYC con BCL-2 y/o BCL-6, independientemente de los resultados de los estudios de inmunohistoquímica, esto pudiese no ser factible desde el punto de vista económico en todos los laboratorios de patología quirúrgica, varios autores emiten recomendaciones, por ejemplo Shaoying Li et al. (84) menciona que la clasificación de la célula de origen puede ser realizada usando cualquier algoritmo de inmunohistoquímica (que quizás

sea remplazado en el futuro por perfiles de expresión génica realizado en bloques de parafina), posteriormente buscar el estado de doble expresor mediante marcadores de inmunohistoquímica para MYC y BCL-2 (con puntos de corte de 40% y 50% respectivamente) y finalmente realizar estudios de FISH de forma secuencial empezando con el rearrreglo de MYC, si este resulta positivo continuar con BCL-2 y BCL-6. Wang XJ et al (86) mencionan que usando un punto de corte del 40% para MYC por inmunohistoquímica, la expresión de este marcador tiene una sensibilidad del 81% y especificidad del 61% para predecir el rearrreglo de MYC. Una limitante de este estudio es que solo se realizó la búsqueda de los rearrreglos de MYC con BCL-2 y/o BCL-6 en casos que resultaron ser doble expresores, por que cabe la posibilidad que el número de linfomas B de alto grado en nuestro servicio sea mayor, por lo que la búsqueda del estado doble hit o triple hit debería ser según el juicio del patólogo, integrando la información clínica del paciente con los resultados de los estudios de inmunohistoquímica, además de que empezar únicamente con la búsqueda del rearrreglo de MYC, es una idea razonable que pudiese reducir los costos. La importancia de reconocer a los linfomas B de alto grado es que estos linfomas con la terapia R-CHOP presentan una respuesta completa es relativamente baja con sobrevida media de 4.5 a 18.5 meses, por lo que se han propuesto terapias de inducción más intensivas. La terapia con dosis ajustada de rituximab más etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida y doxorubicina (R-EPOCH) tiene mayor respuesta completa a comparación de R-CHOP, aun así 20-30% de los pacientes presentan enfermedad primaria refractaria, por lo que es necesario realizar ensayos clínicos con prueba con nueva terapias.

CAPÍTULO IX

9. CONCLUSIONES

Todos los casos de linfomas B de células grandes deberían ser clasificados con el algoritmo de Hans, de esta forma con un panel de CD 10, BCL-6 y MUM-1 todos los casos pueden ser clasificados en nuestro servicio, además, debido a la importancia pronóstica del estado doble expresor, en todos los casos se podría realizar además marcadores de inmunohistoquímica para BCL-2 y MYC.

La búsqueda de los rearrreglos de MYC y BCL-2 y/o BCL-6 podría ser factible en aquellos casos en donde la presentación clínica es agresiva, pudiendo realizar al principio solo la búsqueda del rearrreglo de MYC de esta forma se evita la realización de pruebas de FISH innecesarias.

Los objetivos de este estudio se cumplieron, esta base de datos podría ser utilizada en el futuro para la realización de otras investigaciones.

CAPÍTULO X

10. BIBLIOGRAFÍA

1. - Kanungo A, Medeiros LJ, Abruzzo LV, Lin P. Lymphoid neoplasms associated with concurrent t(14;18) and 8q24/c-MYC translocation generally have a poor prognosis. *Mod Pathol* 2006; 19: 25–33.
- 2.- Ott G, Ziepert M, Klapper W, et al: Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood* 116:4916-4925,2010
- 3.- Snuderl, MD et. Al. B-cell Lymphomas With Concurrent IGH-BCL2 and MYC Rearrangements Are Aggressive Neoplasms With Clinical and Pathologic Features Distinct From Burkitt Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2010. Volumen 3, pags 327-340
4. - Michael J. Kluk,MD et. Al. MYC Immunohistochemistry to Identify MYC-Driven B-Cell Lymphomas in Clinical Practice. *Am J Clin Pathol* February 2016;145:166-179
5. - Shaoying Li et. Al. B-cell lymphomas with MYC/8q24 rearrangements and IGH@BCL2/t(14;18) (q32;q21): an aggressive disease with heterogeneous histology, germinal center B-cell immunophenotype and poor outcome. *Modern Pathology*. (2012) 25 145–156
- 6.- Barrans S, Crouch S, Smith A, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol* 2010;28:3360–3365.
- 7.- Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92:3152–3162.
- 8.- Niitsu N, Okamoto M, Miura I et al. Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations. *Leukemia* 2009;23:777–783.
- 9.- Aukema SM, Siebert R, Schuuring E et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* 2011;117:2319–2331.

- 10.-** Li S, Lin P, Fayad LE et al. B-cell lymphomas with MYC/8q24 rearrangements and IGH@BCL2/t(14;18) (q32;q21): an aggressive disease with heterogeneous histology, germinal center B-cell immunophenotype and poor outcome. *Mod Pathol* 2012;25:145–156.
- 11.-** Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzmänn T et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica* 2013;98:1554–1562.
- 12.-** Tapia G, Lopez R, Muñoz-Mármol AM et al. Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with MYC gene status in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology* 2011;59:672–678.
- 13.-** Green TM, Nielsen O, de Stricker K et al. High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2012;36:612–619.
- 14.-** Johnson NA, Slack GW, Savage KJ et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012;30:3452–3459.
- 15.-** Horn H, Ziepert M, Becher C et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013;121:2253–2263.
- 16.-** Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M et al. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol* 2014;27:958–971.
- 17.-** Mahmoud AZ, George TI, Czuchlewski DR et al. Scoring of MYC protein expression in diffuse large B-cell lymphomas: concordance rate among hematopathologists. *Mod Pathol* 2015;28:545–551.
- 18.-** Chisholm KM, Bangs CD, Bacchi CE et al. Expression profiles of MYC protein and MYC gene rearrangement in lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2015;39:294–303.
- 19.-** Valera A et al. Definition of MYC genetic heteroclonality in diffuse large B-cell lymphoma with 8q24 rearrangement and its impact on protein expression. *Modern Pathology* (2016) 29, 844–853
- 20.-** Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 976–90.

- 21.-** Sarkozy Clémentine, Double-hit and double-protein-expression lymphomas: aggressive and refractory lymphomas. *Lancet Oncol* 2015; 16: e555–567
- 22.-** Landsburg DJ, Nasta SD, Svoboda J, Morrisette JJ, Schuster SJ. 'Double-hit' cytogenetic status may not be predicted by baseline clinicopathological characteristics and is highly associated with overall survival in B cell lymphoma patients. *Br J Haematol* 2014; 166: 369–74.
- 23.-** Zhou K, Xu D, Cao Y, Wang J, Yang Y, Huang M. C-MYC aberrations as prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma: a metaanalysis of epidemiological studies. *PLoS One* 2014; 9: e95020. 42 Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R-CHOP era. *Ann Oncol* 2014; 25: 2124–33.
- 24.-** Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M, et al. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol* 2014; 27: 958–71.
- 25.-** Christine P. Hans, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *BLOOD* 2004; 103: 275-282
- 26.-** Kluin PM, Harris NL, Stein H, et al. B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. In: Swerdlow S, Campo E, Harris NL, eds; *International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue*. Geneva: World Health Organization; 2008:265-266.
- 27.-** Michaux L, Wlodarska I, Theate I, et al. Coexistence of BCL1/CCND1 and CMYC aberrations in blastoid mantle cell lymphoma: a rare finding associated with very poor outcome. *Ann Hematol*. 2004;83(9):578-583.
- 28.-** Steven H. Swerdlow, Diagnosis of 'double hit' diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *American society of Hematology*. 2014;
- 29.-** Foot NJ, Dunn RG, Geoghegan H, Wilkins BS, Neat MJ. Fluorescence in situ hybridisation analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections in the diagnostic work-up of non-Burkitt high grade B-cell non-

Hodgkin's lymphoma: a single centre's experience. *J Clin Pathol*. 2011;64(9):802-808.

30.- Horn H, Ziepert M, Becher C, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013;121(12):2253-2263.

31.- Perry AM, Crockett D, Dave BJ, et al. B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and burkitt lymphoma: study of 39 cases. *Br J Haematol*. 2013;162(1):40- 49.

32.- Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M, et al. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol*. 2014;27(7):958- 971.

33.- Kanagal-Shamanna R, Medeiros LJ, Lu G, et al. High-grade B cell lymphoma, unclassifiable, with blastoid features: an unusual morphological subgroup associated frequently with BCL2 and/or MYC gene rearrangements and a poor prognosis. *Histopathology*. 2012;61(5):945- 954.

34.- Valera A, Lopez-Guillermo A, Cardesa-Salzmänn T, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica*. 2013;98(10):1554-1562.

35.- Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL RituximabCHOP Consortium Program. *Blood*. 2013;121(20):4021-4031.

36.- Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3452-3459.

37.- Green TM, Young KH, Visco C, et al. Immunohistochemical double-hitscore is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3460-3467.

- 38.-** Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009; 114(17):3533-3537.
- 39.-** Copie-Bergman C, Cuillere-Dartigues P, Baia M, et al. MYC translocation partner gene is a predictive factor of survival in diffuse large B-cell lymphomas irrespective of single or double hit MYC gene alterations: a LYSA study [abstract]. *Hematol Oncol*. 2013;31:155.
- 40.-** Barrans S, Crouch S, Smith A, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol*. 2010;28(20): 3360-3365.
- 41.-** Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, et al. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica*. 2013;98(2):255-263.
- 42.-** Lin P, Dickason TJ, Fayad LE, et al. Prognostic value of MYC rearrangement in cases of B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Cancer*. 2012;118(6):1566-1573.
- 43.-** Akyurek N, Uner A, Benekli M, Barista I. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab. *Cancer*. 2012;118(17):4173-4183.
- 44.-** Horn H, Ziepert M, Becher C, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013;121(12):2253-2263
- 45.-** Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M, et al. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol*. 2014;27(7):958- 971
- 46.-** Aukema SM, Kreuz M, Kohler CW, et al. Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma. *Haematologica*. 2014;99(4):726-735

- 47.-** Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, et al. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(3):327-340.
- 48.-** Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, et al. Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations. *Haematologica.* 2009;94(7):935-943.
- 49.-** Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol.* 2012;30(28):3452-3459.
- 50.-** Pillai RK, Sathanoori M, Van Oss SB, Swerdlow SH. Double-hit B-cell lymphomas with BCL6 and MYC translocations are aggressive, frequently extranodal lymphomas distinct from BCL2 double-hit B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(3):323-332.
- 51.-** Mationg-Kalaw E, Tan LH, Tay K, et al. Does the proliferation fraction help identify mature B cell lymphomas with double- and triple-hit translocations? *Histopathology.* 2012;61(6):1214-1218
- 52.-** Pedersen MO, Gang AO, Poulsen TS, et al. Double-hit BCL2/MYC translocations in a consecutive cohort of patients with large B-cell lymphoma - a single centre's experience. *Eur J Haematol.* 2012;89(1):63-71.
- 53.-** Landsburg DJ, Nasta SD, Svoboda J, Morrisette JJ, Schuster SJ. 'Double-hit' cytogenetic status may not be predicted by baseline clinicopathological characteristics and is highly associated with overall survival in B cell lymphoma patients. *Br J Haematol.* 2014;166(3):369-374.
- 54.-** Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R-CHOP era. *Ann Oncol.*
- 55.-** Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol.* 2012;30(28):3452-3459.

- 56.-** Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, et al. MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Br J Haematol*. 2014;165(3):382-391.
- 57.-** Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-
- 58.-** Cook JR, Goldman B, Tubbs RR, et al. Clinical Significance of MYC Expression and/or “High-grade” Morphology in Non-Burkitt, Diffuse Aggressive B-cell Lymphomas: A SWOG S9704 Correlative Study. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(4):494-501
- 59.-** Harrington AM, Olteanu H, Kroft SH, Esho C. The unique immunophenotype of double-hit lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 2011;135(4):649- 650.
- 60.-** Letarte M, Vera S, Tran R, Addis JB, Onizuka RJ, Quackenbush EJ, et al. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med* 1988;168: 1247–53. 2.
- 61.-** Shipp MA, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 1993;82:1052–
- 62.-** Arber DA. CD10: a review. *Appl Immunohistochem* 1997;5: 125–40. 4.
- 63.-** LeBien TW, McCormack RT. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10)—emancipation from a functional enigma. *Blood* 1989;73:625–35
- 64.-** Xu YMR, Kroft SH. Assessment of CD10 in the diagnosis of small B-cell lymphomas: a multiparameter flow cytometric study. *Am J Clin Pathol* 2002;117:291–300.
- 65.-** Xu Y, McKenna RW, Kroft SH. Comparison of immunohistochemistry and flow cytometry with cluster analysis for the detection of CD10. *Mod Pathol*. 2001;14:183A
- 66.-** Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, et al A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res* 2009;15(17):5494-5502.
- 67.-** Nguyen H, Hiscott J, Pitha PM. The growing family of interferon regulatory factors. *Cytok Growth Factor Rev* 1997; 8: 293–312
- 68.-** Mittrucker HW, Matsuyama T, Grossman A, Kundig TM, Potter J, Shahinian A, Wakeham A, Patterson B, Ohashi PS, Mak TW. Requirement

for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 1997; 245: 540-543

69.- Tsuboi K, Iida S, Inagaki H, Kato M, Hayami Y, Hanamura I, Miura K, Harada S, Kikuchi M, Komatsu H, Banno S, Wakita A, Nakamura S, Eimoto T, Ueda R. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia* 2000; 14: 449-456,

70.- Pierre Sesques¹ and Nathalie A. Johnson, Review Article Approach to the diagnosis and treatment of high-grade B-cell lymphomas with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements, *Blood*, 19 January 2017, Volume 129 number 3

71.- Ichiro Kawashima et al, Double-Expressor Lymphoma Is Associated with Poor Outcomes after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation, *Biol Blood Marrow Transplant* 24 (2018) 294-300

72.- Steven H. Swerdlow et. al., WHO Classification of tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4ta edición, International Agency for Research of Cancer Lyon, 2017, Pags 335-340

73.- Hsi ED, Yegappan S. Lymphoma immunophenotyping: a new era in paraffin-section immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol*. 2001;8:218-39

74.- Bilalovic N, Blystad AK, Golouh R, et al. Expression of Bcl-6 and CD10 protein is associated with longer overall survival and time to treatment failure in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2004;121:34-42.

75.- Barrans SL, O'Connor SJM, Evans PAS, et al. Rearrangement of the BCL-6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2002;117:322-32.

76.- Lossos IS, Alizadeh AA, Eisen MB, et al. Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:10209-13.

77.- Berglund M, Thunberg U, Amini RM, et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol*. 2005;18:1113-20.

78.- Colomo L, López-Guillermo A, Perales M, et al. (2003): Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003;101:78-84

- 79.-** Mahmoud, H. M., & El-Sakhawy, Y. N. (2011). Significance of Bcl-2 and Bcl-6 immunostaining in B-Non Hodgkin's lymphoma. Hematology reports, 3(3), e26.
- 80.-** Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. New England Journal of Medicine. 2002;346(25):1937-1947
- 81.-** Steven H. Swerdlow et. al., The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms, Blood, 19 may 2016, volume 127, number 20
- 82.-** Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. Nat Rev Clin Oncol. 2014; 11(1):12-23.
- 83.-** Sietse M. Aukema et, al. , Double-hit B-cell lymphomas, Blood, 24 february 2011, volume 117, number 8
- 84.-** Li, Shaoying et al., Diffuse large B-cell lymphoma Pathology , 2017, Volume 50 , Issue 1 , 74 - 87
- 85.-** Pierre Sesques and Nathalie A. Johnson, Review Article Approach to the diagnosis and treatment of high-grade B-cell lymphomas with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements, Blood, 19 January 2017, Volume 129 number 3
- 86.-** Wang XJ, Medeiros LJ, Lin P, et al. MYC cytogenetic status correlates with expression and has prognostic significance in patients with MYC/ BCL2 protein double-positive diffuse large B-cell lymphoma. Am J Surg Pathol 2015; 39: 1250–8

CAPITULO XI

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Tesis: CLASIFICACIÓN DE LOS LINFOMAS NO HODGKIN DIFUSOS DE CÉLULAS GRANDES B EN BASE AL ALGORITMO DE HANS Y AL ESTADO DE MYC Y BCL-2 POR ESTUDIOS DE IHQ Y FISH

Área de estudio: Anatomía Patológica

Biografía:

Datos personales: Nacido en Chihuahua, Chihuahua el 21 de junio de 1990, hijo de Héctor Manuel Acosta Arzate y Guadalupe Calderón Ochoa

Educación:

Egresado de la Universidad Autónoma de Chihuahua, grado obtenido: Médico Cirujano y Partero