

LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO. FACTORES PRONÓSTICOS: APORTES DE LA ANATOMÍA PATOLÓGICA

Narbaitz M^{1,2}, García-Montenegro M², Metrebian MF¹, Rodríguez A¹, Wannesson B², Sakamoto F³, Negri P⁴, Rivas MM⁵, Venturini C⁶, Pavlovsky M², Fernández I².

¹Academia Nacional de Medicina, ²Fundaleu, ³Grupo Monte Caseros - Paraná, ⁴Instituto Privado de Hematología y Hemoterapia - Paraná, ⁵Hospital Universitario Austral, ⁶Hospital San Martín - Paraná.

Introducción

El linfoma de células del manto (LCM) comprende aproximadamente entre el 5 y 10% de los linfomas no Hodgkin (LNH) (Morton ML et al, 2014; Swerdlow S et al, 2008), con predominio en el sexo masculino y edad media de 60 años. Al diagnóstico suele presentarse en estadio avanzado, buen performance status y sin síntomas B. Es considerado una de las neoplasias linfoides de peor pronóstico (Jares P et al, 2008), cuyo curso clínico se caracteriza por frecuentes recaídas y evolución clínicamente agresiva; sin embargo, se reconoce un amplio espectro de características clínicas, patológicas y biológicas. En los últimos años se han descrito subgrupos con curso clínico más indolente, por lo cual los pacientes podrían beneficiarse de diferentes enfoques terapéuticos (Jares P et al, 2012).

De acuerdo con el libro azul de neoplasias hematológicas de la Organización Mundial de la Salud, el LCM se caracteriza por su citomorfología típica y la presencia de la translocación cromosómica t(11;14)(q13;q32), que yuxtapone el protooncogén ciclina D1 (CCND1, también conocido como BCL1) al gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGH), dando como resultado la sobreexpresión constitutiva de ciclina D1. (Swerdlow S et al, 2008; Swerdlow S et al, 2016)

La mayoría presentan una citomorfología clásica caracterizada por la presencia de células de tamaño pequeño a mediano con contornos nucleares irregulares y nucléolo discreto, mostrando un patrón de crecimiento variable, tipo de la zona del manto, nodular, vagamente nodular o difuso. La citomorfología también puede presentar un espectro variable, que va desde células pequeñas y redondas, monocitoides tipo zona marginal, pleomórficas hasta blastoides, con lo que se puede plantear dificultades en el diagnóstico diferencial como con la leucemia linfocítica crónica, linfoma de la zona marginal, linfoma difuso de células grandes B o proliferaciones blastoides. La variante blastoide y pleomórfica suelen asociarse con una enfermedad más agresiva y un peor pronóstico, pudiendo estar presente al momento del diagnóstico o como progresión histológica durante el curso de la enfermedad (Swerdlow S et al, 2008).

En cuanto al inmunofenotipo, generalmente muestran expresión para IgM, IgD, Bcl2, CD43 y CD5, mientras que CD23, CD10 y Bcl6 son generalmente negativos. Sin embargo, aunque la citomorfología y el fenotipo pueden ser sugestivos de LCM, es mandatorio la confirmación diagnóstica mediante la demostración de la sobreexpresión de ciclina D1 o la presencia de la translocación t(11;14) [Nivel de evidencia III, Grado de recomendación A] (Dreyling M et al, 2013), ya que algunos casos pueden tener morfología y / o fenotipo atípico, como negatividad para CD5 o expresión de CD10, Bcl6, CD23 o Mum1. (Zanetto U et al, 2008; Jares P et al, 2008; Camacho F et al 2004).

En la actualidad, la selección del tratamiento óptimo se basa principalmente en la caracterización mediante factores de riesgo clínicos y biológicos y la carga tumoral (Dreiling et al, 2013). Aunque se han descrito varios marcadores pronósticos de estratificación para LCM, la guía ESMO 2014 de LCM (Dreiling et al, 2014), considera aplicable en la práctica clínica la utilización del Índice pronóstico internacional para linfoma de células del manto (MIPI) (Hoster E et al, 2008; Dreiling M et al, 2013; Dreiling M et al, 2014) y el índice de proliferación tumoral (Dreiling et al, 2013; Hoster E, et al 2016).

Estudios histopatológicos iniciales en LCM reconocieron el índice de proliferación tumoral como el mejor predictor de supervivencia, determinado mediante el índice mitótico o el nivel de expresión del antígeno Ki67. (Argatoff et al, 1997; Tiemann et al, 2005; Katzenberger et al, 2006; Hoster E et al, 2016). Posteriormente mediante estudios de perfil de expresión génica, se identificó una firma de proliferación basada en la sobreexpresión de 20 genes relacionados al ciclo celular, confirmando que el aumento de la proliferación es el mejor predictor biológico de supervivencia caracterizado en paciente con LCM (Rosenwald et al, 2003; Scott D, et al, 2017).

En la actualidad se reconoce que la evaluación del antígeno Ki-67 por inmunohistoquímica es el método mejor aplicable y discriminativo para evaluar el índice de proliferación y es considerado el factor de riesgo biológico mejor establecido en LCM [nivel de evidencia I, Grado de recomendación A], por lo tanto, es recomendable aplicarlo en la rutina clínica para estimar el comportamiento clínico (Dreiling et al, 2014). La principal limitación de este marcador biológico en la práctica diaria, es la falta de reproducibilidad intra e interobservador (De Jong D et al, 2007), para lo cual el Grupo Europeo de LCM ha publicado una guía para evaluación del índice de proliferación en LCM con el objetivo de estandarizar el método (Klapper E et al, 2009).

Otros parámetros de comportamiento biológicos determina en LCM, generalmente relacionados con los mecanismos de proliferación celular, pierden su valor pronóstico independiente en el análisis multivariado en comparación con la firma génica de proliferación (Rosenwald A et al, 2003; Royo C et al, 2011), sugiriendo que la actividad proliferativa representa un integrador común final de diferentes eventos oncogénicos, reforzando su importancia en la aplicación clínica.

Sin embargo, algunas alteraciones moleculares y genéticas mantienen su predicción pronóstica en forma independiente, entre ellos, destacando la inactivación de la vía reguladora ARF/p53 (Hernández et al, 2005). La mutación del gen TP53 localizado en el cromosoma 17p13 se ha descrito en el 14 a 20% de los LCM, asociado con un curso clínico desfavorable (Greiner TC et al, 2006).

La determinación de la sobreexpresión proteica de p53 en cortes histológicos mediante técnicas de inmunohistoquímica puede utilizarse como subrogante de la presencia de mutaciones del gen TP53, ya que dichas mutaciones generan frecuentemente, aunque no siempre, la acumulación aberrante de la proteína p53 disfuncional (Slotta-Huspenina J et al, 2012). Se ha demostrado que la sobreexpresión de p53 con un punto de corte del 20%, se correlaciona con una supervivencia más corta y agrega información pronóstica al MIPI en pacientes tratados con regímenes modernos. Durante la sesión de MCL en el taller de la Asociación Europea de Hematopatología /

Sociedad de Hematopatología en 2014, se concluyó que la inmunohistoquímica para p53 debe considerarse en el estudio de rutina de LCM (Sander B et al, 2016).

Teniendo en cuenta lo expuesto, el objetivo general del presente trabajo se encuentra orientado a la evaluación retrospectiva de las características clinicopatológicas de LCM en pacientes con enfermedad nodal, siendo su objetivo específico:

- Evaluar el rol pronóstico de marcadores de comportamiento biológico como Ki67 y p53, mediante el análisis de su expresión proteica en cortes histológicos por inmunohistoquímica.

Pacientes, materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo de 70 casos de LCM entre el año 2009 y 2017 con seguimiento clínico mayor a 6 meses.

Se seleccionaron muestras fijados en formol e incluidos en parafina de ganglios linfáticos al diagnóstico de la enfermedad. El análisis histopatológico e inmunofenotípico fue reevaluado para su confirmación diagnóstica.

Se calculó el índice de proliferación mediante la determinación inmunohistoquímica de ki67. El cálculo se hizo acorde a las recomendaciones del consenso de evaluación de Ki67 del Grupo Europeo de LCM, utilizando como punto de corte la positividad nuclear del 30%. Se realizó la determinación de la expresión proteica para p53.

De 70 casos seleccionados, 44 fueron evaluables para el análisis de sobrevida por presentar datos clínicos suficientes. El análisis de supervivencia se realizó con el método de Kaplan-Meier y las curvas fueron comparadas con el test de log-rank.

Resultados

En cuanto al análisis demográfico de los casos analizados, el 83% (58/70) fue de sexo masculino con una mediana (Md) de edad de 63 años (37-84).

La distribución topográfica de las muestras diagnósticas resultaron más frecuente en ganglio linfático 77%(54), amígdala 10% (7) y tubo digestivo 7% (5), siendo las restantes cavum y glándula parótida.

En cuanto al análisis histológico, el 84% (59/70) presentó la variante citológica clásica y 16% (11/70) correspondió a la variante blastoide. No se encontró variante de células pequeñas ni pleomórfica. El patrón arquitectural encontrado con mayor frecuencia fue nodular 39% (27), difuso 34% (24) y nodular/difuso 20% (14), encontrándose dos casos con patrón manto (los 3 casos restantes no se pudo evaluar por fragmentación del material).

Según el índice de proliferación, el 41% (29/70) presentó un valor inferior al 30% para la expresión de Ki67 y el 59% (41/70) restante, un valor igual o superior.

En cuanto a la evaluación de la expresión proteica para p53, 2 de los 70 casos presentaron sobreexpresión en casi la totalidad de la proliferación celular (~100%), uno correspondiente a la variante blastoide acompañado por un índice de proliferación con

Ki67 del ~95% y el restante correspondiente a la variante clásica, acompañado por un índice de proliferación con Ki67 menor al 30% y patrón de crecimiento nodular.

Se contaron con datos clínicos suficientes para su análisis en 44 casos, con una Md de seguimiento de 43,5 meses (6-92 meses), de los cuales al diagnóstico 91% (40/44) presentaron estadio IV y 84% (37/44) sin síntomas B. La Md de glóbulos blancos fue de 7.000/mm³ (3.500-26.200) y de LDH fue de 330 UI/L (125-640). El 100% (44/44) recibió tratamiento quimioterápico con esquemas intensivos.

En cuanto al análisis de sobrevida, la mediana (Md) de sobrevida libre de progresión (SLP) de la población general fue de 70 meses. Los casos que mostraron Ki67 mayor o igual al 30% tuvieron una Md de SLP de 41 meses, mientras que aquellos con un Ki67 menor al 30% no alcanzaron la Md de SLP, siendo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.03$).

Si bien no se hizo análisis de sobrevida en relación a la expresión de p53, los dos casos con sobreexpresión para dicho marcador tuvieron una sobrevida libre de progresión de 32 meses en el caso con citomorfología blastoide y 38 meses con citomorfología clásica.

Conclusión

El análisis demográfico de la población mostró un marcado predominio masculino, con una Md de edad y frecuencia de características histopatológicas y clínicas al diagnóstico, coincidente con lo reportado en la bibliografía.

Desde el punto de vista biológico, la sobreexpresión de Ciclina D1 juega un papel importante en la regulación del ciclo celular en la transición de G1 a S, lo que lleva a la inactivación de la proteína del retinoblastoma (pRB) y su efecto supresor sobre la progresión del ciclo celular (Jares P et al, 2008). Por otro lado, estudios genéticos han revelado que el LCM es una de las neoplasias linfoides con mayor nivel de inestabilidad genómica (Salaverria I et al, 2006), identificándose diferentes aberraciones genéticas recurrentes, como pérdidas genómicas en los cromosomas 1p, 8p, 9p (CDKN2A, CDKN2B), 9q, 11q (ATM) y 17p (TP53) y ganancias en 3q, 8q (MYC), 10p (BMI1), 12q (CDK4), 15q y 18q, con implicancias directas en el funcionamiento genes supresores tumorales y oncogenes, dando como resultado una respuesta anómala en los mecanismos de reparación del ADN y una activación descontrolada del ciclo celular. (Fernández et al, 2005; Royo C et al, 2011).

Las diferentes formas para evaluar el índice de proliferación tumoral, sea a través del conteo mitótico, porcentaje de expresión de MKI67 (Ki-67), firma de expresión génica proliferativa u otros marcadores relacionados con la proliferación, han revelado su valor pronóstico en pacientes con LCM (Jares P et al, 2008).

En nuestro estudio la determinación del índice de proliferación mediante la expresión de Ki67, dicotomizado en un punto de corte del 30%, mostró que el 41% (29/70) de los casos presentó un valor inferior y el 59% (41/70) restante un valor igual o superior, cuyo análisis de SLP arrojó resultados estadísticamente significativos, resultando menor en el grupo con Ki67 mayor o igual a 30%, reforzando la importancia del valor pronóstico del índice de proliferación al diagnóstico en pacientes con LCM.

Por otro lado, es importante destacar que las mutaciones TP53 pueden estar presentes en casos con citomorfología clásica y en casos con bajo índice de proliferación (Halldorsdottir AM et al, 2011), aunque se describe más frecuentemente su asociación con la citomorfología blastoide y alto índice de proliferación (Greiner TC et al, 1996; Hernández L et al, 1996).

En cuanto al análisis de SLP en relación a las características citomorfológicas y de expresión para p53, no se obtuvieron resultados significativos, teniendo en cuenta que de los 44 pacientes con datos clínicos evaluables, solo 4 (9%) correspondieron a la variante blastoide y 2 (5%) mostraron sobreexpresión para p53, no siendo número de casos suficientes para un análisis representativo de la población.

Es de destacar que todos los casos con citomorfología blastoide presentaron un índice de proliferación cercano al 90% y que los dos casos con sobreexpresión para p53 tuvieron una SLP baja (32 y 38 meses), cercana a la Md de SLP del grupo con Ki67 alto, resaltando que uno de los casos presentó citomorfología clásica con índice de proliferación bajo, confirmando la independencia pronóstica de la expresión proteica aberrante de p53.

En conclusión, del análisis de este estudio resaltamos el valor pronóstico del índice de proliferación Ki67 al diagnóstico, como método relativamente sencillo, rápido, costo-efectivo y de utilidad en la práctica clínica para predecir el comportamiento de la enfermedad y la importancia de evaluar las alteraciones del gen P53 mediante métodos alternativos y complementarios de su función biológica como es la expresión proteica en cortes histológicos mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Bibliografía

- Argatoff, L.H., Connors, J.M., Klasa, R.J., Horsman, D.E. & Gascoyne, R.D. (1997) Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*, 89, 2067–2078.
- Camacho F., Garcia J, Cigudosa J, Mollejo M, Algara P, Ruiz-Ballesteros E, Gonzalvo P, Martin P, Perez-Seoane C, Sanchez-Garcia J & Piris, M A. Aberrant Bcl6 protein expression in mantle cell lymphoma. *American Journal of Surgical Pathology* 2004; 28, 1051–1056.
- De Jong D., Rosenwald A., Chhanabhai M., Gaulard P., Klapper W., Lee A., Sander B., Thorns C., Campo E., Molina T., Norton A., Hagenbeek A., Horning S., Lister A., Raemaekers J., Gascoyne R.D., Salles G. & Weller E. (2007) Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications—a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Journal of Clinical Oncology*, 25, 805–812.
- Dreyling M, Geisler C H, O. Hermine O, Kluin-Nelemans J, Le Gouill S, Rule S, Shpilberg O, Walewski J & Ladetto M on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2014; 25, 83–92.
- Dreyling M, Geisler C, Hermine O, Kluin-Nelemans HC, Le Gouill S, Rule S, Shpilberg O, Walewski J, Ladetto M; ESMO Guidelines Working Group. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014; 25, 83-92.
- Dreyling M, Thieblemont C, Gallamini A, Arcaini L, Campo E, Hermine O, Kluin-Nelemans J, Ladetto M, Le Gouill S, Iannitto E, Pileri A, Rodriguez J, Schmitz N, Wotherspoon A, Zinzani P & Zucca E. ESMO Consensus conferences: guidelines on malignant lymphoma. part 2: marginal zone lymphoma, mantle cell lymphoma, peripheral T-cell lymphoma. *Annals of Oncology* 2013; 24, 857–877.

- Greiner TC, Dasgupta C, Ho VV, Weisenburger DD, Smith LM, Lynch JC et al. Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2352–2357.
- Hernandez L., Bea S., Pinyol M., Ott G., Katzenberger T., Rosenwald A., Bosch F., Lopez-Guillermo A., Delabie J., Colomer D., Montserrat E. & Campo, E. (2005) CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Research*, 65, 2199–2206.
- Hoster E, Dreyling M, Klapper W et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 2008; 111:558–565.
- Jares P, Campo E. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008; 142, 149-165.
- Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest.* 2012;122:3416- 3423.
- Katzenberger T., Petzoldt C., Holler S., Mader U., Kalla J., Adam P., Ott M.M., Muller-Hermelink H.K., Rosenwald A. & Ott G. (2006) The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood*, 107, 3407.
- Klapper W, Hoster E, Determann O et al. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop* 2009; 2: 103–111.
- Morton LM, Sampson JN, Cerhan JR, Turner JJ, Vajdic CM, Wang SS, Smedby KE, de Sanjose S, Monnereau A, Benavente Y, Bracci PM, Chiu BC, Skibola CF, Zhang Y, Mbulaiteye SM, Spriggs M, Robinson D, Norman AD, Kane EV, Spinelli JJ, Kelly JL, La Vecchia C, Dal Maso L, Maynadie M, Kadin ME, Cocco P, Costantini AS, Clarke CA, Roman E, Miligi L, Colt JS, Berndt SI, Mannetje A, de Roos AJ, Krickler A, Nieters A, Franceschi S, Melbye M, Boffetta P, Clavel J, Linet MS, Weisenburger DD, Slager SL. Rationale and design of the international lymphoma epidemiology consortium (InterLymph) non-Hodgkin lymphoma subtypes project. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2014; 44, 807-809.
- Scott D, et al. New Molecular Assay for the Proliferation Signature in Mantle Cell Lymphoma Applicable to Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Biopsies. *J Clin Oncol* 2017; 35:
- Rosenwald A, Wright G, Wiestner A et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003; 3: 185–197
- Royo C, Salaverria I, Hartmann E et al. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2011; 21:322–334.
- Sander B, Quintanilla-Martinez L, Ott G, Xerri L, Kuzu I, Chan JK, Swerdlow SH, Campo E. Mantle cell lymphoma--a spectrum from indolent to aggressive disease. *Virchows Arch.* 2016; 468, 245-257.
- Slota-Huspenina J., Koch I., De Leval L., Keller G., Klier M., Bink K., Kremer M., Raffeld M., Fend F. & Quintanilla-Martinez, L. The impact of cyclin D1 mRNA isoforms, morphology and p53 in mantle cell lymphoma: p53 alterations and blastoid morphology are strong predictors of a high proliferation index. *Haematologica* 2012, 97, 1422–1430.
- Swerdlow S, Campo E, Harris NE, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC press, Lyon 2008.
- Swerdlow S, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016 19; 2375-2390.
- Tiemann M., Schrader C., Klapper, W., Dreyling M.H., Campo E., Norton A., Berger F., Kluin P., Ott G., Pileri S., Pedrinis E., Feller A.C., Merz H., Janssen D., Hansmann M.L., Krieken H., Moller P., Stein H., Unterhalt M., Hiddemann W. & Parwaresch R. (2005) Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *British Journal of Haematology*, 131, 29–38
- Zanetto U, Dong H, Huang Y et al. Mantle cell lymphoma with aberrant expression of CD10. *Histopathology* 2008; 53, 20–29.