



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Genética, Antropología Física y
Fisiología Animal.

Tesis Doctoral

Nuevos marcadores pronósticos en el Linfoma
Difuso de Célula Grande B Gástrico: expresión de
proteínas y metilación de promotores

Maialen Martin Arruti

Leioa, junio 2010



A mi familia

A Borja

*Rabia, es la sangre que hierve por conseguir
las metas de nuestras imaginación.*

*Rabia, es contrario a desidia y derrota,
es la puerta que no se debe cerrar.*

Reincidentes

AGRADECIMIENTOS

Quisiera aprovechar estas primeras páginas para dar las gracias a todas las personas que me han ayudado tanto en lo profesional como en lo personal y sin las cuales este proyecto no hubiese sido posible.

En primer lugar, a África García-Orad, por la dirección de la tesis, por haberme dado la oportunidad de aprender tantas cosas y haber confiado en mí desde el principio.

Al Dr. Manuel Vaquero, por haberme introducido en este mundo y haberme ayudado con toda la parte anatomopatológica de este trabajo.

Muchas gracias a los Doctores Ramón Díaz de Otazu, del Hospital Txagorritxu e Iñaki Zabalza, del Hospital Galdakao, por haber colaborado en la recogida de casos y haberme facilitado los datos clínicos de los pacientes.

En el Hospital Donostia, tengo mucha gente a la que darle las gracias. A Carmen Lobo, por haberme ayudado en la última parte de esta tesis. A Irune Ruiz, gracias por dejarme utilizar el servicio de Anatomía Patológica como laboratorio para la última parte del proyecto y por confiar en mí. A las hematólogas Izaskun Urbieta, por ayudarme en la difícil tarea de recopilar los datos clínicos de los pacientes y María Jesús Vidal, por aclarar mis dudas. También gracias a los técnicos de Anatomía Patológica, por haberme enseñado tantas cosas que me han sido útiles tanto para este proyecto como para mi trabajo actual. Por último, gracias a todos los que habéis pasado las tardes aquí conmigo y que me habéis escuchado y apoyado para que esta última fase fuese menos dura, a Erika Otazu, Nathalia Garrido, Mikel Azkue, Mikel Larzabal, Noelia Rojas, Juan Carlos Saenz y Mary Silva.

Le estoy muy agradecida al Dr. Javier Ballesteros, que tanto me ha enseñado y ayudado con la parte estadística de esta tesis.

Gracias a las Dras. Paz Arizti e Idoia Martín por su inestimable colaboración en la corrección de esta tesis.

Como no, muchas gracias a mis compañeras de laboratorio durante estos años, por haberme enseñado tanto y haberme ayudado tanto en lo profesional como en lo personal: Idoia, Elena, Espe, Maite, Elixabet, Nora, Irene, Aitor, Ángela, Cristina y Silvia. Muchas gracias a todos.

A todos los miembros del Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal y al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina, por su ayuda en la experimentación del día a día.

A mis amigos, por haberme escuchado y animado cuando lo necesitaba, a pesar de que no entendiesen muy bien lo que hacía y por qué. Eskerrik asko nire ondoan egoteagatik naiz eta ni zuengandik aldendu (gracias por estar a mi lado, aunque yo me haya alejado de vosotros). Gracias sobre todo a Saioa, te prometí una gran cena y la tendrás.

Por supuesto, muchas gracias a mis padres, por apoyarme siempre en la carrera profesional que yo he elegido y aguantarme en estos años de tesis. También al resto de mi familia.

Y por supuesto, un millón de gracias a Borja, por estar siempre ahí, aguantarme, ayudarme, escucharme, la mayoría de veces sin entenderme demasiado y sin el que no hubiese podido llegar al punto final de esta tesis.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
API2	Inhibidor de apoptosis 2
ATM	Mutación de ataxia telangiectasia
AZA	Azacitidine
β2-MG	beta-2-microglobulina
Bcl-2	Proteína 2 del linfoma de célula B
Bcl-6	Proteína 6 del linfoma de célula B
BLIMP-1	Proteína 1 de maduración inducida en linfocitos B
BMP-6	Proteína 6 morfogenética del hueso
CBA	Célula B activada
CD10	Ciclina D10
CD20	Ciclina D20
CD5	Ciclina D5
CDH1	Cadherina 1
CDK6	Ciclina D6
CEOP	ciclofosfamida, epirubicina, vincristina, prednisona
CG	Centro germinal
CHOP	Ciclofosfamida, oncovina, prednisona, doxorubicina
CIMP	Fenotipo metilador
CNOP	Ciclofosfamida, mitoxantrona, prednisona, vincristina
CpG	Citosina fosfato guanina
DAC	Decitabine
DAB	Diaminobencidina
DAP-k	Proteína quinasa asociada a apoptosis
DLBCL	Linfoma difuso de célula grande B
DNMT	DNA metiltransferasa
dNTPs	Deoxinucleotido trifosfatos
DPL	Diseño y puesta a punto en nuestro laboratorio
EDTA	Ácido ethyleno-diamino-tetracético
EtOH	Etanol
Ext	Extranodal
FHIT	Fragile histidine triad
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
Gast	Gástrico
Gcet1	Transcripto 1 expresado en células B del centro germinal
Gint	Gastrointestinal

Abreviaturas

<i>GSTP1</i>	Glutathiona-S-transferasa P1
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H₂O_{bd}	H ₂ O bidestilada
HCl	Ácido clorídrico
<i>hMLH1</i>	mutL homólogo 1
<i>ID4</i>	Inhibidor de unión a ADN 4
IGV	Cadena variable de inmunoglobulinas
IHQ	Inmunohistoquímica
IPI	Índice pronóstico internacional
K₂HPO₄	Fosfato monoácido de potasio
Kb	Kilobases
KCl	Cloruro potásico
LDH	Lactato dehidrogenasa
LLA	Leucemia linfática aguda
LNH	Linfoma no-Hodgkin
MALT	Tejido linfoide asociado a la mucosa
<i>MALT1</i>	Translocación 1 del linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa
mARN	ARN mensajero
MgCl₂	Cloruro de magnesio
<i>MGMT</i>	O ⁶ -metilguanina ADN metiltransferasa
miARN	Micro ARN
MSP	Reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación
MUM1/IRF4	Múltiple mieloma-1/interferon regulatory factor-4
N.A.	No asociación
N.D.	No determinado
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio
NaAc	Acetato sódico
NaCl	Cloruro sódico
NaOH	Sodio hidróxido
NF-κB	Factor nuclear κB
NK	Natural killer
Nod	Nodal
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>p15INK4</i>	Inhibidor de quinasa ciclina-dependiente p15
<i>p16INK4</i>	Inhibidor de quinasa ciclina-dependiente p16
<i>p53</i>	Proteína tumoral 53
<i>p57</i>	Proteína tumoral 57
<i>p73</i>	Proteína tumoral 73
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfator salino

Abreviaturas

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PSA	Persulfato amónico
QT	Quimioterapia
R-QT	Rituximab + Quimioterapia
RT	Radioterapia
S.E.	Sin especificar
SAM	S-adenosilmetionina
SG	Supervivencia global
sIg	Inmunoglobulina soluble
SLF	Supervivencia libre de fallo
SSA	Antígeno específico de especie
Sssl	Metiltransferasa
T°	Temperatura
TNF	factor de necrosis tumoral
TBE	Tampón Tris/Bórico/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
V(D)J	variable (diversity) joining
VHL	Gen Von Hippel-Lindau

ÍNDICE

<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
Linfoma difuso de célula grande B (DLBCL)	3
Definición	3
DLBCL gástrico	10
Marcadores pronósticos actuales en el DLBCL gástrico	15
Parámetros clínicos.....	15
Perfil de expresión genético	16
Expresión de proteínas	18
Metilación de promotores.....	31
Metilación de ADN en la oncogénesis	31
Metilación de los promotores en tejido gástrico e implicación de <i>H. pylori</i>	34
Valor pronóstico de la metilación de promotores.....	36
<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i>	<i>49</i>
Hipótesis.....	51
Objetivos	52
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	<i>53</i>
Población de estudio.....	55

Índice

Detección de la t(11;18)(q21;q21)	58
Detección de proteínas	63
Análisis de metilación de promotores.....	66
Detección de <i>Helicobacter pylori</i>	73
Detección por visualización al microscopio	73
Detección por nested-PCR.....	74
Análisis estadísticos.....	77
Procesado de muestras. Protocolos.....	78
Extracción de ADN genómico	78
Cuantificación y análisis de calidad del ADN	79
Tratamiento de ADN con bisulfito sódico.....	83
Metilación del ADN	85
Reactivos	87
<u>RESULTADOS</u>	<u>91</u>
Correlación entre los parámetros clínicos y el pronóstico	93
Sexo y edad al diagnóstico	94
Niveles de LDH y β 2-MG en el suero	95
Afectación ganglionar por el linfoma.....	97
Infiltración de la médula ósea.....	97
Tratamiento.....	98

La translocación t(11;18) en los DLBCL gástricos y el pronóstico	99
Detección de proteínas y su asociación con el pronóstico.....	100
Algoritmos inmunohistoquímicos	100
Valor predictivo de las proteínas CD10, Bcl-6, Gcet1, MUM-1, Bcl-2 y BLIMP-1.....	103
Metilación de promotores.....	110
Implicación de la metilación de promotores en la oncogénesis del DLBCL gástrico	111
Implicación de <i>H. pylori</i> en la metilación de promotores	116
Metilación de promotores en el DLBCL gástrico y asociación con el pronóstico	123
<u>DISCUSIÓN</u>	135
Asociación pronóstica de parámetros clínicos y tratamiento.....	138
Presencia de la t(11;18) en los DLBCL gástricos	142
Asociación pronóstica de la expresión de proteínas.....	145
Metilación de promotores.....	151
<u>CONCLUSIONES</u>	161
<u>REFERENCIAS</u>	163

INTRODUCCIÓN

LINFOMA DIFUSO DE CÉLULA GRANDE B (DLBCL)

DEFINICIÓN

Las **neoplasias linfoides** son el sexto grupo más frecuente de neoplasias¹ y constituyen un conjunto heterogéneo de tumores del sistema linfático derivados de células en diferentes estadios de diferenciación. Además de sus distintos orígenes celulares, se caracterizan por diferencias en su evolución clínica, factores de riesgo y su pronóstico².

En las últimas décadas, la clasificación de las neoplasias linfoides ha tenido grandes cambios debido a los avances en biología molecular, genética e inmunología³⁻⁵. En el año 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujo una nueva clasificación basada en los criterios REAL (Revised European-America Lymphoma) y FAB (French-America-British), estableciendo un consenso para todas las neoplasias hematopoiéticas⁶. La OMS² divide las neoplasias linfoides en función de la línea celular de la que proceden mediante su inmunofenotipo. Se han reconocido tres categorías principales: neoplasias de células B, de células T/NK y linfomas de Hodgkin. Dentro de la categoría de células B y T/NK, se han reconocido dos grupos principales: neoplasias precursoras, que corresponden a los estadios más tempranos de diferenciación, y neoplasias periféricas o maduras, que corresponden a estadios más diferenciados.

Las neoplasias de células B maduras representan el 85% de todos los linfomas no-Hodgkin (LNH). Son más frecuentes en países desarrollados, con índices altos en Australia y Norteamérica, intermedios en Europa (excepto Europa Occidental) e Islas Pacíficas y relativamente bajos en Asia y Europa Occidental⁷. Los subtipos más frecuentes son el linfoma folicular (LF) y el linfoma difuso de célula grande B (DLBCL)².

Introducción

El **DLBCL** representa el 30-40% de todos los linfomas de tipo B⁸. Este linfoma se produce sobre todo en adultos, con una edad media de alrededor de 70 años, aunque también se puede ver en adultos jóvenes e incluso en niños⁹ y suele ser más frecuente en hombres que en mujeres¹⁰.

El DLBCL se define como una “proliferación difusa de linfocitos B neoplásicos grandes, con un tamaño nuclear igual o mayor al de un macrófago normal o más de dos veces el tamaño de un linfocito normal”⁹ (figura 1).

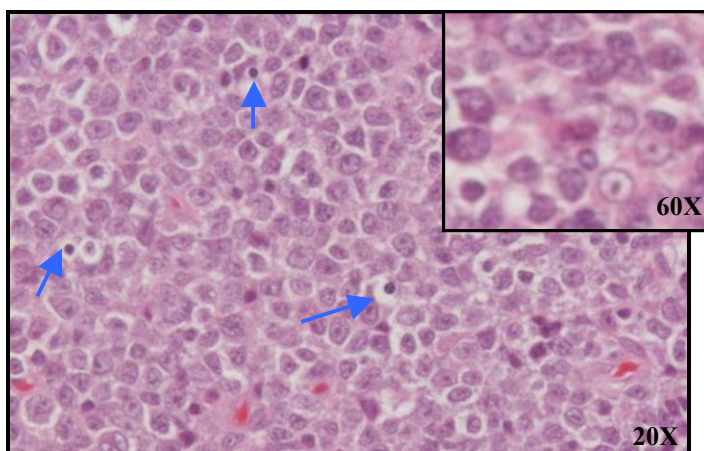


Figura 1: Fotografía de DLBCL (aumento 20X). En la imagen, se puede apreciar algún linfocito normal (señalado con flecha) y una proliferación de células B grandes. Detalle a mayor aumento (60X) de las células neoplásicas.

El DLBCL es morfológicamente muy diverso y se puede dividir en variantes comunes y raras. Se han descrito tres variantes comunes principales: la centroblastica, la inmunoblástica y la anaplásica² (figura 2). Dentro de estas tres variantes, la más común es la centroblastica (figura 2A), con abundancia de centroblastos, que son células linfoides de tamaño mediano o grande, con forma oval o redondeada, un núcleo vesicular con abundante cromatina y de dos a cuatro nucleolos marginales adyacentes a la membrana nuclear. El citoplasma es

usualmente escaso. En algunos casos, el tumor es monomórfico, compuesto por centroblastos (> 90%). Sin embargo, en la mayoría de los casos es polimórfico, con mezcla de centroblastos e inmunoblastos.

En la variante inmunoblástica (figura 2B), más del 90% de las células son inmunoblastos, con un único nucleolo localizado en el centro y una cantidad apreciable de citoplasma. También puede haber inmunoblastos con diferenciación plasmacitoide.

Por último, la variante anaplásica (figura 2C) se caracteriza por células ovales o poligonales de tamaño muy grande, con núcleos pleomórficos y algunas de ellas pueden parecerse a células de Hodgkin o Reed-Stenberg. Las células pueden presentar un patrón de crecimiento sinusoidal y/o cohesivo y pueden imitar al carcinoma indiferenciado.

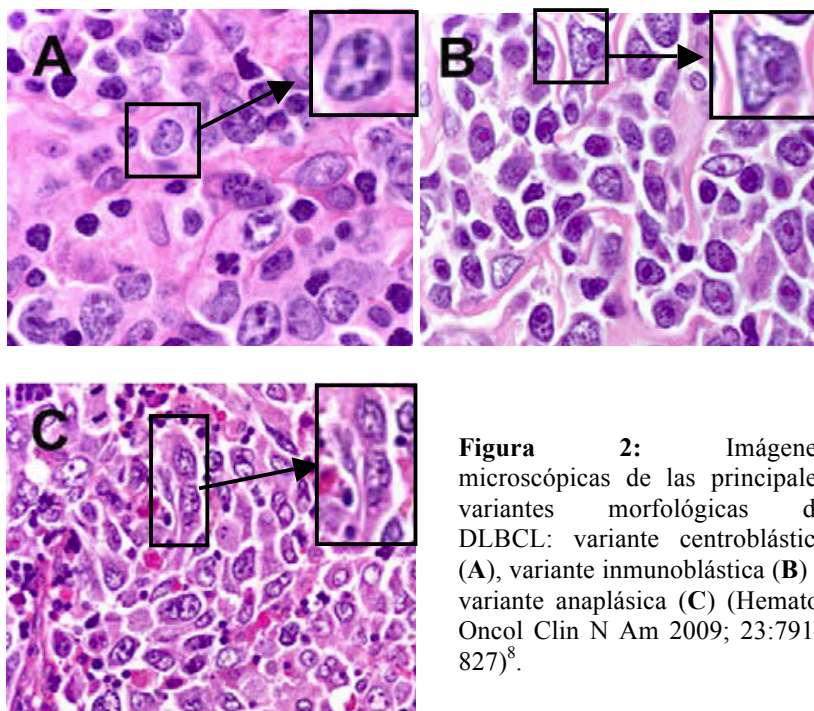


Figura 2: Imágenes microscópicas de las principales variantes morfológicas de DLBCL: variante centroblástica (A), variante inmunoblástica (B) y variante anaplásica (C) (Hematol Oncol Clin N Am 2009; 23:791–827)⁸.

Introducción

El DLBCL es, por lo tanto, un tumor muy heterogéneo en apariencia morfológica, así como en cuanto a otras características clinicopatológicas¹⁰. El inmunofenotipo de estos linfomas es variable (por ejemplo, proteínas como CD10, Bcl-6 o Bcl-2 pueden expresarse o no). Esta diferencia se debe a que los DLBCL pueden originarse de linfocitos B en diferentes estadios de diferenciación: algunos se originan de linfocitos del centro germinal (CG) y otros de células B post-CG² (figura 3). También las alteraciones genéticas son variables, no habiendo una alteración que tipifique el DLBCL. Las mutaciones somáticas afectan a múltiples genes, como *PIMI*, *MYC*, *RHOH/TTF (ARHH)* y *PAX5*, que se encuentran en más del 50% de los casos y pueden contribuir en la oncogénesis. La translocación más frecuente se da en la región 3q27, involucrando al gen *BCL6*. La translocación del gen *BCL2* (por ejemplo, t(14;18)) se ve en el 20-30% de los casos y la de *MYC* en menos del 10% de los casos². También el pronóstico es variable, ya que el 60-70% de los pacientes sobreviven, pero el 30-40% fallecen antes de 5 años. Esta heterogeneidad ha llevado a numerosos investigadores a estudiar la biología de los DLBCL, centrándose en el lugar donde se originan y desarrollan¹⁰. Algunos trabajos realizados en este ámbito han propuesto que esta heterogeneidad podría ser en parte debida a la localización anatómica del linfoma¹¹.

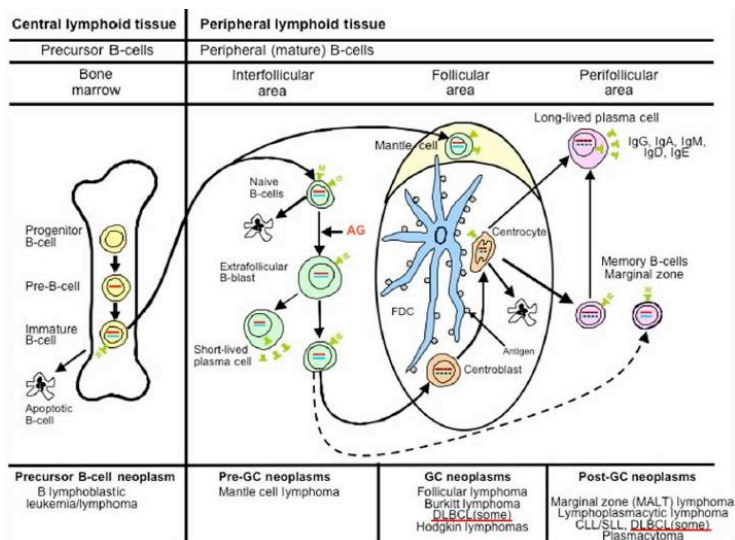


Figura 3: Diagrama representativo de la diferenciación de células B en relación a las más frecuentes neoplasias de estas células. Algunos DLBCLs se generan de las células B del CG, mientras que otros se generan de las células plasmáticas post-CG (Lyon: IARC; 2008)².

Los DLBCL, normalmente, se generan en los ganglios linfáticos, pero pueden tener una localización extranodal aproximadamente en el 40% de los casos (figura 4), siendo la localización más frecuente el tracto gastrointestinal (estómago y zona ileocecal)².

Introducción

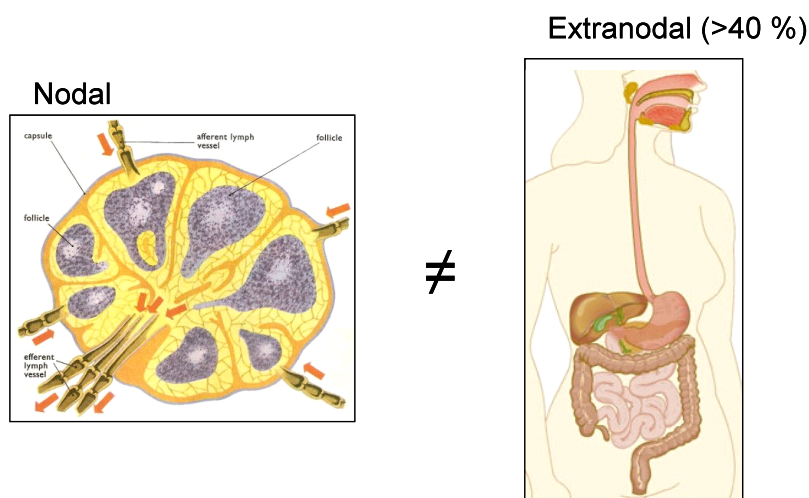


Figura 4: Localizaciones donde se puede dar el DLBCL, nodal o extranodal.

Se han descrito diferencias clinicopatológicas entre DLBCL nodales y extranodales. Moller y cols.¹² observaron que en los casos en estadio I los extranodales tenían peor pronóstico y en los de estadio IV la supervivencia era mayor que la de los casos nodales. Además de estas diferencias clínicas, Jehan y cols.¹³ describieron diferencias en el perfil de expresión de genes entre casos nodales y extranodales. Tras analizar 19 casos nodales y 8 extranodales mediante matrices de expresión, detectaron 218 genes desigualmente expresados entre los dos grupos. También se han descrito diferencias entre distintas localizaciones extranodales. López-Guillermo y cols.¹⁴ analizaron diferencias clinicopatológicas en un total de 382 casos según su localización, observando que en los casos extranodales, específicamente en los del tracto gastrointestinal, la expresión de Bcl-6 era más frecuente. Los casos localizados en el anillo de Waldeyer y el tracto gastrointestinal se presentaban con estadio temprano, sin infiltración de la médula ósea, nivel de LDH normal y un IPI (índice pronóstico internacional) bajo o intermedio/bajo, además de presentar una mejor supervivencia que los pacientes con DLBCL nodal o de otras localizaciones extranodales (figura 5). Por

otro lado, Connor y cols.¹⁵ analizaron la expresión de CD10, Bcl-6, MUM-1, Bcl-2 y p53 en 15 DLBCL gástricos y 14 intestinales y describieron diferencias inmunofenotípicas entre estas dos localizaciones extranodales.

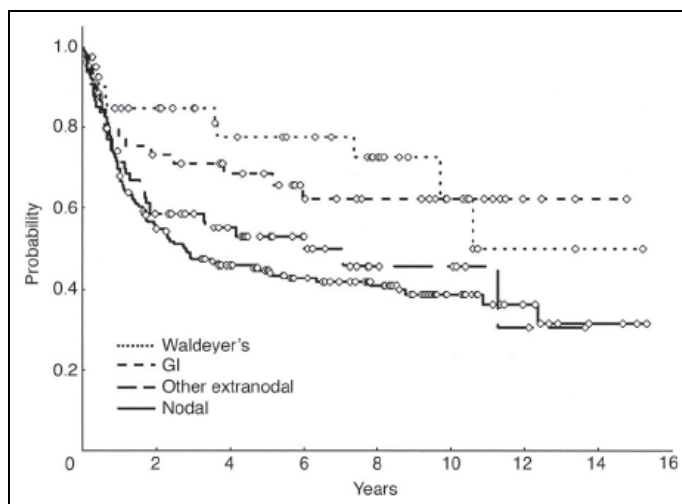


Figura 5: Supervivencia global de 382 pacientes con DLBCL según su localización (anillo de Waldeyer, tracto gastrointestinal (GI), otros sitios extranodales o nodales) (J Clin Oncol 2005; 23:2797-804)¹⁴.

Las diferencias clinicopatológicas y pronósticas observadas en el DLBCL parecen ser en parte determinadas por su localización¹⁴. Entre los DLBCL extranodales, una de las localizaciones más frecuentes es el estómago².

DLBCL GÁSTRICO

El DLBCL gástrico representa el 40-70% de los linfomas gástricos. Se produce, al igual que los nodales, más frecuentemente en hombres y la edad media de presentación es entre 50 y 60 años. Su presentación clínica es similar a la del cáncer gástrico, siendo los síntomas más frecuentes dolor epigástrico, dispepsia y pérdida de peso¹⁶.

Histológicamente, el DLBCL gástrico está compuesto por células grandes, con un núcleo vesicular y un nucleolo prominente, un citoplasma basofílico y un índice de proliferación de moderado a alto. Las lesiones se caracterizan por una intensa infiltración de linfocitos neoplásicos en la lámina propia gástrica. En la mayoría de los casos, las células predominantes son centroblastos o inmunoblastos, siendo lo más frecuente una mezcla de ambas¹⁷ (figura 6).

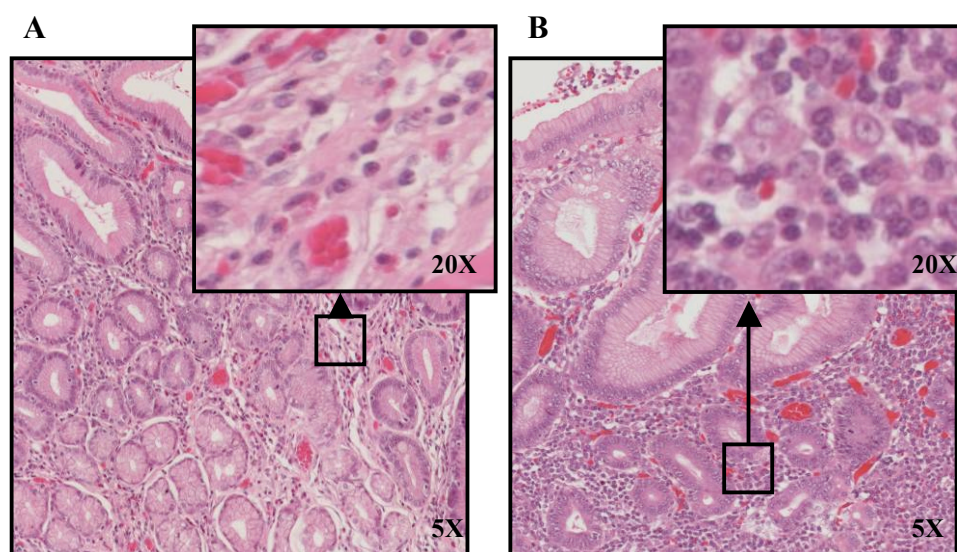


Figura 6: Imagen microscópica de mucosa gástrica sana (A) y DLBCL gástrico (B) (5X), y detalles a mayor aumento (20X).

La etiología de los DLBCL gástricos es aún desconocida. Normalmente, suelen ser tumores *de novo*, pero también pueden ser una progresión o transformación de otros linfomas menos agresivos, como el linfoma MALT (linfoma del tejido linfoide asociado a las mucosas). De hecho, algunos DLBCL aparecen con linfoma MALT asociado².

En el caso de los linfomas MALT gástricos, está aceptado que la mayoría de los casos se generan debido a la infección por la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), ya que el 90% de los casos presentan infección¹⁶. En los DLBCL gástricos, a pesar de que la bacteria también se encuentra en el 35% de los casos, su papel en la evolución del tumor es discutido¹⁷.

Otra causa etiológica del linfoma MALT es la t(11;18)(q21;q21), que aparece en el 30% de los casos (figura 7A)¹⁶. Esta translocación produce la proteína de fusión API2-MALT1, que es capaz de activar la vía de NF-κB¹⁸ (figura 7B), la cual tiene un papel importante en la respuesta inmune, inflamatoria y apoptótica y es esencial para la supervivencia y activación de los linfocitos. La activación constitutiva de NF-κB parece ser determinante en la patogénesis de los linfomas MALT¹⁹.

Introducción

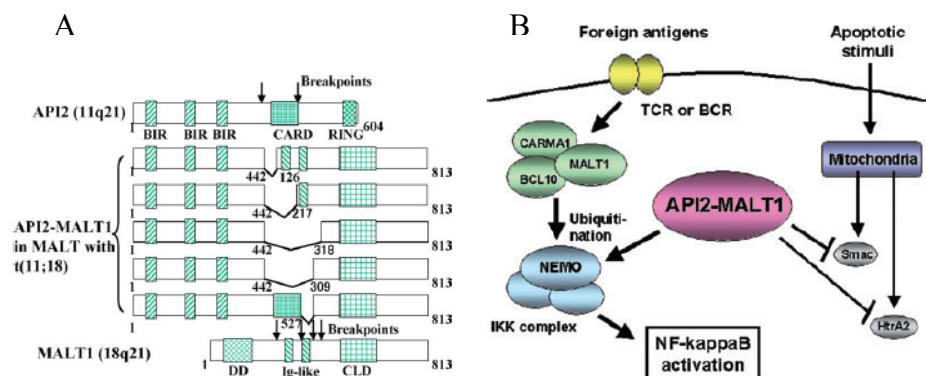


Figura 7: **A:** Representación esquemática de las diferentes variantes de la proteína de fusión API2-MALT1 según los puntos de rotura que dan lugar a la t(11;18) (Apoptosis 2005; 10:25–34)¹⁹. **B:** Mecanismo del efecto antiapoptótico de la proteína de fusión API2-MALT1. La estimulación del receptor de células T (TCR) o B (BCR) promueve la oligomerización de CARMA1, BCL10 y MALT1; este complejo induce la ubiquitinación de NEMO y la activación de NF- κ B, que conlleva a la acción antiapoptótica. La proteína API2-MALT1 también puede ejercer este efecto antiapoptótico mediante la inhibición de los reguladores de apoptosis mitocondrial, como Smac y HtrA2. (Pathol Int. 2007; 57(8):474-84)²⁰.

Hasta hace poco se proponía que los linfomas MALT gástricos con la t(11;18) no progresaban a DLBCL gástrico, ya que la alteración no se encontraba en estos linfomas²¹⁻²⁵. Por lo tanto, la presencia de la t(11;18) podía considerarse como un factor de no progresión a alto grado en los linfomas MALT. Sin embargo, trabajos recientes han encontrado esta translocación en el 14-19% de los DLBCL gástricos, lo que indicaría que los MALT gástricos con la alteración cromosómica también pueden progresar a DLBCL gástricos²⁶⁻²⁷ (figura 8) y cuestionaría la utilización de esta translocación como marcador de buen pronóstico.

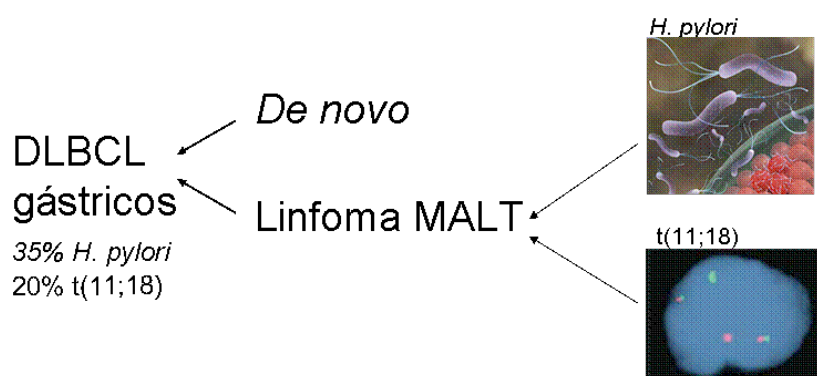


Figura 8: Esquema de la posible etiología del DLBCL gástrico.

TRATAMIENTO

Hoy en día, el tratamiento de los DLBCL gástricos aún no está bien definido²⁸. Hasta hace poco, la primera línea de tratamiento consistía en una gastrectomía (extirpación quirúrgica del estómago), pero en los últimos años esta práctica se ha ido eliminando, a pesar de que su papel en la evolución del paciente es controvertido. Algunos estudios sugieren que esta cirugía mejora la supervivencia y previene complicaciones como la perforación, la obstrucción y la hemorragia²⁹⁻³⁰. Sin embargo, otros estudios retrospectivos sugieren que un tratamiento conservador sin cirugía tiene los mismos o mejores resultados que la gastrectomía^{28,31}.

Actualmente, el tratamiento de los DLBCL, independientemente de su localización, suele consistir en quimioterapia basada en antraciclinas: epirubicina, o adriamicina o mitoxantrone combinado con ciclofosfamida, vincristina y prednisona (regímenes CHOP, CEOP o CNOP). Este cóctel quimioterápico puede estar combinado con Rituximab¹⁶, un anticuerpo monoclonal que reconoce las moléculas CD20 de los linfocitos y mejora notablemente la supervivencia de los LNH de células B³². Aunque el efecto de la

Introducción

incorporación de Rituximab a la quimioterapia no ha sido probado en un ensayo clínico con un gran número de pacientes con DLBCL gástrico, Rituximab se añade debido a su probado beneficio terapéutico en el DLBCL nodal¹⁶. Recientemente, un trabajo con 75 DLBCL gástricos ha comprobado que Rituximab también mejora la supervivencia en estos linfomas³³.

En los últimos años, se ha propuesto que los DLBCL gástricos con presencia de *H. pylori* podrían tratarse con antibióticos para la erradicación de la bacteria. Esta terapia es el tratamiento inicial de los pacientes con linfoma MALT infectados por *H. pylori* y que no presentan la t(11;18). Los antibióticos, al erradicar la bacteria, interrumpen el estímulo inflamatorio que favorece el crecimiento del tumor. Esta terapia tiene como resultado la remisión completa del linfoma MALT en el 70% de los pacientes, en un tiempo variable desde muy pocos meses hasta más de 12 meses³⁴. Aunque hasta hace poco se pensaba que los DLBCL gástricos eran independientes del estímulo por *H. pylori*, recientemente se ha propuesto que el DLBCL gástrico infectado por la bacteria también puede ser dependiente de ésta, observándose casos de remisión completa del linfoma con terapia antibiótica, no solo en pacientes con DLBCL gástrico con MALT asociado, sino también en pacientes sin áreas de MALT³⁵⁻⁴⁰. Por ejemplo, un estudio reciente que analizó esta terapia en 15 pacientes con DLBCL gástrico en estadio I, sin áreas de MALT y con infección por *H. pylori*, observó la remisión completa del linfoma en 4 de los casos (26,7%), proponiendo la erradicación de *H. pylori* como primera línea de tratamiento en pacientes con DLBCL gástrico en estadio I, superficial y sin invasión de la submucosa, aunque en pacientes con la enfermedad más avanzada este tratamiento no parece efectivo⁴⁰.

Aunque el pronóstico del DLBCL gástrico es en general bueno, aproximadamente el 20% de los pacientes no sobreviven a los 5 años¹⁷. Por ello,

sería de gran utilidad disponer de marcadores pronósticos que pudiesen predecir la evolución y ajustar el tratamiento para estos casos con peor pronóstico.

MARCADORES PRONÓSTICOS ACTUALES EN EL DLBCL GÁSTRICO

PARÁMETROS CLÍNICOS

Al principio de la década de los 90, el “Proyecto Internacional de Factores Pronóstico en Linfomas No-Hodgkin” desarrolló el Índice Pronóstico Internacional (IPI), que tiene en cuenta 5 factores de riesgo clínicos⁴¹:

- Edad > 60 años
- Estadío III a IV
- Localizaciones extranodales > 1
- Estado general ≥ 2
- LDH > 1 vez aumentado

Se identificaron cuatro grupos de riesgo en DLBCL nodales (bajo, bajo-intermedio, alto-intermedio y alto), según el número de factores positivos que presenta el paciente. Con este índice, el porcentaje de pacientes que sobreviven a los 5 años va disminuyendo según aumenta el número de factores de riesgo⁴¹, aunque tanto en el grupo de IPI bajo como en el alto hay casi un 30% de pacientes que quedan mal clasificados. Cuando este índice se probó en casos gástricos, no mostró la misma eficacia, presentando supervivencias similares en los pacientes de IPI bajo y alto (IPI bajo 91% e IPI alto 71%)^{31,42} (Tabla 1).

Introducción

Tabla 1: Pronóstico de DLBCL nodales y gástricos basado en el Índice Pronóstico Internacional (IPI)

	Nº de factores	SG 5-años (%)**	
		DLBCL nodales	DLBCL gástricos
Bajo	0 ó 1	73	91
Bajo intermedio	2	51	63
Alto intermedio	3	43	64
Alto	4 ó 5	26	71

Abreviaturas; SG: supervivencia global

* N Engl J Med, 1993; 329:987-94⁴¹

** Clin Lab Haematol, 1997; 20(5):297-302⁴²

En DLBCL gástricos, se han asociado diferentes parámetros clínicos con la supervivencia. Por ejemplo, el género femenino²⁹, la gastrectomía^{29,30}, el grado histológico bajo y un buen estado general³⁰ se han asociado con mejor pronóstico, mientras que una edad superior a 60 años³⁰, unos niveles aumentados de LDH²⁹ y de β_2 -microglobulina (β_2 -MG)²⁸ y la afectación ganglionar⁴³ se han asociado con menor supervivencia, si bien el valor pronóstico de estos parámetros es discutido.

PERFIL DE EXPRESIÓN GENÉTICO

En el año 2000, Alizadeh y cols.⁴⁴, partiendo de la hipótesis de que la heterogeneidad clínica de los DLBCL era el reflejo de una heterogeneidad molecular, analizaron el perfil de expresión de ADN de casos nodales mediante matrices de expresión génica. Así, clasificaron los DLBCL nodales en dos grupos principales dependiendo de los genes que expresaban: el tipo centro-germinal (tipo CG) y el tipo célula B activada (tipo CBA) (figura 9A). Además, pudieron observar que los pacientes de tipo CG presentaban una supervivencia significativamente mayor (figura 9B).

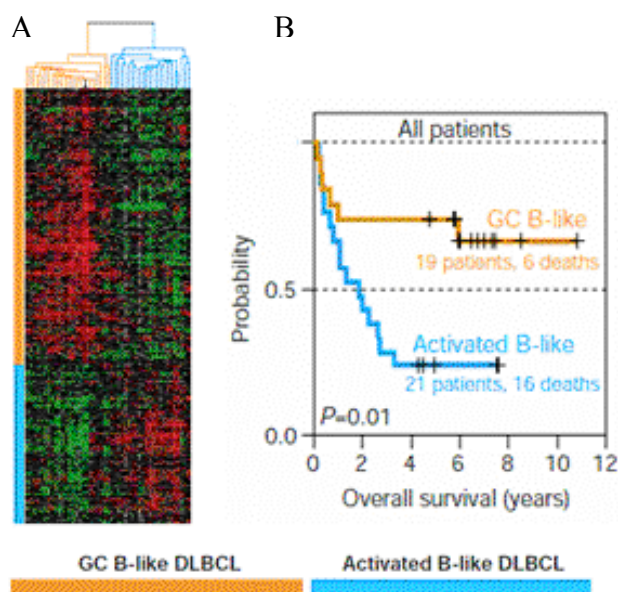


Figura 9: **A:** Clasificación de DLBCL nodales según su expresión genética. En naranja, se señalan los casos del tipo CG y los genes expresados por éstos y en azul, los del tipo CBA y los genes que expresan. **B:** Gráfica de supervivencia Kaplan-Meier según la clasificación de expresión de genes en tipo CG (GC B-like) y tipo CBA (activated B-like) (Nature 2000; 403:503-11)⁴⁴.

Sin embargo, las matrices de expresión son una tecnología costosa e inasequible para muchos laboratorios de diagnóstico anatomopatológico, por lo que esta clasificación pronóstica no resulta muy útil en la rutina diaria. Por ello, de acuerdo a los datos extraídos de estas matrices y a las proteínas cuya expresión de mRNA se ha visto asociada al tipo CG o no-CG, se ha tratado de buscar una firma pronóstica basada en un pequeño número de proteínas.

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Numerosos estudios han tratado de buscar marcadores inmunohistoquímicos que puedan predecir el pronóstico de los DLBCL (tabla 2). Se han propuesto algoritmos que combinan un panel de anticuerpos y marcadores individuales que podría clasificar estos linfomas en grupos pronósticos.

Algoritmos inmunohistoquímicos

El algoritmo inmunohistoquímico más estudiado y reconocido hasta el momento es el algoritmo de Hans, que fue descrito por Hans y cols. en 2004⁴⁵ con el propósito de conseguir la clasificación pronóstica descrita por Alizadeh y cols. mediante matrices de expresión.

Con un panel inmunohistoquímico de tres anticuerpos (CD10, Bcl-6 y MUM-1), dividieron los DLBCL nodales en dos grupos: tipo centro germinal (tipo CG) y tipo no-centro germinal (tipo no-CG) (figura 10A). Observaron que esta clasificación inmunohistoquímica predecía la supervivencia de los DLBCL nodales de manera similar a la clasificación por matrices de ADN de Alizadeh y cols., ya que los casos del tipo CG presentaron una supervivencia superior a los del tipo no-CG (figura 10B)⁴⁵.

Estudios posteriores han analizado el algoritmo de Hans en series de DLBCL nodales o en casos nodales y extranodales. Algunos de estos trabajos han reproducido el valor pronóstico de este algoritmo⁴⁶⁻⁴⁹, pero otros no han encontrado una asociación significativa entre esta clasificación y la supervivencia⁵⁰⁻⁵³ (tabla 2A).

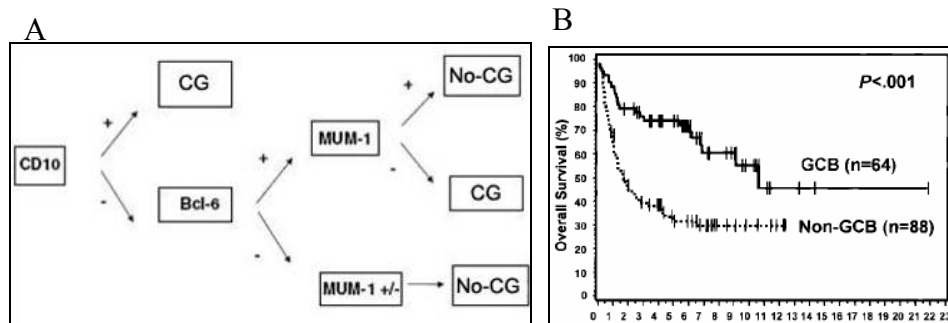


Figura 10: **A:** Algoritmo inmunohistoquímico descrito por Hans y cols., según la expresión de las proteínas CD10, Bcl-6 y MUM-1. **B:** Gráfica Kaplan-Meier según el algoritmo de Hans. Los pacientes del tipo CG (GCB) presentan mayor supervivencia que los del tipo no-CG (non-GCB) (Blood 2004; 103:275-82)⁴⁵.

En DLBCL gastrointestinales, no se ha encontrado asociación entre el algoritmo de Hans y la supervivencia⁵⁵⁻⁵⁶. Chen y cols.⁵⁷, con 32 casos de DLBCL específicamente gástricos, encontraron asociación entre el tipo CG y mayor supervivencia (tabla 2A), lo que podría indicar diferencias entre estas dos localizaciones.

Tabla 2 A: Resultados de la asociación entre algoritmos inmunohistoquímicos y pronóstico en DLBCL

Tipo (algoritmo)	DLBCL				DLBCL gástricos o gastrointestinales					
	% casos	Pronóstico	N, localización	p	Referencia	% casos	Pronóstico	N, localización	p	Referencia
Tipo CG (Hans)	42%	+	152, nod	<0,001	Hans, 2004 ⁴⁵	31%	+	32, gast	0,034	Chen, 2006 ³⁷
	52%	+	235, nod	0,002	Berglund, 2005 ⁴⁶	45%	N.A.	29 Gint	0,58	Connor, 2007 ³⁵
	34%	+	71, nod	0,004	Muris, 2006 ⁴⁷	73%	N.A.	48, Gint	>0,05	Mitchel, 2008 ³⁶
	50%	+	91, nod+ext	0,001	Sjo, 2007 ⁴⁸					
	34%	+	116, nod	<0,05	Chen, 2010 ⁴⁹					
	47%	N.A.	88, S.E.	0,636	Nyman, 2009 ⁵⁰					
	42%	N.A.	51, nod	0,0748	Oh, 2006 ⁵¹					
	38%	N.A.	116, nod+ext	0,064	Amen, 2007 ⁵²					
	39%	N.A.	42, nod+ext	0,870	Peh, 2008 ⁵³					
	55%	+	71 nod	<0,0001	Muris, 2006 ⁴⁷	?	?			
Grupo1 (Muris)	60%	+	91, nod+ext	0,020	Sjo, 2007 ⁴⁸					
	73%	+	116, nod	<0,05	Chen, 2010 ⁴⁹					
Tipo CG (Choi)	58%	+	88, S.E.	0,041	Nyman, 2009 ⁵⁰	?	?			
		+	110, nod	<0,001	Choi, 2009 ⁵⁸					

Abreviaturas; N: número de casos, +: valor pronóstico favorable, N.A.: no asociación, Gast: gástricos, Nod: nodales, Ext: extranodales, S.E.: sin especificar, Gín: gastrointestinales

Más recientemente, Muris y cols. (2006)⁴⁷ propusieron otro algoritmo inmunohistoquímico basado en la expresión de Bcl-2, CD10 y MUM-1 (figura 11A). De este modo, dividieron los DLBCL nodales en dos grupos (grupo 1 y grupo 2) y propusieron que esta clasificación predecía la supervivencia de los pacientes de manera más exacta que el algoritmo de Hans, con una mayor supervivencia del grupo 1 frente al grupo 2 (figura 11B, tabla 2A).

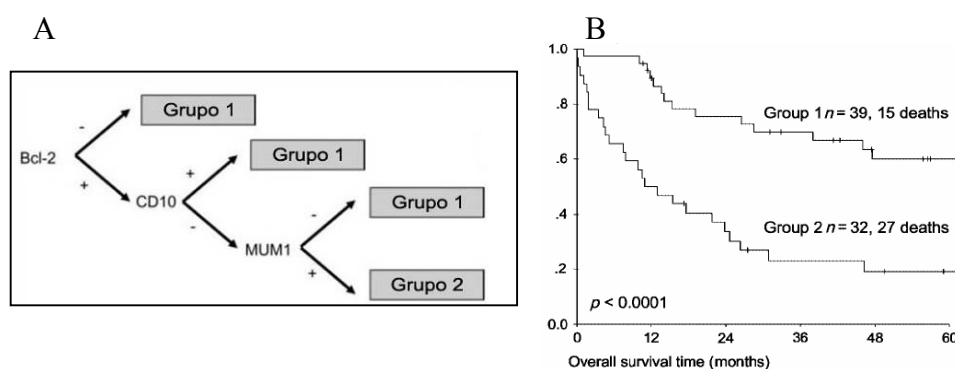


Figura 11: A: Algoritmo inmunohistoquímico descrito por Muris y cols. basándose en la expresión de las proteínas Bcl-2, CD10 y MUM-1. **B:** Gráfica de Kaplan-Meier según el algoritmo de Muris (J Pathol 2006; 208:714-23)⁴⁷.

Otros tres estudios han analizado este algoritmo y también encontraron una asociación entre el grupo 1 y mayor supervivencia en DLBCL (tabla 2A)⁴⁸⁻⁵⁰. Sin embargo, hasta el momento el valor pronóstico de la clasificación mediante el algoritmo de Muris no se ha estudiado en casos gástricos.

En el año 2009, Choi y cols.⁵⁸ han descrito un nuevo algoritmo inmunohistoquímico, utilizando la expresión de Gcet1, CD10, Bcl-6, MUM-1 y FOXP-1 (figura 12A), que clasifica los DLBCL nodales en tipo CG y no-CG de manera más exacta que el algoritmo de Hans. Observaron una menor supervivencia en los pacientes de tipo CG que en los de no-CG (figura 12B). Este algoritmo aún no ha sido analizado en otros trabajos.

Introducción

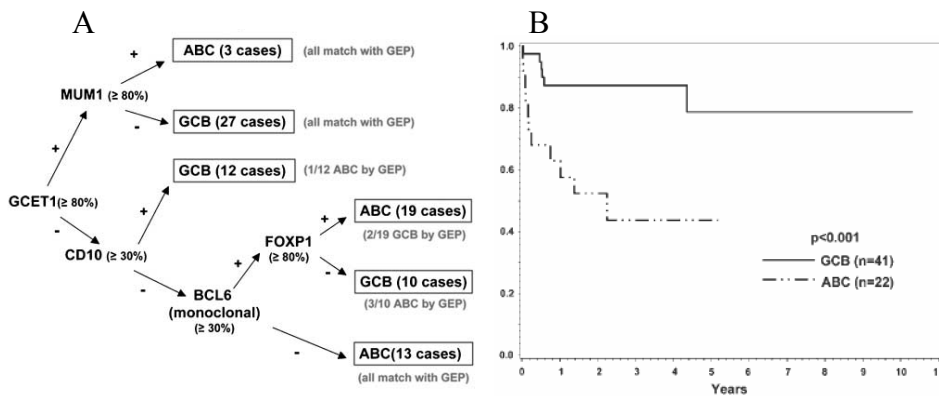


Figura 12: A: Algoritmo inmunohistoquímico descrito por Choi y cols. basándose en la expresión de las proteínas Bcl-6, CD10, Gce11, MUM-1 y FOXP-1. **B:** Gráfica de Kaplan-Meier según el algoritmo de Choi (Clin Cancer Res 2009; 15(17):5494-502)⁵⁸.

Marcadores proteicos individuales

Además de los algoritmos inmunohistoquímicos, también se ha estudiado el valor pronóstico de las proteínas CD10, Bcl-6, Gce11, MUM-1, Bcl-2 y BLIMP-1, frecuentemente expresadas en DLBCL nodales^{45-54,60,62} y en el caso de CD10, Bcl-6 y MUM-1 también en DLBCL gástricos⁵⁵⁻⁵⁹ (tabla 2 A-B).

Asociados a buen pronóstico

Entre ellas, las proteínas que expresan los linfocitos B del centro germinal CD10, Bcl-6 y Gce11 se han propuesto como marcadores de buen pronóstico en los DLBCLs (tabla 2B).

Tabla 2 B: Resultados de la asociación entre expresión de las proteínas CD10, Bcl-6 y Gcet1 y el pronóstico en DLBCL

Proteína	DLBCL			DLBCL gástricos o gastrointestinales		
	% casos	Pronóstico	N, localización	P	Referencia	
CD10	28%	+	152, nod	0,019	Hans, 2004 ⁴⁵	
	35%	+	235, nod	0,04	Berglund, 2005 ⁴⁶	0,04 Ponzoni, 2003 ³⁹
	23%	+	71, nod	0,03	Muris, 2006 ⁴⁷	0,93 Connor, 2007 ⁵⁵
	41%	+	91, nod+ext	0,027	Sjo, 2007 ⁴⁸	
	22%	N.A.	51, nod	0,0992	Oh, 2006 ⁵¹	
	30%	N.A.	116, nod+ext	>0,05	Amen, 2007 ⁵²	
Bcl-6	29%	N.A.	42, nod+ext	0,450	Peh, 2008 ⁵³	
	56%	+	152, nod	<0,001	Hans, 2004 ⁴⁵	72% + 38, gast <0,05 Chen, 2006 ⁵⁷
	48%	+	235, nod	0,00003	Berglund, 2005 ⁴⁶	50% N.A. 61, gast 0,40 Ponzoni, 2003 ³⁹
	65%	+	91, nod+ext	0,005	Sjo, 2007 ⁴⁸	
	63%	-	42, nod+ext	0,038	Peh, 2008 ⁵³	
	58%	N.A.	71, nod	0,7	Muris, 2006 ⁴⁷	
Gcet1	39%	N.A.	51, nod	0,2509	Oh, 2006 ⁵¹	
	58%	N.A.	116, nod+ext	>0,05	Amen, 2007 ⁵²	
	47%	N.D.	72, nod	-	Montes-Moreno, 2007 ⁶⁰	? ?

Abreviaturas; N: número de casos, +: valor pronóstico favorable, -: valor pronóstico adverso, N.A.: no asociación, N.D.: no determinado, Nod: nodales, Ext: extranodales, S.E.: sin especificar, Gast: gástricos, Gnt: gastrointestinales

Introducción

CD10 (ciclina D 10) es una metaloproteína de tipo II de la membrana celular de 100 kDa. Se expresa en los linfocitos de los centros germinales durante los primeros pasos de los reordenamientos de la cadena pesada⁵³ (figura 13A).

En estudios realizados con DLBCL nodales y extranodales, la expresión de CD10 se ha descrito entre el 22% y el 41% de los casos^{45-48,50-53}. En algunos de estos estudios se ha observado una asociación entre la expresión de CD10 y mayor supervivencia⁴⁵⁻⁴⁸. Sin embargo, otras investigaciones no han encontrado una relación significativa entre esta proteína y el pronóstico (figura 13B)⁵¹⁻⁵³ (tabla 2B).

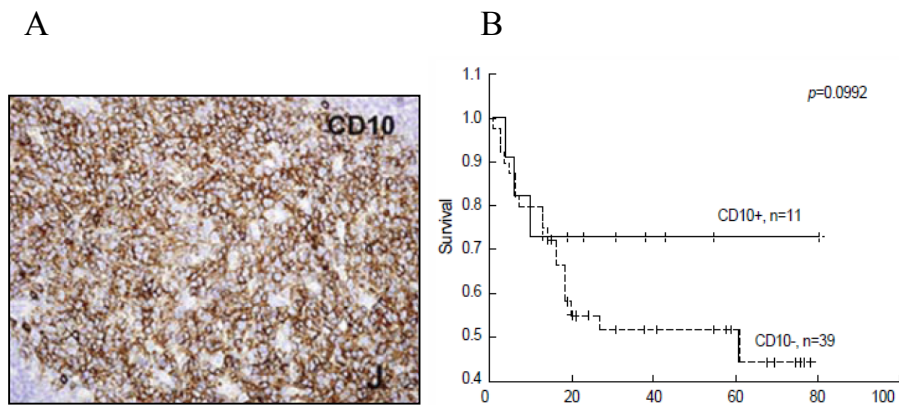


Figura 13: A: Expresión de CD10 en células B del centro germinal. B: Curva de supervivencia Kaplan-Meier según la expresión de CD10 (Korean Med Sci, 2006; 21:397-405)⁵¹.

Solo hemos encontrado un estudio en casos específicamente gástricos, en el que Ponzoni y cols.⁵⁹ encontraron la expresión de CD10 en 16 de 61 casos (26%), que se asociaron a mayor supervivencia. Sin embargo, Connor y cols.⁵⁵, que analizaron 29 DLBCL gástricos e intestinales, no vieron ninguna asociación entre CD10 y la supervivencia (tabla 2B).

La proteína represora de la transcripción **Bcl-6** (proteína 6 del linfoma de célula B) es reguladora de la diferenciación a centro germinal e inhibidora de la inflamación y se expresa también predominantemente en las células B del CG (figura 14A). En situaciones normales, las células B pre-CG sobreexpresan Bcl-6 y migran a las áreas foliculares, donde se inicia la formación del CG. También se cree que suprime la diferenciación plasmática⁵³.

La expresión de Bcl-6 se ha descrito en el 39-65% de los DLBCLs^{45-48,50-53}. Su expresión se ha asociado con mayor supervivencia^{45-46,48} (figura 14B), aunque algunos trabajos no han encontrado una asociación significativa con el pronóstico^{47,51,52} e incluso se ha encontrado asociada a menor supervivencia⁵³ (tabla 2B).

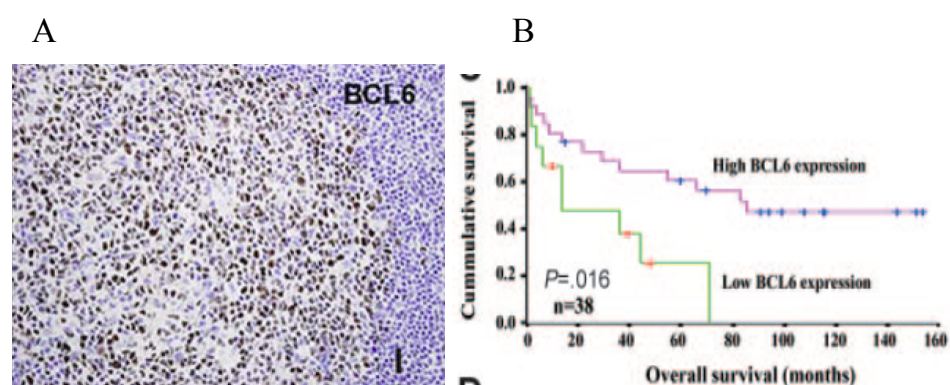


Figura 14: **A:** Expresión de Bcl-6 en células B del centro germinal. **B:** Curva de supervivencia Kaplan-Meier según la expresión de Bcl-6 (Blood 2006; 108:2373-83)⁵⁷.

Dos estudios han analizado la expresión de Bcl-6 en casos gástricos. Chen y cols.⁵⁷, al analizar 38 casos, encontraron su expresión asociada a mayor supervivencia; sin embargo, esta asociación no se confirmó en el estudio de Ponzoni y cols.⁵⁹, realizado con 61 casos.

Introducción

Gcet1 (*Germinal centre B-cell expressed transcript 1*) es una molécula que pertenece a la familia de inhibidores de las serina-proteasas o serpinas. Se ha detectado un incremento de su expresión en células B del CG (figura 15) y en neoplasias derivadas de éstas⁶⁰.

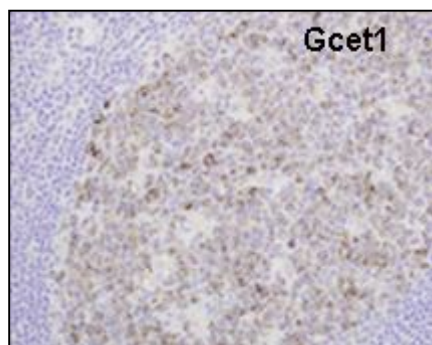


Figura 15: Expresión de Gcet1 en linfocitos B del CG (Blood 2007; 111(1):351-8)⁶⁰.

La expresión de esta proteína en DLBCL nodales ha sido estudiada por Montes-Moreno y cols.⁶⁰ en 72 casos, siendo el 47% de éstos positivos para la proteína. Al subdividirlos utilizando el algoritmo de Hans, vieron que la mayoría de los casos con expresión de la proteína eran del tipo CG. Por ello, propusieron que Gcet1 podría identificar casos de DLBCL con diferente curso biológico o características clínicas. No obstante, su posible valor pronóstico no ha sido estudiado en DLBCL nodales ni gástricos.

Asociados a mal pronóstico

En los DLBCL nodales y en mezclas de nodales y extranodales, las proteínas que se expresan sobre todo en linfocitos B plasmáticos, como son MUM-1, Bcl-2 y BLIMP-1, se han asociado a mal pronóstico (tabla 2C).

Tabla 2 C: Resultados de la asociación entre la expresión de las proteínas MUM-1, Bcl-2 y BLIMP-1 y el pronóstico en DLBCL

Proteína	DLBCL			DLBCL gástricos o gastrointestinales						
	% casos	Pronóstico	N, localización	P	Referencia	% casos	Pronóstico	N, localización	P	Referencia
MUM-1	47%	-	152, nod	0,009	Hans, 2004 ⁴⁵	72%	N.A.	29, gint	1	Connor, 2007 ³⁵
	65%	-	71, nod	0,01	Muris, 2006 ⁴⁷					
	32%	N.A.	235, nod	0,7	Berglund, 2005 ⁴⁶					
	54%	N.A.	91, nod+ext	0,118	Sjö, 2007 ⁴⁸					
	31%	N.A.	51, nod	0,5207	Oh, 2006 ⁵¹					
	62%	N.A.	116, nod+ext	>0,05	Amen, 2007 ³²					
Bcl-2	68%	N.A.	42, nod+ext	0,872	Peh, 2008 ⁵³					
	55%	-	235, nod	0,03	Berglund, 2005 ⁴⁶	55%	N.A.	29, gint	0,7	Connor, 2007 ³⁵
	73%	-	71, nod	0,0007	Muris, 2006 ⁴⁷					
	71%	-	91, nod+ext	0,038	Sjö, 2007 ⁴⁸					
	37%	-	116, nod+ext	<0,001	Amen, 2007 ³²					
	67%	-	117 S.E.	0,034	Nyman, 2009 ⁵⁴					
BLIMP-1	53%	-	45, ext	0,009	Chatzitolis, 2010 ⁶¹					
	50%	N.A.	152, nod	0,17	Hans, 2004 ⁴⁵					
	45%	N.A.	51, nod	0,5307	Oh, 2006 ⁵¹					
	71%	N.A.	42, nod+ext	0,990	Peh, 2008 ⁵³					
43%	-	235, nod	<0,05	Garcia, 2006 ⁶⁰						

Abreviaturas, N: número de casos; -: valor pronóstico adverso, N.A.: no asociación, Nod: nodales, Ext: extranodales, S.E.: sin especificar, Gint: gastrointestinales

Introducción

MUM-1/IRF-4 (*Multiple myeloma-1/interferon regulatory factor-4*) es miembro de la familia de factores de transcripción específica de linfocitos IRF. MUM-1 regula la expresión de genes en respuesta a señalizaciones por interferones y citoquinas. Se expresa fuertemente en el último estadio de la diferenciación intra-CG de células B y en los siguientes pasos de diferenciación a células plasmáticas. Por lo tanto, es un marcador útil para neoplasias derivadas de estos estadios celulares (figura 16A)⁵³.

Su expresión se ha observado en el 31-72% de los DLBCLs^{45-48,50-53} y algunos trabajos la han asociado a menor supervivencia^{45,47}, aunque otros no han encontrado ninguna asociación con el pronóstico (figura 16B)^{46,48,51-53} (tabla 2C).

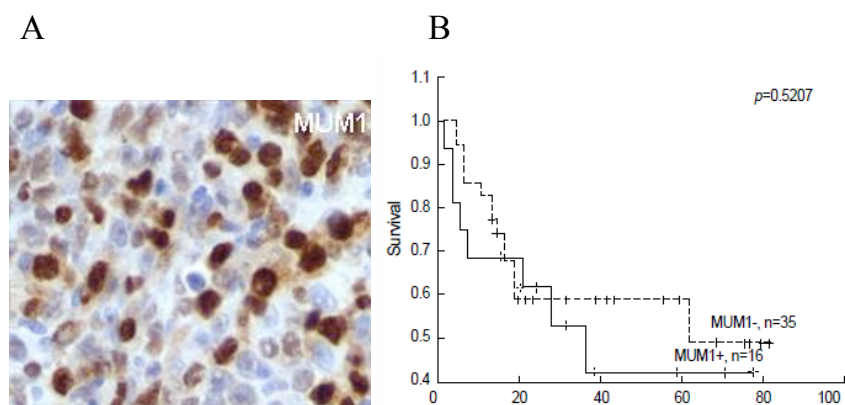


Figura 16: **A:** Expresión de MUM-1 en DLBCL gástrico. **B:** Curva de supervivencia Kaplan-Meier según la expresión de MUM-1 (Korean Med Sci, 2006; 21:397-405)⁵¹.

Hasta la fecha, el valor pronóstico de MUM-1 no se ha analizado de manera individual en DLBCL gástricos, tan solo se ha realizado un estudio con 29 casos gastrointestinales, en el que la expresión de MUM-1 se describió en el

72% de los casos, pero no se encontró asociación con la supervivencia⁵⁵ (tabla 2C).

La proteína **Bcl-2** (proteína 6 del linfoma de célula B) es una molécula crucial en la inhibición de la apoptosis. También se considera como una proteína importante en la resistencia a múltiples drogas, debido a su efecto antiapoptótico⁶¹. Se expresa sobre todo durante etapas muy tempranas de la diferenciación de células B y también en la etapa de diferenciación final (figura 17A)².

En los DLBCLs, la expresión de Bcl-2 se ha descrito en el 37-73% de los casos^{45-48,51-53,61}. Algunos de estos estudios han asociado su expresión con menor supervivencia^{46-48,52,61} (figura 17B) y recientemente también se ha propuesto que esta asociación pronóstica se produce en los DLBCL de tipo no-CG según el algoritmo de Hans, y no en los de tipo CG⁵⁴. Sin embargo, también hay trabajos que no han encontrado relación con el pronóstico^{45,51,53} (tabla 2C).

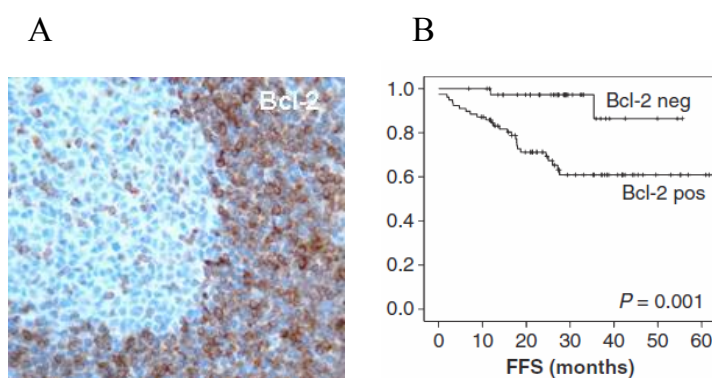


Figura 17: A: Expresión de Bcl-2 en células B plasmáticas. B: Curva de supervivencia Kaplan-Meier según la expresión de Bcl-2 (Eur J on Haema, 2009;82:364-372)⁵⁴.

Introducción

En DLBCL gastrointestinales, la expresión de Bcl-2 se ha descrito en 16 de 29 casos (55%), sin encontrar asociación con la supervivencia⁵⁵. En valor pronóstico de Bcl-2 no ha sido analizado en casos específicamente gástricos.

La proteína **PRDM1/BLIMP-1** (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*) pertenece a la familia de represores transcripcionales PRDM. En tejido normal, se expresa en células plasmáticas del CG y de su periferia (figura 18A). Esta proteína es reguladora de la diferenciación terminal de células B y tiene la capacidad de conducir las células B activadas, o de CG, a células secretoras de anticuerpos con fenotipo de célula plasmática. También puede activar una respuesta apoptótica en células B inmaduras y células pre-B⁶².

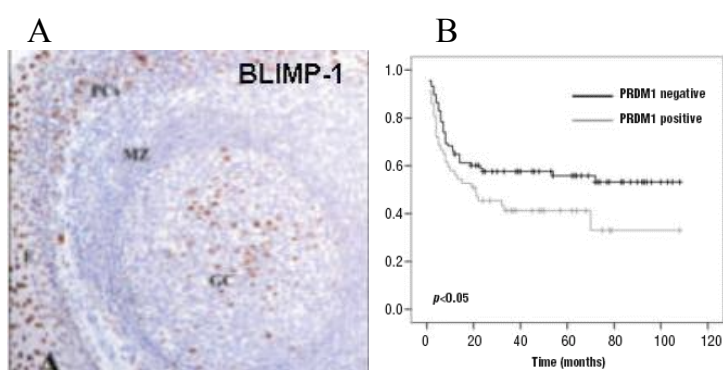


Figura 18: A: Expresión de BLIMP-1 en células B plasmáticas. B: Curva de supervivencia Kaplan-Meier según la expresión de BLIMP-1 (Haematol 2006; 91(4):467-74)⁶².

En DLBCL nodales, García y cols.⁶² encontraron la expresión de BLIMP-1 en 101 de 235 casos (43%) y asociada a peor pronóstico (figura 18B, tabla 2C). La expresión de BLIMP-1 no ha sido analizada en casos gástricos.

En resumen, de todos los marcadores analizados en los DLBCL nodales, muchos de ellos no están bien establecidos y siguen en discusión y hasta el momento no hay ningún marcador proteico bien determinado en los DLBCL gástricos.

METILACIÓN DE PROMOTORES

METILACIÓN DE ADN EN LA ONCOGÉNESIS

En el cáncer, tradicionalmente, se ha descrito que los oncogenes pueden estar sobre-expresados debido a ganancias cromosómicas, amplificaciones, translocaciones y mutaciones puntuales activadoras y los genes supresores de tumores se pueden inactivar por pérdidas cromosómicas, deleciones totales o intragénicas y mutaciones puntuales inactivadoras⁶³. Además de estos cambios, en los últimos años se ha demostrado que el cáncer no es tan solo una enfermedad poligénica, sino también una enfermedad “poliepigenética”, en la que genes involucrados en numerosas vías (ciclo celular, reparación de ADN, apoptosis, adhesión celular o respuesta hormonal) están regulados por mecanismos epigenéticos^{64,65}.

La epigenética es una alteración que modula la organización de la cromatina y la expresión de genes sin alterar la secuencia de ADN. Las dos alteraciones epigenéticas principales descritas son la modificación de las proteínas de la cromatina y la metilación del ADN⁶⁶.

La metilación anómala del ADN es una característica del cáncer. Prácticamente todos los tipos de cáncer están asociados a alteraciones de la metilación. Estas alteraciones pueden ser la hipermetilación, que se da

Introducción

principalmente en las islas CpG localizadas en las regiones promotoras de los genes supresores de tumores, y la hipometilación, que se da sobre todo en secuencias repetitivas y en el cuerpo del gen⁶⁶⁻⁷⁰.

La **metilación del ADN**, principalmente originada en las citosinas de los dinucleótidos CG, se cataliza por el enzima ADN metiltransferasa (DNMT), que añade un grupo metilo donado por la S-adenosilmetionina (SAM) a la posición 5 del anillo de citosina (figura 19). Las regiones con altas concentraciones de estos dinucleótidos CpG, llamadas islas CpG⁷¹, se encuentran sobre todo en las regiones promotoras y el primer exón, aunque también pueden aparecer en otras regiones del gen⁷²⁻⁷⁵.

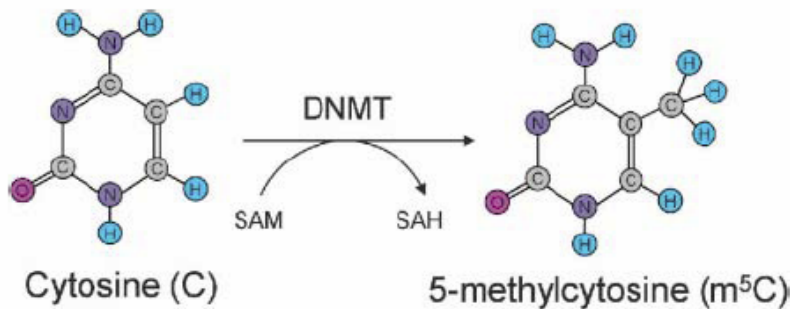


Figura 19: Metilación de citosinas. Los residuos de citosinas del ADN se convierten en 5-metilcitosinas mediante las ADN metiltransferasas (DNMTs). El grupo metilo es donado por la S-adenosilmetionina (SAM), que se convierte en S-adenosilhomocisteína (SAH) (APMIS. 2007; 115(10):1039-59)⁶³.

La **hipermetilación de las islas CpG** de los promotores de genes supresores de tumores puede inducir el silenciamiento del gen. Está aceptado que la inactivación de genes supresores de tumores por hipermetilación de ADN confiere al clon tumoral una ventaja selectiva^{63,76} (figura 20).

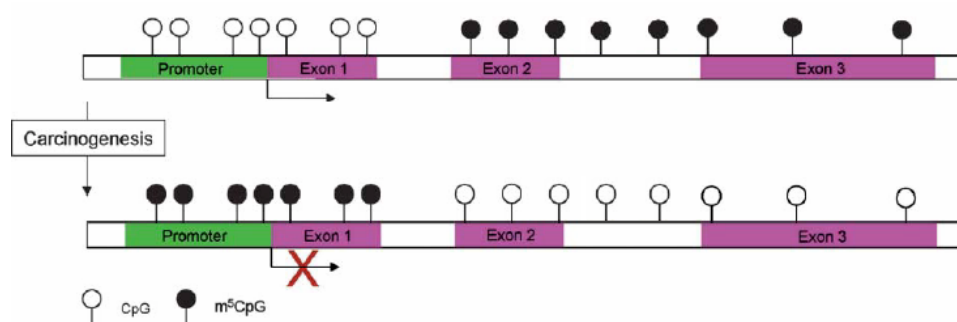


Figura 20: Diagrama representativo de metilación de ADN de un gen supresor de tumores y cáncer. En una célula sana (arriba), las islas CpG de los promotores no están metiladas, pero sí las regiones exónicas e intrónicas del gen. En una célula tumoral (abajo), se produce la hipermetilación de los promotores, que da lugar a la inhibición de la transcripción del gen y a la hipometilación global de ADN (APMIS. 2007; 115(10):1039-59)⁶³.

La **hipometilación genómica** (pérdida de metilación del ADN) puede contribuir en la carcinogénesis mediante tres mecanismos: la inestabilidad cromosómica, la reactivación de elementos transponibles y la pérdida de impronta⁷⁷. La baja metilación del ADN puede favorecer la recombinación mitótica, lo que podría conllevar a la pérdida de heterocigosidad y promover reordenamientos detectables mediante cariotipo. El ADN intragenómico parasitario y otros transposones previamente silenciados podrían ser transcritos y “saltar” a otras partes del genoma, pudiendo romper genes normales. La hipometilación puede también afectar a la impronta de genes contribuyendo a la oncogénesis. También se ha observado que la hipometilación del ADN en regiones intragénicas va incrementándose a través de todos los pasos de la oncogénesis⁷⁸, desde proliferaciones benignas a cáncer invasivo⁷⁷, y que puede ser un mecanismo de alteración en el funcionamiento de los snRNAs⁷⁹.

METILACIÓN DE PROMOTORES EN TEJIDO GÁSTRICO E IMPLICACIÓN DE *H. PYLORI*

En otros tumores gástricos como el carcinoma, la metilación de promotores de genes en la mucosa gástrica no neoplásica se ha asociado al riesgo de desarrollar este tipo de cáncer, ya que se ha observado un incremento progresivo de la metilación desde tejido gástrico de individuos sanos a tejido gástrico sano de pacientes con tumor y a tejido tumoral⁸⁰⁻⁸³ (figura 21). La metilación de promotores en tejido sano de pacientes y su asociación con el riesgo a desarrollar cáncer también se ha descrito en cáncer de hígado⁸⁴, colon⁸⁵, esófago⁸⁶, mama⁸⁷ y riñón⁸⁸, pero no se ha analizado aún en el DLBCL gástrico.

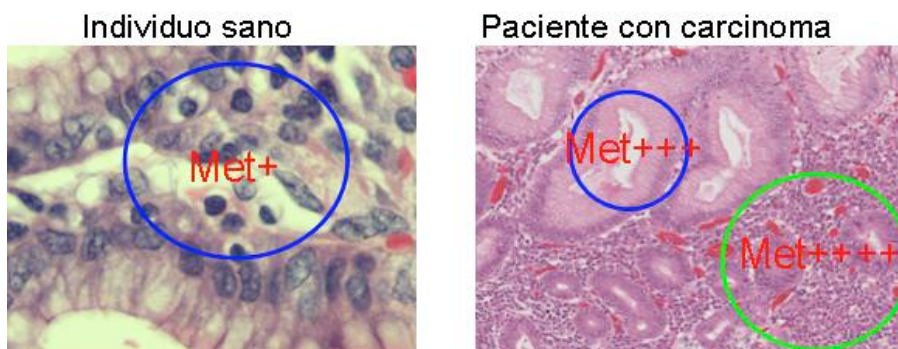


Figura 21: Esquema representativo del aumento de la metilación de promotores de tejido gástrico de pacientes sanos a tejido gástrico sano de pacientes con tumor (círculo azul) y a cáncer gástrico (círculo verde), que indica una implicación de la metilación en su oncogénesis.

Se ha propuesto que *H. pylori*, además de producir una respuesta inflamatoria, puede inducir la metilación de promotores en el tejido gástrico, ya que la metilación de numerosos genes se ha visto incrementada en el tejido

gástrico no neoplásico infectado por esta bacteria frente al no infectado^{81-83,89,90-92}. Esta asociación entre *H. pylori* y metilación también se ha descrito en linfomas gástricos primarios⁹³⁻⁹⁵. El mecanismo por el cual *H. pylori* podría producir metilación se desconoce; una posible explicación es que la infección promueva la liberación de especies reactivas de oxígeno, que podrían desestabilizar el ADN, y de óxido nítrico, el cual podría activar las DNMTs, induciendo la metilación de ADN. Además, hay evidencias de que *H. pylori* puede inducir la proliferación celular, lo que también podría promover la metilación del ADN⁸⁹ (figura 22).

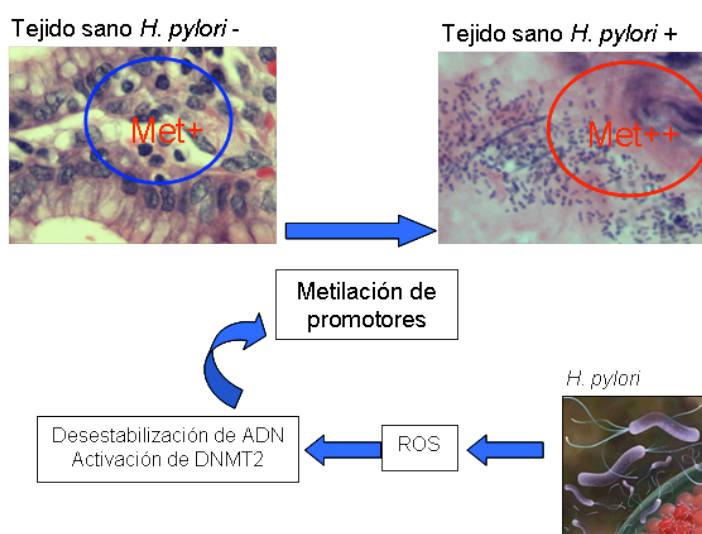


Figura 22: Esquema del posible mecanismo de metilación de ADN inducido por *H. pylori*.

Otra evidencia de que *H. pylori* puede inducir la metilación de promotores es que se ha observado que su erradicación con antibióticos, además de frenar la respuesta inflamatoria, puede revertir la metilación tanto en pacientes con gastritis crónica⁹⁶⁻¹⁰¹ como en pacientes con linfoma MALT¹⁰².

VALOR PRONÓSTICO DE LA METILACIÓN DE PROMOTORES

En los últimos años, se ha demostrado que la metilación de promotores, además de tener un papel importante en la oncogénesis, también puede ser un marcador pronóstico de supervivencia o de respuesta al tratamiento en algunos tumores.

En los glioblastomas, el tumor cerebral del sistema nervioso central más frecuente en adultos, el silenciamiento epigenético del gen *MGMT* mediante la metilación de su promotor se ha asociado con mayor supervivencia en pacientes tratados con agentes alquilantes (figura 23)¹⁰³. Esto se debe a que *MGMT* es un enzima reparador que reduce la toxicidad de los agentes alquilantes, confiriendo resistencia terapéutica. Por ello, los pacientes que tienen el gen *MGMT* silenciado tienen mayor sensibilidad a esta terapia¹⁰⁴.

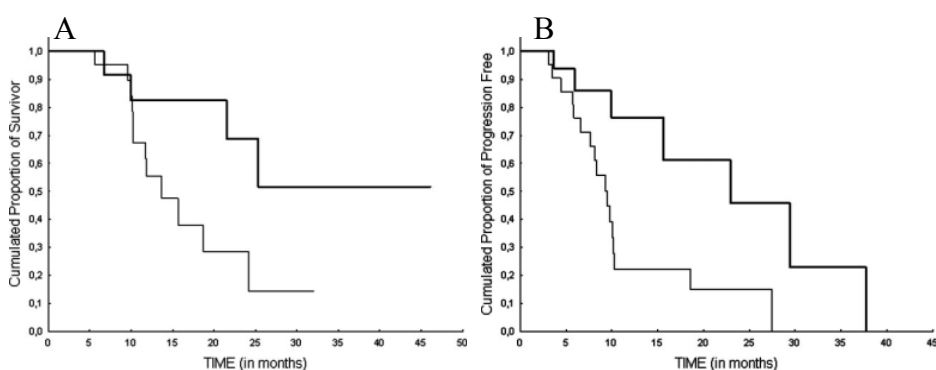


Figura 23: Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global (A) y supervivencia libre de progresión (B) en relación a la metilación de *MGMT*. La línea oscura representa los pacientes con *MGMT* metilado y la clara los no metilados. Tanto la supervivencia global ($p = 0,05$) como la supervivencia libre de progresión ($p < 0,01$) son mayores en los casos que presentan la metilación (Cancer 2009; 115(15):3512-8)¹⁰³.

Recientemente se ha estudiado el valor pronóstico del fenotipo metilador (CIMP+: presencia de múltiples genes simultáneamente metilados). El CIMP+ se ha asociado a peor pronóstico en LLA, en un estudio en el que en una muestra de 54 casos se analizó la metilación de 38 genes involucrados en vías de immortalización y señalización celular. Al clasificar los casos según el número de genes que tenían metilados, aquellos que presentaban 0-2 promotores metilados (CIMP-) presentaron mayor supervivencia que los que tenían más de dos genes metilados (CIMP+) (figura 24)¹⁰⁵.

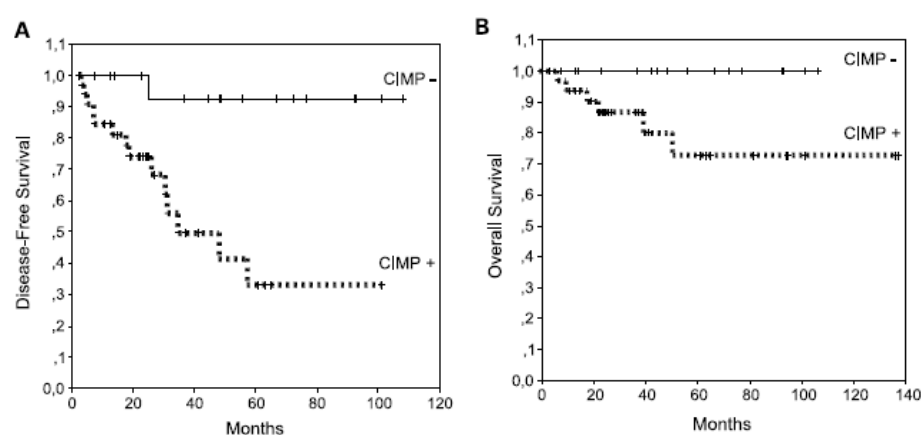


Figura 24: Curvas de supervivencia Kaplan-Meier en pacientes con LLA, que muestran una menor supervivencia libre de enfermedad ($p = 0,002$) (A) y supervivencia global ($p = 0,04$) (B) en los casos CIMP+ (más de 2 genes metilados) (Clin Cancer Res 2006; 12(16):4845-50)¹⁰⁵.

También en un estudio en carcinomas colorrectales, el CIMP+ se asoció con peor pronóstico. En este trabajo, se analizó la metilación de los promotores de *hMLH1*, *p16*, *MINT1*, *MINT2* y *MINT31* y los casos se clasificaron según el número de genes metilados: no-CIMP (0 genes metilados), CIMP-bajo (1-3 genes metilados) y CIMP-alto (4-5 genes metilados). La supervivencia de los pacientes disminuyó con el aumento del CIMP (figura 25)¹⁰⁶.

Introducción

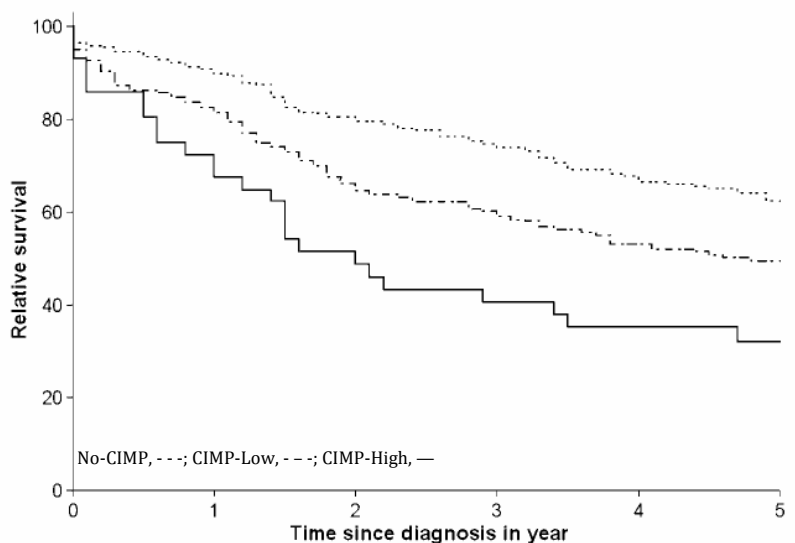


Figura 25: Curvas Kaplan-Meier en carcinoma colorrectal atendiendo al CIMP. El incremento de genes metilados está asociado a una disminución de la supervivencia ($p < 0,001$) (Cancer Res; 68(20):8541-6)¹⁰⁶.

Son numerosos los tumores en los que la metilación de promotores está considerada como marcador pronóstico. Por ejemplo, la metilación de *BRCA1* se ha asociado con menor respuesta al tratamiento en cáncer de mama y ovario y la de *hMLH1* a peor pronóstico en cáncer de colon, gástrico y endometrial¹⁰⁴.

En los DLBCLs en general, muchos estudios han investigado la hipermetilación de algunos promotores de genes, como los supresores de tumores y detoxificantes, observando que esta alteración epigenética es muy frecuente en este tipo de tumores¹⁰⁷⁻¹¹⁶. Además, algunos de estos trabajos han tratado de determinar el valor pronóstico de la metilación de promotores de diferentes genes. La metilación de los promotores de *p16*, *FHIT*, *VHL*, *DAP-k* y *BMP-6* se ha asociada a menor supervivencia, y la de *p57*, *MGMT* y *GSTP1* a un mejor pronóstico, si bien no se ha llegado a resultados concluyentes (tabla 3). En el caso de los DLBCL gástricos, son pocos los trabajos que han analizado la metilación de promotores, y se han realizado con un número reducido de

muestras (10-32 casos), pero también indican que la metilación en genes supresores de tumores, detoxificantes y reparadores del ADN es un fenómeno frecuente en este tipo de tumores^{93-95,117}. Sin embargo, ninguno de estos trabajos ha evaluado el posible valor pronóstico de la metilación de promotores en los DLBCL gástricos (tabla 3).

En una revisión exhaustiva de la bibliografía, hemos encontrado que los promotores de los genes *p16*, *FHIT*, *p73*, *p57*, *CDH1*, *p15*, *ID4*, *VHL*, *DAP-kinasa*, *BMP-6*, *ATM*, *hMLH1*, *MGMT* y *GSTP1* se encuentran frecuentemente metilados en los DLBCLs en general y en algunos casos esta metilación se ha asociado a un valor pronóstico (tabla 3).

Tabla 3: Resultados de metilación de promotores y asociación con el pronóstico en los DLBCL

Gen	DLBCL				DLBCL gástricos					
	% casos metilados	Pronóstico	N, localización	p	Referencia	% casos metilados	Pronóstico	N, localización	p	Referencia
<i>p16</i>	52%	-	46, nod+ext	0,001	Amara, 2008 ¹⁰⁸	40%	?	10, gast		Kaneko, 2003 ⁹³
	45%	-	59, nod+ext	0,010	Shiozawa, 2006 ¹⁰⁹	73%	?	11, gast		Min, 2006 ⁹⁴
	54%	N.A.	44, nod	>0,05	Lee, 2009 ¹⁰⁷	25%	?	32, gast		Huang, 2007 ¹¹⁷
<i>FHIT</i>	23%	-	114 S.E.	0,023	Al-Kuraya, 2006 ¹¹⁰	-	?			
<i>p73</i>	N.D.	?				30%	?	10, gast		Kaneko, 2003 ⁹³
<i>p57</i>	48%	+	44, nod	0,0218	Lee, 2009 ¹⁰⁷	36%	?	11, gast		Min, 2006 ⁹⁴
<i>CDH1</i>	59%	N.A.	46, nod+ext	0,880	Amara, 2008 ¹⁰⁸	44%	?	32, gast		Huang, 2007 ¹¹⁷
	32%	N.A.	44, nod	>0,05	Lee, 2009 ¹⁰⁷					
<i>p15</i>	41%	N.A.	46, nod+ext	0,483	Amara, 2008 ¹⁰⁸					
	41%	N.A.	59, nod+ext	0,515	Shiozawa, 2006 ¹⁰⁹	50%	?	10, gast		Kaneko, 2003 ⁹³
<i>ID4</i>	95%	?	20, nod		Hagiwara, 2007 ¹¹¹	N.D.				
<i>VHL</i>	44%	-	46, nod+ext	0,017	Amara, 2008 ¹⁰⁸	N.D.				
<i>DAP-k</i>	59%	-	46, nod+ext	0,003	Amara, 2008 ¹⁰⁸	90%	?	10, gast		Kaneko, 2003 ⁹³
	68%	N.A.	53, nod+ext	>0,05	Nakamichi, 2007 ¹¹²	66%	?	32, gast		Huang, 2007 ¹¹⁷
<i>BMP-6</i>	60%	-	35, nod	0,038	Datbata, 2007 ¹¹³	N.D.				
<i>ATM</i>	N.D.					12%	?	32, gast		Huang, 2007 ¹¹⁷
<i>hMLH1</i>	N.D.					30%	?	10, gast		Kaneko, 2003 ⁹³
						38%	?	32, gast		Huang, 2007 ¹¹⁷
<i>MGMT</i>	53%	+	44, nod	0,047	Lee, 2009 ¹⁰⁷					
	36%	+	63 S.E.	0,037	Ohno, 2006 ¹¹⁴					
	76%	+	190 S.E.	0,004	Al-Kuraya, 2006 ¹¹⁵	47%	?	32, gast		Huang, 2007 ¹¹⁷
	36%	+	85 S.E.	0,02	Esteller, 2002 ¹¹⁶					
	40%	N.A.	53, nod+ext	>0,05	Nakamichi, 2007 ¹¹²					
	23%	+	53, nod+ext	<0,05	Nakamichi, 2007 ¹¹²					
<i>GSTPI</i>	63%	N.A.	46, nod+ext	0,110	Amara, 2008 ¹⁰⁸	N.D.	?			
	0%	?	44, nod		Lee, 2009 ¹⁰⁷					

Abreviaturas; N: número de casos, N.D.: no determinado, -: valor pronóstico adverso, +: valor pronóstico favorable, N.A.: no asociación, Gast. gástricos, Nod: nodales, Ext: extranodales, S.E.: sin especificar

Metilación de *p16*:

El gen *p16*, supresor de tumores, es un inhibidor de kinasas ciclina-dependientes que induce parada en fase G1. La inactivación de *p16* por metilación de la isla CpG, que se extiende del promotor al exón 1, se ha descrito en gran variedad de cánceres humanos⁸⁹.

En los DLBCL, la metilación del promotor de *p16* se ha analizado en tres estudios, en los que se ha detectado en el 54% (n = 44)¹⁰⁷, el 52% (n = 46)¹⁰⁸ y el 45% (n = 59)¹⁰⁹ de los casos. Su asociación con la supervivencia es controvertida, ya que aunque algunos estudios la han asociado a mejor pronóstico¹⁰⁸⁻¹⁰⁹, otros no han encontrado valor pronóstico (tabla 3)¹⁰⁷.

En los tres estudios de casos gástricos, la metilación de *p16* se ha detectado en el 40% (n = 10)⁹³, 73% (n = 11)⁹⁴ y 25% (n = 32)¹¹⁷ de los casos. Se ha propuesto esta metilación está asociada con la transformación del linfoma MALT a DLBCL gástricos, ya que ésta es más frecuente en los DLBCLs que en los MALT gástricos⁹⁴, pero ningún estudio ha analizado su valor pronóstico en estos linfomas (tabla 3).

Metilación de *FHIT*

El gen *FHIT* (*fragile histidine triad*) es un gen supresor de tumores cuya expresión desaparece en diversos tipos de tumores y, en algunos de ellos, esta pérdida tiene valor pronóstico¹¹⁸. Su inactivación por mutaciones puntuales es un fenómeno poco frecuente, pero la pérdida de expresión puede estar causada por otros mecanismos, como pérdida de heterocigosidad e hipermetilación de su promotor¹¹⁰.

Introducción

En los DLBCL, Al-Curaya y cols.¹¹⁰ encontraron metilación de *FHIT* en el 27% de los casos (n = 114) y éstos se asociaron a menor supervivencia (tabla 3). Sin embargo, no hay ningún trabajo que estudie su metilación en DLBCL gástricos.

Metilación de *p73*

El gen *p73* es miembro de la familia de *p53* y como otros miembros de esta familia está implicado en el ciclo celular, la apoptosis, la reparación de ADN y la diferenciación celular. Su sobreexpresión se ha descrito en el cáncer de vejiga, de pulmón y de ovario, y se ha asociado con resistencia a tratamientos. Además, un estudio ha sugerido que la metilación de *p73*, al inhibir su expresión, podría ser un marcador de buen pronóstico de sensibilidad a agentes alquilantes¹¹⁹.

Hasta el momento, sólo hemos encontrado un trabajo con DLBCL gástricos realizado en tan solo 10 muestras, en el que la metilación del promotor de *p73* se encontró en el 30% de los 10 casos⁹³. Sin embargo, no se ha analizado su valor pronóstico en este tipo de linfomas, ni tampoco en casos nodales (tabla 3).

Metilación de *p57*

El gen *p57* es un inhibidor de kinasas ciclina-dependientes, miembro de los genes supresores de tumores. Se sabe que su inactivación está involucrada en el desarrollo de numerosas neoplasias humanas, como el carcinoma hepatocelular y el carcinoma gástrico. Además, su metilación es frecuente en linfomas de células B¹¹⁷.

En los DLBCLs, la metilación de *p57* se ha detectado en el 48% de los casos (n = 44)¹⁰⁷, y en casos gástricos, en el 36% (n = 11)¹¹⁷. Al estudiar su

posible valor pronóstico, Lee y cols.¹⁰⁷ encontraron una asociación con mayor supervivencia en los DLBCLs con un IPI bajo. Pero en ninguno de los trabajos se ha analizado su valor pronóstico en los casos gástricos (tabla 3).

Metilación de *CDH1*

El gen *CDH1* codifica la proteína E-cadherina, una molécula de adhesión tumoral que suprime la proliferación e invasión de las células tumorales¹⁰⁹. En el cáncer gástrico, se ha descrito que los casos que expresan E-cadherina se correlacionan con ausencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales¹²⁰.

La inactivación de este gen por metilación de su promotor es frecuente en tumores. En los DLBCL, un trabajo realizado con 46 casos detectó su metilación en el 59% de ellos, pero no asociada a la supervivencia¹⁰⁸. En los DLBCL gástricos, un estudio ha analizado la metilación de este gen en 32 casos, siendo el 44% positivos para la metilación¹¹⁷. Tampoco en este estudio se ha analizado el valor pronóstico de esta metilación en DLBCL gástricos (tabla 3).

Metilación de *p15*

El gen *p15* es un gen supresor de tumores, miembro de los inhibidores de kinasas ciclina-dependientes. Su promotor no se encuentra metilado en tejido normal, pero está frecuentemente silenciado por metilación en tumores sólidos y hematológicos¹⁰⁹.

La metilación del promotor de *p15* en el DLBCL se ha analizado en tres estudios, en los que los porcentajes de casos metilados fueron del 32% (n = 44)¹⁰⁷, 41% (n = 46)¹⁰⁸ y 41% (n = 59)¹⁰⁹ de los casos, respectivamente. Sin embargo, no se ha encontrado asociación entre su metilación y la supervivencia de los DLBCLs¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ (tabla 3).

Introducción

En los casos gástricos, Kaneko y cols., analizando tan solo 10 casos, encontraron metilación del promotor de *p15* en el 50% de los pacientes⁹³, pero tampoco se ha analizado su significado pronóstico (tabla 3).

Metilación de *ID4*

El gen *ID4* es miembro de la familia de inhibidores de unión de ADN de proteínas hélice-bucle-hélice (ID). Las proteínas ID funcionan como reguladores negativos dominantes de factores de transcripción hélice-bucle-hélice. Su metilación o silenciamiento transcripcional se ha visto en el cáncer gástrico, el colorrectal y el cáncer de mama. Además, su metilación se ha asociado a metástasis de ganglios linfáticos en el cáncer de mama. Por ello, podría servir como marcador genético precoz de metástasis¹¹¹.

En los DLBCLs, la metilación del promotor de *ID4* se ha referido en el 95% de 20 casos¹¹¹. Sin embargo, no se ha estudiado su posible valor como marcador pronóstico de supervivencia ni su metilación en DLBCL gástricos (tabla 3).

Metilación de *VHL*

El gen *VHL* se identificó como un gen supresor de tumores responsable del síndrome familiar Von Hippel-Lindau, que produce predisposición a desarrollar angiomas retinales, hemangioblastomas del sistema nervioso central, tumores pancreáticos, feocromocitomas y múltiples carcinomas renales de célula clara bilaterales. La proteína *VHL* se expresa en gran variedad de células humanas, incluyendo linfocitos y macrófagos¹⁰⁸. En los últimos años, se ha visto que tiene un importante papel en el control de la diferenciación y la polaridad celular. Parte de esta función se debe probablemente a la regulación de los cilios, estructuras que están implicadas en la regulación de la polaridad celular y la proliferación¹²¹.

En los DLBCLs, tan solo Amara y cols.¹⁰⁸ analizaron la metilación de este gen, detectándola en el 44% de 46 casos y observaron que los casos con metilación presentaban una supervivencia menor. Tampoco en este caso hemos encontrado ningún estudio que analice la metilación del promotor de este gen en los DLBCL gástricos (tabla 3).

Metilación de *DAP-kinasa (DAP-k)*

El gen *DAP-k* es un supresor de tumores que codifica un enzima dependiente de calcio-calmodulina con actividad serina-treonina kinasa. Está involucrado en la apoptosis inducida por TNF- α y FAS, y se ha demostrado que es esencial en la muerte celular programada inducida por IFN γ . La hipermetilación de *DAP-k* se ha descrito en gran variedad de tumores, incluyendo los linfomas y, además, se ha asociado a pronóstico desfavorable en alguno de ellos¹⁰⁸.

En los DLBCL, la metilación de *DAP-k* se ha analizado en dos estudios realizados con mezclas de casos nodales y extranodales, detectando su metilación en el 59% (n = 46)¹⁰⁸ y el 68% (n = 53)¹¹² de los casos. En el estudio de Amara y cols.¹⁰⁸, la metilación de *DAP-k* se asoció a peor supervivencia. Sin embargo, Nakamichi y cols.¹¹² no encontraron ninguna asociación con el pronóstico (tabla 3).

En los casos gástricos, la metilación del promotor de *DAP-k* parece ser muy frecuente. Se ha detectado en el 90% de 10 casos⁹³ y en el 66% de 32 casos¹¹⁷. Tampoco se ha estudiado su valor pronóstico en casos gástricos (tabla 3).

Introducción

Metilación de *BMP-6*

Las proteínas BMP (*Bone morphogenetic protein*) fueron originariamente identificadas como proteínas que inducían la formación de hueso y cartílago, pero hoy en día se consideran citoquinas multifuncionales. En varios tumores humanos, las BMPs modulan la diferenciación celular y la proliferación, frecuentemente inhibiéndolas, por lo que están implicadas en la oncogénesis. Por ejemplo, la pérdida de expresión de *BMP-2* se ha visto en cáncer de próstata, colon y estómago, y se ha sugerido que la inactivación de *BMP-3b* y *BMP-6* promueve el desarrollo de cáncer de pulmón¹¹³.

El mecanismo por el cual se origina esta inactivación de las *BMPs* no está esclarecido. Por ello, Daibata y cols.¹¹³ estudiaron la metilación del promotor de *BMP-6* en 90 linfomas primarios, 35 de los cuales eran DLBCL, viendo que el 60% de éstos presentaban metilación. Además, los casos con metilación se correlacionaron con menor supervivencia. Sin embargo, no hemos encontrado ningún otro trabajo que haya estudiado la metilación de este gen en el DLBCL, así como tampoco en DLBCL gástricos (tabla 3).

Metilación de *ATM*

El gen *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*) codifica para una proteína que es el miembro principal de la respuesta celular a roturas de doble cadena de ADN y tiene un importante papel en la detección del daño al ADN y en el inicio de la vía de reparación de ADN. Activa mediante fosforilación numerosos sustratos involucrados en la reparación del ADN, el control del ciclo celular y la apoptosis¹²².

Aún no se ha estudiado la metilación del promotor de *ATM* en DLBCL nodales. En linfomas gástricos primarios se ha analizado en un estudio, en el que

se ha descrito en el 12% de 32 casos¹¹⁷. No obstante, no se ha determinado si existe alguna correlación con el pronóstico de esta enfermedad (tabla 3).

Metilación de *hMLH1*

El gen *hMLH1* codifica para una proteína con función reparadora de ADN. La pérdida de su expresión por metilación ocurre con frecuencia en gran variedad de tumores¹⁰⁴, por ejemplo, en cáncer de colon el 15% de los casos presentan inestabilidad de microsatélites debido a la metilación de *hMLH1* y, además, se ha asociado a una mayor resistencia a algunas drogas quimioterápicas¹¹⁹.

No hemos encontrado ningún trabajo que analice la metilación del promotor de este gen en DLBCL nodales. En los DLBCL gástricos, la metilación de *hMLH1* se ha descrito en el 30% de 10 casos⁹³ y en el 37% de 32 casos¹¹⁷, pero no se ha estudiado su posible valor pronóstico en esta patología (tabla 3).

Metilación de *MGMT*

MGMT (*O*⁶-methylguanine DNA methyltransferase) es un gen reparador del ADN que protege a las células de la toxicidad de agentes alquilantes¹⁰⁷. Los agentes alquilantes son una de las drogas terapéuticas más utilizadas, que frecuentemente actúan modificando la posición O⁶ de la guanina. Por ello, su toxicidad, pero también su eficacia, disminuye en los tumores que expresan *MGMT*¹¹⁹.

Estudios previos han encontrado metilación del promotor de *MGMT* en el 36-76% de los DLBCLs^{107,112,114-116}, además, algunos de ellos la han asociado a un mejor pronóstico^{107,114-116}, si bien otros estudios no han encontrado ninguna asociación¹¹² (tabla 3).

Introducción

En los DLBCL gástricos, Huang y cols.¹¹⁷ encontraron el promotor de *MGMT* metilado en el 47% de los 32 casos analizados, pero no se ha estudiado su implicación pronóstica (tabla 3).

Metilación de *GSTP1*

El gen *GSTP1* (*Glutathione-S-transferase P1*) codifica para un isoenzima de GSTs que cataliza la conjugación de glutatión a algunos agentes anticáncer y está involucrado en la resistencia a agentes quimioterápicos¹⁰⁷.

La metilación de *GSTP1* en DLBCLs se ha encontrado en el 0% (n = 44)¹⁰⁷, 63% (n = 46)¹⁰⁸ y 23% (n = 53)¹¹² de los casos. En el estudio de Nakamichi y cols.¹¹² se vio una asociación entre la metilación de este promotor y mayor supervivencia, mientras que en otros estudios no se ha encontrado ninguna correlación con el pronóstico¹⁰⁸. En cuanto a los casos gástricos, ningún trabajo ha estudiado la metilación de *GSTP1* (tabla 3).

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los DLBCL gástricos, que presentan diferencias clínicas y biológicas respecto a los DLBCL nodales, son un tipo de linfomas de pronóstico variable. Se ha propuesto, aunque con resultados contradictorios, que la expresión de proteínas implicadas en la maduración de los linfocitos B podría ser marcador pronóstico en los DLBCL nodales. Sin embargo, la utilidad de los marcadores eficaces en DLBCL nodales no ha sido confirmada en los DLBCL gástricos. Por otro lado, la metilación de promotores, fenómeno frecuente en cáncer y con valor pronóstico en algunos casos, es una alteración epigenética frecuente en los DLBCL. En tejido gástrico, se ha visto que la infección por *H. pylori* en etapas preneoplásicas incrementa la metilación de promotores y que ésta puede estar implicada en la oncogénesis del cáncer gástrico. Sin embargo, la implicación de la metilación de promotores en la oncogénesis del DLBCL gástrico y el papel de *H. pylori* en los cambios epigenéticos no se ha analizado en los pacientes con DLBCL gástrico, así como tampoco su posible valor pronóstico.

Por ello, en este trabajo planteamos que algunos de los marcadores pronósticos clínicos, inmunohistoquímicos y/o epigenéticos utilizados en los DLBCL nodales pueden predecir la evolución y supervivencia de los pacientes con DLBCL gástrico.

OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo han sido, por un lado, caracterizar y clasificar los DLBCL gástricos utilizando marcadores con valor pronóstico que permitan predecir su evolución y, por otro lado, caracterizar el proceso de metilación en estos linfomas y estudiar la implicación de *H. pylori* en este proceso. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Identificar marcadores asociados al pronóstico. Para ello, se analizó la correlación entre la supervivencia global (SG) y libre de fallo (SLF) en los pacientes con DLBCL gástricos y:
 - Parámetros clínicos como el sexo, la edad, los niveles de LDH y β 2-MG en suero, la afectación ganglionar, la infiltración medular por el linfoma y los diferentes tratamiento
 - La presencia de la translocación t(11;18)(q21;q21)
 - La expresión de proteínas que se han descrito ya en otros linfomas
 - La metilación de promotores de genes implicados en la oncogénesis del DLBCL gástrico

2. Caracterizar el proceso de metilación en el DLBCL gástrico y determinar la implicación de *H. pylori* en la metilación de los promotores de los genes característicos del DLBCL gástrico
 - Análisis del patrón de metilación en los DLBCL gástricos, tejido gástrico sano de pacientes con tumor y controles gástricos de pacientes sin neoplasia
 - Detección de la infección por *H. pylori*
 - Correlación entre la infección por *H. pylori* y metilación en individuos controles y con DLBCL gástrico.

MATERIAL Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

En este estudio, se han incluido un total de 101 individuos: 43 casos de DLBCL gástricos y 58 controles de biopsias gástricas sin neoplasia. Casos y controles fueron emparejados por sexo y edad. Los casos de DLBCL gástrico fueron diagnosticados en los Hospitales Donostia, Txagorritxu y Galdakao (1985-2007) por personal cualificado, y los controles proceden del Hospital Donostia. La distribución por edad y género de casos y controles se describe en la tabla 4.

Tabla 4: Distribución por edad y género de los casos y controles estudiados

	Total	Controles	Casos
Participantes (n, %)	101	58 (57,4)	43 (42,6)
Edad (media, años)	61,87	59,1	64,65
Edad (rango, años)	9-91	9-85	0-91
Género (n, %)			
Masculino	62 (61,4%)	32 (55,2%)	30 (69,7%)
Femenino	39 (38,6%)	26 (44,8%)	13 (30,3%)

El diagnóstico de los casos fue confirmado mediante una revisión patológica, utilizando portaobjetos de cortes teñidos con hematoxilina-eosina y con técnicas inmunohistoquímicas, de acuerdo con la clasificación de la OMS⁶. Los controles se seleccionaron a partir de pacientes a los que se les realizó una biopsia gástrica sin presentar ninguna neoplasia.

De cada paciente con DLBCL gástrico se recogieron 7 parámetros clínicos (tabla 5), que se seleccionaron siguiendo los siguientes criterios:

Material y métodos

- Edad (mayor o menor de 60 años): en DLBCL nodales, una edad mayor o igual a 60 años se ha asociado a menor supervivencia⁴¹, si bien en DLBCL gástricos no se ha encontrado esta asociación^{28,29}.
- Sexo: en DLBCL nodales, el sexo masculino se ha asociado a menor supervivencia¹²³. También en casos gástricos se ha visto esta asociación²⁹, aunque ha sido discutida por otros trabajos²⁸.
- Nivel de LDH al diagnóstico: niveles aumentados de LDH han sido asociados a menor supervivencia en DLBCL nodales¹²³⁻¹²⁴. En DLBCL gástricos, su valor pronóstico no está claro, ya que Ibrahim y cols.²⁹ también observaron esta asociación, pero Hung y cols.²⁸ no vieron asociación pronóstica.
- Nivel de β 2-microglobulina (B2-MG) al diagnóstico: en DLBCL nodales¹²⁵ y también en gástricos²⁸, niveles aumentados de B2-MG se han asociado a menor supervivencia, aunque Ke y cols.¹²⁶ en un trabajo reciente con casos nodales, no han visto esta asociación.
- Afectación ganglionar por el linfoma: la diseminación del linfoma a ganglios linfáticos ha sido asociada a menor supervivencia en un grupo de linfomas MALT y DLBCL gástricos⁴³.
- Infiltración de la médula ósea: en DLBCL nodales, la infiltración medular por el linfoma se ha asociado a una menor respuesta al tratamiento¹²³.
- Tratamiento: en DLBCL gástricos, la implicación pronóstica de la gastrectomía no está clara, ya que algunos trabajos la asocian a una mayor supervivencia^{29,30} y otros no^{28,31}. Tampoco está claro el efecto de añadir Rituximab a la quimioterapia, ya que en DLBCL nodales se ha probado que mejora el pronóstico¹²⁷, pero en DLBCL gástricos no se ha analizado su impacto en la supervivencia.

Para realizar los análisis de supervivencia, en cada paciente se determinó la supervivencia global (SG: tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta fallecimiento o hasta última revisión) y la supervivencia libre de fallo (SLF: tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la recaída del linfoma, el fallecimiento o la última revisión) (tabla 5).

Tabla 5: Características clínicas de los pacientes con DLBCL gástrico

Característica		N (%)
Edad	< 60 años	16 (37,2)
	≥ 60 años	27 (62,8)
Sexo	Masculino	30 (69,7)
	Femenino	13 (30,3)
LDH*	Normal	18 (81,8)
	Aumentado	4 (18,2)
B₂-MG*	Normal	9 (52,9)
	Aumentado	8 (47,1)
Afectación ganglionar*	No	13 (46,4)
	Sí	15 (53,6)
Infiltración de la médula ósea*	No	21 (95,5)
	Sí	1 (4,5)
Tratamiento	Gastrectomía	4 (9,3)
	Gastrectomía + QT	22 (51,2)
	Gastrectomía + R-QT	5 (11,6)
	Gastrectomía + QT + RT	1 (2,3)
	Gastrectomía + desconocido	1 (2,3)
	QT	5 (11,6)
	R-QT	2 (4,7)
	Ninguno	2 (4,7)
	Desconocido	1 (2,3)
SG 5 años	Sí	31 (72,1)
	No	12 (27,9)
SLF 5 años	Sí	29 (67,4)
	No	14 (32,6)

Abreviaturas; N(%): número y porcentaje de casos, QT: quimioterapia, R-QT: quimioterapia con Rituximab, RT: radioterapia, SG: supervivencia global, SLF: supervivencia libre de fallo, *: parámetros no conocidos en todas las muestras.

Material y métodos

Tres de los pacientes con DLBCL gástrico fallecieron a causa de complicaciones tras la gastrectomía, por lo que se excluyeron de todos los análisis de supervivencia excepto del de asociación entre la realización de la gastrectomía y el pronóstico.

En cuanto a los controles, se tomaron los siguientes datos: sexo, edad y diagnóstico (tabla 6).

Tabla 6: Características clínicas de los controles

Característica		N (%)
Edad	< 60 años	29 (50)
	≥ 60 años	29 (50)
Sexo	Masculino	32 (55,2)
	Femenino	26 (44,8)
Diagnóstico	Sin alteraciones	13 (22,4)
	Gastritis crónica	35 (60,3)
	Úlcera	7 (12,1)
	Gastritis crónica y úlcera	3 (5,2)

Abreviaturas; N (%): número y porcentaje de casos

DETECCIÓN DE LA t(11;18)(q21;q21)

La presencia de la translocación t(11;18)(q21;q21) se determinó mediante hibridación *in situ* fluorescente o FISH. Este método está basado en la complementariedad de los ácidos nucleicos y consiste en hibridar células en interfase o metafase con sondas específicas de ADN marcadas con nucleótidos fluorescentes.

El FISH se realizó en cortes de tejido de 3 μm de cada biopsia con muestra representativa del tumor sobre portas cargados positivamente. Se utilizó la sonda de fusión *API2/MALT1* (Vysis, ref. 32-231007), compuesta por una mezcla de dos sondas: la sonda *API2* de 1 Mb, marcada con fluorocromo verde, que señala la región 11q21, y la sonda *MALT1* de 670 kb, marcada con fluorocromo rojo, que señala la región 18q21 (figura 26).

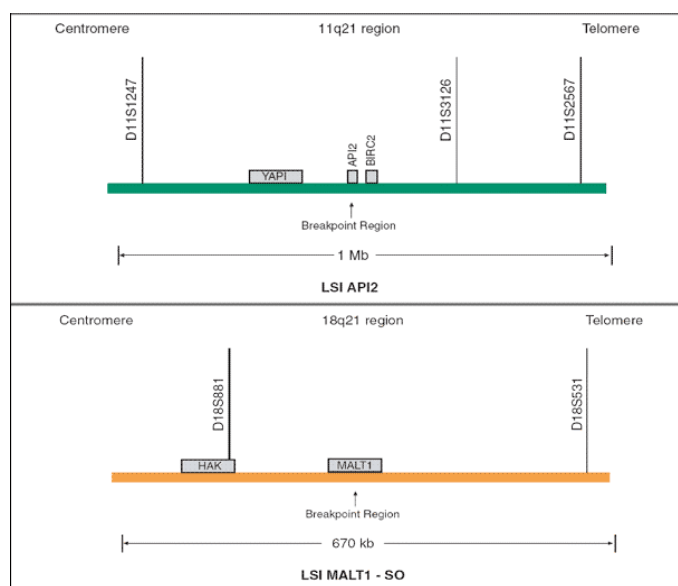


Figura 26: Esquema del marcaje de la sonda *API2/MALT1* (Vysis).

Las células sin la translocación presentan dos señales verdes y dos rojas separadas, mientras que las células con la translocación presentan una señal roja, una verde y dos señales de fusión (figura 27).

Material y métodos

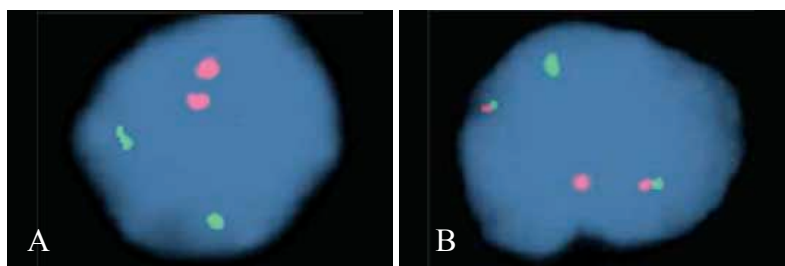


Figura 27: Resultado de la hibridación de la sonda de fusión *API2/MALTI* sobre (A) un núcleo normal y (B) un núcleo con la t(11;18).

Material

- Sonda de fusión *API2-MALTI* (Vysis)
- Xilol (Sigma-Aldrich)
- Etanol 100% (Merck)
- Agua bidestilada
- Tampón citrato pH 6,5 diluido a 1X (Dako)
- Tampón PBS (ver tabla 13)
- Proteínasa K en solución a 100mg/ml (Sigma-Aldrich)
- SSC en solución a 2X (Vysis)
- Solución de formol tamponado pH 4 (Oppac)
- Tampón de lavado 2X SSC/0,3% NP-40 (ver tabla 13)
- Contraste DAPI II (Vysis)
- Estufa (MMM-group)
- Olla a presión (Magefesa)
- Baño de agua (Selecta, Precisdig)
- Microcentrífuga (HERAEUS Biofuge pico)
- Placa calefactora (Selecta, Plactronic)
- Cámara húmeda (placa petri de plástico con papel de filtro humedecido con agua bidestilada)

Procedimiento

➤PASO 1. Desparafinación e hidratación

1. Incubar las muestras toda la noche a 56°C
2. Realizar 2 lavados de xilol durante 10 min cada uno
3. 2 lavados de etanol absoluto, 5 min cada uno
4. Dejar secar al aire

➤PASO 2. Pretratamiento

5. Llenar la olla a presión con tampón citrato 1X suficiente como para que al introducir el cestillo con los portas, éstos se cubran por completo
6. Poner a calentar y cuando comience a hervir introducir el cestillo con los portas
7. Tapar la olla y cronometrar 2 min desde que empiece a salir vapor
8. Abrir la olla y dejar enfriar (con los portas dentro de la olla con el tampón)
9. Lavar los portas en agua bidestilada

➤PASO 3. Digestión

10. Llenar un coplin con 50 ml de PBS 1X que debe estar previamente calentado (10-15 min) a 37 °C
11. Añadir 250 µl de proteinasa K (10 mg/ml) a este PBS 1X calentado y sumergir las muestras durante 15 minutos
12. Lavar 5 min en SSC (2X)
13. Secar al aire
14. Meter en formol tamponado, 10 min
15. Lavar 5 minutos en SSC (2X)
16. Secar al aire

➤PASO 4. Hibridación

17. Sacar la sonda de -20°C y tras descongelar, centrifugar unos segundos
18. Marcar con rotulador de vidrio la zona en la que está el tejido

Material y métodos

19. Mezclar en un tubo de 0,5 ml por cada muestra: 7 μ l de tampón de hibridación, 1 μ l de sonda y 2 μ l H₂O bd
20. Agitar la mezcla con vórtex y centrifugar unos segundos
21. Añadir 10 μ l de la mezcla sobre el tejido y tapar inmediatamente con un cubre (24 x 24 mm). Asegurarse de que la sonda se reparte bien por toda la zona en la que se encuentra el tejido, presionando ligeramente
22. Poner los portas en una placa calefactora a 90°C durante 4 minutos
23. Retirar los portas de la placa y envolverlos en parafilm
24. Meter los portas en una cámara húmeda, en horizontal y boca arriba. Incubar a 37 °C durante 14-18 horas

➤ PASO 5. Lavado

25. Precalentar un coplin con tampón de lavado post-hibridación durante 30 min en baño de agua, hasta que alcance $72 \pm 1^\circ\text{C}$.
26. Sumergir los portas en tampón post-hibridación a T^a ambiente sin parafilm. Eliminar los cubres con cuidado
27. Sumergir los portas 2 min en tampón post-hibridación a $72 \pm 1^\circ\text{C}$
28. Dejar secar al aire (pero no completamente) en vertical y en oscuridad
29. Poner 10 μ l de DAPI sobre el área de hibridación y cubrir con cubre grande (24 x 60)
30. Guardar a -20°C al menos durante 1 hora antes de observar al microscopio

➤ PASO 6. Visualización en microscopio de fluorescencia Olympus BX41

El resultado de las hibridaciones se determinó analizando las señales de 200 núcleos por muestra.

Un inconveniente de las sondas de fusión es la obtención de falsos positivos para la presencia de la translocación (las señales verde y roja pueden estar fusionadas por azar) o para la amplificación (más de dos señales verdes o rojas debido a la superposición de núcleos). Es preciso por ello establecer un

punto de corte a partir del cual la translocación y la amplificación se consideren positivas. Para ello, se tomaron seis biopsias de gastritis crónica y, tras realizar el FISH, se cuantificó en número de núcleos que presentaba un marcaje inespecífico (presencia de translocación o amplificación) en un total de 200 núcleos por muestra. El punto de corte se calculó realizando la media de los seis casos + 3 desviación estándar^{21,27} (tabla 7).

Tabla 7: Puntos de corte para la t(11;18) (1R1V2F y 1R1V1F), la amplificación de 18q21 (3R2V) y la de 11q21 (2R3V)

Señales	Interpretación	Media % de células	Punto de corte
1R 1V 2F	t(11;18)	0	3%
1R 1V 1F	t(11;18)	6	9%
≥3R 2V	Amplificación 18q21	1,4	4,4%
2R ≥3V	Amplificación 11q21	0,9	3,9%

Abreviaturas; R: señal roja, V: señal verde

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

La presencia o ausencia de proteínas se estudió por inmunohistoquímica. Para el análisis de Bcl-10, CD10, Bcl-2, Bcl-6 y Mum-1, se utilizaron anticuerpos comerciales de DAKO. Para BLIMP-1 y Gcet1, se utilizaron anticuerpos cedidos por el CNIO. La técnica se realizó en cortes de 4 µm sobre portas.

Material

- Xilol (Sigma-Aldrich)
- Etanol (Merck)
- Tampón citrato 1X (DAKO)
- Agua destilada
- Buffer para inmunohistoquímica (DAKO)

Material y métodos

- Peroxidasa (DAKO)
- Anticuerpos primarios (ver tabla 8)
- Envision (DAKO)
- Olla a presión (Magefesa)
- Autostainer Plus Universal Staining System (DAKO)

Procedimiento

➤PASO 1. Desparafinado, hidratación y pretratamiento de las muestras:

1. Incubar las muestras toda la noche en estufa a 60°C
2. Realizar dos pases de xilol de 5 min cada uno e hidratar mediante una serie de etanoles en concentración decreciente (100% y 96%) y finalmente en agua destilada.
3. Realizar un pretratamiento en olla a presión con tampón citrato 1X (pH 6,5 para CD10, Bcl-2 y MUM-1 y pH 9 para Bcl-10, Bcl-6, BLIMP-1 y Gcet1) durante 2 min.
4. Lavar las muestras en agua destilada e introducirlas en buffer para inmunohistoquímica hasta la posterior tinción.

➤PASO 2. Tinción inmunohistoquímica:

La tinción inmunohistoquímica se realizó utilizando el sistema Autostainer Plus Universal Staining System de DAKO, que la realiza de manera automatizada mediante el siguiente procedimiento:

5. Incubar las muestras con solución bloqueante peroxidasa durante 5 min para inhibir la peroxidada endógena.
6. Incubar con anticuerpo primario previamente diluido a la concentración adecuada para cada uno (tabla 8) durante 30 min.

Tabla 8: Referencia de anticuerpos utilizados, condiciones de pretratamiento y dilución de cada uno de ellos

Anticuerpo	Referencia	Pretratamiento	Dilución
CD10	M0727, Dako	Tampón citrato pH 6,5	1:15
Bcl-6	M7211, Dako	Tampón citrato pH 9	1:10
Gcet1	AM-015, CNIO	Tampón citrato pH 9	1:2
MUM-1	M7259, Dako	Tampón citrato pH 6,5	1:50
Bcl-2	M0887, Dako	Tampón citrato pH 6,5	1:250
BLIMP-1	AM-003, CNIO	Tampón citrato pH 9	1:2

➤**PASO 3. Visualización del anticuerpo:**

La visualización del anticuerpo también se realizó en el sistema Autostainer Plus Universal Staining System de DAKO, con el sistema EnVision de DAKO, mediante el siguiente procedimiento:

7. Incubar con el reactivo de detección, compuesto por un reactivo de dextrano unido a moléculas de peroxidasa y moléculas de anticuerpo secundario, que reaccionan tanto con inmunoglobulinas de conejo como de ratón.
8. Incubar con el sistema de sustrato, compuesto por diaminobenzidina concentrada (DAB), y por un buffer que contiene peróxido de hidrógeno. Este sistema produce un producto final marrón en el lugar del antígeno diana.
9. Incubar con hematoxilina para la contratinción de los núcleos.

➤**PASO 4: Visualización del resultado:**

Tras montar los portaobjetos con medio de montaje y cubreobjetos de 24x60 mm, el resultado de la inmunohistoquímica se visualizó en microscopio óptico, determinando las muestras positivas y negativas para cada marcador. Se consideraron como positivos los casos que presentaban más de un 30% de células marcadas con el anticuerpo (figura 28).

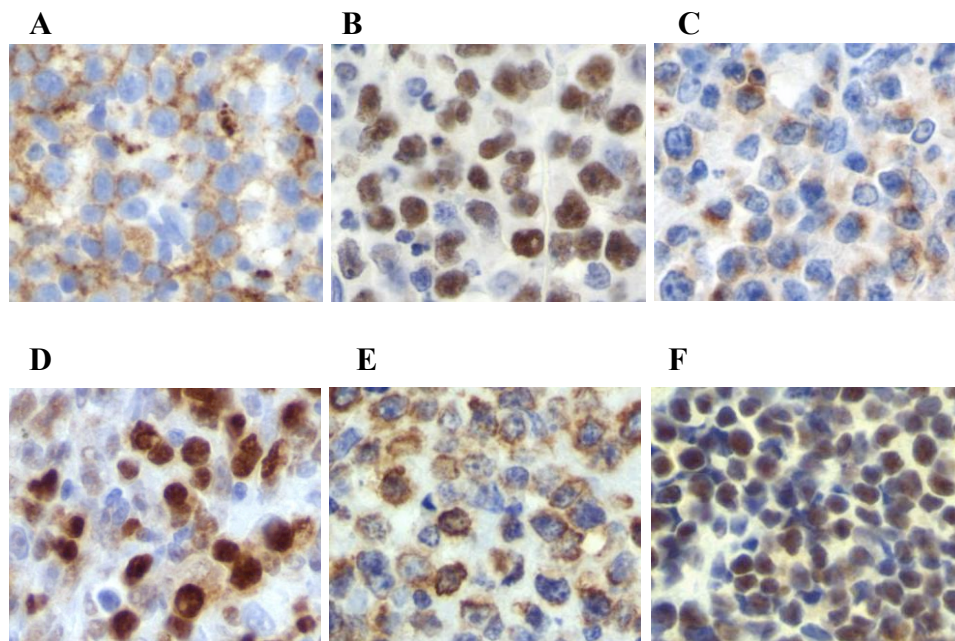


Figura 28: Casos positivos para la inmunohistoquímica de CD10 (A), Bcl-6 (B), Gcet-1 (C), MUM-1 (D), Bcl-2 (E) y Blimp-1 (F).

ANÁLISIS DE METILACIÓN DE PROMOTORES

Los estudios de metilación de ADN se realizaron con el objetivo de analizar el estado de metilación de los promotores de 14 genes. Estos análisis se realizaron utilizando la técnica de PCR específica de metilación (MSP). Esta técnica se basa en un tratamiento con bisulfito sódico del ADN genómico. Tal y como se puede ver en la figura 29, en la reacción con bisulfito, todas las citosinas no metiladas son deaminadas y sulfonadas, proceso que las transforma en uracilo, mientras que las 5-metilcitosinas se mantienen intactas.

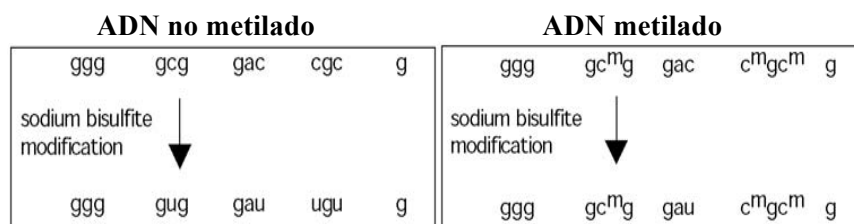


Figura 29: Resultado del tratamiento de ADN con bisulfito.

La modificación química con sodio bisulfito (ver protocolo “modificación de ADN con bisulfito”) crea diferencias entre las secuencias del ADN metilado y del no metilado. Esta técnica permite realizar una amplificación por PCR con cebadores específicos para distinguir entre ADN metilado y no metilado, técnica conocida como MSP. Los cebadores fueron seleccionados mediante revisión bibliográfica, o diseñados mediante el software “Methprimer” (<http://www.ucsf.edu/urogene/methprimer/html>), que se basa en el algoritmo Primer3¹²⁸. Teniendo en cuenta que la mayoría de islas CpG se encuentran dentro de los promotores de los genes, el área óptima para el diseño de cebadores fue la región rica en C-G más cercana al sitio de inicio de la transcripción. Los cebadores fueron diseñados de forma que contenían al menos 3 sitios CpG en su secuencia, uno de ellos al final del extremo 3’, para discriminar de manera más precisa entre ADN metilado y no metilado. Además, también contenían citosinas fuera de los puntos CpG, para así amplificar tan solo el ADN modificado con bisulfito. Las secuencias de los cebadores se describen en la tabla 9.

Tabla 9: Secuencias de los cebadores de MSP, tamaño de los productos de PCR, temperatura de anillamiento, ciclos de la reacción y referencia bibliográfica

Nombre	Cebadores (5'→3')	Tamaño (pb)	T° (°C)	Ciclos	Bibliografía
p16-U-F	TTATTAGAGGGTGGGTTGGATTGT	151	62	35	Min y cols., 2006 (94)
p16-U-R	CCATACAATAAACCAACCAACCAA				
p16-M-F	TTATTAGAGGGTGGGCGGATGCG				
p16-M-R	GACCCCGAACCGCGACCGTAA	150	62	35	
FHIT-U-F	TTGGGTGTGGGTTTGGGTTTTATG	74	64	35	Choi y cols., 2007 (129)
FHIT-U-R	CATAACAACAACCAACCCCACTA				
FHIT-M-F	TTGGGCGCGGTTTGGGTTTTACGC				
FHIT-M-R	CGTAAACGACGCCGCCCACTA	74	64	35	
p73-U-F	AGGGGATGTAGTGAATGGGTTTT	69	63	35	Kaneko y cols., 2003 (93)
p73-U-R	ATCACAAACCCAAACATCAACATCCA				
p73-M-F	GGACGTAGCGAAATCGGGTTTC	60	63	35	
p73-M-R	ACCCCGAACATCGACGTCCG				
p57-U-F	TTGGTTAGTTTTGAGTGA	139	58	40	Min y cols., 2006 (94)
p57-U-R	TCTACATATACAAAACAACAACAA				
p57-M-F	TCGGTTAGTTTTGAGCGAGC	133	58	35	
p57-M-R	TACGTATACGAAAACCGCAGCAGC				
CDH1-U-F	TTAGTAATTTTAGGTTAGGGTTATTGTG	125	58	35	DPL
CDH1-U-R	TTAACTAAAAATCACCTACCAAC				
CDH1-M-F	TAATTTAGGTTAGAGGTTATCGC	123	60	35	
CDH1-M-R	AAATTACTAAAAATTCACCTACCGAC				
p15-U-F	TGTGATGTTTTGTAATTTTGTGGTT	154	58	40	Shiozawa y cols., 2006 (109)
p15-U-R	CCATACAATAACCAACAACCAA				
p15-M-F	GCGTTCGTAATTTTGGGGTT	147	58	40	
p15-M-R	CGTACAATAACCGAACGACCGA				
ID4-U-F	TTTGAAAGGAGTGATTAGGATATTT	110	58	35	DPL
ID4-U-R	AAAAAATCTTTACTCAATAAACAAAC				
ID4-M-F	CGAAGGGAGTGATTAGGATATTC	108	58	35	
ID4-M-R	AAAAAATCTTTACTCAATAAACCGAC				

Tabla 9: Secuencias de los cebadores de MSP, tamaño de los productos de PCR, temperatura de anillamiento, ciclos de la reacción y referencia bibliográfica (continuación)

Nombre	Cebadores (5'-3')	Tamaño (pb)	Tª (°C)	Ciclos	Bibliografía
VHL-U-F	GTTGGAGGATTTTTGTGTATGT	70	58	35	Amara y cols., 2008 (108)
VHL-U-R	CCCAACCCAAACACCAAAA				
VHL-M-F	TGGAGGATTTTTTGGGTACGC	70	58	40	
VHL-M-R	GAACCGAACGGCGGAA				
DAP-k-U-F	GGAGGATAGTTGGATTGATTAATGTT	106	60	35	Nakamichi y cols., 2007 (112)
DAP-k-U-R	CAAAATCCCTCCCAACACAAA	98	60	35	
DAP-k-M-F	GGATAGTCGGATCGATTAAACGTC				
DAP-k-M-R	CCCTCCCAAACGCCGA				
BMP-6-U-F	TGTTTTATTGGTTGTTAGTTTGTG	101	58	35	Zhang y cols., 2007 (130)
BMP-6-U-R	CCAAACATAAACTTCTACACACC	100	58	35	
BMP-6-M-F	CGTTTTATTGGTTGTTAGTTTGTG				
BMP-6-M-R	CAACGLAAACTTCTACTACGGG				
ATM-U-F	GAAATTTGTTTTGTTGTTTTT	155	56	40	DPL
ATM-U-R	CAACTTAACATTTACACTCACCC	151	58	40	
ATM-M-F	ATTCGTTTTCGTTGTTTTT				
ATM-M-R	GACTTAACGTTTACGACTCGC				
hMLH1-U-F	TTTTGATGTAGTGTTTTATAGGGTTGT	124	58	35	Huang y cols., 2007 (117)
hMLH1-U-R	ACCACCTCATATAACTACCCACA	115	58	35	
hMLH1-M-F	ACGTAGACGTTTTTATAGGGTCCG				
hMLH1-M-R	CCTCATCGTAACACCGCGG				
MGMT-U-F	TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT	93	58	35	Nakamichi y cols., 2007 (112)
MGMT-U-R	AACTCCACACTTCCAAAACAAAACA	81	58	35	
MGMT-M-F	TTTCGACGTTGTAAGGTTTTCCG				
MGMT-M-R	GCACCTTCCGAAAACGAAACG				
GSTP1-U-F	GATGTTGGGTGTAGTGGTTGTT	97	59	35	Rossi y cols., 2004 (131)
GSTP1-U-R	CCACCCCAATACTAAATCACAAACA	91	59	35	
GSTP1-M-F	TTCCGGGTGTAGCGGTGTC				
GSTP1-M-R	GCCCCAATACTAAATCACGACG				

Abreviaturas, U: cebadores para ADN no metilado, M: cebadores para ADN metilado, F: forward, R: reverse, pb: pares de bases, Tª: temperatura, DPL: diseño y puesta a punto en nuestro laboratorio

Material y métodos

Para cada muestra se amplificó la secuencia metilada y no metilada. Como control negativo se utilizó ADN humano de placenta (Bioline). Como control específico de metilación se utilizó ADN de una biopsia gástrica fijada en formol e incluida en parafina, metilada con el enzima Sssl (ver protocolo “metilación de ADN”). También se incluyeron blancos (agua) y ADN genómico no modificado con bisulfito sódico. Las PCRs se realizaron en un volumen de reacción de 25 μ l (ver condiciones de PCR en la página 72). Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida al 8% (1,6 ml de bisacrilamida al 40%, 6,4 ml de TBE 1X, 28 μ l de persulfato amónico (PSA) y 14 μ l de TEMED).

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y los resultados se visualizaron con el sistema de documentación de geles Bio-Rad Gel Doc™ 2000. Para estimar el tamaño aproximado de los productos de PCR se utilizó el marcador de tamaño Hyperladder V.

La reacción de MSP se dio por válida cuando el control metilado presentaba la banda correspondiente al ADN metilado, el control no metilado la del ADN no metilado y el blanco y el ADN no modificado con bisulfito no presentaban ninguna banda. En cuanto a las muestras, se consideraron no metiladas las que tan solo presentaban la banda correspondiente al ADN no metilado, y como metiladas las que presentaban solo la banda de ADN metilado o ambas (figura 30). Las muestras que no amplificaron ninguna de las dos bandas se consideraron nulas.

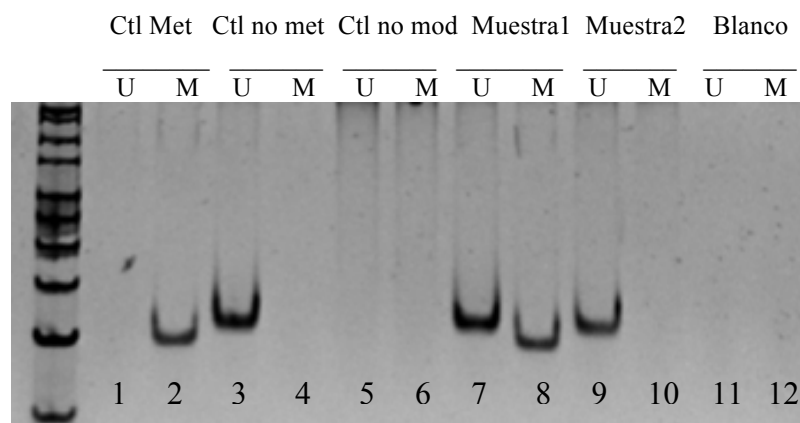


Figura 30: Resultado de PCR de metilación de *MGMT*. Calles 1 y 2: control metilado; calles 3 y 4: control no metilado; calles 5 y 6: control no modificado; calles 7 y 8: muestra metilada; calles 9 y 10: muestra no metilada; calles 11 y 12: blanco. En las calles M se han utilizado los primers que amplifican el ADN metilado y en las U los que amplifican en no metilado.

Abreviaturas: Ctl Met: control metilado, Ctl no met: control no metilado, Ctl no mod: control no modificado.

Material y métodos

Protocolo de PCR

	Tiempo	Temperatura	N° de ciclos
Preactivación	10 min	95°C	
Denaturalización	30 s	95°C	
Anillamiento	30 s	58°C-64°C	35-40
Extensión	30 s	72°C	
Extensión final	10 min	72°C	

Condiciones de la PCR

Reactivo (stock)	Concentración final
ADN (100 ng/μl)	100 ng
dNTPs (10 mM)	0,2 mM
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM
Buffer (10 X)	1 x
Cebador F (10 μM)	0,1 μM
Cebador R (10 μM)	0,1 μM
Enzima (Inmolasa 5 U/μl)	0,5 U
H ₂ O _{bd}	-

Condiciones de electroforesis

Gel: 8% de acrilamida

Buffer: TBE 1 X (*ver* Tabla 13)

Buffer de carga: 3 μl de Buffer de carga (*ver* Tabla 13)

Producto de PCR: 10 μl

Tiempo de electroforesis: 90 min a 20 mA

DETECCIÓN DE *Helicobacter pylori*

La detección de la bacteria *H. pylori* se realizó con dos técnicas diferentes: por visualización de las biopsias al microscopio y por nested-PCR.

DETECCIÓN POR VISUALIZACIÓN AL MICROSCOPIO

Los portaobjetos con cortes del tejido de 4 μm de grosor y teñidos con hematoxilina-eosina con muestra representativa de la mucosa gástrica fueron visualizados al microscopio óptico a 100 aumentos por personal cualificado, determinándose los casos negativos (figura 31A), positivos (figura 31B) y dudosos para la bacteria.

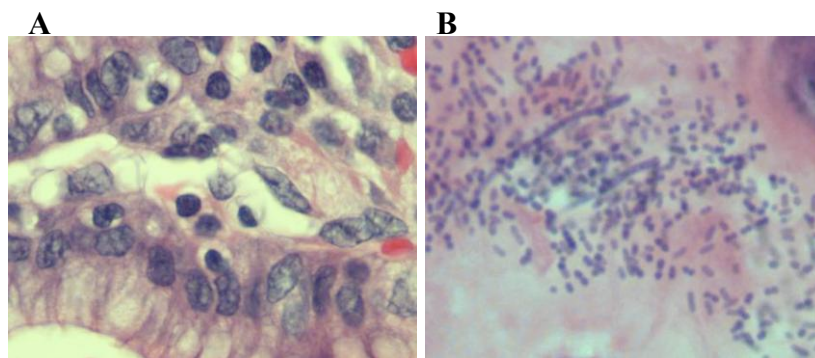


Figura 31: Visualización de la mucosa gástrica por microscopía a 100X aumentos. **A:** caso negativo para *H. pylori*; **B:** caso positivo para *H. pylori*.

DETECCIÓN POR NESTED-PCR

La detección de la bacteria *H. pylori* por nested-PCR se realizó mediante la amplificación del gen *SSA* (*Specie Specific Antigen*) (figura 32), considerado uno de los de mayor especificidad de la bacteria¹³². Los cebadores fueron diseñados con el programa Primer 3¹²⁸ (tabla 10).

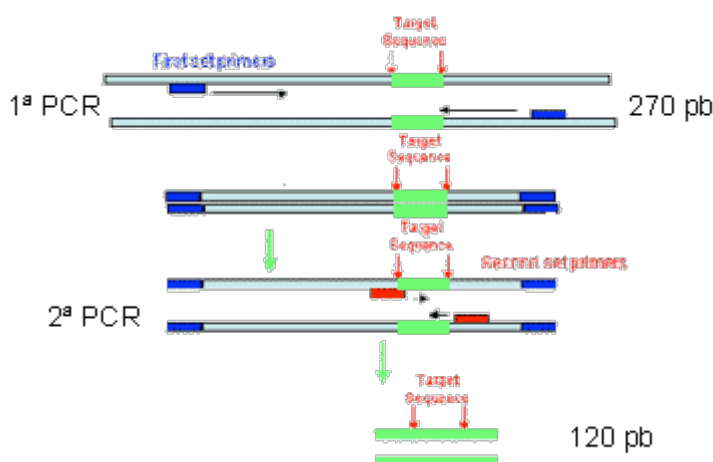


Figura 32: Esquema representativo de la amplificación del gen *SSA* de *H. pylori* por nested-PCR.

Tabla 10: Secuencia de los cebadores utilizados en la nested-PCR para la amplificación del gen *SSA* de *H. pylori*

		Secuencia (5'...3')	Tamaño (pb)
1ª PCR	<i>SSA1-F</i>	GCTTTAATGTGATTGGCGTGT	270
	<i>SSA1-R</i>	CTACCATGCGAAGCATTTC	
2ª PCR	<i>SSA2-F</i>	ATTTTCGCATGGAAAAACACC	120
	<i>SSA2-R</i>	TCGCTTCTTCAAACAGCACA	

La primera PCR se realizó en un volumen final de 25 µl utilizando 100 ng de ADN. La segunda PCR se realizó en el mismo volumen, añadiendo 3 µl de

producto de amplificado de la primera PCR (ver protocolo de PCR en la página 75). Los productos de la segunda PCR se separaron por tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% que contenían 5 µl de bromuro de etidio por cada 100 ml (ver las condiciones de electroforesis de la página 76). Los resultados se visualizaron bajo luz ultravioleta (254 nm) utilizando el sistema de documentación de geles Bio-Rad Gel Doc™ 2000. Para identificar el tamaño aproximado de las moléculas migradas en la electroforesis, se seleccionó el marcador de tamaño Hyperladder V (figura 33).

Protocolo de PCR

Reactivos (stock)	Concentración final	
	<u>1ª PCR</u>	<u>2ª PCR</u>
ADN (100 ng/µl)	100 ng	3 µl
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	
Buffer (10 X)	1 x	
Cebador F (10 µM)	0,1 µM	
Cebador R (10 µM)	0,1 µM	
Enzima (Immolasa 5 U/µl)	0,5 U	
H ₂ O bd	-	

Condiciones de la PCR

	Tiempo	Temperatura	Nº de ciclos
Preactivación	7 min	95°C	
Desnaturalización	30 s	95°C	
Anillamiento	30 s	60°C	35 ciclos
Extensión	30 s	72°C	
Extensión final	10 min	72°C	

Material y métodos

Condiciones de electroforesis

Gel: agarosa al 2%

Buffer: TBE 1 X

Buffer de carga: 4 µl de azul de bromofenol

Producto de PCR: 6 µl

Tiempo de electroforesis: 40 min a 90 V

Cada muestra fue analizada por triplicado para así testar una mayor cantidad de ADN (600 ng por muestra) y eliminar falsos negativos. Como control positivo, se utilizó una biopsia de gastritis crónica en la que se había comprobado la presencia de la bacteria en el microscopio óptico, y como control negativo una muestra de ADN de sangre periférica sin la bacteria.

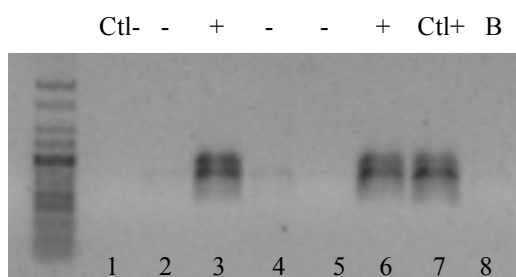


Figura 33: Resultado de PCR de metilación de *H. pylori*. Calle 1: control negativo; calles 2, 4 y 5: muestras negativas; calles 3 y 6: muestras positivas; calle 7: control positivo; calle 8: blanco.

Abreviaturas: Ctl-: control negativo, Ctl+: control positivo, -: muestra negativa, +: muestra positiva, B: blanco.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa StataSE 8.

La relación entre la presencia o ausencia de los diferentes marcadores clínicos, proteicos y de metilación de promotores estudiados y la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de fallo (SLF) se analizó mediante las curvas de supervivencia Kaplan-Meier y análisis estadístico log-rank. La SG se calculó desde el día del diagnóstico hasta la fecha de fallecimiento o de última revisión y la SLF, desde el día del diagnóstico hasta la fecha de recidiva del linfoma, fallecimiento o última revisión sin recidiva.

La relación entre las diferentes variantes nominales entre dos grupos se analizó mediante el test de Fisher. Mediante este análisis, se estudiaron las diferencias en el porcentaje de metilación entre los controles gástricos, el tejido gástrico sano de los pacientes con linfoma y el tejido tumoral del DLBCL gástrico, así como entre casos y controles con y sin presencia de *H. pylori*.

En todos los análisis se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

PROCESADO DE MUESTRAS. PROTOCOLOS

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

La extracción de ADN de cada muestra se realizó a partir de material incluido en parafina. Se utilizaron cinco cortes de 5 μm de grosor que se introdujeron en tubos de 1,5 ml. Finalmente, se siguió el método de fenol-cloroformo¹³³:

Material:

- Xilol (Sigma-Aldrich)
- Etanol (Merck)
- Agua bidestilada
- Buffer TE (ver tabla 13)
- Proteinasa K en dilución a a 10 mg/ml (Sigma-Aldrich)
- Fenol (USB)
- Cloroformo (Sigma-Aldrich)
- Isoamil alcohol (Sigma-Aldrich)
- Acetato sódico en solución a 2 M (Merck)
- Glucógeno en solución a 20 mg/ml (Roche)
- Microtubos 1,5 ml (Sarstedt)
- Baño de agua (Selecta, Precisdig)
- Microcentrífuga (HERAEUS Biofuge pico)
- Micropipetas (Labsystem Finnpipette)

Procedimiento:

1. Desparafinar las muestras añadiendo 1 ml de xilol a cada una y mezclar. Centrifugar durante 5 min a 13000 rpm y eliminar el sobrenadante. Repetir este paso nuevamente

2. Añadir 1 ml de etanol 100%, centrifugar 5 min y eliminar el sobrenadante. Repetir este paso con concentraciones decrecientes de etanol al 80%, 70% y finalmente con agua bidestilada
3. Proceder a la lisis celular mediante incubación de las muestras primero con 460 µl de Buffer TE a 100°C durante 20 min y después añadiendo 40 µl de proteinasa K (10 mg/ml) e incubando a 56°C durante toda la noche
4. Añadir 500 µl de fenol-cloroformo- isoamil alcohol en proporción 25:24:1, invertir las muestras para homogeneizar las fases y centrifugar durante 10 min a 13.000 rpm. Esta centrifugación permite la separación de las muestras en dos fases: una superior acuosa, que contiene el ADN, y otra inferior fenólica, que se debe desechar. Con ayuda de una pipeta, recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo previamente etiquetado
5. Precipitar el ADN añadiendo acetato sódico 2M en proporción 1/10 a la fase acuosa, 1 µl de glucógeno (20 mg/ml) y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Para permitir la total precipitación del ADN, incubar durante 1 hora a -20°C
6. Centrifugar durante 20 min a 13.000 rpm y eliminar el sobrenadante
7. Lavar el pellet de ADN con 1 ml de etanol 80% frío y centrifugar de nuevo 5 min a 13.000 rpm, volviendo a eliminar el sobrenadante
8. Dejar secar el pellet de ADN al aire y finalmente resuspenderlo en 20 µl de H₂O bidestilada estéril

CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LA CALIDAD DEL ADN

La concentración y pureza del ADN fueron medidos con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Para determinar la pureza, se utilizó el ratio de absorbancia a 260 y 280 nm, considerando como ADN “puro” un ratio de ~1,8.

Material y métodos

El ADN extraído del material incluido en parafina suele ser habitualmente de baja calidad. Hay varios factores que afectan a su integridad y a la amplificación por PCR como son el espesor del tejido, el tipo y tiempo de fijación, el tiempo de almacenamiento, el proceso de extracción de ADN y la presencia de inhibidores de PCR. Por ello, es necesario evaluar su estado antes de utilizarlo en técnicas moleculares. Para ello, se utilizó la PCR multiplex control BIOMED-2¹³⁴. En este protocolo, se utilizan cinco pares de cebadores de genes control para amplificar productos de exactamente 100, 200, 300, 400 y 600 pb (tabla 11).

Tabla 11: Genes seleccionados para determinar la calidad del ADN

Gen	Símbolo	Exon	GenBank	Tamaño
<i>Human thromboxane synthase gene</i>	<i>TBXAS1</i>	exon 9	D34621	100 bp
<i>Human recombination activating gene</i>	<i>RAG1</i>	exon 2	M29474	200 bp
<i>Human promyelocytic leukaemia zinc-finger gene</i>	<i>PLZF</i>	exon 1	AF060568	300 bp
<i>Human AF4 gene</i>	<i>AF4</i>	exon 11	Z83687	400 bp
<i>Human AF4 gene</i>	<i>AF4</i>	exon 3	Z83679	600 bp

Las secuencias de los cebadores utilizados en la PCR se describen en la figura 34.

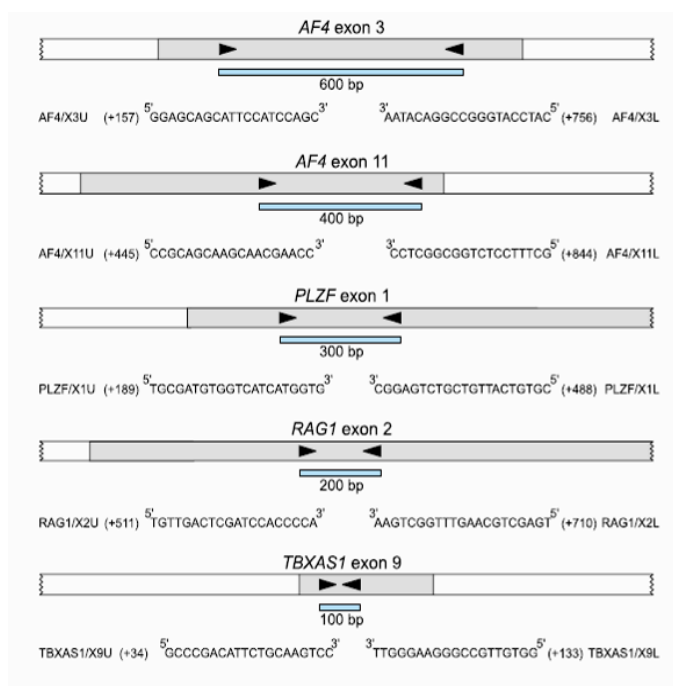


Figura 34: Diagrama esquemático de los cinco exones control y los cinco pares de cebadores para la obtención de los productos de PCR de 600, 400, 300, 200 y 100 bp, respectivamente (Leukemia 2003; 17:2257-317)¹³⁴.

La PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l, utilizando 100 ng de ADN (ver protocolo de PCR de la página 82). Los productos de PCR se separaron por tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, los cuales contenían 5 μ l de bromuro de etidio por cada 100 ml (ver las condiciones de electroforesis de la página 82). Los resultados se visualizaron bajo luz ultravioleta (254 nm), utilizando el sistema de documentación de geles Bio-Rad Gel Doc™ 2000. Para identificar el tamaño aproximado del tamaño de las moléculas migradas en la electroforesis, se seleccionó el marcador de tamaño Hyperladder V.

Material y métodos

Protocolo de PCR

Reactivos (stock)	Concentración final
ADN (100 ng/μl)	100 ng
dNTPs (10 mM)	0,2 mM
MgCl ₂ (50 mM)	2 mM
Buffer (10 X)	1 X
Cebador F (10 μM) (AF4ex3)	5 pmol
Cebador F (10 μM) (TBXAS1, RAG1, PLZF, AF4ex11)	2,5 pmol
Cebador R (10 μM) (AF4ex3)	5 pmol
Cebador R (10 μM) (TBXAS1, RAG1, PLZF, AF4ex11)	2,5 pmol
Enzima (Immolasa 5 U/μl)	0,5 U
H ₂ O bd	-

Condiciones de la PCR

	Tiempo	Temperatura	N° de ciclos
Preactivación	10 min	95°C	
Desnaturalización	30 s	95°C	
Anillamiento	30 s	60°C	30 ciclos
Extensión	30 s	72°C	
Extensión final	10 min	72°C	

Condiciones de electroforesis

Gel: agarosa al 2%

Buffer: TBE 1 X

Buffer de carga: 4 μl azul de bromofenol

Producto de PCR: 6 μl

Tiempo de electroforesis: 40 min a 90 V

TRATAMIENTO DEL ADN CON BISULFITO SÓDICO

La conversión del ADN con bisulfito sódico se realizó con el kit comercial CpGenome™ DNA Modification kit (Chemicon® International), siguiendo el protocolo del fabricante:

Material

- Muestras de ADN (3 µg)
- CpGenome DNA Modification kit (Chemicon International)
- NaOH en solución a 3M (Sigma-Aldrich)
- Etanol (Merck)
- Microtubos 1,5 ml (Sarstedt)
- Pipetas Pasteur (3 ml) (Sarstedt)
- Microcentrífuga (HERAEUS® Biofuge pico)
- Baño de agua (Selecta, Precisdig)

Procedimiento

➤ PASO 1. Modificación de ADN

1. Añadir 7 µl de 3 M NaOH a 3 µg de ADN en 100 µl de agua y mezclar
2. Incubar el ADN durante 10 min a 50°C
3. Añadir 550 µl de reactivo de modificación I recién preparado y mezclar
4. Incubar a 50°C durante 4-16 horas protegido de la luz

➤ PASO 2. Lavado inicial

5. Resuspender el reactivo de modificación III en vortex
6. Añadir 5 µl de reactivo de modificación III a los tubos con la solución de ADN
7. Añadir 750 µl de reactivo de modificación II recién preparado y mezclar

Material y métodos

8. Incubar a temperatura ambiente durante 5-10 min
9. Centrifugar durante 10 seg a 5.000 X g para precipitar el reactivo de modificación III. (Se verá un pequeño pellet blanco). Descartar el sobrenadante
10. Añadir 1 ml de EtOH 70%, mezclar, centrifugar durante 10 seg a 5.000 X g, y descartar el sobrenadante. Realizar este paso 3 veces
11. Tras descartar el sobrenadante por tercera vez, centrifugar los tubos a máxima velocidad durante 2 min y eliminar el sobrenadante restante

➤ PASO 3. Finalización de la modificación de ADN (Desulfonación), segundo lavado y dilución

12. Añadir 50 µl de 20 mM NaOH/90% EtOH a cada muestra
13. Mezclar para resuspender el pellet e incubar a temperatura ambiente durante 5 min
14. Centrifugar durante 10 seg a 5.000 X g para precipitar todo el contenido al fondo del tubo. Añadir 1 ml de EtOH 90% y mezclar para limpiar el pellet. Centrifugar de nuevo y eliminar el sobrenadante. Repetir este paso una vez más
15. Tras eliminar el sobrenadante por segunda vez, centrifugar las muestras a máxima velocidad durante 3 min
16. Eliminar el sobrenadante restante. Dejar secar el pellet durante 10-20 min a temperatura ambiente
17. Añadir 30 µl de buffer TE (ver tabla 13)
18. Incubar las muestras durante 15 min a 60°C para diluir el ADN
19. Centrifugar a máxima velocidad durante 2-3 min y transferir las muestras (el sobrenadante) a un nuevo tubo

METILACIÓN DEL ADN

La obtención de un ADN totalmente metilado se realizó mediante el enzima Sssl (New England Biolabs), que metila toda las citosinas (C5) de los sitios CpG reconociendo la secuencia 5'...CG...3'.

Material

- NEBuffer2 10X (New England Biolabs)
- SAM 1600 μ M (New England Biolabs)
- 1 μ g de DNA extraído de biopsia fijada en formol e incluida en parafina
- Sssl metilasa (4 U/ μ l) (New England Biolabs)
- Fenol (USB)
- Cloroformo (Sigma-Aldrich)
- Isoamil alcohol (Sigma-Aldrich)
- Acetato sódico en solución a 2 M (Merck)
- Glucógeno en solución a 20 mg/ml (Roche)
- Microtubos 1,5 ml (Sarstedt)
- Baño de agua (Selecta, Precisdig)
- Microcentrífuga (HERAEUS® Biofuge pico)
- Micropipetas (Labsystem Finnpiptete)

Procedimiento

➤PASO 1. Metilación del ADN

1. Añadir en orden por cada muestra (Nota: trabajar en hielo):
 - 35 μ l de H₂O estéril
 - 5 μ l de NEBuffer2 10X
 - 5 μ l de SAM 1600 μ M
 - 4 μ l de ADN (1 μ g de ADN)
 - 1 μ l de Sssl metilasa (4 U/ μ l)
2. Mezclar bien pipeteando arriba y abajo

Material y métodos

3. Incubar 2-4h a 37°C
4. Parar la reacción calentando 20 min a 65°C

➤PASO 2. Purificación del ADN

5. Añadir a cada muestra 50 µl de H₂O esteril y 200 µl de fenol-cloroformo-isoamil alcohol en proporción 100:96:4. Mezclar bien para homogeneizar las fases
6. Centrifugar 10 min a 13000 rpm y recuperar la fase acuosa en otro tubo
7. Añadir a cada muestra 1/10 volumen de acetato sódico 2M, 1 µl de glucógeno (20mg/ml) y 2 volúmenes de EtOH absoluto frío (-20°C)
8. Incubar 1 h a -20°C
9. Centrifugar 20 min a 13.000 rpm y desechar el sobrenadante
10. Lavar añadiendo 1 ml de EtOH 80% frío
11. Centrifugar 5 min a 13.000 rpm y desechar el sobrenadante
12. Dejar secar el ADN
13. Resuspender el ADN en H₂O estéril, ajustándolo a la concentración deseada

REACTIVOS

Tabla 12: Lista de reactivos utilizados

Reactivo	Técnica	Casa comercial	Referencia
Sonda API2/MALT1	FISH	Vysis	32-231007
Xilol	FISH, IHQ, extracción ADN	Oppac	UN-1307
Etanol absoluto	FISH, IHQ, extracción ADN	Merck	100983.1000
Tampón Citrato pH 6.5	FISH, IHQ	Dako	S2031
Proteinasa K	FISH / Extracción ADN	Sigma-Aldrich	P2308
NaCl	FISH	Merck	106404
KCl	FISH	Sigma-Aldrich	P9541
Na ₂ HPO ₄	FISH	Panreac	131721
K ₂ HPO ₄	FISH	Panreac	132333
SSC 20X	FISH	Vysis	32-804850
Formol tamponado	FISH	Oppac	021TC0000
Igepal (NP-40)	FISH	Vysis	32-804818
DAPI II	FISH	Vysis	32-804831
Tampón citrato pH 9	IHQ	Dako	
Buffer para IHQ	IHQ	Dako	S2022
Bloqueante Peroxidasa	IHQ	Dako	S2023
EnVision	IHQ	Dako	K5007
Hematoxilina	IHQ	Dako	S3301
Medio de montaje	IHQ		
Tris base	Extracción ADN / Electroforesis	USB	75825
EDTA	Extracción ADN / Electroforesis	Sigma-Aldrich	E-5134
Fenol ultrapuro	Extracción ADN	USB	75829
Cloroformo	Extracción ADN	Sigma-Aldrich	C2432
Isoamilalcohol	Extracción ADN	Sigma-Aldrich	I9392
NaAc	Extracción ADN	Merck	6268
Glucógeno	Extracción ADN	Roche	901393
Cebadores	PCR	Bonsai Technologies	-
dNTPs	PCR	Bioline	39028
Immolase™ DNA polimerase	PCR	Bioline	21047

Tabla 12: Lista de reactivos utilizados (continuación)

Reactivo	Técnica	Casa comercial	Referencia
Agarosa D-1 Low EEO	Electroforesis	Pronadisa	8016
Buffer de carga azul de bromofenol	Electroforesis	Sigma-Aldrich	B-6896
Glicerol	Electroforesis	Merck	1.040.921.000
Ácido bórico	Electroforesis	Panreac	131015
Hyperladder V	Electroforesis	Bioline	33031
Bromuro de etidio	Electroforesis	BioRad	161-0433
CpGenome DNA Modification kit	Modificación con bisulfito	Chemicon International	S7820
β-Mercaptoetanol	Modificación con bisulfito	Sigma-Aldrich	M-7522
NaOH	Bisulfite conversion	Panreac	1.416.871.211
AND humano de placenta	MSP	Bioline	35025
Acilamida	Electroforesis	BioRad	161-144
TEMED	Electroforesis	BioRad	161-0800
Persulfato amónico	Electroforesis	BioRad	161-0700
Buffer de carga 5X	Electroforesis	BioRad	161-0767
Kit Enzima Sssl	Metilación de ADN	New England Biolabs	M0226S

Tabla 13: Preparación de tampones y soluciones

Solución	Preparación
PBS 10 X	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ en 800 ml de H ₂ O destilada. Ajustar pH a 6,8 con HCl. Añadir H ₂ O hasta 1 litro. Esterilizar en autoclave. Preparar dilución 1:10.
2X SSC/0,3% NP-40	5 ml SSC 20X, 150 µl NP-40. Añadir H ₂ O hasta 50 ml.
Buffer TE	Tris 10 mM, EDTA 1 mM en volumen final de disolución. Ajustar pH a 9. Esterilizar en autoclave
Azul de bromofenol	2 ml EDTA 0,5 M pH=8; 5 ml glicerol 100%; azul de bromofenol. Enrasar volumen a 10 ml con agua destilada.
TBE 10X	Tris 1,34 M; ácido bórico 749 mM; EDTA 25,5 mM. Ajustar a pH=7,3
NaOH 3M	1 g NaOH / 8,3 ml agua destilada
20 mM NaOH/90% EtOH	Combinar 900 µl de 100% EtOH, 93,4 µl de H ₂ O y 6,6 µl de 3 M NaOH
Reactivo I Chemicon	Por cada muestra a modificar, pesar 0,227 g de Reactivo de Modificación I y añadir a 0,571 ml de agua. Mezclar para disolver. Ajustar el pH a 5,0. Proteger de la luz. Para mejores resultados, este reactivo debe utilizarse inmediatamente tras su preparación
Reactivo II Chemicon	Añadir 1 µl de β-mercaptoethanol a 20 ml de agua destilada. Añadir 750 µl de esta solución a 1,35 g de Reactivo de Modificación II por cada muestra a modificar. Mezclar hasta disolver completamente.
SAM 1600 µM	Por cada muestra a metilar, mezclar 0,25 µl de SAM 32 mM con 4,75 µl de agua destilada estéril

RESULTADOS

CORRELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y EL PRONÓSTICO

Se seleccionaron 8 parámetros clínicos que han sido implicados con el pronóstico de pacientes con DLCBL nodales o gástricos. Se analizó la correlación de dichos parámetros con la SG y la SLF en los DLCBL gástricos, tal como se describe en la tabla 14.

Tabla 14: Correlación entre los parámetros clínicos y la SG y la SLF.

Parámetro		N (%)	SG 5 años N (%)	p	SLF 5 años N (%)	p
Sexo	Hombre	27 (67,5)	20 (74,1)	0,4203	18 (66,7)	0,2207
	Mujer	13 (32,5)	11 (84,6)		11 (84,6)	
Edad	< 60 años	15 (37,5)	13 (86,7)	0,2674	13 (86,7)	0,1162
	≥ 60 años	25 (62,5)	18 (72)		16 (64)	
LDH	Normal	18 (81,8)	16 (88,9)	0,4239	16 (88,9)	0,0004*
	Aumentado	4 (18,2)	3 (75)		1 (25)	
β2-MG	Normal	9 (52,9)	8 (88,9)	0,7443	8 (88,9)	0,0695
	Aumentado	8 (47,1)	7 (87,5)		5 (62,5)	
Afectación ganglionar	No	13 (50)	12 (92,3)	0,1199	12 (92,3)	0,1285
	Sí	13 (50)	9 (69,2)		9 (69,2)	
Infiltración medular	No	21 (95,5)	18 (85,7)	-	18 (85,7)	-
	Sí	1 (4,5)	0 (0)		0 (0)	
Gastrectomía	No	10 (23,3)	6 (60)	0,1469	5 (50)	0,0526
	Sí	33 (76,7)	26 (78,8)		25 (75,6)	
Tratamiento	QT	22 (81,5)	19 (86,4)	0,5137	18 (81,8)	0,4303
	QT+Ritux	5 (18,5)	5 (100)		5 (100)	

Abreviaturas; N (%): número y porcentaje de casos, QT: quimioterapia; Ritux: Rituximab, SG: supervivencia global, SLF: supervivencia libre de fallo.

*Valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

SEXO Y EDAD AL DIAGNÓSTICO

La frecuencia de varones fue superior a la de mujeres, tal que como se ha descrito para esta patología. Los hombres presentaron una SG y una SLF ligeramente menores que las mujeres, aunque no estadísticamente significativas ($p = 0,4203$ y $0,2207$, respectivamente) (figura 35). De los 27 varones, 7 (25,9%) fallecieron antes de los 5 años y en otros 2 casos (7,4%) se observó una recaída durante este tiempo. En el grupo de mujeres, sólo dos pacientes de las 13 que componían la muestra (15,4%) no sobrevivieron a los 5 años.

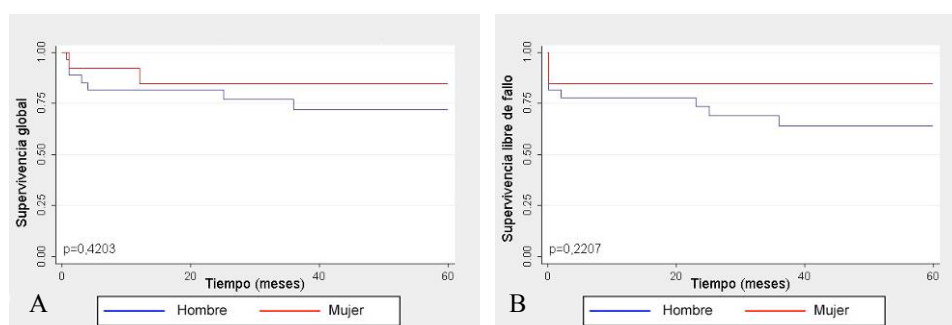


Figura 35: Asociación entre sexo y SG (A) y SLF (B) en DLBCL gástricos, estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Por otro lado, atendiendo a la edad de los individuos se detectó una menor SG y SLF en el grupo de individuos mayor de 60 años (figura 36), aunque no se llegó a alcanzar un valor estadísticamente significativo ($p = 0,2674$ y $p = 0,1162$, respectivamente). Siete de los 25 individuos mayores de 60 años (28%) fallecieron antes de 5 años y en dos pacientes (8%) hubo recaída. En el grupo menor de 60 años, de 15 individuos, fallecieron tan solo dos (13,3%).

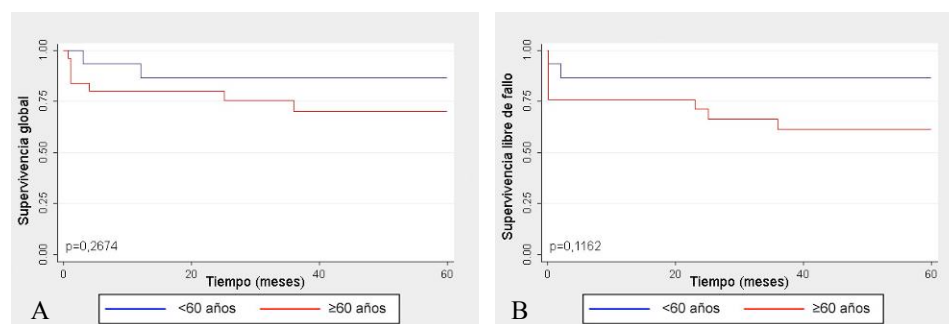


Figura 36: Asociación entre edad y SG (A) y SLF (B) en DLBCL gástricos, estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

NIVELES DE LDH Y β 2-MG EN EL SUERO

Los casos con nivel de LDH aumentado presentaron una menor SG y SLF (figura 37), siendo esta diferencia estadísticamente significativa en el caso de la SLF ($p = 0,0004$). De los cuatro pacientes con nivel de LDH aumentado uno (25%) falleció y otros dos (50%) presentaron recaída dentro del plazo de 5 años. De los 18 pacientes con valores de LDH normales, sólo dos (11,1%) fallecieron en ese período. Por lo tanto, en nuestra muestra de DLBCL gástricos, los casos con LDH aumentado presentaron menor supervivencia, ya que tan solo uno (25%) de los pacientes con niveles aumentados de LDH sobrevivió sin recaída, frente a los 16 pacientes (88,9%) que sobrevivieron cuando los valores de LDH fueron normales.

Resultados

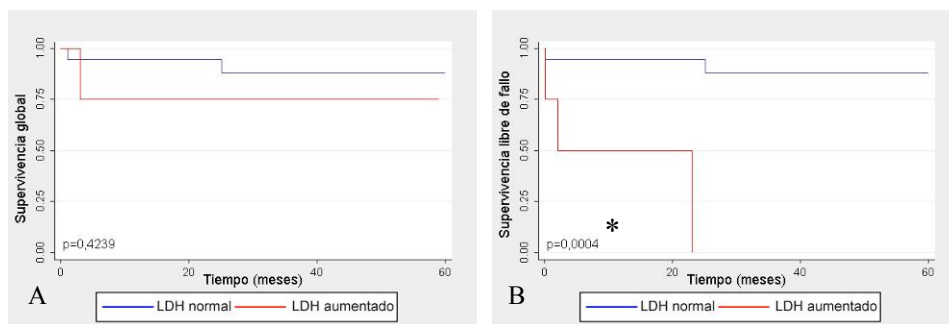


Figura 37: Asociación entre niveles en suero de LDH y SG (A) y SLF (B) en DLBCL gástricos, estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

*Valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

El nivel de β_2 -MG no se asoció con la SG ($p = 0,7443$), pero sí se vio una asociación que fue casi significativa entre los niveles aumentados de esta proteína y una menor SLF ($p = 0,0695$) (figura 38). De los 8 individuos con niveles superiores a 2,4 mg/l, uno (12,5%) falleció al mes del diagnóstico y en otros dos casos (25%) se observó una recaída, mientras que en el grupo de 9 pacientes con niveles normales de β_2 -MG tan solo uno (11,1%) falleció.

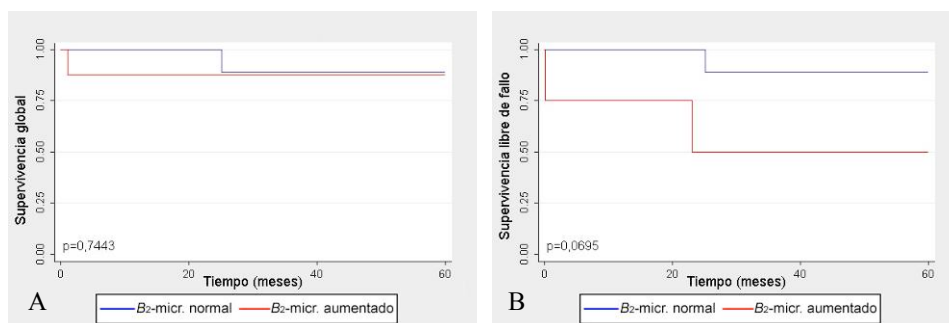


Figura 38: Asociación entre niveles en suero de β_2 - microglobulina y SG (A) y SLF (B) en DLBCL gástricos, estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

AFECCIÓN GANGLIONAR POR EL LINFOMA

En los casos en los que había afectación ganglionar, se observó una disminución en la SG y la SLF desde los primeros meses de seguimiento (figura 39), aunque sin presentar una significación estadística ($p = 0,1199$ y $p = 0,1285$, respectivamente). De los 13 casos positivos para la afectación ganglionar, 4 pacientes (30,8%) fallecieron. En cambio, de los 13 casos negativos, sólo uno (7,7%) falleció.

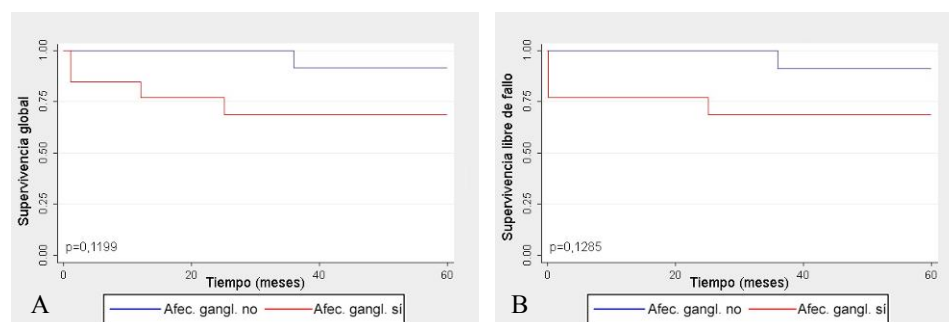


Figura 39: Asociación entre presencia o ausencia de afectación ganglionar y SG (A) y SLF (B) en DLBCL gástricos, estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

INFILTRACIÓN DE LA MÉDULA ÓSEA

De los 22 casos en los que se pudo valorar la infiltración de la médula ósea sólo uno fue positivo, por lo que no se pudo realizar el análisis estadístico de supervivencia. No obstante, este paciente con infiltración medular falleció a los 3 meses del diagnóstico.

TRATAMIENTO

En aquellos casos en los que se había realizado una gastrectomía, los pacientes presentaron mayor SG y mayor SLF, no llegando a ser significativa, en el caso de SLF quedó muy cerca del valor significativo ($p = 0,1469$ y $p = 0,0526$, respectivamente) (figura 40). De los 33 pacientes gastrectomizados, 7 individuos (21,2%) no sobrevivieron a los 5 años y uno (3,0%) no respondió al tratamiento, mientras que de los 10 no gastrectomizados, 4 pacientes (40%) fallecieron antes de los 4 meses y otro (10%) sufrió una recaída del linfoma a los 23 meses.

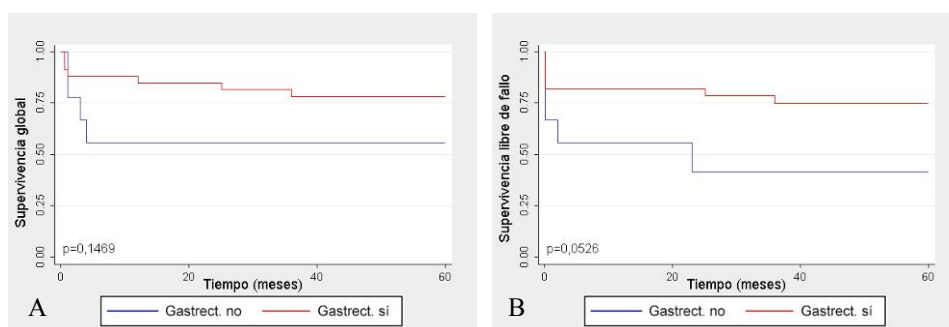


Figura 40: Asociación entre gastrectomía y SG (A) y SLF (B) en DLBCL gástricos, estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Por otro lado, entre los pacientes gastrectomizados, al comparar el grupo de pacientes a los que se les administró sólo quimioterapia con los que recibieron también Rituximab se observó una ligera disminución de la SG y la SLF en el grupo que no recibió Rituximab, aunque estadísticamente no hubo diferencias significativas entre ambos grupos (figura 41). Ninguno de los 5 pacientes a los que se dio el anti-CD20 falleció, mientras que de los otros 22 pacientes, 3 (13,6%) fallecieron y uno (4,5%) recayó.

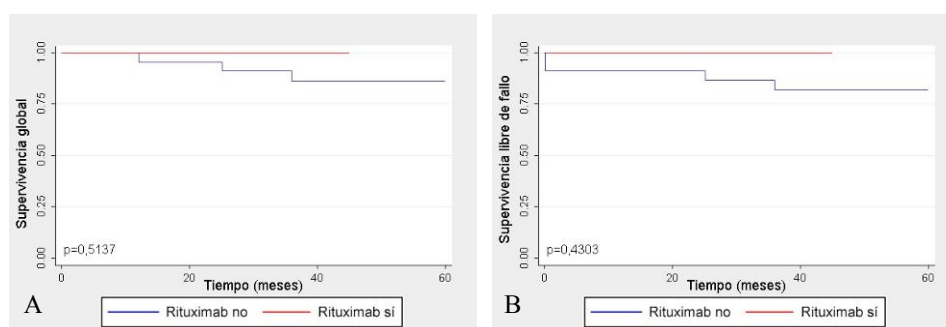


Figura 41: Asociación entre tratamiento con Rituximab y SG (A) y SLF (B) en DLBCL gástricos, estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Por lo tanto, de todos los marcadores clínicos analizados, el nivel aumentado de LDH en suero mostró asociación con una menor supervivencia en DLBCL gástricos. Cabe resaltar que la realización de la gastrectomía parece estar asociada a una mayor SLF.

LA TRANSLOCACIÓN $t(11;18)$ EN LOS DLBCL GÁSTRICOS Y EL PRONÓSTICO

La translocación $t(11;18)$ se ha considerado como un marcador de resistencia al tratamiento con antibióticos en los linfomas MALT y, en algunos casos, se ha sugerido que también en los DLBCL gástricos. En este trabajo, analizamos la presencia de la translocación en 43 DLBCL gástricos y obtuvimos señal de la hibridación por FISH en 38 casos.

Ninguno de los 38 casos presentó la $t(11;18)$. Todos los casos excepto uno presentaron 2 señales verdes y dos rojas separadas (figura 42A), características de las células sin la translocación.

Resultados

En uno de los casos se detectó una amplificación de la región 11q21, en la que se encuentra el gen API2, el 91% de los núcleos analizados presentaron dos señales rojas y entre 4 y 6 señales verdes (figura 42B). En este paciente, la evolución fue desfavorable, ya que tras realizar una gastrectomía, falleció en el periodo de un mes.

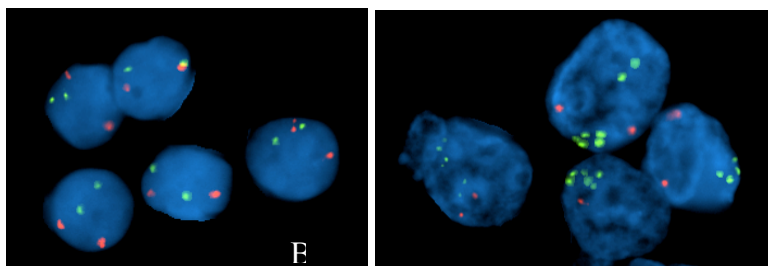


Figura 42: DLBCL gástrico sin translocación t(11;18) (API2-MALT1) (A) , y caso con amplificación de la región 11q21 (API2) (B). Núcleo teñido con DAPI (azul), gen API2 (verde) y gen MALT1 (rojo).

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS Y SU ASOCIACIÓN CON EL PRONÓSTICO

En los DLBCL nodales, se han descrito algoritmos inmunohistoquímicos y proteínas con valor pronóstico. Por otro lado, se sabe que la localización de los DLBCL implica diferencias clínicas y biológicas. Por ello, en este apartado evaluaremos la eficacia de estos marcadores pronósticos en los DLBCL gástricos.

ALGORITMOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Mediante el algoritmo de Hans, 21 casos (48,8%) de los 43 DLBCL gástricos analizados se clasificaron como de tipo CG, 19 casos (44,2%) se clasificaron como no-CG y los 3 casos restantes (7,0%) no se pudieron valorar.

En los 21 casos de tipo CG, 13 fueron positivos para CD10 y 8 negativos para CD10 y MUM-1 y positivos para Bcl-6, mientras que de los 19 casos no-CG, todos fueron negativos para CD10, 15 de ellos también fueron negativos para Bcl-6 y 4 casos fueron positivos para Bcl-6 y MUM-1.

Al analizar el valor pronóstico de esta clasificación (tabla 15), no se encontraron diferencias entre los DLBCL gástricos de tipo CG o no-CG ni en la SG ($p = 0,3727$) ni en la SLF ($p = 0,4192$) (figura 43). Un paciente del grupo CG y dos del grupo no-CG fallecieron por la gastrectomía. Posteriormente, de los 20 individuos restantes del grupo CG, seis (30%) fallecieron y uno (5%) recayó dentro del periodo de 5 años. En los 17 pacientes del grupo no-CG, tres (17,6%) fallecieron y en uno (5,9%) no se observó respuesta al tratamiento.

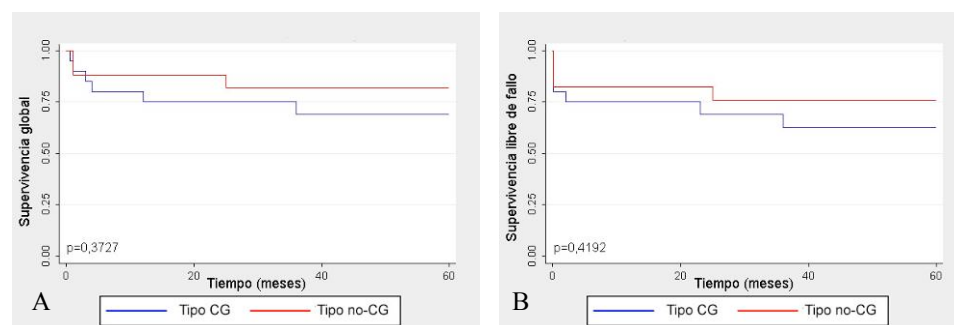


Figura 43: Asociación entre tipo CG o no-CG, determinado mediante el algoritmo de Hans, y SG (A) y SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

En lo referente al algoritmo de Muris, 39 de los casos fueron clasificados como grupo 1, mientras que tan solo uno de los casos se clasificó dentro del grupo 2. Aunque este caso podría estar asociado a mal pronóstico, ya que no respondió al tratamiento, no se pudo realizar el análisis estadístico de supervivencia.

Resultados

Por último, clasificamos los DLBCL gástricos según el algoritmo de Choi. A pesar de no disponer de los datos de expresión de FOXP1, pudimos clasificar la mayoría de los pacientes. Así, doce de los casos (41,4%) se clasificaron como tipo CG y 17 (58,6%) como no-CG. Cuatro de los pacientes que se habían clasificado como tipo CG con el algoritmo de Hans quedaron dentro del tipo no-CG con el algoritmo de Choi.

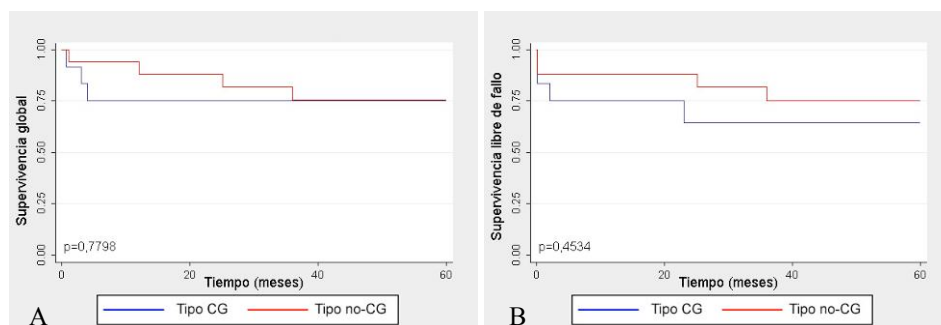


Figura 44: Asociacion entre tipo CG o no-CG determinado mediante el algoritmo de Choi y la SG (A) o SLF (B) estimada mediante las curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Al analizar el valor pronóstico de esta clasificación, no encontramos asociacion de ninguno de los tipos con la SG ($p = 0,7798$) ni con la SLF ($p = 0,4534$) (tabla 15).

Tabla 15: Correlacion entre los algoritmos inmunohistoquímicos y la SG y la SGL.

Algoritmo y tipo		N (%)	SG 5 años N (%)	P	SLF 5 años N (%)	P
Algoritmo de Hans	Tipo CG	20 (54,1)	14 (70)	0,3727	13 (65)	0,4192
	Tipo no-CG	17 (45,9)	14 (82,4)		13 (76,5)	
Algoritmo de Muris	Grupo 1	38 (97,4)	29 (76,3)	-	28 (73,7)	-
	Grupo 2	1 (2,6)	1 (100)		0 (0)	
Algoritmo de Choi	Tipo CG	12 (41,4)	9 (75)	0,7798	8 (66,7)	0,4534
	Tipo no-CG	17 (58,6)	13 (76,5)		13 (76,5)	

Abreviaturas; N (%): número y porcentaje de casos, SG: supervivencia global, SLF: supervivencia libre de fallo

Por lo tanto, ninguno de los algoritmos inmunohistoquímicos analizados en este trabajo mostró asociación significativa con el pronóstico de los DLBCL gástricos (tabla 15).

VALOR PREDICTIVO DE LAS PROTEÍNAS CD10, BCL-6, GCET1, MUM-1, BCL-2 Y BLIMP-1

La proteína CD10 se detectó en 14 de los 43 casos de DLBCL gástrico (32,6%), la proteína Bcl-6 en 22 casos de 40 (55%), Gcet1 en 9 de 43 (20,9%), MUM-1 fue positivo en 13 de 40 casos (32,5%), Bcl-2 en 8 de los 43 casos (18,6%) y BLIMP-1 en 12 de 43 casos (27,9%) (tabla 16).

Tabla 16: Porcentaje de casos con expresión de las proteínas estudiadas descritas en la literatura (bibliografía), y las detectadas en este estudio (muestras)

Proteína	Bibliografía				Muestras	
	DLBCL nodales		DLBCL gástrico		DLBCL gástrico	
	%	n	%	n	%	n
CD10	22/23/28/35	51/71/152/161	27	61	32,6	43
Bcl-6	39/48/56/58	51/161/152/71	50/72	61/39	55	40
Gcet1	47	72	-	-	23,08	43
MUM-1	31/32/47/65	51/161/152/71	50	15	32,5	43
Bcl-2	45/50/55/73	51/152/161/71	-	-	18,6	43
BLIMP-1	43	235	-	-	27,9	43

Los porcentajes de expresión detectados en este trabajo en CD10, Bcl-6 y MUM-1 son similares a los encontrados en trabajos previos. Cabe resaltar que es la primera vez que se analizan Gcet1, Bcl-2 y BLIMP-1 en DLBCL específicamente gástricos (tabla 16).

Resultados

Expresión de CD10

Los pacientes con DLBCL gástrico que fueron positivos para CD10 presentaron una menor SG y SLF, aunque no estadísticamente significativa ($p = 0,0891$ y $p = 0,0576$, respectivamente) (figura 45). De los 13 casos positivos, 5 (38,5%) fallecieron antes de los 5 años y en uno (7,7%) hubo recaída. De los 27 casos negativos, 4 (14,8%) fallecieron y uno (3,7%) no respondió al tratamiento (tabla 17).

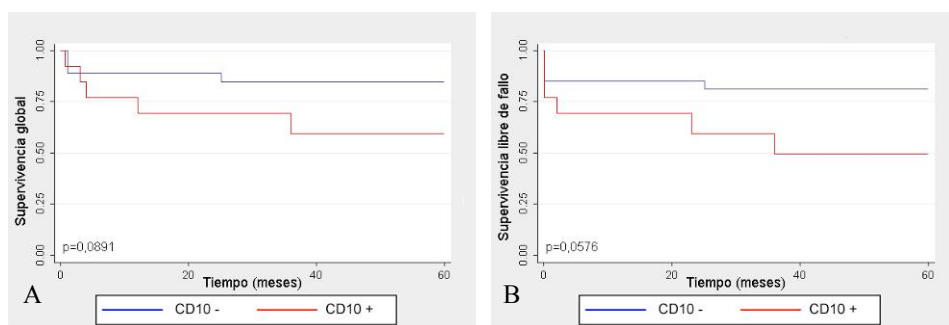


Figura 45: Análisis de asociación entre expresión de CD10 y SG (A) y SLF (B) estimado mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Expresión de Bcl-6

En el análisis de supervivencia, no se encontró asociación entre la expresión de Bcl-6 y la SG ($p = 0,9410$) ni la SLF ($p = 0,4774$) (Figura 46). De los 21 casos con expresión de Bcl-6, cinco individuos (23,8%) fallecieron y dos (9,5%) recayeron, frecuencias similares a las obtenidas para los casos Bcl-6 negativos, en los que de los 16 casos, cuatro (25%) fallecieron (tabla 17).

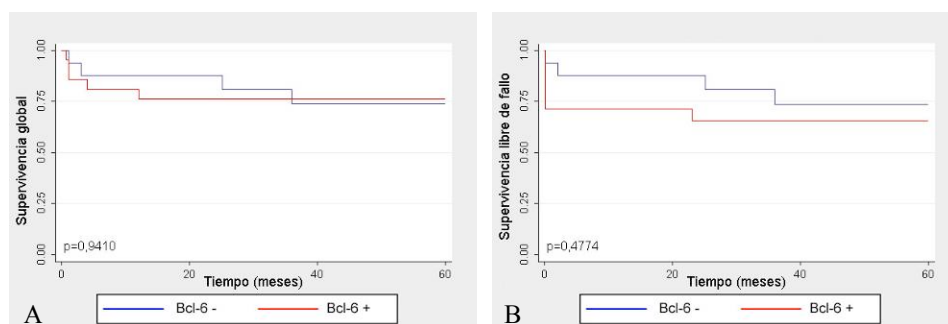


Figura 46: Asociación entre expresión de Bcl-6 y SG (A) o SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Expresión de Gcet1

Todos los casos positivos para Gcet1 fueron del tipo CG según el algoritmo de Hans. En el análisis Kaplan-Meier, no se encontró asociación entre la expresión de Gcet1 y la SG ($p = 0,9252$) ni la SLF ($p = 0,7119$) (figura 47). De los 9 individuos que presentaron expresión de la proteína, 2 (22,2%) fallecieron. De los 31 pacientes con resultados negativos para la expresión de Gcet1, 7 (22,6%) fallecieron y dos (6,5%) presentaron recaída (tabla 17).

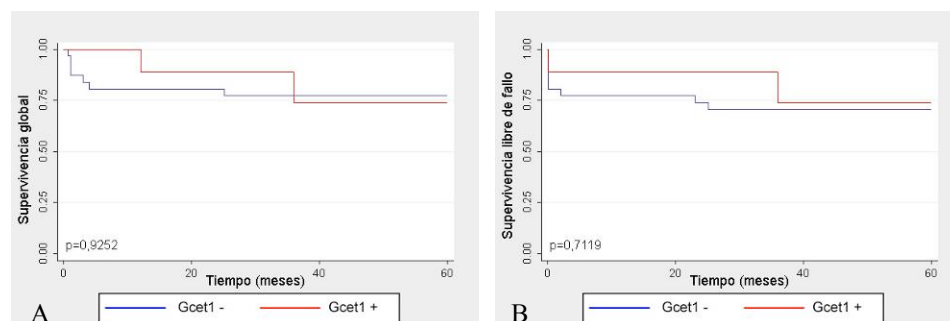


Figura 47: Asociación entre expresión de Gcet1 y SG (A) y SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Resultados

Expresión de MUM-1

La expresión de MUM-1 no mostró asociación con la SG ni la SLF ($p = 0,9797$ y $p = 0,7685$, respectivamente) (figura 48). De los 12 casos con expresión de la proteína, 3 (25%) fallecieron y uno (8,3%) no respondió al tratamiento, y de los otros 25 individuos negativos en la detección de esta proteína, 6 (24%) fallecieron y en uno (4%) se dio recaída (tabla 17).

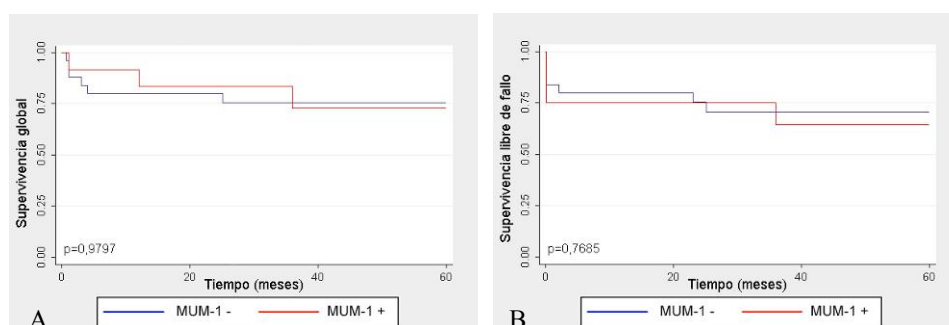


Figura 48: Asociación entre expresión de MUM-1 y SG (A) y SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Expresión de Bcl-2

Cinco de los casos con expresión de Bcl-2 (62,5%) se clasificaron como tipo no-CG mediante el algoritmo de Hans y 3 (37,5%) como tipo CG.

Se pudo observar que los casos positivos para esta proteína presentaban menores SG y SLF, aunque estas diferencias no alcanzaron un valor significativo ($p = 0,2620$ y $p = 0,0873$, respectivamente) (figura 49). De los 8 casos positivos para Bcl-2, 3 individuos (37,5%) fallecieron en un periodo de hasta 24 meses y uno (12,5%) no respondió al tratamiento. De los 32 casos negativos, 6 (18,8%) fallecieron antes de los 36 meses y en uno (3,1%) se observó recaída (tabla 17).

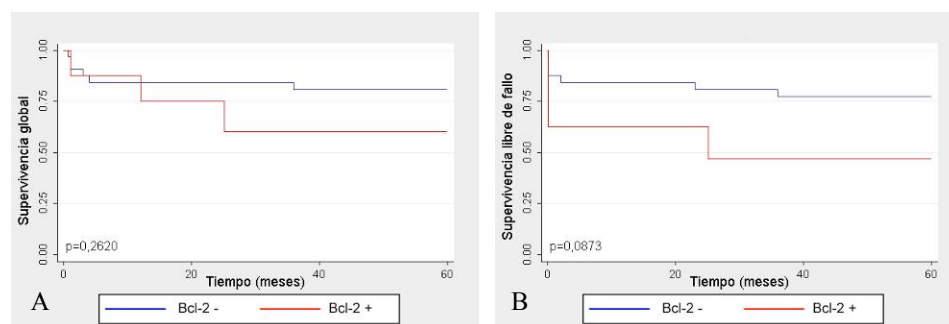


Figura 49: Asociación entre expresión de Bcl-2 y SG (A) y SLF (B) por curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Recientemente, se ha propuesto que Bcl-2 es marcador de peor pronóstico en DLBCL nodales de tipo no-CG, pero no en los de tipo CG. Por ello, analizamos su valor pronóstico separando estos dos grupos mediante el algoritmo de Hans.

En los pacientes de tipo CG, la expresión de Bcl-2 no mostró asociación con el pronóstico. Dentro de los pacientes del grupo no-CG, los pacientes con expresión de Bcl-2 mostraron una SLF menor y estadísticamente significativa con respecto a los que no expresaron Bcl-2 ($p = 0,0264$) (figura 50). De los 5 pacientes con expresión de esta proteína dos (40%) fallecieron y en otro caso (10%) hubo recaído. De los 12 pacientes de tipo no-CG son expresión de Bcl-2 tan sólo uno (8,3%) falleció (tabla 17).

Resultados

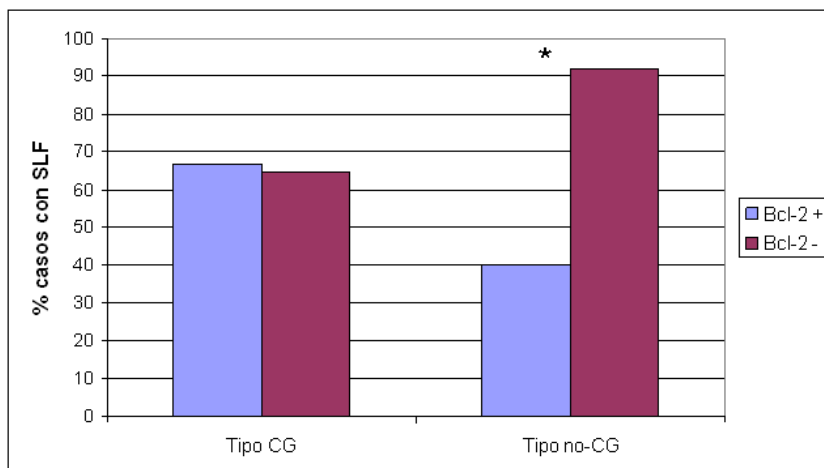


Figura 50: Porcentaje de casos con SLF según la expresión de Bcl-2 en DLBCL gástricos de tipo CG y no-CG según el algoritmo de Hans.

*Valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

Expresión de BLIMP-1

Siete de los 12 casos positivos para la expresión de la proteína BLIMP-1 (58,3%) se clasificaron como tipo CG con el algoritmo de Hans y los otros cinco (41,7%) como no-CG. En linfocitos B normales, las células positivas para BLIMP-1 co-expresan MUM-1 y no expresan Bcl-6. En nuestro caso, 5 de los 12 casos positivos para BLIMP-1 fueron negativos para MUM-1 y 10 de ellos, fueron también positivos para Bcl-6.

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de la proteína BLIMP-1 y una menor SG y SLF ($p = 0,0158$ y $p = 0,0003$, respectivamente) (figura 51). De los 11 casos positivos, cinco (45,5%) fallecieron en un periodo de 12 meses y dos pacientes (18,2%) sufrieron una recaída. Sin embargo, de los 29 casos negativos, tan solo 4 (13,8%) fallecieron. Por tanto, el porcentaje de pacientes que sobrevivió sin recaída a los 5 años fue tan solo del 36,4% en los casos positivos para BLIMP-1, mientras que

fue del 86,2% en los pacientes con DLBCL gástricos que no expresaron BLIMP-1 (tabla 17).

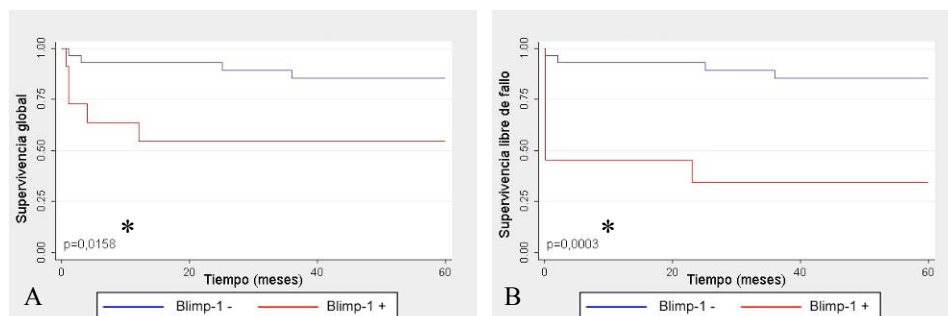


Figura 51: Asociación entre expresión de BLIMP-1 y SG (A) y SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

*Valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

A la vista de todos los resultados presentados en este apartado, podemos decir que la expresión de la proteína BLIMP-1 se ha mostrado como un marcador de mal pronóstico en los casos de DLBCL gástricos.

Tabla 17: Correlación entre la expresión de proteínas y la SG o la SLF.

Proteína y expresión	N (%)	SG 5 años N (%)	p	SLF 5 años N (%)	p
CD10	+	13 (32,5)	0,0891	7 (53,8)	0,0576
	-	27 (67,5)		22 (81,5)	
Bcl-6	+	21 (56,8)	0,9410	14 (66,7)	0,4774
	-	16 (43,2)		12 (75)	
Gcet1	+	9 (22,5)	0,9252	7 (77,8)	0,7119
	-	31 (77,5)		22 (71,0)	
MUM-1	+	12 (32,4)	0,9797	8 (66,7)	0,7685
	-	25 (67,6)		18 (72)	
Bcl-2	+	8 (20)	0,2620	4 (50)	0,0873
	-	32 (80)		25 (78,1)	
Bcl-2 / CG	+	3 (15)	0,9292	2 (66,7)	0,8546
	-	17 (85)		11 (64,7)	
Bcl-2 / no-CG	+	5 (15)	0,1438	2 (40)	0,0264 *
	-	12 (85)		11 (91,7)	
BLIMP-1	+	11 (27,5)	0,0158 *	4 (36,4)	0,0003 *
	-	29 (72,5)		25 (86,2)	

Abreviaturas; N (%): número y porcentaje de casos, SG: supervivencia global, SLF: supervivencia libre de fallo

*Valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

METILACIÓN DE PROMOTORES

Se ha demostrado que la metilación de promotores puede tener un papel importante en la oncogénesis, además de ser un marcador pronóstico de supervivencia o de respuesta al tratamiento en algunos tumores. A este respecto, en este apartado analizaremos tanto el posible papel de la metilación en el proceso de oncogénesis del DLBCL gástrico así como el posible valor pronóstico de la metilación de los promotores de los genes más representativos en este linfoma.

Asimismo, evaluaremos la posible implicación de la infección por *H. pylori* en este proceso de metilación de los promotores en los DLBCL gástricos, dado que se ha descrito una asociación entre metilación e infección por *H. pylori* en tejidos gástricos.

El porcentaje de casos con el promotor de cada gen metilado, así como el obtenido en otros trabajos previos con DLBCLs y DLBCL gástricos se especifican en la tabla 18.

Tabla 18: Porcentaje de casos con metilación de los genes estudiados descritos en la literatura (bibliografía), y los detectados en este estudio (muestras)

Gen	Bibliografía				Muestras	
	DLBCL		DLBCL gástrico		DLBCL gástrico	
	%	n	%	n	%	n
<i>p16</i>	52, 55, 45	46, 44, 59	25, 40, 73	26, 10, 11	78	41
<i>FHIT</i>	23	114	-	-	15	40
<i>p73</i>	-	-	30	10	23,1	39
<i>p57</i>	48	44	36	11	60,5	38
<i>CDHI</i>	59	46	44	26	89,2	37
<i>p15</i>	32, 41, 41	44, 46, 59	50	10	25	36
<i>ID4</i>	95	20	-	-	80	35
<i>VHL</i>	44	46	-	-	2,7	37
<i>DAP-k</i>	59, 68	46, 53	66, 90	26, 10	91,9	37
<i>BMP-6</i>	60	35	-	-	53,8	39
<i>ATM</i>	-	-	12	26	5,4	37
<i>hMLH1</i>	-	-	30, 38	10, 26	0	39
<i>MGMT</i>	36, 40, 76	85, 53, 190	47	26	23,3	43
<i>GSTP1</i>	0, 23, 63	44, 53, 46	-	-	5,1	39

En nuestro trabajo con DLBCL gástricos, 6 de los 14 promotores de genes analizados (*p16*, *p57*, *CDHI*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6*) se encontraron metilados en más de la mitad de los casos. Aunque en menor porcentaje, también se encontró metilación en los promotores de los genes *FHIT*, *p73*, *p15*, *VHL*, *ATM*, *MGMT* y *GSTP1*. Tan solo en el caso de *hMLH1* no se encontró ningún caso metilado de los 39 analizados (tabla 18).

IMPLICACIÓN DE LA METILACIÓN DE PROMOTORES EN LA ONCOGÉNESIS DEL DLBCL GÁSTRICO

Con el objetivo de determinar si la metilación de promotores detectada en los DLBCL gástricos era específica del tejido gástrico o del tumor, se comparó el porcentaje de metilación de estos promotores en los DLBCL gástricos frente al porcentaje en tejido gástrico de pacientes sanos (tabla 19).

Resultados

Tabla 19: Número y porcentaje de individuos con el promotor metilado de los 14 genes estudiados en los DLBCL gástricos y en muestras de controles gástricos.

Gen	Metilación del promotor (n, %)		
	DLBCL gástricos	Controles gástricos	p
<i>p16</i>	32/41 (78,0%)	19/56 (33,9%)	< 0,001*
<i>FHIT</i>	6/40 (15%)	3/54 (5,6%)	0,163
<i>p73</i>	9/39 (23,1%)	0/56 (0%)	< 0,001*
<i>p57</i>	23/38 (60,5%)	2/50 (4%)	< 0,001*
<i>CDH1</i>	33/37 (89,2%)	27/53 (50,9%)	< 0,001*
<i>p15</i>	9/36 (25%)	3/56 (5,4%)	0,01*
<i>ID4</i>	28/35 (80%)	18/55 (32,7%)	< 0,001*
<i>VHL</i>	1/37 (2,7%)	1/43 (2,3%)	1
<i>DAP-k</i>	34/37 (91,9%)	20/44 (45,5%)	< 0,001*
<i>BMP-6</i>	21/39 (53,8%)	4/58 (6,9%)	< 0,001*
<i>ATM</i>	2/37 (5,4%)	1/54 (1,9%)	0,564
<i>hMLH1</i>	0/39 (0%)	6/55 (10,9%)	0,014*
<i>MGMT</i>	10/43 (23,3%)	7/57 (12,3%)	0,183
<i>GSTP1</i>	2/39 (5,1%)	0/57 (0%)	0,163

*Valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

La metilación en 8 promotores los 14 genes analizados (*p16*, *p73*, *p57*, *CDH1*, *p15*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6*) fue estadísticamente mayor en los DLBCL gástricos que en los controles ($p < 0,001$ para *p16*, *p73*, *p57*, *CDH1*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6* y $p = 0,01$ para *p15*). Por lo tanto, este elevado nivel de metilación puede ser considerado como característica del tumor y podría estar implicado en el proceso de oncogénesis. No se vieron diferencias entre casos y controles en la metilación de los promotores de *FHIT*, *VHL*, *ATM*, *MGMT* y *GSTP1*, que fueron los genes con menor frecuencia de metilación tanto en los DLBCL gástricos como en los controles. Tan solo el promotor del gen *hMLH1* apareció más

frecuentemente metilado en los controles que en los linfomas ($p = 0,014$) (figura 52).

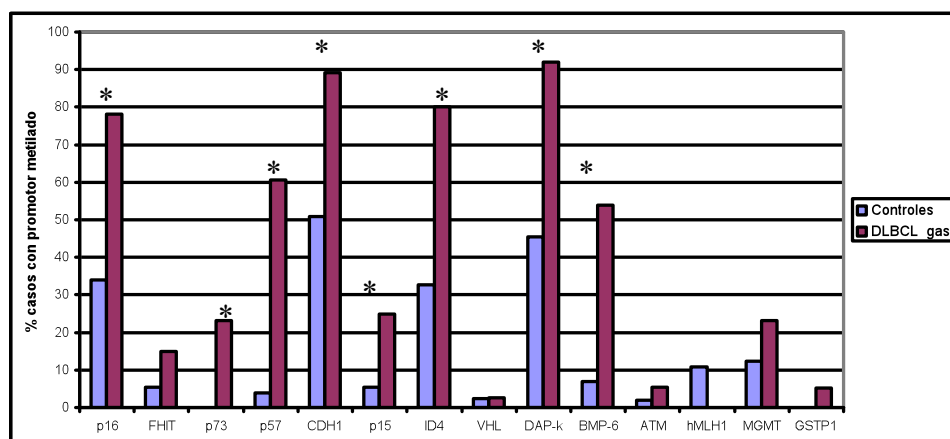


Figura 52: porcentaje de DLBCL gástricos y controles con el promotor de cada gen metilado.

*Valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

Para analizar la posible implicación de la metilación de promotores específicos de los DLBCL gástricos en su oncogénesis se analizó el estado de metilación de estos promotores en el tejido gástrico sano de pacientes con DLBCL gástrico en comparación con el encontrado en los controles gástricos y el tejido tumoral de los DLBCL gástricos (tabla 20).

Tabla 20: Número y porcentaje de individuos con el promotor metilado de los 14 genes estudiados en los controles gástricos, el tejido gástrico sano de los pacientes con linfoma y los DLBCL gástricos.

Gen	Metilación del promotor (n, %)			P según test de Fisher	
	Controles gástricos	Tejido gástrico sano de casos	DLBCL gástricos	P Controles vs. tejido gástrico sano de casos	P DLBCL gástricos vs. tejido gástrico sano de casos
<i>p16</i>	19/56 (33,9%)	0/16 (0%)	32/41 (78,0%)	0.008 *	< 0.001 *
<i>FHIT</i>	3/54 (5,6%)	0/17 (0%)	6/40 (15%)	1	0.164
<i>p73</i>	0/56 (0%)	3/16 (18,75%)	9/39 (23,1%)	0.009 *	1
<i>p57</i>	2/50 (4%)	2/15 (13,33%)	23/38 (60,5%)	0.226	0.002 *
<i>CDHI</i>	27/53 (50,9%)	6/16 (37,5%)	33/37 (89,2%)	0.402	< 0.001 *
<i>p15</i>	3/56 (5,4%)	3/15 (20%)	9/36 (25%)	0.104	1
<i>ID4</i>	18/55 (32,7)	8/15 (53,33)	28/35 (80%)	0.227	0.085
<i>VHL</i>	1/43 (2,3%)	0/13 (0%)	1/37 (2,7%)	1	1
<i>DAP-k</i>	20/44 (45,5%)	11/15 (73,33%)	34/37 (91,9%)	0.063	0.327
<i>BMP-6</i>	4/58 (6,9%)	4/16 (25%)	21/39 (53,8%)	0.061	0.075
<i>ATM</i>	1/54 (1,9%)	0/15 (0%)	2/37 (5,4%)	1	1
<i>hMLHI</i>	6/55 (10,9%)	3/15 (20%)	0/39 (0%)	0.392	0.018 *
<i>MGMT</i>	7/57 (12,3%)	6/17 (35,29%)	10/43 (23,3%)	0.062	0.352
<i>GSTPI</i>	0/57 (0%)	0/15 (0%)	2/39 (5,1%)	1	1

*Valor de p estadísticamente significativo (p < 0,05)

Al comparar los porcentajes de metilación entre los controles gástricos y el tejido gástrico sano de los pacientes con linfoma, se observó un incremento en este último grupo en los genes *p73*, *p57*, *p15*, *ID4*, *DAP-k*, *BMP-6*, *hMLH1* y *MGMT*, diferencia que fue estadísticamente significativa en el caso de *p73* ($p = 0,009$) y que se acercó al valor significativo en el caso de *DAP-k* ($p = 0,063$), *BMP-6* ($p = 0,061$) y *MGMT* ($p = 0,062$). Tan solo el promotor de *p16* se encontró metilado con mayor frecuencia en los controles que en el tejido sano de los pacientes de manera estadísticamente significativa ($p = 0,008$) (tabla 20).

Entre el tejido gástrico sano y el tumoral de los pacientes con DLBCL gástrico, la metilación fue estadísticamente mayor en el tejido tumoral en los genes *p16* ($p < 0,001$), *p57* ($p = 0,002$) y *CDHI* ($p < 0,001$). En el caso de *p73*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6* (genes que se encontraban más metilados en el DLBCL gástrico que en los controles), aunque la metilación fue mayor en el tejido tumoral que en el tejido sano de los pacientes con linfoma, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (tabla 20).

Teniendo en cuenta los 3 grupos de muestras analizados, en seis de los genes (*p73*, *p57*, *p15*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6*), todos ellos significativamente más metilados en casos que en controles, se pudo observar un incremento progresivo de la metilación de los promotores en el tejido que podemos considerar pretumoral con respecto a los controles, metilación que se incrementó cuando se analizó el tejido de linfoma (figura 53), lo que puede indicar que la metilación de los promotores de estos genes es un evento preneoplásico implicado en el inicio del proceso de oncogénesis, y que esta metilación se incrementa a medida que el tejido evoluciona a tumoral.

Resultados

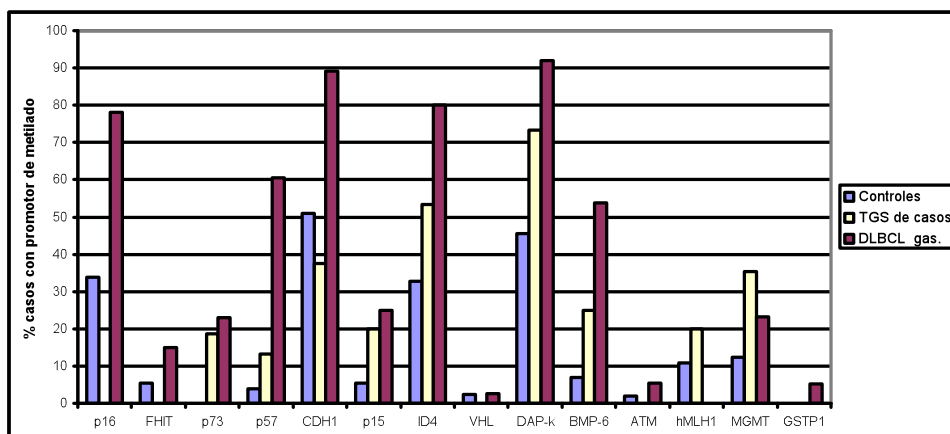


Figura 53: Porcentaje de casos con metilación del promotor de cada gen en controles, tejido peritumoral y DLBCL gástricos.
Abreviaturas; TGS: tejido gástrico sano

IMPLICACIÓN DE *H. PYLORI* EN LA METILACIÓN DE PROMOTORES

Una vez comprobado que existe un estado pretumoral en el que se ha producido un incremento de metilación de promotores de determinados genes, quisimos comprobar si el incremento de la metilación era causado por la infección de *H. pylori*.

Para ello, en primer lugar detectamos la presencia de *H. pylori* tanto en las muestras de DLBCL gástricos como en los controles, para después determinar si había asociación entre la presencia de *H. pylori* y la metilación de los promotores.

Detección de *H. pylori* en DLBCL gástricos y controles

La presencia de la bacteria *H. pylori* se analizó por microscopía óptica y por nested-PCR en 40 casos de DLBCL gástrico y en 58 controles. De la población inicial de 43 casos de DLBCL gástricos, hubo 3 en los que no pudo realizarse la detección de *H. pylori* al no disponer de muestras de mucosa gástrica.

En los DLBCL gástricos, la detección de la bacteria por microscopía fue positiva en 9 de los casos (22,5%), mientras que por nested-PCR se detectó en 13 de los casos (32,5%) (tabla 21). Tan solo una de las muestras positivas por microscopía fue negativa por nested-PCR. En cinco de los casos negativos por microscopía, *H. pylori* se detectó por nested-PCR.

En los controles gástricos, mediante la técnica de microscopía *H. pylori* se detectó en 21 de las 58 muestras (36,2%) y mediante nested-PCR la prueba fue positiva en 30 de ellas (51,7%) (tabla 21). En este caso, todas las muestras positivas por microscopía fueron también positivas por nested-PCR, mientras que en 9 de los casos, la bacteria sólo se detectó mediante la técnica molecular.

Tabla 21: Detección de *H. pylori* mediante microscopía y nested-PCR en DLBCL gástricos y controles

	Casos positivos para <i>H. pylori</i> (n, %)	
	DLBCL gástricos (40)	Controles (58)
Microscopía	9 (22,5)	21 (36,2)
Nested-PCR	13 (32,5)	30 (51,7)
Total	14 (35)	30 (51,7)

Resultados

Asociación entre *H. pylori* y metilación de los promotores

Con el fin de estudiar la implicación de *H. pylori* en la metilación de los promotores, se analizó si había más metilación en los promotores de genes de los controles gástricos infectados por *H. pylori* que en los no infectados.

En la tabla 22 se muestran estos resultados de metilación en los promotores de 14 genes analizados.

Tabla 22: Número y porcentaje de controles gástricos que tienen el promotor de cada gen estudiado metilado en presencia o ausencia de *H. pylori*.

Gen	Metilación del promotor (n, %)		p
	<i>H. pylori</i> -	<i>H. pylori</i> +	
<i>p16</i>	5/27 (18,5%)	14/29 (48,3%)	0,025 *
<i>FHIT</i>	2/26 (7,7%)	1/28 (3,6%)	0,604
<i>p73</i>	0/28 (0%)	0/29 (0%)	-
<i>p57</i>	0/24 (0%)	2/26 (7,7%)	0,491
<i>CDHI</i>	12/24 (50%)	15/29 (51,7%)	1
<i>p15</i>	1/28 (3,6%)	2/28 (7,1%)	1
<i>ID4</i>	6/26 (23,1%)	12/29 (41,4%)	0,166
<i>VHL</i>	1/20 (5%)	0/23 (0%)	0,465
<i>DAP-k</i>	7/24 (29,2%)	13/20 (65%)	0,032 *
<i>BMP-6</i>	1/28 (3,6%)	3/30 (10%)	0,612
<i>ATM</i>	1/27 (3,7%)	0/27 (0%)	1
<i>hMLHI</i>	3/27 (11,1%)	3/28 (10,7%)	1
<i>MGMT</i>	2/28 (7,1%)	5/29 (17,2%)	0,423
<i>GSTP1</i>	0/28 (0%)	0/29 (0%)	-

*Valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

Seis de los genes (*p16*, *p57*, *p15*, *ID4*, *DAP-k*, *BMP-6* y *MGMT*), mostraron un aumento de los casos con metilación en el grupo de controles gástricos infectados por *H. pylori*. Este aumento fue estadísticamente significativo en el caso de los promotores de los genes *p16* y *DAP-k* ($p = 0,025$ y $p = 0,032$, respectivamente) y se acercó al valor significativo en el gen *ID4* ($p = 0,166$). No se vieron diferencias destacables de metilación en los promotores de *FHIT*, *CDH1*, *VHL*, *hMLH1* y *ATM* (tabla 22, figura 54).

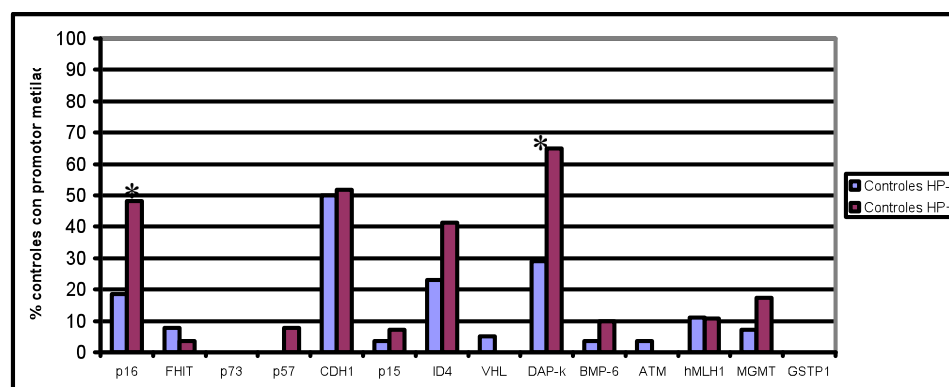


Figura 54: porcentajes de controles gástricos con el promotor de los diferentes genes metilados en casos negativos y positivos para *H. pylori* y su asociación estadística según el test de Fisher.

*Valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

Con el fin de analizar la implicación de *H. pylori* en la metilación de los 8 genes característicos de los DLBCL gástricos (*p16*, *p73*, *p57*, *CDH1*, *p15*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6*), se calculó la media del porcentaje de controles con metilación teniendo en cuenta estos genes dentro del grupo sin infección e infectado por la bacteria (figura 55). En el caso de los controles sin presencia de *H. pylori*, la media del porcentaje de metilación fue de 15,3%, mientras que en los controles infectados fue de 27,7%. La diferencia entre los dos grupos fue estadísticamente significativa ($p = 0,002$).

Resultados

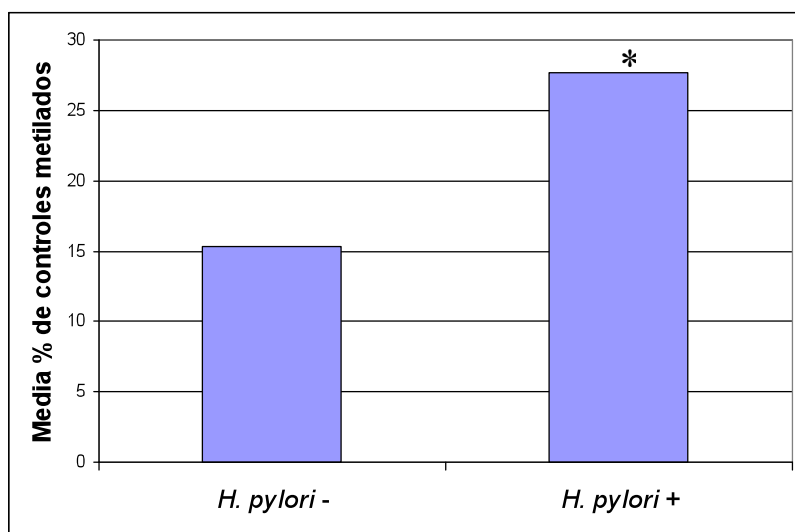


Figura 55: Promedio del porcentaje de controles con metilación considerando los genes *p16*, *p73*, *p57*, *CDH1*, *p15*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6*, según la infección por *H. pylori*.

*Valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

Las muestras infectadas por *H. pylori* están más metiladas, lo que sugiere que esta infección juega algún papel en este proceso epigenético.

También determinamos el número de DLBCL gástricos y sus porcentajes con metilación de cada gen según estuviera o no presente *H. pylori*, tal y como se describen en la tabla 23.

Tabla 23: Número y porcentaje de DLBCL gástricos que tienen el promotor de cada gen estudiado metilado en presencia o ausencia de *H. pylori*.

Gen	Metilación del promotor (n, %)		p
	<i>H. pylori</i> -	<i>H. pylori</i> +	
<i>p16</i>	18/24 (75%)	12/14 (85,7%)	0,684
<i>FHIT</i>	2/25 (8%)	4/12 (33,3%)	0,034*
<i>p73</i>	7/24 (29,2%)	2/12 (16,7%)	0,685
<i>p57</i>	13/23 (56,5%)	9/12 (75%)	0,463
<i>CDH1</i>	19/21 (90,5%)	11/13 (84,6%)	0,627
<i>p15</i>	5/21 (23,8%)	4/12 (33,3%)	0,690
<i>ID4</i>	16/21 (76,2%)	9/11 (81,8%)	1
<i>VHL</i>	0/22 (0%)	1/12 (8,3%)	0,353
<i>DAP-k</i>	20/22 (90,9%)	11/12 (91,7%)	1
<i>BMP-6</i>	11/23 (47,8%)	9/13 (69,2%)	0,301
<i>ATM</i>	1/21 (4,8%)	1/13 (7,7%)	1
<i>hMLH1</i>	0/12 (0%)	0/24 (0%)	-
<i>MGMT</i>	6/26 (23,1%)	4/14 (28,6%)	0,718
<i>GSTP1</i>	1/24 (4,2%)	1/12 (8,3%)	1

*Valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

En los pacientes que presentaban la bacteria se vio un ligero incremento en el porcentaje de casos metilados en los genes *p16*, *p15*, *ID4*, *VHL*, *ATM*, *MGMT* y *GSTP1* y un incremento aún mayor en los genes *FHIT*, *p57* y *BMP-6*, aunque sólo en el caso de *FHIT* la diferencia fue estadísticamente significativa ($p = 0,034$). En el promotor de *DAP-k* los resultados de metilación en muestras infectadas y sin infectar por *H. pylori* fueron muy similares y tan solo en los genes *p73* y *CDH1* el porcentaje de casos metilados fue ligeramente mayor en los pacientes sin *H. pylori* (figura 56).

Resultados

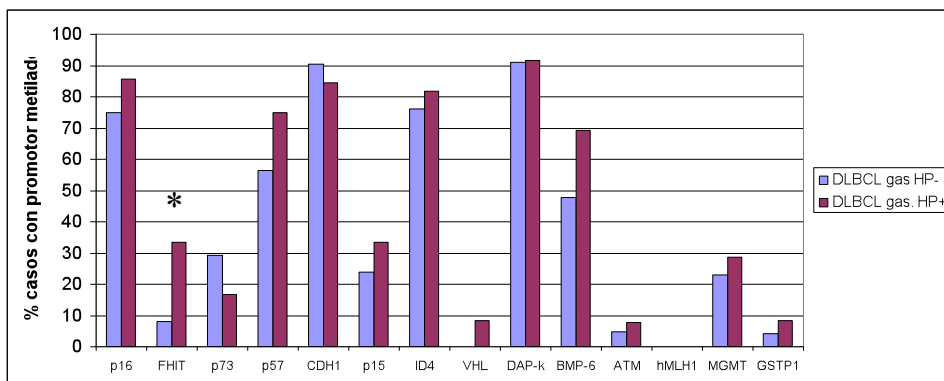


Figura 56: Porcentajes de DLBCL gástricos con el promotor de los diferentes genes metilados en casos negativos y positivos para *H. pylori*.
*Valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

Al comparar la media del porcentaje de metilación de los genes *p16*, *p73*, *p57*, *CDH1*, *p15*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6* en DLBCL gástricos con infección y sin presencia de *H. pylori*, los valores fueron exactamente los mismos en los dos grupos (60,9) (figura 57).

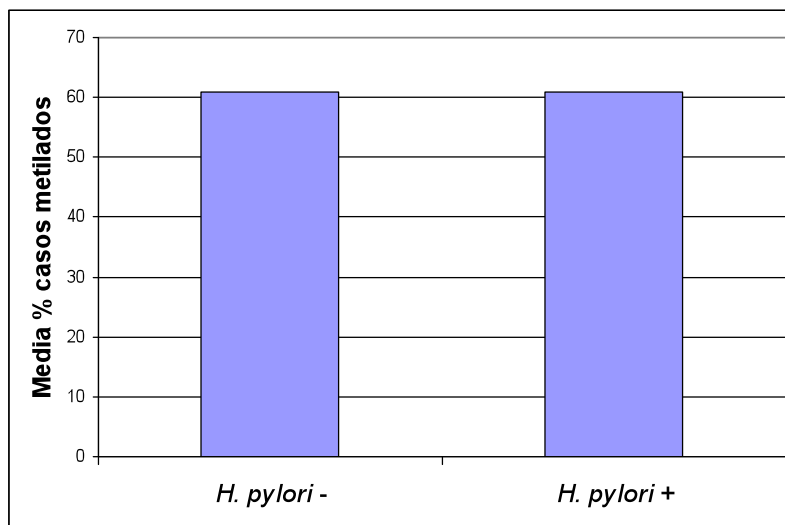


Figura 57: Promedio del porcentaje de DLBCL gástricos con metilación considerando los genes *p16*, *p73*, *p57*, *CDH1*, *p15*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6*, según la infección por *H. pylori*.

Según lo visto, la metilación de los promotores aumenta significativamente independientemente de la infección por *H.pylori* al comparar muestras control con DLBCL gástricos. Por su parte, las muestras control infectadas por *H. pylori* ven incrementada considerablemente la metilación de los promotores. Este fenómeno no se replica en las muestras de DLBCL gástrico, probablemente porque los promotores de los genes de los casos no infectados ya están muy metilados.

METILACIÓN DE PROMOTORES EN DLBCL GÁSTRICO Y ASOCIACIÓN CON EL PRONÓSTICO

Se analizó la asociación de la metilación de los promotores en los DLBCL gástricos con la SG y la SLF (tabla 24). Los genes *VHL*, *ATM*, *GSTP1* y *hMLH1* no se incluyeron en este análisis porque tan solo había dos casos o menos metilados en estos promotores. Los genes *CDH1* y *DAP-k* tampoco se estudiaron al presentar la mayoría de los casos metilación de sus promotores.

Metilación del promotor de *p16*

La metilación del promotor de *p16* no se asoció con la SG ni la SLF ($p = 0,4830$ y $p = 0,7420$, respectivamente) (figura 58). De los 29 casos positivos para la metilación, 6 (20,7%) fallecieron antes de 5 años y en dos (6,9%) se dio recaída. De los 9 casos no metilados, 3 (33,3%) fallecieron.

Resultados

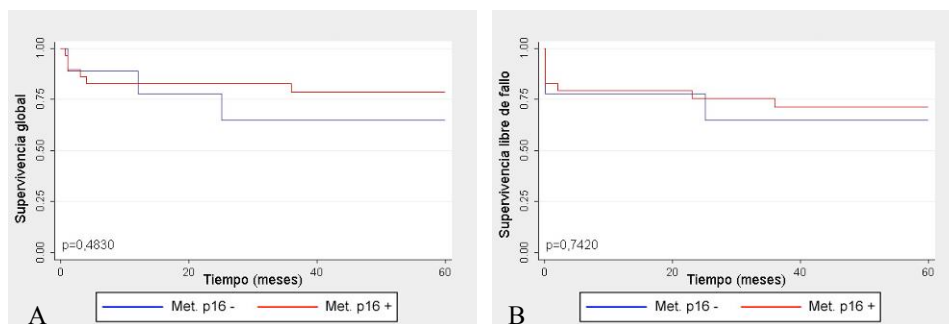


Figura 58: Asociación entre la metilación del promotor de *p16* y la SG (A) o la SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Metilación del promotor de FHIT

La SG fue menor en los casos negativos para la metilación de FHIT, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0,2466$), y no hubo diferencias en la SLF ($p = 0,7584$) (figura 59). De 5 casos metilados ninguno falleció en 5 años y uno (20%) no respondió al tratamiento. En cuanto a los 32 casos no metilados, 8 (25%) fallecieron antes de los 5 años y uno (3,1%) recayó.

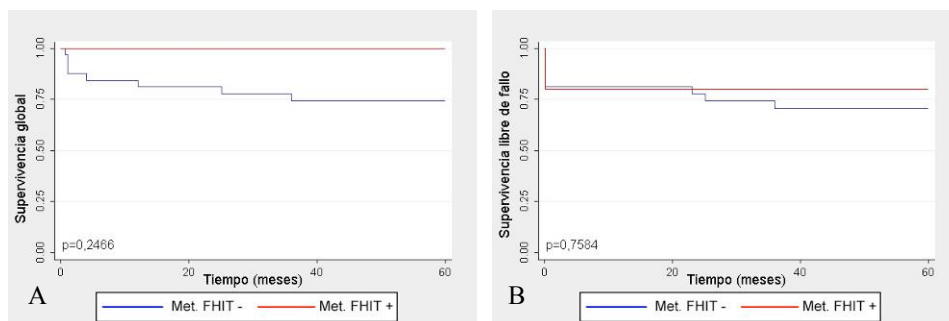


Figura 59: Asociación entre la metilación del promotor de *FHIT* y la SG (A) o la SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Metilación del promotor de *p73*

Los casos negativos para la metilación presentaron menor SG y SLF, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (figura 60). Tan solo uno de los 8 casos metilados (12,5%) falleció, mientras que de los 28 casos no metilados 7 (25%) fallecieron y en dos (7,1%) se dio recaída.

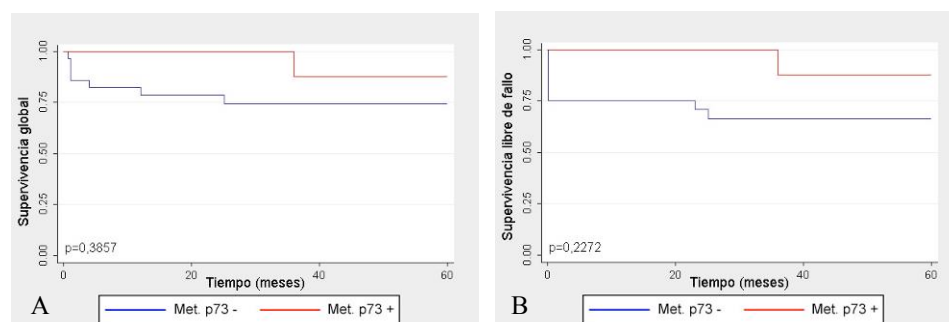


Figura 60: Asociación entre la metilación del promotor de *p73* y la SG (A) o la SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Metilación del promotor de *p57*

Se detectó una ligera disminución de la SG y una menor SLF en los casos no metilados en el promotor de este gen, pero no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,3837$ y $p = 0,0916$, respectivamente) (figura 61). De los 20 casos con el promotor metilado, 3 (15%) fallecieron, mientras que de los 15 casos negativos, 4 (26,7%) fallecieron y en otros dos (13,3%) se dio recaída.

Resultados

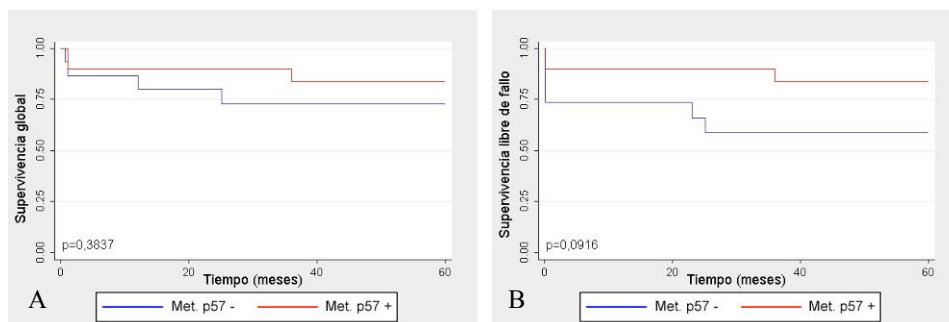


Figura 61: Asociación entre la metilación del promotor de *p57* y la SG (A) o la SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Metilación del promotor de *p15*

La SG y la SLF fueron similares entre los casos positivos y negativos para la metilación de *p15* ($p = 0,6310$ y $p = 0,9979$, respectivamente) (figura 62). De los 8 casos metilados, dos (25%) fallecieron, mientras que de los 25 no metilados, 5 (20%) fallecieron y en dos (8%) se dio recaída.

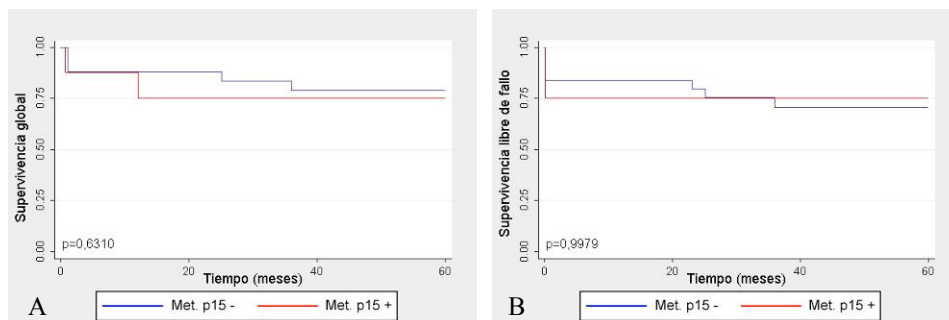


Figura 62: Asociación entre la metilación del promotor de *p15* y la SG (A) o la SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Metilación del promotor de *ID4*

No se vieron diferencias entre los casos con y sin metilación del promotor de *ID4* ($p = 0,5820$ y $p = 0,8449$, respectivamente) (figura 63). Cinco (20%) de los 25 casos con el promotor metilado fallecieron y en uno (4%) se dio recaída. De los 7 casos sin metilar, 2 (28,6%) fallecieron.

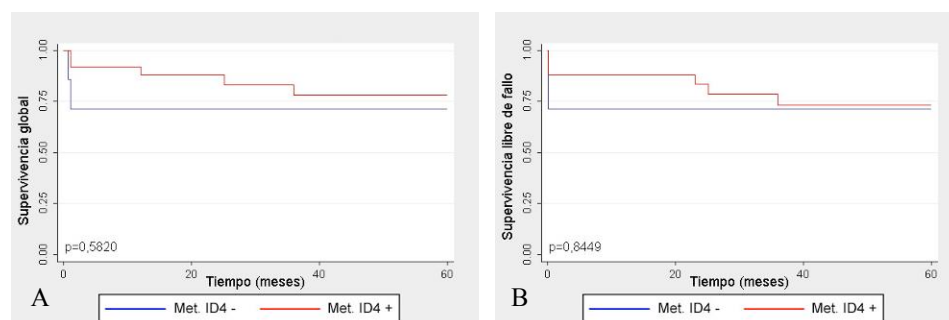


Figura 63: Asociación entre la metilación del promotor de *ID4* y la SG (A) o la SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Metilación del promotor de *BMP-6*

No se observaron diferencias en la SG y la SLF entre el grupo de pacientes metilados y sin metilar en el promotor de gen *BMP-6* ($p = 0,9207$ y $p = 0,4302$, respectivamente) (figura 64). De los 18 casos metilados en este promotor, 4 (22,2%) fallecieron. De los 18 casos negativos, también fallecieron 4 (22,2%) y en dos (11,1%) se dio recaída.

Resultados

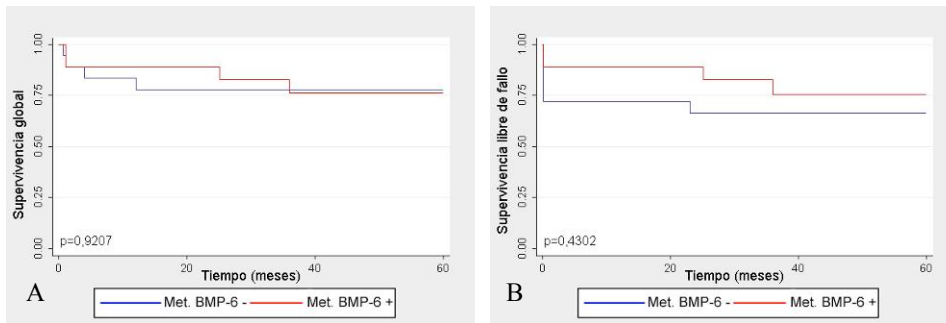


Figura 64: Asociación entre la metilación del promotor de *BMP-6* y la SG (A) o la SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Metilación del promotor de MGMT

Se observó una SG y SLF menores en los casos que no presentaban metilación del promotor de *MGMT*, aunque estas diferencias no alcanzaron el valor significativo ($p = 0,4175$ y $p = 0,2762$, respectivamente) (figura 65). De los 8 casos metilados, tan solo uno (12,5%) falleció, mientras que de los 32 negativos, 8 (25%) fallecieron y en 2 (6,3%) se dio recaída.

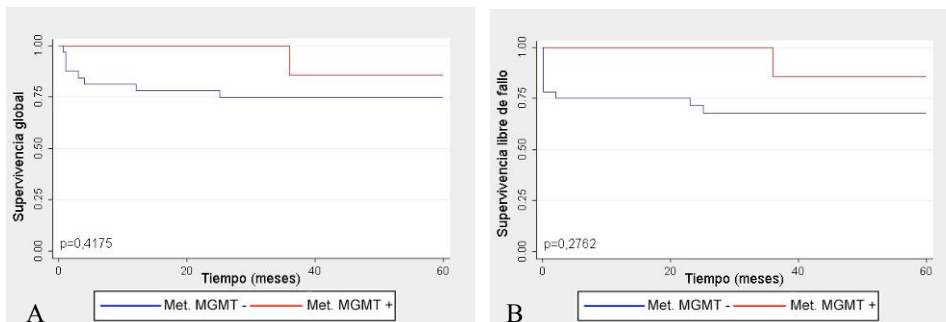


Figura 65: Asociación entre la metilación del promotor de *MGMT* y la SG (A) o la SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Por lo tanto, la metilación de ninguno de los promotores de los genes analizados en este trabajo mostró asociación de forma individual con el pronóstico en los DLBCL gástricos (tabla 24).

Tabla 24: Correlación entre la metilación de promotores en los casos de DLBCL gástricos y la SG o la SGL.

Parámetro		N (%)	SG 5 años	p	SLF 5 años	p
			N (%)		N (%)	
<i>p16</i>	M	29 (76,3)	23 (79,3)	0,4830	21 (72,4)	0,7420
	U	9 (23,7)	6 (66,7)		6 (66,7)	
<i>FHIT</i>	M	5 (13,5)	5 (100)	0,2466	4 (80)	0,7584
	U	32 (86,5)	24 (75)		23 (71,9)	
<i>p73</i>	M	8 (22,2)	7 (87,5)	0,3857	7 (87,5)	0,2272
	U	28 (77,8)	21 (75)		19 (67,9)	
<i>p57</i>	M	20 (57,1)	17 (85)	0,3837	17 (85)	0,0916
	U	15 (42,9)	11 (73,3)		9 (60)	
<i>CDH1</i>	M	30 (88,2)	25 (83,3)	-	23 (76,7)	-
	U	4 (11,8)	2 (50)		2 (50)	
<i>p15</i>	M	8 (24,2)	6 (75)	0,6310	6 (75)	0,9979
	U	25 (75,8)	20 (80)		18 (72)	
<i>ID4</i>	M	25 (78,1)	20 (80)	0,5820	19 (76)	0,8449
	U	7 (21,9)	5 (71,4)		5 (71,4)	
<i>VHL</i>	M	1 (2,9)	1 (100)	-	1 (100)	-
	U	33 (97,1)	26 (78,8)		24 (72,7)	
<i>DAP-k</i>	M	31 (91,2)	24 (77,4)	-	22 (71)	-
	U	3 (8,8)	2 (66,7)		2 (66,7)	
<i>BMP-6</i>	M	18 (50)	14 (77,8)	0,9207	14 (77,8)	0,4302
	U	18 (50)	14 (77,8)		12 (66,7)	
<i>ATM</i>	M	2 (5,9)	1 (50)	-	1 (50)	-
	U	32 (94,1)	25 (78,1)		23 (71,9)	
<i>hMLH1</i>	M	0	-	-	-	-
	U	0	-		-	
<i>MGMT</i>	M	8 (20)	7 (87,5)	0,4175	7 (87,5)	0,2762
	U	32 (80)	24 (75)		22 (68,8)	
<i>GSTP1</i>	M	2 (5,6)	2 (100)	-	2 (100)	-
	U	34 (94,4)	26 (76,5)		24 (70,6)	

Abreviaturas; M: metilado, U: no metilado, N (%) número de casos y porcentaje, SG: supervivencia global, SLF: supervivencia libre de fallo

Resultados

Fenotipo metilador

Se analizó el valor pronóstico del fenotipo metilador (CIMP) (tabla 25). Al presentar tan solo dos casos con menos de tres promotores metilados, y 3 casos con más de nueve, el análisis se realizó entre los pacientes con menos de 4 y más de 8 promotores metilados.

Comparando la SG y la SLF de los casos de DLBCL gástricos que presentaban menos de 4 promotores metilados o más de 4 promotores metilados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (figura 66). De los 25 casos con más de 4 genes metilados, 5 (20%) fallecieron y dos (8%) recayeron. De los 8 casos con menos de 4 genes metilados, 2 (25%) fallecieron.

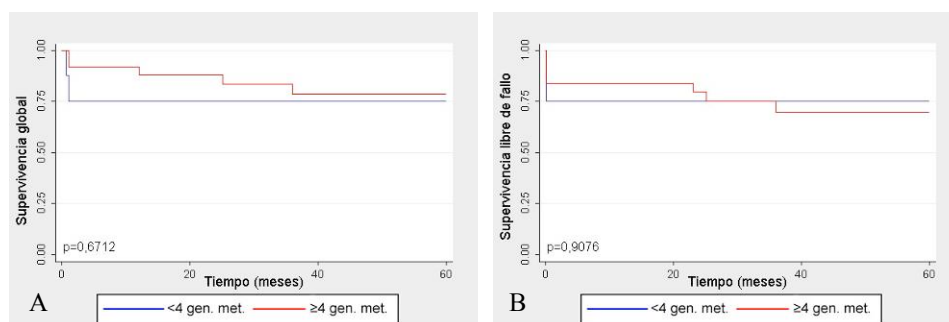


Figura 66: Asociación entre la presencia de menos o más de 4 promotores metilados y la SG (A) o la SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Tampoco se vieron diferencias entre los casos con más de 5 genes metilados o con menos (figura 67). De los 20 casos con más de 5 promotores metilados, 4 (20%) fallecieron antes de los 5 años. De los 13 casos restantes, 3 (23,1%) fallecieron y en uno (7,7%) se dio recidiva.

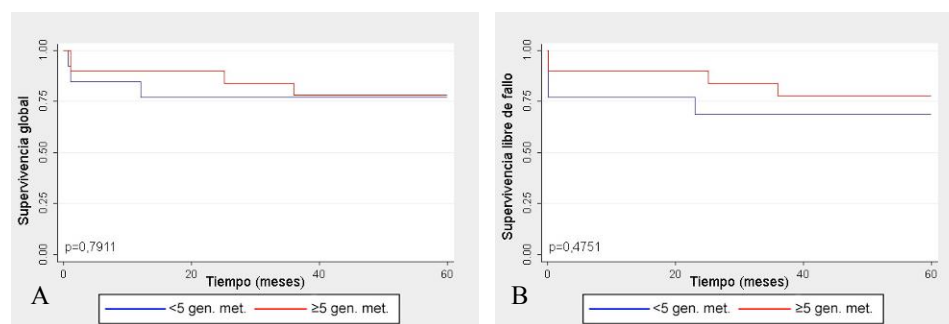


Figura 67: Asociación entre la presencia de menos o más de 5 promotores metilados y la SG (A) o la SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

La SG y SLF fueron similares entre los casos con más de 6 genes metilados o con menos de 6 (figura 68). De los 16 casos con más de 6 metilaciones, tres (18,8%) no sobrevivieron a los 5 años, mientras que de los 18 casos con menos de 6 promotores metilados, 4 (22,2%) fallecieron y en dos (11,1%) hubo recaída.

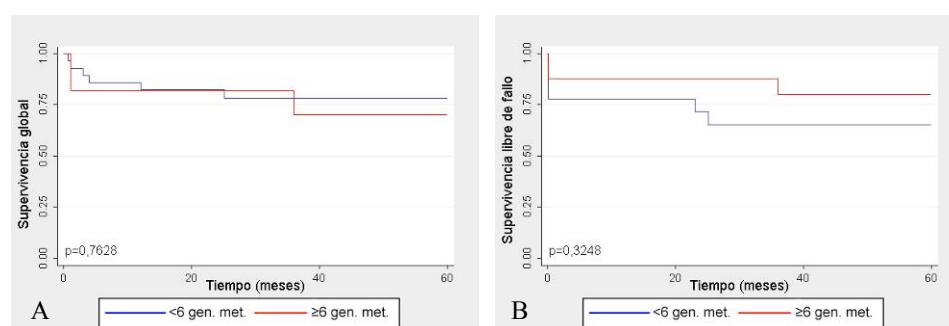


Figura 68: Asociación entre la presencia de menos o más de 6 promotores metilados y la SG (A) o la SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

El grupo de casos con menos de 7 genes metilados, mostró una SG y SLF menor que los que presentaban más de 7 promotores metilados (figura 69), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0,1983$ y $p = 0,0847$, respectivamente). De los 11 casos con más de 7 metilaciones, tan

Resultados

solo uno (9,1%) falleció, mientras que de los 21 casos con menos de 7 genes metilados, 6 (28,6%) fallecieron y dos (9,5%) recayeron.

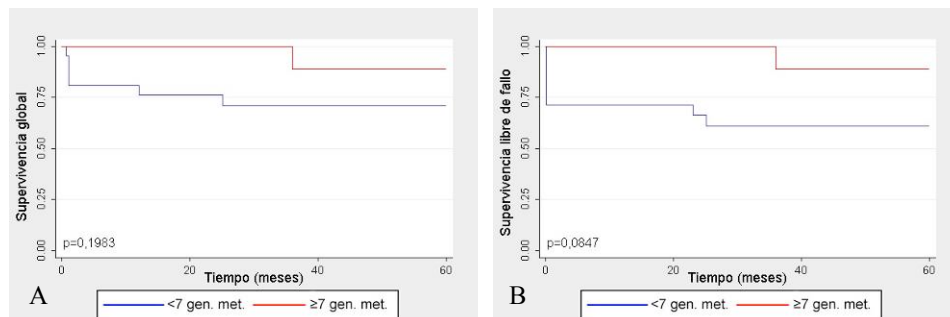


Figura 69: Asociación entre la presencia de menos o más de 7 promotores metilados y la SG (A) o la SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Por último, los casos con menos de 8 promotores metilados también mostraron una ligera disminución de la SG y la SLG (figura 70), aunque no estadísticamente significativa ($p = 0,4469$ y $p = 0,2606$, respectivamente). De los 8 casos con más de 8 metilaciones, sólo uno (12,5%) falleció, mientras que de los 25 casos con menos de 8 genes metilados, 6 (24%) fallecieron y en dos (8%) se dio recaída.

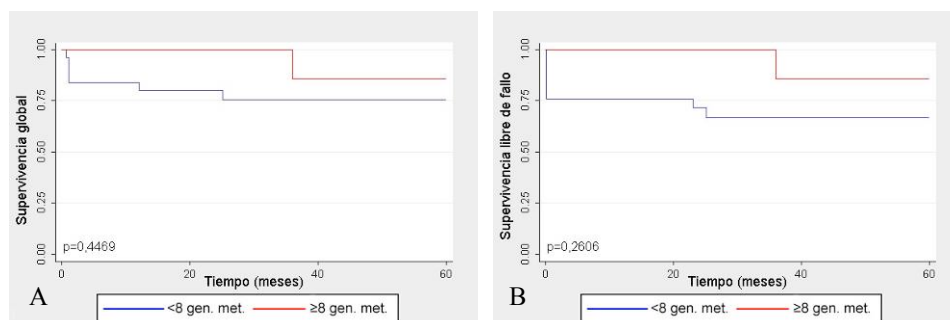


Figura 70: Asociación entre la presencia de menos o más de 8 promotores metilados y la SG (A) o la SLF (B) estimada mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Por lo tanto, la metilación de los promotores de los genes analizados en este trabajo no mostró asociación con el pronóstico de los DLBCL gástricos ni independientemente ni en conjunto.

Tabla 25: Correlación entre el número de promotores metilados y la SG o la SGL.

Nº de genes metilados	N (%)	SG 5 años	p	SLF 5 años	p
		N (%)		N (%)	
< 4	8 (24,2)	6 (75)	0,6712	6 (75)	0,9076
≥ 4	25 (75,8)	20 (80)		18 (72)	
< 5	13 (39,4)	10 (76,9)	0,7911	9 (69,2)	0,4751
≥ 5	20 (60,6)	16 (80)		16 (80)	
< 6	18 (52,9)	14 (77,8)	0,7628	12 (66,7)	0,3248
≥ 6	16 (47,1)	13 (81,2)		13 (81,2)	
< 7	21 (65,6)	15 (71,4)	0,1983	13 (61,9)	0,0847
≥ 7	11 (34,4)	10 (90,9)		10 (90,9)	
< 8	25 (75,8)	19 (76)	0,4469	17 (68)	0,2606
≥ 8	8 (24,2)	7 (87,5)		7 (87,5)	

Abreviaturas; N (%) número de casos y porcentaje, SG: supervivencia global, SLF: supervivencia libre de fallo

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo ha sido establecer marcadores que clasifiquen los DLBCL gástricos en grupos pronósticos para poder de ese modo ajustar el tratamiento. Para ello, se analizó el valor pronóstico de parámetros clínicos, de expresión de proteínas y del estado de metilación de promotores en una muestra de DLBCL gástricos.

En este trabajo, nos hemos centrado en los DLBCL gástricos. Las publicaciones que hasta el momento han tratado de definir marcadores pronósticos en los DLBCL son contradictorios. Se ha descrito que el inmunofenotipo y las características clinicopatológicas de casos nodales y extranodales no es el mismo¹²⁻¹³, encontrando en algunos casos diferencias también entre distintas localizaciones extranodales¹⁴⁻¹⁵. Estas diferencias y los resultados contradictorios de la literatura nos han llevado a considerar la necesidad de utilizar una muestra muy homogénea y de una sola localización. Seleccionamos la localización gástrica debido a que, además de ser una muestra homogénea, es la localización extranodal más frecuente, hecho importante dada la baja frecuencia de esta patología y la dificultad que supone obtener una muestra suficiente.

Hemos estudiado un total de 101 muestras, de las cuales 58 son controles de biopsias gástricas sin neoplasia y 43 son biopsias de DLBCL gástricos. Los 43 pacientes analizados se recolectaron durante un período de 22 años (1985-2007) en tres hospitales del País Vasco (Hospital Donostia, Txagorritxu y Galdakao).

ASOCIACIÓN PRONÓSTICA DE PARÁMETROS CLÍNICOS Y TRATAMIENTO

De todos los parámetros clínicos analizados en este trabajo (sexo, edad, niveles de LDH y β 2-MG en suero, afectación ganglionar, infiltración de la médula ósea y tratamientos) hemos detectado una asociación significativa de los niveles aumentados de LDH y casi significativa de la no realización de gastrectomía con una SLF menor.

En este trabajo, el sexo del paciente no estaba asociado a la supervivencia, aunque se pudo observar una tendencia en los varones a tener una menor SLF que en las mujeres (66,7% vs. 84,6%, $p = 0,2207$). En DLBCL nodales, el sexo se ha propuesto como marcador pronóstico, ya que Tomita y cols.¹²³, en un trabajo en el que analizaron 177 casos, encontraron una menor supervivencia significativa de los varones frente a las mujeres (62% vs. 78%, $p = 0,01$). Ibrahim y cols.²⁹, en un grupo de 185 DLBCL gástricos, también describieron una asociación entre sexo masculino y menor supervivencia (67% vs. 81%, $p = 0,03$) pero Hung y cols.²⁸, en 81 casos, no encontraron esta asociación (44 vs. 86 meses, $p = 0,0690$). En este último trabajo, al igual que en el nuestro, se ha observado una tendencia en los hombres con DLBCL a tener una menor supervivencia, lo que sugiere que sí existe una ligera asociación pronóstica, aunque ésta sea de poco peso, ya que tan solo los trabajos que han utilizado un alto número de muestras han encontrado asociación estadísticamente significativa.

En nuestro estudio la edad del paciente (mayor o menor de 60 años) no se asoció con la supervivencia (SLF: 64% vs. 86,7%, $p = 0,1162$). Una edad superior a 60 años ha sido propuesta como marcador de mal pronóstico en DLBCL nodales. De hecho, éste es uno de los factores pronósticos que se tienen en cuenta para establecer el IPI⁴¹, ya que tras analizar 3273 casos detectaron una

menor supervivencia de los pacientes en este grupo de edad (41% vs. 60%, $p < 0,001$). Sin embargo, es de destacar que, al igual que nosotros, Hung y cols.²⁸, que analizaron un total de 81 casos de DLBCL gástricos ($p = 0,8982$) e Ibrahim y cols.²⁹, que estudiaron 185 casos de DLBCL gástricos ($p = 0,08$), no detectaron asociación entre la edad y el pronóstico. Hasta la fecha todos los trabajos realizados en DLBCL gástricos indican que la edad no es un factor pronóstico en estos linfomas, a diferencia de lo que se ha observado en los DLBCL de localización nodal.

En este trabajo, fueron pocos los pacientes que presentaron niveles aumentados de LDH, dato que apoya los resultados de López-Guillermo y cols.¹⁴, que describieron que los DLBCL gástricos presentan niveles más bajos de LDH que los nodales. Éstos casos con LDH aumentado se asociaron a una SLF significativamente menor (25% vs. 88,9%, $p = 0,0004$). Esta asociación había sido ya descrita en DLBCL nodales por Tomita y cols.¹²³, que analizaron 177 casos (48% vs. 91%, $p < 0,001$) y por Guglielmi y cols.¹²⁴, que analizaron 474 casos (18% vs. 48%, $p < 0,001$), y es uno de los factores pronósticos considerados en el IPI⁴¹. En el caso de los DLBCL gástricos, en el estudio de Hibrahim y cols.²⁹, en el que se analizaron 185 DLBCL gástricos, los niveles aumentados de LDH también se asociaron con peor pronóstico (67% vs. 92%, $p < 0,0001$). Asimismo, el trabajo de Hung y cols.²⁸, que analizó 88 DLBCL gástricos, no encontró una asociación significativa entre el nivel de LDH y el pronóstico, pero observó una tendencia a sobrevivir menos de aquellos pacientes con LDH aumentado (47 meses vs. 71 meses, $p = 0,4449$). Todos estos resultados sugieren que el nivel de LDH es un buen marcador pronóstico tanto para DLBCL nodales como para gástricos, aunque en los linfomas gástricos haya muy pocos pacientes con niveles aumentados de LDH.

No encontramos asociación significativa entre el alto nivel de $\beta 2$ -MG y la supervivencia en la población de DLBCL gástricos analizados. En DLBCL

Discusión

nodales, Litam y cols.¹²⁵, que estudiaron 88 pacientes, detectaron una asociación entre los casos con niveles aumentados de β 2-MG y menor ratio de respuesta completa (36% vs. 71%, $p < 0,001$). Sin embargo, recientemente, Ke y cols.¹²⁶, que analizaron 83 DLBCL nodales, no detectaron esta asociación. En DLBCL gástricos, Hung y cols.²⁸, en 88 casos, asociaron los niveles aumentados de β 2-MG a menor supervivencia (44 meses vs. 86 meses, $p = 0,0082$). En nuestro trabajo, aunque no encontramos asociación significativa entre este parámetro y el pronóstico, se vio una tendencia a presentar menor SLF en los casos con niveles aumentados de β 2-MG (62,5% vs. 88,9%, $p = 0,0695$). Puede que con un mayor número de muestras, dado que este parámetro lo hemos podido registrar solo en 17 de los casos, se llegue a encontrar asociación entre los niveles de β 2-MG y la supervivencia en los DLBCL gástricos.

La afectación ganglionar fue propuesta como marcador de mal pronóstico en un trabajo con linfomas MALT y DLBCL gástricos por Montalban y cols.⁴³, que analizaron 84 MALT gástricos y 59 DLBCL gástricos. En nuestro trabajo, este parámetro no mostró asociación significativa con la SG ni la SLF (69,2% vs. 92,3%, $p = 0,1199$ y $p = 0,1285$, respectivamente). Dado que en el trabajo de Montalbán y cols. la mayor parte de la muestra la componían pacientes con linfoma MALT, podría ser que la afectación ganglionar sea un marcador pronóstico válido para estos linfomas de bajo grado, pero no así para los DLBCL gástricos.

En el presente trabajo no se pudo valorar la implicación pronóstica de la infiltración de la médula ósea en los DLBCL gástricos, ya que tan solo un paciente, que falleció, presentaba la infiltración, por lo que no pudo realizarse el análisis estadístico correspondiente. Por un lado, nuestro resultado confirma lo encontrado por López-Guillermo y cols.¹⁴, quienes habían descrito que los DLBCL del tracto gastrointestinal, al contrario que los nodales o los de otras localizaciones extranodales, no suelen presentar infiltración medular, lo que

nuevamente confirma que existen diferentes características entre los linfomas según su localización. Y, por otro lado, al ser tan raro que exista infiltración de la médula ósea en los DLBCL gástricos, nuestros datos indican que este parámetro no resulta de utilidad a nivel pronóstico en estos linfomas.

En cuanto al tratamiento, por un lado, encontramos una asociación casi significativa entre los casos en los que se realizó gastrectomía y una mayor SLF (75,6% vs. 50%, $p = 0,0526$). En los últimos años, la gastrectomía no se utiliza como tratamiento de primera línea, ya que algunos trabajos han propuesto que un tratamiento conservador, sin gastrectomía, proporciona resultados de supervivencia similares a los de la realización de la cirugía y una mejor calidad de vida. Así, Hung y cols.²⁸, detectaron supervivencias parecidas en 88 pacientes con y sin gastrectomía (60 meses vs. 64 meses, $p = 0,4873$). Aviles y cols.³¹ tampoco vieron diferencias entre tratamiento con o sin la cirugía en 589 pacientes ($p = 0,866$). Sin embargo, Medina-Franco y cols.³⁰, que estudiaron 41 pacientes con MALT o DLBCL gástrico, asociaron la realización de la gastrectomía con mayor supervivencia (168 meses vs. 91 meses, $p = 0,04$). Nuestros resultados indican que esta cirugía podría mejorar el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, hay que tener en cuenta la baja calidad de vida de los pacientes gastrectomizados. Además, la operación tiene un riesgo de mortalidad, tal como hemos visto en nuestro trabajo, en el que tres de los 33 pacientes gastrectomizados (9,1%) fallecieron a causa de la cirugía.

Por otro lado, entre los pacientes gastrectomizados, analizamos las diferencias de supervivencia entre los 22 tratados con quimioterapia y los cinco tratados con quimioterapia más Rituximab. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en cuanto a la SG (86,4% vs. 100%, $p = 0,5137$) ni la SLF (81,8% vs. 100%, $p = 0,4303$). En DLBCL nodales, la adición de Rituximab ha mejorado el pronóstico de los pacientes, tal como lo demuestra un estudio reciente en el que tras comparar la evolución de

Discusión

560 pacientes tratados con QT con la de 271 tratados con R-QT, se comprobó que la supervivencia del segundo grupo era significativamente mayor ($p < 0,001$)¹²⁷. En DLBCL gástricos, recientemente, Chihara y cols.³³, que estudiaron 75 casos, también describieron mejoras en la supervivencia con la utilización de Rituximab. En nuestro trabajo, a pesar de que no hemos visto diferencias significativas, hay que tener en cuenta que de los 5 pacientes tratados con quimioterapia más Rituximab ninguno falleció ni recayó, lo que sugiere que este fármaco mejora el pronóstico de los pacientes con DLBCL gástrico, pero sólo se han podido tener en cuenta 5 pacientes, por lo que esta hipótesis necesitará confirmarse con un mayor número de casos.

PRESENCIA DE LA t(11;18) EN LOS DLBCL GÁSTRICOS

Los linfomas MALT pueden tener su origen en la infección por *H. pylori* o en translocaciones cromosómicas, siendo la más frecuente la t(11;18)¹⁶. Hasta hace poco, estaba aceptado que los linfomas MALT con la t(11;18) no progresaban a DLBCL gástrico. Sin embargo, recientemente, dos trabajos han detectado la translocación en DLBCL gástricos en porcentajes similares a los encontrados en linfomas MALT^{26,27}. En los linfomas MALT gástricos, los casos que provienen de la infección por *H. pylori* son tratados con antibióticos para su erradicación, mientras que los casos que presentan la t(11;18) no responden a este tratamiento³⁴. En los últimos años, el tratamiento con antibióticos está siendo propuesto también para los DLBCL gástricos³⁵⁻⁴⁰, por lo tanto, la presencia de la t(11;18) podría utilizarse como marcador pronóstico de resistencia a la erradicación de *H. pylori*. Por ello, analizamos la presencia de la t(11;18) en nuestra muestra de DLBCL gástricos.

En el presente estudio, la presencia de la translocación t(11;18)(q21;q21) se determinó mediante hibridación in situ fluorescente o FISH, utilizando la

sonda de fusión *API2/MALT1*, compuesta por una mezcla de dos sondas, la sonda *API2* marcada con fluorocromo verde y que señala la región 11q21 y la sonda *MALT1* marcada con fluorocromo rojo y que señala la región 18q21. Las células con la translocación presentan una señal roja, una verde y dos señales de fusión. Para establecer el punto de corte a partir del cual considerar como positiva la translocación, es necesario utilizar muestras no neoplásicas, ya que la fusión de la señal roja y verde puede darse debida al azar^{21,27}. Por ello, antes de analizar los DLBCL gástricos, establecimos este valor con 6 muestras de gastritis crónica. Teniendo en cuenta los puntos de corte obtenidos, ninguno de los 38 casos analizados en nuestro estudio mostró la t(11;18). Este resultado coincide con el descrito por Nakamura y cols.²¹, que analizaron un total de 141 DLBCL gástricos por FISH mediante sondas de fusión, 58 de ellos con linfoma MALT asociado, y ninguno presentó la t(11;18).

Toraccio y cols.²⁶, que estudiaron la presencia de la t(11;18) en 31 DLBCL gástricos por nested-RT-PCR, la detectaron en 6 de ellos (19,4%). Esta técnica tiene mayor sensibilidad que el FISH y con ella se puede detectar un porcentaje de células con la translocación del orden del $1/10^{-6}$. Este método de nested-PCR de detección de la t(11;18) u otras translocaciones se ha desestimado para su empleo en diagnóstico debido a que una frecuencia de la translocación de $1/10^{-6}$ puede darse en individuos sanos. Por ejemplo, la t(14;18), característica del linfoma folicular, se ha encontrado en sangre periférica en el 46% de los individuos sanos en al menos una célula de cada 25.000¹³⁵. Por ello, creemos que en el estudio de Toraccio y cols.²⁶ podrían estar detectando una cantidad de células con la t(11;18) muy pequeña, ya que no se utilizaron controles sanos para comprobar que esta alteración no estaba presente ya en los linfocitos de los pacientes sin neoplasias. Estos autores, en cuatro de los casos positivos por RT-PCR, realizaron una comprobación mediante FISH con sondas de fusión. En tres, encontraron sólo dos señales de fusión, considerando que presentaban la t(11;18)

Discusión

y la pérdida de los cromosomas normales 11 y 18, aunque no especifican el porcentaje de células en las que detectan esta alteración ni el punto de corte. En otro caso, detectaron una señal verde, una roja y una de fusión en más del 4% de las células, considerando que presentaba la t(11;18) y la pérdida de uno de los cromosomas derivados der(11) o der(18). En este caso, tampoco establecieron un punto de corte. En nuestra muestra, el punto de corte que establecimos para considerar un caso como positivo fue del 9% (aparición de una señal de fusión roja-verde en el 9% de las células), por lo que la detección de una señal de fusión en el 4% de las células la consideramos debida al azar y la clasificamos como negativa para esta translocación

Bernasconi y cols.²⁷, que analizaron la translocación en 56 DLBCL gástricos por FISH, la encontraron en 8 casos (14,3%), pero en su trabajo no especifican el porcentaje de células con la alteración ni el punto de corte. Además, en este caso, utilizaron sondas de “Break apart”, una combinación de sondas con fluorocromo rojo y verde que se unen a los dos extremos del gen *MALT1* en la región 18q21 y que al detectarse separadas indican la rotura del gen *MALT1*, pero no la t(11;18) específicamente.

De acuerdo a nuestros resultados, se puede considerar que la translocación t(11;18) no está presente en los DLBCL gástricos, una vez establecido un punto de corte que elimine las detecciones debidas al azar. Además, este resultado sugiere que, tal como se proponía anteriormente²¹⁻²⁵, los linfomas MALT con la t(11;18) no progresan a DLBCL gástricos.

Por otro lado, uno de los pacientes con DLBCL gástrico presentó la amplificación del gen *API2*, localizado en la región 11q21. Este paciente falleció un mes después del diagnóstico. Numerosos trabajos defienden la idea de que *API2* es un importante oncogén, ya que promueve la supervivencia celular, estimulando el crecimiento tumoral. De hecho, la expresión de la proteína Api2 se encuentra frecuentemente aumentada en cáncer de pulmón y en mesotelioma

pleural y en estos últimos se ha asociado con la resistencia al tratamiento¹³⁶. Al ser tan solo un caso el que presentó esta amplificación, no es posible concluir una posible asociación de ésta con la supervivencia, por lo que sería de interés estudiar su presencia en un mayor número de casos y establecer su posible valor pronóstico.

ASOCIACIÓN PRONÓSTICA DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

En este trabajo, hemos analizado el valor pronóstico de los algoritmos inmunohistoquímicos y la expresión de proteínas que se han asociado con la supervivencia en diferentes tipos de DLBCL, como son el algoritmo de Hans, Muris y Choi y la expresión de las proteínas CD10, Bcl-6, Gcet1, MUM-1, Bcl-2 y BLIMP-1.

Mediante el algoritmo de Hans, aproximadamente la mitad de los casos analizados en nuestra muestra se clasificaron dentro del grupo CG y la otra mitad en el grupo no-CG. Nosotros, en nuestra población de pacientes con DLBCL gástricos, no encontramos asociación entre esta clasificación (CG, no-CG) y la supervivencia.

La mayoría de los trabajos realizados en DLBCL nodales han reproducido el valor pronóstico de este algoritmo^{45-47,49} o al menos han detectado una clara tendencia a una mayor supervivencia del grupo CG⁵¹. Sin embargo, los trabajos realizados con muestras heterogéneas de casos nodales y extranodales⁵²⁻⁵⁴ o gastrointestinales⁵⁵⁻⁵⁶ no han encontrado tal asociación entre el algoritmo de Hans y el pronóstico, lo que podría ser debido a que este algoritmo es válido tan solo para casos nodales y que la utilización de mezclas de casos nodales y extranodales anula su valor pronóstico. En DLBCL gástricos, Chen y cols.⁵⁷, que

Discusión

analizaron 32 pacientes asiáticos, al contrario que nosotros, encontraron una asociación significativa de los casos no-CG clasificados por el algoritmo de Hans y el mal pronóstico ($p = 0,034$). El hecho de que dos trabajos diferentes, utilizando metodología, número de muestra y análisis estadístico similar, encuentren resultados contradictorios podría deberse a diferencias poblacionales y cuestiona la utilidad de este algoritmo en los DLBCL gástricos de diferentes poblaciones.

El algoritmo de Choi, recientemente descrito como mejora al algoritmo de Hans, tampoco se asoció al pronóstico en nuestra muestra de DLBCL gástricos. En DLBCL nodales, se ha propuesto que este algoritmo clasifica de manera más exacta los dos grupos, ya que por un lado la clasificación de las muestras en tipo CG y no-CG se ajusta más a la obtenida de los datos de matrices de expresión y, por otro lado, el valor pronóstico es más significativo que el del algoritmo de Hans ($p < 0,001$)⁵⁸. Nuestros resultados indican que la clasificación de los DLBCL gástricos en tipo CG y no-CG con este algoritmo, al igual que ocurría con el algoritmo de Hans, no tiene utilidad como valor pronóstico.

En este trabajo, tan solo uno de los casos (2,6%), que falleció al mes del diagnóstico, se clasificó como grupo 2 con el algoritmo de Muris, no pudiendo realizar el análisis estadístico de supervivencia. En el trabajo de Muris y cols.⁴⁷, el 45% de los casos nodales se clasificaron como grupo 2. El hecho de encontrar tan baja frecuencia de individuos en el grupo 2 en los DLBCL gástricos apoya la idea de la existencia de diferencias inmunofenotípicas entre casos nodales y gástricos y hace que el valor pronóstico del algoritmo de Muris en estos linfomas sea de escasa validez.

Además de los algoritmos inmunohistoquímicos, en el presente trabajo también se ha estudiado el valor pronóstico independiente de la expresión de distintas proteínas. Por un lado, las proteínas que expresan los linfocitos B del centro germinal, CD10, Bcl-6 y Gcet1 que se han propuesto como marcadores de

buen pronóstico en los DLBCLs en general y, por otro lado, las proteínas que se expresan sobre todo en linfocitos B plasmáticos, como son MUM-1, Bcl-2 y BLIMP-1, que se han asociado a mal pronóstico en casos de DLBCL nodales y en mezcla de nodales y extranodales.

Así, al comparar el porcentaje de casos con expresión de CD10, Bcl-6 y MUM-1, éstos fueron similares a los descritos por otros estudios, tanto en casos nodales como en gástricos. Sin embargo, el porcentaje de casos con expresión de Gcet1, Bcl-2 y BLIMP-1 fue inferior al encontrado por otros trabajos en DLBCL nodales, pasando de frecuencias del 47%, 55% y 43% en casos nodales a 23%, 19% y 28% en casos gástricos, respectivamente. Este resultado apoya la hipótesis de que existen diferencias en caracterización inmunofenotípica de DLBCLs de diferente localización.

Al analizar el valor pronóstico de las seis proteínas en nuestra muestra de estudio, encontramos una fuerte asociación de la expresión de BLIMP-1 con un mal pronóstico de los casos de DLBCL gástricos así como de la expresión de Bcl-2 en pacientes con DLBCL gástricos de tipo no-CG también con un mal pronóstico. Para el resto de proteínas analizadas no se observó asociación entre la expresión y pronóstico del linfoma.

La expresión de CD10 no mostró asociación significativa con la supervivencia en nuestro trabajo. En la mayoría de los estudios realizados con DLBCL nodales, la expresión de esta proteína se ha asociado a mejor pronóstico⁴⁵⁻⁴⁷. Por ejemplo, Berglund y cols.⁴⁶, que analizaron 161 DLBCL nodales, observaron que los casos que expresaban CD10 mostraban una mayor SG ($p = 0,04$), al igual que en el trabajo de Hans y cols.⁴⁵, con 152 casos ($p = 0,019$). Tan solo en un estudio, el de Oh y cols.⁵¹, que analizaron 51 casos, su valor pronóstico no fue estadísticamente significativo, aunque también observaron una tendencia hacia una menor supervivencia en los casos positivos para CD10 ($p = 0,0992$). Otros estudios realizados con mezclas de casos nodales

Discusión

y extranodales⁵²⁻⁵³ o gastrointestinales⁵⁵, no han encontrado asociación entre la expresión de CD10 y la supervivencia, al igual que nosotros. Estos resultados podrían deberse, una vez más, a la utilización de muestras de diferentes localizaciones o a que la expresión de CD10 es un marcador pronóstico válido tan solo en casos nodales. Que sepamos, solo un estudio previo, realizado con 61 DLBCL gástricos, asoció la expresión de CD10 con mayor supervivencia (88% vs. 66%, $p = 0,04$)⁵⁹. Por lo tanto, el valor pronóstico de esta proteína en DLBCL gástricos sigue siendo cuestionable, al encontrarse resultados contradictorios.

No encontramos asociación entre la expresión de Bcl-6 y el pronóstico, resultado similar al obtenido por Ponzoni y cols⁵⁹, que tampoco encontraron esta asociación en 61 DLBCL gástricos ($p = 0,28$). Sin embargo, Chen y cols.⁵⁷, que analizaron 38 DLBCL gástricos, asociaron la expresión de Bcl-6 con mejor pronóstico ($p = 0,016$). Esta diferencia podría deberse a que en este estudio consideraron como positivos para Bcl-6 los casos con tinción en más del 50% de las células, mientras que tanto en nuestro estudio como en el resto de los encontrados en la bibliografía, los casos positivos debían presentar un 30% de células teñidas^{45-49,51-53,59}. Por lo tanto, con el criterio de positividad del 30% establecido, Bcl-6 parece no ser un marcador de supervivencia en DLBCL gástricos.

La expresión de Gcet1 se detectó sólo en los DLBCL gástricos de tipo CG, según el algoritmo de Hans, por lo que, tal como habían descrito Montes-Moreno y cols.⁶⁰, es un marcador inmunohistoquímico válido de este grupo. En linfocitos B normales, la proteína Gcet1 también se expresa tan solo en células del centro germinal⁶⁰. A pesar de que es un marcador de CG, en DLBCL gástricos este hecho no le confiere valor pronóstico, ya que el grupo CG definido por el algoritmo de Hans o el de Choi no tiene valor pronóstico en los DLBCL gástricos, tal como hemos descrito previamente. Parece que Gcet1 no tiene

utilidad pronóstica en DLBCL gástricos, pudiendo ser útil en los DLBCL nodales.

La expresión de MUM-1 no mostró asociación con la SG ($p = 0,9797$) ni la SLF ($p = 0,7685$). Algunos trabajos con casos nodales han propuesto la expresión de esta proteína como marcador de menor supervivencia^{45,47}, aunque son numerosos los trabajos con casos nodales, nodales y extranodales o gastrointestinales que han discutido esta asociación^{46,48,51-53}. En casos específicamente gástricos, su valor pronóstico no ha sido analizado, aunque sí en un grupo de DLBCL gastrointestinales, en los que, al igual que nosotros, Connor y cols.⁵⁵, que analizaron 29 casos, tampoco encontraron la expresión de MUM-1 asociada al pronóstico ($p = 1$). Estos resultados sugieren que MUM-1 no es un marcador de supervivencia en DLBCL gástricos, siendo su valor pronóstico en otras localizaciones también discutible.

La expresión de Bcl-2 no mostró ser un marcador pronóstico válido en DLBCL gástricos. Su valor pronóstico en DLBCL nodales ha sido discutido, ya que mientras algunos trabajos han asociado la expresión de Bcl-2 a menor supervivencia⁴⁶⁻⁴⁷, otros no han encontrado esta asociación^{45,51}. En trabajos con DLBCLs de diferentes localizaciones, nuevamente algunos han asociado su expresión a peor pronóstico^{48,52,61}, mientras que otros no han detectado asociación^{53,55}. Podría ser que estos resultados contradictorios se deban a que, tal como han descrito Nyman y cols.⁵⁴, la expresión de Bcl-2 es un marcador de mal pronóstico en los DLBCL de tipo no-CG según el algoritmo de Hans, pero no así en los de CG. Por ello, nosotros analizamos los DLBCL gástricos de estos dos grupos de manera separada. Dentro del tipo CG, los pacientes con y sin expresión de Bcl-2 mostraron supervivencias similares, pero dentro del tipo no-CG, los casos con expresión de Bcl-2 tuvieron una menor SLF, que fue estadísticamente significativa (40% vs. 91,7%, $p = 0,0264$). Nuestros resultados indican que en DLBCL gástricos la expresión de Bcl-2 en pacientes de tipo no-CG, definidos

Discusión

mediante el algoritmo de Hans, podría ser un indicador de peor pronóstico. El papel pronóstico de la expresión de Bcl-2 podría ser debido a su papel antiapoptótico, ya que las células que expresan Bcl-2 son resistentes a los agentes quimioterápicos, al ser estos incapaces de eliminar las células mediante la inducción de la apoptosis⁶¹.

En este trabajo, por primera vez en DLBCL gástricos, la expresión de BLIMP-1 se asoció a menor SG (54,5 vs. 86,2%, $p = 0,0158$) y de manera muy significativa a menor SLF (36,4 vs. 86,2, $p = 0,0003$). En DLBCL nodales, BLIMP-1 tan solo se ha analizado en un trabajo por García y cols.⁶², con 235 casos, en el que también encontraron la expresión de esta proteína asociada a menor SLF ($p < 0,05$). Por lo tanto, la expresión de BLIMP-1 es un marcador de mayor agresividad en DLBCL gástricos, así como en nodales.

A pesar de que en los linfocitos normales la proteína BLIMP-1 se expresa en los últimos estadios de la diferenciación a células plasmáticas, detectamos su expresión tanto en casos de tipo CG como no-CG. En las células normales del centro germinal, las células positivas para BLIMP-1 co-expresan MUM-1 y no expresan Bcl-6. Sin embargo, en nuestro trabajo, al igual que en el de García y cols.⁶², encontramos tanto casos BLIMP-1 positivos/MUM-1 negativos como BLIMP-1 positivos/Bcl-6 positivos, lo que indica que se pierde la distribución normal de estas proteínas en los DLBCL.

Como conclusión de todos los marcadores proteicos que hemos analizado en este trabajo, la expresión de BLIMP-1 es la que clasifica de manera más significativa los DLBCL gástricos en grupos pronósticos, siendo de utilidad para detectar los casos con un mal pronóstico. Este marcador, de manera independiente, da más información que el resto de algoritmos o proteínas independientes analizados en nuestra población de DLBCL gástricos.

METILACIÓN DE PROMOTORES

En estudios realizados en DLBCLs¹⁰⁷⁻¹¹⁶, se ha observado que la metilación de promotores de genes supresores de tumores (*p16*, *FHIT*, *p73*, *p57*, *CDH1*, *p15*, *ID4*, *VHL*, *DAP-k* y *BMP-6*), genes reparadores de ADN (*ATM* y *hMLH1*) y genes detoxificantes (*MGMT* y *GSTP1*) es un fenómeno frecuente. En DLBCL específicamente gástricos, son muy pocos los trabajos que han verificado la metilación de promotores de algunos de estos genes (*p16*, *p73*, *p57*, *CDH1*, *p15*, *DAP-k*, *ATM*, *hMLH1* y *MGMT*) y en los trabajos encontrados la muestra es de un número muy bajo de casos (10-26 casos)^{93-94,117}, pero aunque con bajo poder estadístico, parecen indicar que la metilación de promotores es frecuente en los DLBCL gástricos. Por ello, en nuestro trabajo, quisimos analizar el estado de metilación de los promotores frecuentemente metilados en DLBCLs en un mayor número de casos de DLBCL gástricos.

En nuestra muestra de DLBCL gástricos, en 13 de los 14 genes analizados, encontramos casos con el promotor metilado, y en 6 de ellos (*p16*, *p57*, *CDH1*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6*), todos genes supresores de tumores, el porcentaje de casos con metilación fue superior al 50% (78%, 60%, 89%, 80%, 92% y 54%, respectivamente). Aunque en menor porcentaje, también se encontraron casos con metilación del promotor en los genes *FHIT*, *p73*, *p15*, *VHL*, *ATM*, *MGMT* y *GSTP1* (15%, 23%, 25%, 2,7%, 5%, 23% y 5%, respectivamente). Los porcentajes de metilación encontrados en los promotores de *p73*, *DAP-k* y *ATM* son similares a los encontrados en trabajos previos con DLBCL gástricos^{93-94,117}. En el caso de *p16*, *p57* y *CDH1*, hemos detectado un mayor porcentaje de casos con metilación que los estudios anteriores, y en el caso de *p15*, *hMLH1* y *MGMT* un menor porcentaje, aunque puede que la diferencia respecto a estos estudios se deba al bajo número de muestras utilizados en los tres trabajos previos realizados, que tan sólo analizaron 10⁹³, 11⁹⁴ y 26 casos¹¹⁷ respectivamente. En

Discusión

cuanto al resto de los genes (*FHIT*, *ID4*, *VHL*, *BMP-6* y *GSTP1*), que sepamos, es la primera vez que se analizan en DLBCL específicamente gástricos.

Por otro lado, los porcentajes de metilación que encontramos en los promotores de *FHIT*, *p57*, *p15*, *ID4*, *BMP-6*, *MGMT* y *GSTP1* es similar al descrito por otros trabajos en DLBCL nodales o de otras localizaciones¹⁰⁷⁻¹¹⁶. En otros genes como *p16*, *CDH1* y *DAP-k* detectamos una mayor metilación que la descrita en trabajos previos con DLBCLs, en los que la metilación de *p16* se había descrito en aproximadamente el 50% de los casos¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, la de *CDH1* en el 59%¹⁰⁸, y la de *DAP-k* en el 59%-68% de los casos¹⁰⁸⁻¹¹². Por el contrario, la metilación encontrada en nuestros DLBCL gástricos en el promotor de *VHL* fue inferior a la descrita en un grupo de 33 DLBCL nodales y 13 extranodales, en los que se detectó en el 44% de los casos¹⁰⁸. Estas diferencias en los porcentajes de metilación de promotores de algunos de los genes podrían apoyar nuevamente la hipótesis de la existencia de diferencias biológicas entre DLBCLs de diferentes localizaciones.

Dado que la metilación de promotores también se ha descrito en tejido gástrico de individuos sanos^{80-83,89-92}, quisimos determinar si la metilación de promotores observada en el tejido tumoral del DLBCL gástrico era específica del tumor o si por el contrario era también frecuente en el tejido gástrico sano. Para ello, analizamos la metilación de los promotores de los 14 genes de nuestro estudio en un grupo de 58 controles gástricos de individuos sin neoplasias, en comparación con el tejido tumoral de los pacientes con DLBCL gástrico.

En estos controles de nuestro estudio, algunos de los genes analizados, como *p16*, *CDH1*, *ID4* y *DAP-k*, ya se encontraban metilados con una frecuencia considerable (33,9%, 50,9%, 32,7% y 45,5%, respectivamente). De hecho, de los 14 genes que analizamos, ocho, todos ellos genes supresores de tumores (*p16*, *p73*, *p57*, *CDH1*, *p15*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6*), se encontraban ya metilados en el

tejido gástrico de individuos sanos, si bien con menor frecuencia que en las muestras de DLBCL gástrico.

Este cambio en la metilación entre los tejidos sanos y malignos es una característica ya descrita en cánceres gástricos. Así, por ejemplo, Yoo y cols.⁸² analizaron la metilación de 23 islas CpG en 69 muestras tumorales de carcinoma gástrico y 82 tejidos gástricos de pacientes con gastritis, observando que la metilación, aunque ya existía en individuos con gastritis, aumentaba en los tejidos tumorales.

Nosotros quisimos ir un paso más allá en nuestro estudio y quisimos saber si a medida que el tejido se malignizaba la metilación de los promotores de los genes también se incrementaba. De este modo, en un paso siguiente quisimos ver qué ocurría en el tejido gástrico sano de los pacientes con DLBCL gástrico en cuanto a su metilación con respecto a los tejidos control sano y tumoral. Entre el tejido gástrico sano control y el de los pacientes con linfoma, la metilación fue mayor en éste último grupo en la mayoría de los genes, diferencia que fue significativa en el gen *p73* ($p = 0,009$) y casi significativa en los genes *DAP-k* ($p = 0,063$), *BMP-6* ($p = 0,061$) y *MGMT* ($p = 0,062$). Además, en seis de los genes (*p73*, *p57*, *p15*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6*), observamos un incremento progresivo de la metilación del tejido gástrico de los controles a tejido gástrico sano de los pacientes con linfoma y a tejido tumoral. Por ejemplo, la metilación de *ID4* observada en estos tres grupos, tejido control, tejido sano de pacientes con DLBCL y tejido tumoral, fue del 33%, 53% y 80% respectivamente. En el caso del promotor del gen *DAP-k* la metilación fue del 45%, 73% y 92%, respectivamente, y la del promotor de *BMP-6* del 7%, 25% y 54%, respectivamente. Este aumento progresivo de la metilación sugiere que la metilación de estos promotores podría estar implicada en el proceso de la oncogénesis y en la evolución del tumor.

Discusión

Similares observaciones se describen en los trabajos de Maekita y cols.⁸³ y Nakajima y cols.⁸⁰ estudiando la metilación de 8 y 48 genes, respectivamente, en tejido gástrico sano de individuos sin neoplasias y de pacientes con cáncer gástrico. Estos autores observaron que la metilación aumentaba en el tejido sano de pacientes con cáncer respecto al tejido sano de pacientes sin neoplasia.

Por lo tanto, podemos concluir que la metilación progresiva de los promotores de los genes supresores de tumores *p73*, *p57*, *p15*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6* podría ser un evento epigenético temprano en el proceso de la oncogénesis, pudiendo ser un indicador que permita reconocer estados pretumorales o de riesgo.

Otro aspecto en el que hemos intentado profundizar en el presente trabajo ha sido la posible implicación de la infección por *H. pylori* en el proceso de metilación de los promotores de los genes. Tal como hemos visto anteriormente, algunos de los genes analizados en nuestro trabajo, como *p16*, *CDH1*, *ID4* y *DAP-k*, se encontraban metilados frecuentemente en el tejido gástrico control utilizado. Parte de estos controles pertenecían a pacientes con gastritis crónica o úlceras e infectados por *H. pylori*. En los últimos años, se ha propuesto que la infección por esta bacteria puede inducir metilación de promotores^{81-83,89-92}. Por ello, quisimos analizar el efecto de la infección por *H. pylori* en la metilación de los promotores en el tejido gástrico de pacientes sin neoplasia, primero, y de DLBCL gástricos, después.

En los genes *p16*, *p57*, *p15*, *ID4*, *DAP-k*, *BMP-6* y *MGMT* observamos un incremento del porcentaje de individuos con metilación en los controles infectados por *H. pylori*. Esta diferencia fue estadísticamente significativa en el caso de los genes *p16* (18% vs. 48%, $p = 0,028$) y *DAP-k* (29% vs. 65%, $p = 0,032$) y se acercó al valor significativo en el gen *ID4* (23% vs. 41%, $p = 0,166$). El aumento de la metilación en genes como *p16* debido a la infección por *H. pylori* ya había sido descrita con anterioridad. Por ejemplo, Tahara y

cols.⁹⁰ analizaron la metilación de *p16*, *p14*, *CDH1* y *DAP-k* en 191 controles gástricos con o sin *H. pylori*, observando que los casos infectados presentaban un aumento de la metilación de *p16* y *CDH1*, así como del número de genes metilados. Dong y cols.⁸⁹, que estudiaron la metilación de *p16* en 920 biopsias gástricas con y sin infección, también describieron una mayor metilación de este gen en los tejidos con *H. pylori*. Estos estudios, junto con el nuestro, sugieren que la bacteria *H. pylori* puede inducir la metilación de promotores de algunos genes específicos.

Los tres genes que presentaban un aumento de la metilación en los controles infectados por *H. pylori*, (*p16*, *DAP-k* e *ID4*), son los que presentaron mayor porcentaje de casos de metilación en los DLBCL gástricos (78%, 92% y 80%, respectivamente). Además, considerando los 8 genes que habíamos encontrado más metilados en los DLBCL gástricos que en los controles, la media del porcentaje de metilación en los casos infectados fue superior a la de los no infectados de manera estadísticamente significativa (27,7% vs. 15,3%, $p = 0,002$).

A partir de todos estos resultados, podemos concluir que la metilación de los promotores de genes implicados en la evolución del DLBCL gástrico en tejido gástrico no neoplásico puede deberse, al menos en parte, a la infección por *H. pylori*.

Asimismo, proponemos que los pacientes con enfermedades gástricas no neoplásicas causadas por *H. pylori*, como gastritis crónica o úlcera, que presenten metilación de los promotores de estos genes sean considerados como un grupo de mayor riesgo a desarrollar DLBCL gástrico y, por tanto, deberían someterse a un mayor control de la enfermedad y de la erradicación de la bacteria.

En los linfomas MALT, está demostrado que en los casos con infección por *H. pylori*, que presentan un incremento de la metilación de promotores⁹⁴, la

Discusión

terapia de erradicación de la bacteria con antibióticos elimina el tumor³⁴. Esta erradicación, además de detener el estímulo inflamatorio, parece que va acompañada de una disminución de la metilación de promotores¹⁰². Debido a que la terapia con antibióticos está siendo propuesta para los DLBCL gástricos, quisimos analizar si había un aumento de la metilación en los casos infectados por *H. pylori*, ya que esto podría apoyar la utilización de los antibióticos. En algunos genes, como *p16*, *p57*, *p15*, *BMP-6* y *MGMT*, observamos un ligero incremento de la metilación en los casos con *H. pylori*. Este incremento fue estadísticamente significativo tan solo en el caso de *FHIT* (8% vs. 33%, $p = 0,034$). En cuanto a la media del porcentaje de metilación de los 8 genes más frecuentemente metilados en DLBCL gástricos que en los controles, esta fue exactamente igual en los casos con y sin infección por *H. pylori* (60,9). Estos resultados indican que una vez llegado el tumor a alto grado, la metilación se estabiliza, independientemente del estado de infección por la bacteria, lo que cuestiona la utilidad de los antibióticos en los DLBCL gástricos.

Ningún trabajo hasta ahora ha analizado el valor pronóstico de la metilación de los promotores de estos genes en DLBCL específicamente gástricos. En algunos tumores, se ha visto que la metilación de los promotores de genes específicos presenta valor pronóstico. Así, por ejemplo, en el glioblastoma, aquellos casos con el promotor del gen *MGMT* metilado tienen una mayor supervivencia y respuesta al tratamiento¹⁰³; en el cáncer de mama y ovario, la metilación de *BRCA1* se ha asociado con menor respuesta al tratamiento y en el cáncer de colon, gástrico y endometrial la metilación del gen *hMLH1* se ha asociado a peor pronóstico¹⁰⁴. Algunos estudios realizados con DLBCL nodales o mezclas de casos nodales y extranodales han propuesto la metilación de promotores como valor pronóstico, aunque no se ha llegado a resultados concluyentes. La metilación de los promotores de los genes *p16*^{108,109}, *FHIT*¹¹⁰, *DAP-k*¹⁰⁸, *BMP-6*¹¹³ y *VHL*¹⁰⁸ se ha asociado a peor pronóstico, aunque en el

caso de *p16*¹⁰⁷ y *DAP-k*¹¹² esta asociación ha sido discutida. Por otro lado, la metilación de *p57*¹⁰⁷, *MGMT*^{107,114-116} y *GSTP1*¹¹² se ha asociado a mayor supervivencia, siendo también discutido en el caso de *MGMT*¹¹².

Por ello, en el presente trabajo analizamos la asociación de la metilación de los promotores de los 14 genes seleccionados en nuestro estudio (genes supresores de tumores: *p16*, *FHIT*, *p73*, *p57*, *CDH1*, *p15*, *ID4*, *VHL*, *DAP-k* y *BMP-6*; genes reparadores de ADN: *ATM* y *hMLH1*; y genes detoxificantes: *MGMT* y *GSTP1*) con la supervivencia global y libre de fallo en nuestra muestra de DLBCL gástricos.

Ninguno de los promotores de los genes analizados en este trabajo mostró asociación con la SG ni con la SLF de manera individual.

Así, los casos con el promotor de *p16* metilado mostraron una SG y SLF similar a los no metilados ($p = 0,4830$ y $p = 0,7420$, respectivamente). En trabajos realizados con 46 y 59 DLBCL nodales y extranodales, Amara y cols.¹⁰⁸ y Shiozawa y cols.¹⁰⁹ asociaron la metilación de *p16* con peor pronóstico ($p = 0,001$ y $p = 0,01$, respectivamente), mientras que Lee y cols.¹⁰⁷, que estudiaron 44 DLBCL nodales, al igual que nosotros en casos gástricos, no encontraron asociación con la supervivencia. Por lo tanto, según nuestros resultados, la metilación de *p16* parece no tener valor pronóstico en los DLBCL gástricos, mientras que su asociación con la supervivencia en otras localizaciones es controvertida.

La metilación del promotor del gen *FHIT*, que en este trabajo no mostró asociación con la supervivencia, ha sido propuesta como marcador de menor supervivencia en DLBCLs por Al-Kuraya y cols.¹¹⁰, que estudiaron 114 casos de estos linfomas ($p = 0,0232$). Teniendo en cuenta nuestros resultados, la metilación de este gen parece no tener valor pronóstico en los DLBCL gástricos.

Discusión

Los DLBCL gástricos con metilación en el promotor del gen *p57* mostraron una mayor SLF, aunque no fue estadísticamente significativa (85% vs. 60%, $p = 0,0916$). Lee y cols.¹⁰⁷, en un grupo de 44 DLBCL nodales, asociaron la metilación de este gen a mayor supervivencia en los casos con un IPI bajo. Nosotros no pudimos realizar el análisis de supervivencia tan solo en los pacientes con IPI bajo, ya que en la mayoría de los casos no disponíamos de este dato, por lo que sería de interés poder analizarlo en futuros trabajos.

En el presente estudio la metilación del promotor del gen *CDHI* no se asoció al pronóstico, como tampoco lo hizo en el trabajo de Amara y cols.¹⁰⁸, en el que analizaron 46 DLBCLs nodales y extranodales. En conclusión, la metilación de *CDHI* parece no ser un marcador pronóstico en DLBCL gástricos ni de otras localizaciones.

Al igual que en trabajos anteriores, no detectamos asociación entre la metilación del promotor del gen *p15* y la supervivencia en nuestra muestra de DLBCL gástricos. Lee y cols.¹⁰⁷, Amara y cols.¹⁰⁸ y Shiozawa y cols.¹⁰⁹, que estudiaron 44 DLBCL nodales, 46 y 59 DLBCL nodales y extranodales, respectivamente, tampoco asociaron la metilación de *p15* al pronóstico, por lo que la metilación de este gen no parece servir como marcador pronóstico en DLBCL gástricos ni de otras localizaciones.

Los DLBCL gástricos con metilación de *VHL* fueron muy pocos, tan solo dos de ellos presentaron su promotor metilado, lo que descarta su posible utilidad como marcador pronóstico. En un trabajo con 46 DLBCL nodales y extranodales, la metilación del promotor de este gen, que se detectó en el 44% de los casos, se asoció a menor supervivencia ($p = 0,017$)¹⁰⁸. La metilación de este gen parece darse de manera diferente en DLBCL gástricos que en DLBCL de otras localizaciones.

Casi todos los DLBCL gástricos, excepto tres, presentaron metilación del promotor de *DAP-k*, lo que también descarta su utilidad como valor pronóstico. Amara y cols.¹⁰⁸, en un trabajo con 46 DLBCL nodales y extranodales, detectaron su metilación en un menor porcentaje, en el 59% de los casos, asociando éstos a menor supervivencia ($p = 0,003$). Sin embargo, en los DLBCL gástricos la metilación de *DAP-k* parece ser una alteración frecuente, que aparece en casi todos los casos. El hecho de que sea tan frecuente elimina su utilización pronóstica para diferenciar a los pacientes con un mal pronóstico.

Los individuos con DLBCL gástricos, con o sin metilación del promotor del gen *BMP-6*, mostraron supervivencias similares, al contrario que en el trabajo de Daibata y cols.¹¹³ con 35 DLBCL nodales, en el que asociaron su metilación a menor supervivencia ($p = 0,038$). En los DLBCL gástricos, al contrario que en los nodales, la metilación de *BMP-6* no parece tener valor pronóstico.

Los DLBCL gástricos con metilación del promotor del gen *MGMT* mostraron una SLF superior, aunque no estadísticamente significativa (87,5 vs. 68,8, $p = 0,2762$). La mayoría de trabajos que han analizado su valor pronóstico en DLBCL nodales o de diferentes localizaciones han asociado su metilación a mayor supervivencia^{107,114-116}. Sin embargo, en DLBCL gástricos, la metilación del promotor del gen *MGMT*, aunque parece mejorar ligeramente la supervivencia del paciente, no parece ser de utilidad como marcador pronóstico.

Tan solo dos de los DLBCL gástricos mostraron metilación del promotor del gen *GSTP1*, no pudiendo analizar su valor pronóstico. En DLBCLs, otros trabajos que han encontrado su metilación en un mayor número de casos han discutido su valor pronóstico, ya que Nakamichi y cols.¹¹², en un grupo de 53 DLBCL nodales y extranodales, la asociaron a mejor pronóstico, mientras que Amara y cols.¹⁰⁸, con 46 DLBCL nodales y extranodales, no encontraron asociación pronóstica. En el caso de los DLBCL gástricos, la baja frecuencia de la metilación de *GSTP1* descarta su utilidad como valor pronóstico.

Discusión

En cuanto al resto de los promotores de genes que analizamos, *p73*, *ID4*, *ATM* y *hMLH1*, hasta ahora no se había analizado su posible valor pronóstico en DLBCL gástricos ni de otras localizaciones. Nuestros resultados indican que, al menos en casos gástricos, la metilación de los promotores de estos genes no presenta asociación con la supervivencia.

En algunos tumores, el fenotipo metilador (CIMP) se ha asociado a un peor pronóstico. Román-Gómez y cols.¹⁰⁵, que analizaron la metilación de 38 promotores de genes en 54 casos de LLA, observaron una asociación entre la presencia de más de dos genes metilados y menor supervivencia. Ludovic y cols.¹⁰⁶, en un grupo de 582 muestras de adenocarcinoma de colon, analizaron la metilación de promotores de 5 genes, detectando una menor supervivencia en los casos con 1-3 genes metilados y aún menor en los casos con 4-5 genes metilados. En DLBCL gástricos, así como en nodales, ningún trabajo ha analizado el posible valor pronóstico del CIMP.

Por ello, teniendo en cuenta los 14 genes analizados en nuestro trabajo, estudiamos la asociación entre el número de genes metilados y la SG y SLF en los DLBCL gástricos. En primer lugar, pudimos observar que, en estos linfomas, el fenotipo metilador es frecuente, ya que tan solo dos de los casos presentaron menos de tres promotores metilados y 16 de ellos (47% de los casos) presentaron más de 6 promotores metilados. En segundo lugar, observamos que no había asociación entre el CIMP y el pronóstico. Esto indica que, teniendo en cuenta los genes analizados en este trabajo, el número de promotores metilados no es un marcador pronóstico útil, aunque no se puede descartar que considerando los promotores de otros genes el CIMP pueda estar asociado a la supervivencia.

CONCLUSIONES

1. Los DLBCL gástricos presentan características diferentes a los nodales: niveles bajos de LDH, una frecuencia de infiltración medular casi inexistente, diferencias inmunofenotípicas y en el porcentaje de metilación de promotores de algunos genes.
2. Presentar niveles elevados de LDH y no haberse sometido a gastrectomía constituyen marcadores de mal pronóstico en los individuos con DLBCL gástrico.
3. La translocación t(11;18) no está presente en los DLBCL gástricos analizados, lo que sugiere que los linfomas MALT con la t(11;18) no progresan a DLBCL gástrico.
4. Entre los algoritmos inmunohistoquímicos y los marcadores proteicos individuales analizados en este trabajo, la expresión de BLIMP-1 clasifica de manera más precisa a los pacientes con DLBCL gástrico de mal pronóstico. Además, la expresión de Bcl-2 en DLBCL gástricos de tipo no-CG, según el algoritmo de Hans, es un marcador de pronóstico adverso.
5. La metilación de promotores de los genes supresores de tumores *p16*, *p73*, *p57*, *CDH1*, *p15*, *ID4*, *DAP-k* y *BMP-6* en los DLBCL gástricos podría ser un evento epigenético temprano en el proceso de la oncogénesis, pudiendo ser un indicador que permita reconocer estados pretumorales o de riesgo. Esta metilación podría deberse, al menos en parte, a la infección por *H. pylori*.

Conclusiones

6. Los individuos con enfermedades gástricas e infección por *H. pylori* que presenten un fenotipo metilador deben considerarse un grupo de riesgo a desarrollar cáncer gástrico y deberían someterse a un mayor control de la enfermedad, con especial atención a la erradicación de la infección bacteriana.
7. La metilación de los promotores de los 14 genes analizados en este trabajo no tiene valor pronóstico en los casos de DLBCL gástricos, ni de manera individual ni en conjunto.

REFERENCIAS

Referencias

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D. GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide IARC Cancer Base No. 52004; Lyon, France IARC Press version 2.0.
2. Swerdlov SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
3. Aisenberg AC, 2000. Historical review of lymphomas. Br J Haematol; 109:466-76.
4. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, 2000. Lymphoma classification-from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO classification of lymphoid neoplasms. Ann Oncol; 11:3-10.
5. Herrinton LJ, 1998. Epidemiology of the Revised European-American Lymphoma classification subtypes. Epidemiol Rev; 20:187-203.
6. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors, 2001. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press.
7. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55:74-108.
8. de Leval L, Hasserjian RP, 2009. Diffuse Large B- Cell Lymphomas and Burkitt Lymphoma. Hematol Oncol Clin N Am; 23:791-827
9. Gurbaxani S, Anastasi J, Hyjek E, 2009. Diffuse Large B-Cell Lymphoma— More Than a Diffuse Collection of Large B Cells. Arch Pathol Lab Med; 133:1121-86
10. Said J, 2009. Diffuse aggressive B-cell lymphomas. Adv Anat Pathol; 16:216-35.

Referencias

11. Hunt KE, Reichard KK, 2008. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Arch. Pathol. Lab. Med; 132:118-24.
12. Moller MB, Pedersen NT, Christensen BE, 2004. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications of extranodal *versus* nodal presentation – a population-based study of 1575 cases. Brit J of Haem; 124:151-9.
13. Jehan Z, Siraj AK, Abukaber J, Ruiz C, Simon R, Sultana M, Uddin S, Bavi P, Hussain A, Razack S, Ezzat A, Al-Dayel F, Sauter G, Al-Kuraya KS, 2008. Distinct gene expression profiles: nodales versus extranodal diffuse large B-cell lymphoma. Oncology ; 75:71-80.
14. Lopez-Guillermo A, Colomo L, Jiménez M, Bosch F, Villamor N, Arenillas L, Muntanola A, Montoto S, Giné E, Colomer D, Beà S, Campo E y Montserrat E, 2005. Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Clinical and Biological Characterization and Outcome According to the Nodal or Extranodal Primary Origin. J Clin Oncol; 23:2797-804.
15. Connor J, Ashton-Key M, 2007. Gastric and intestinal diffuse large B-cell lymphomas are clinically and immunophenotypically different. An immunohistochemical and clinical study. Histopath; 51:697-703.
16. Psyrris A, Papageorgiou S, Economopoulos T, 2008. Primary extranodal lymphomas of stomach: clinical presentation, diagnostic pitfalls and management. Ann Oncol; 19:1992-9.
17. Ferreri AJM, Montalban C, 2007. Primary diffuse large B-cell lymphoma of the stomach. Crit Rev Oncol Hematol; 63:65–71.
18. Isaacson PG, 2005. Update on MALT lymphomas. Best Pract Res Clin Haematol; 18(1):57-68.
19. Osokawa Y, 2005. Anti-apoptotic action of API2-MALT1 fusion protein involved in t(11;18)(q21;q21) MALT lymphoma. Apoptosis; 10:25-34.

20. Inagaki H, 2007. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: Molecular pathogenesis and clinicopathological significance advances in NF- κ B Signaling. *Pathol Int.*; 57(8):474-84.
21. Nakamura S, Ye H, Bacon CM, Goatly A, Liu H, Kerr L, Banham AH, Streubel B, Yao T, Tsuneyoshi M, Savio A, Takeshita M, Dartigues P, Ruskoné-Fourmestraux A, Matsumoto T, Iida M y Du MQ, 2008. Translocations involving the immunoglobulin heavy chain gene locus predict better survival in gastric diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*; 14:3002-10.
22. Chuang SS, Lee C, Hamoudi RA, Liu H, Lee PS, Ye H, Diss TC, Dogan A, Isaacson PG, Du MQ, 2003. High frequency of t(11;18) in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas in Taiwan, including one patient with high-grade transformation. *Br J Haematol.*; 120(1):97-100.
23. Inagaki H, Okabe M, Seto M, Nakamura S, Ueda R, Eimoto T, 2001. API2-MALT1 fusion transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: multiplex RT-PCR detection using formalin-fixed paraffin embedded specimens. *Am J Pathol*; 158:699-706.
24. Rosenwald A, Ott G, Stilgenbauer S, Kalla J, Brecht M, Katzenberger T, Greiner A, Ott MM, Gawin B, Döhner H, Müller-Hermelink HK, 1999. Exclusive detection of the t(11;18)(q21;q21) in extranodal marginal zone B cell lymphomas (MZBL) of MALT type in contrast to other MZBL and extranodal large B cell lymphomas. *Am J Pathol*; 155:1817-21.
25. Ott G, Katzenberger T, Greiner A, Kalla J, Rosenwald A, Heinrich U, Ott MM, Müller-Hermelink HK, 1997. The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) type. *Cancer Res*; 57(18):3944-8.
26. Toracchio S, Ota H, de Jong D, Wotherspoon A, Ruge M, Graham DY, Samani A, El-Zimaity HM, 2009. Translocation t(11;18)(q21;q21) in gastric B-cell lymphomas. *Cancer Sci*; 100(5):881-7.

Referencias

27. Bernasconi B, Karamitopoulou-Diamantis E, Tornillo L, Lugli A, Di Vizio D, Dirnhofer S, Wengmann S, Glatz-Krieger K, Fend F, Capella C, Insabato L, Terracciano LM, 2008. Chromosomal instability in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas: a fluorescent in situ hybridization study using a tissue microarray approach. *Hum Pathol.*; 39(4):536-42.
28. Hung YS, Lin TL, Kuo MC, Tang TC, Dunn P, Wang PN, Wu JH, Chang H, Kuo TT, Shih LY, 2008. Primary gastric diffuse large B-cell lymphoma. *Chang Gung Med J*; 31(2):159-66.
29. Ibrahim EM, Ezzat AA, Raja MA, Rahal MM, Ajarim DS, Mann B, Baloush A, Stuart RK, Bazarbashi SN, 1999. Primary gastric non-Hodgkin's lymphoma: Clinical features, management, and prognosis of 185 patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Ann of Oncol*; 10:1441-9.
30. Medina-Franco H, Germes SS, Maldonado CL, 2007. Prognostic Factors in Primary Gastric Lymphoma. *Ann Surg Oncol*; 14(8):2239-45.
31. Avilés A, Nambo MJ, Neri N, Huerta-Guzmán J, Cuadra I, Alvarado I, Castañeda C, Fernández R, González M, 2004. The role of surgery in primary gastric lymphoma: results of a controlled clinical trial. *Ann Surg.*; 240(1):44-50.
32. van Meerten T, Hagenbeek A, 2009. CD20-targeted therapy: a breakthrough in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Neth J Med*; 67(7):251-9.
33. Chihara D, Oki Y, Ine S, Kato H, Onoda H, Taji H, Kagami Y, Yamamoto K, Morishima Y, 2010. Primary gastric diffuse large B-cell Lymphoma (DLBCL): Analyses of prognostic factors and value of pretreatment FDG-PET scan. *Eur J Haematol*. [Epub ahead of print].
34. Zucca E, Dreyling M, 2009. Gastric marginal zone lymphoma of MALT type: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann of Oncol*; 20(4):113-4.
35. Morgner A, Miehle S, Fischbach W, Schmitt W, Muller-Hermelink H, Greiner A, Thiede C, Schetelig J, Neubauer A, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E,

2001. Complete remission of primary high-grade B-cell gastric lymphoma after cure of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Oncol*; 19:2041-8.
36. Cavanna L, Pagani R, Seghini P, Zangrandi A, Paties C, 2008. High grade B-cell gastric lymphoma with complete pathologic remission after eradication of *Helicobacter pylori* infection: Report of a case and review of the literature. *World J Surg Oncol*; 6(35):1-19.
37. Chen LT, Lin JT, Tai JJ, Chen GH, Yeh HZ, Yang SS, Wang HP, Kuo SH, Sheu BS, Jan CM, Wang WM, Wang TE, Wu CW, Chen CL, Su IJ, Whang-Peng J, Cheng AL, 2005. Long-term results of anti-*Helicobacter pylori* therapy in early-stage gastric high-grade transformed MALT lymphoma. *J Natl Cancer Inst*; 97:1345-53.
38. Salam I, Durai D, Murphy JK, Sundaram B, 2001. Regression of primary highgrade gastric B-cell lymphoma following *Helicobacter pylori* eradication. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 13: 1375-8.
39. Alsolaiman MM, Bakis G, Nazeer T, MacDermott RP, Balint JA, 2003. Five years of complete remission of gastric diffuse large B cell lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*; 52:507-9.
40. Tari A, Asaoku H, Kashiwado K, Tadashi Y, Yoshino T, Kitadai Y, Tanaka S, Fujihara M, 2009. Predictive value of endoscopy and endoscopic ultrasonography for regresión of gastric diffuse large B-cell lymphomas alter *Helicobacter pylori* eradication. *Dig Endosc*; 21:219-27.
41. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma, 1993. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*; 329:987-94.
42. Avilés A, Narváez BR, 1998. Beta-2 microglobulin and lactate dehydrogenase levels are useful prognostic markers in early stage primary gastric lymphoma. *Clin Lab Haematol*; 20(5):297-302.
43. Montalbán C, Castrillo JM, Abraira V, Serrano M, Bellas C, Piris MA, Carrion R, Cruz MA, Laraña JG, Menarguez J, y cols., 1995. Gastric B-cell mucosa-

Referencias

- associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. Clinicopathological study and evaluation of the prognostic factors in 143 patients. *Ann Oncol.*; 6(4):355-62.
44. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C y cols., 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*; 403:503-11.
 45. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, y cols., 2004. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*; 103:275-82.
 46. Berglund M, Thunberg U, Amini RM, Book M, Roos G, Erlanson M, Linderöth J, Dictor M, Jerkeman M, Cavallin-Stahl E, Sundström C, Rehn-Eriksson S, Backlin C, Hagberg H, Rosenquist R, Enblad G, 2005. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol*; 18:1113-20.
 47. Muris JJF, Meijer CJLM, Vos W, van Krieken JHJM, Ossenkoppele GJ, Oudejans JJ, 2006. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol*; 208:714-23.
 48. Sjö LD, Poulsen CB, Hansen M, Møller MB, Ralfkiaer E, 2007. Profiling of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry: identification of prognostic subgroups. *Eur J of Haem*; 79(50):501-7.
 49. Chen Z, Du Z, Chen J, Chen Z, Bao Y, Tang F, 2010. Prognostic evaluation of immunohistochemical profiles in diffuse large B-cell lymphoma: a Chinese study. *Med Oncol*. [Epub ahead of print]
 50. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML, Banham AH, Leppä S, 2009. Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Mod Pathol.*; 22(8):1094-101.

51. Oh, YH, Park CK, 2006. Prognostic Evaluation of Nodal Diffuse Large B Cell Lymphoma by Immunohistochemical Profiles with Emphasis on CD138 Expression as a Poor Prognostic Factor. *Korean Med Sci*; 21:397-405.
52. Amen F, Horncastle D, Elderfield K, Banham AH, Bower M, Macdonald D, Kanfer E, Naresh KN, 2007. Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patients. *Histopath*; 51:70-9.
53. Peh SC, Gan GG, Lee LK, Eow GI, 2008. Clinical relevance of CD10, BCL-6 and multiple myeloma-1 expression in diffuse large B-cell lymphomas in Malaysia. *Path internat*; 58:572-9.
54. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML, Banham AH, Enblad G, Leppa S, 2009. Bcl-2 but not FOXP1, is an adverse risk factor in immunochemotherapy-treated non-germinal center diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J on Haema*; 82:364-372.
55. Connor J, Ashton-Key M, 2007. Gastric and intestinal diffuse large B-cell lymphomas are clinically and immunophenotypically different. An immunohistochemical and clinical study. *Histopath*; 51:697-703.
56. Mitchell KA, Finn WG, Owens SR, 2008. Differences in germinal centre and non-germinal center phenotype in gastric and intestinal diffuse large B-cell lymphomas. *Leuk Lymph*; 49(9):1717-23.
57. Chen YW, Hu XT, Liang AC, Au WY, So CC, Wong ML, Shen L, Tao Q, Chu KM, Kwong YL, Liang LH, Srivastava G, 2006. High BCL6 expression predicts better prognosis, independent of BCL6 mutations, in gastric lymphoma translocation status, translocation partner, or BCL6-deregulating. *Blood*; 108:2373-83.
58. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC y cols., 2009. A New Immunostain Algorithm Classifies Diffuse Large B-Cell Lymphoma into Molecular Subtypes with High Accuracy. *Clin Cancer Res*; 15(17):5494-502.

Referencias

59. Ponzoni M, Andres JM, Ferreri AJM, Pruneri G, Pozzi B, Dell'Oro S, Pigni A, Pinotti G, Villa E, Freschi M, Viale G, Capella C, 2003. Prognostic Value of Bcl-6, CD10 And CD38 Immunoreactivity in Stage I-II Gastric Lymphomas: Identification of a Subset of CD10⁺ Large B-Cell Lymphomas with a Favorable Outcome. *Int J Cancer* 2003; 106:288-91.
60. Montes-Moreno S, Roncador G, Maestre L, Martinez N, Sanchez-Verde L, Camacho F, Cannata J, Martinez-Torrecuadrada JL, Shen Y, Chan WC, Piris MA, 2007. Gcet1 (centerin), a highly restricted marker for a subset of Germinal Centre-derived lymphomas. *Blood*; 111(1):351-8.
61. Chatzitoliou A, Venizelos I, Tripsiannis G, Anastassopoulos G y Papadopoulos N, 2010. Prognostic significance of CD95, P53, and BCL2 expression in extranodal non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol*; 89(9):889-96.
62. Garcia JF, Roncador G, García JF, Sáenz AI, Maestre L, Lucas E, Montes-Moreno S, Fernandez Victoria R, Martinez-Torrecuadrada JL, Marafioti T, Mason DY, Piris MA, 2006. PRDM1/BLIMP-1 expression in multiple B and T-cell lymphoma. *Haematol*; 91(4):467-74.
63. Grønbaek K, Hother C, Jones PA, 2007. Epigenetic changes in cancer. *APMIS*.; 115(10):1039-59.
64. Baylin SB, Herman JG, 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*; 16:168-74.
65. James G. Herman U, 1999. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Cancer Biology*; 9:359-67.
66. Esteller M, 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*; 8:286-98.
67. Caiafa P, Zampieri M, 2005. DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands. *J Cell Biochem*; 94:257-65.

68. Padjen K, Ratnam S, Storb U, 2005. DNA methylation precedes chromatin modifications under the influence of the strain-specific modifier Ssm1. *Mol Cell Biol*; 25:4782-91.
69. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A, 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*; 393:386-9.
70. Jones PA, Baylin SB, 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*; 3:415-28.
71. Gardiner-Garden M, Frommer M, 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*; 196:261-82.
72. Bird AP, 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*; 321:209-13.
73. Jones PA, Takai D, 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*; 293:1068-70.
74. Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H, 1992. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*; 13:1095-107.
75. Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB, 2001. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*; 20:3156-65.
76. Robertson KD, 2005. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*; 6:597-610.
77. Esteller M, 2005. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 45:629-56.
78. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima T, 2005. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res*; 65:828-34.
79. Cheung HH, Lee TL, Rennert OM, Chan WY, 2009. DNA methylation of cancer genome. *Birth Defects Res C Embryo Today*; 87(4):335-50.

Referencias

80. Nakajima T, Yamashita S, Maekita T, Niwa T, Nakazawa K y Ushijima T, 2009. The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae. *Int. J. Cancer*; 124:905-10.
81. Ando T, Yoshida T, Enomoto S, Asada K, Tatematsu M, Ichinose M, Sugiyama T, Ushijima T, 2009. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: Its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int. J. Cancer*; 124:2367-74.
82. Yoo EJ, Park SY, Cho NY, Kim N, Lee HS, Kang GH, 2008. *Helicobacter pylori*-infection-associated CpG island hypermethylation in the stomach and its possible association with Polycomb repressive marks. *Virchows Arch*; 452:515-24.
83. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, Arii K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D, Sugimura T, Ichinose M, Ushijima T, 2006. High Levels of Aberrant DNA Methylation in *Helicobacter pylori* - Infected Gastric Mucosae and its Possible Association with Gastric Cancer Risk. *Clin Cancer Res*; 12(3):989-95.
84. Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Mizokami M, Ueda R, Hirohashi S, 2000. Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis—a comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*; 32:970-9.
85. Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, Houlihan PS, Krouse RS, Prasad AR, Einspahr JG, Buckmeier J, Alberts DS, Hamilton SR, Issa JP, 2005. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*; 97:1330-8.
86. Ishii T, Murakami J, Notohara K, Cullings HM, Sasamoto H, Kambara T, Shirakawa Y, Naomoto Y, Ouchida M, Shimizu K, Tanaka N, Jass JR, Matsubara N, 2007. Oesophageal squamous cell carcinoma may develop within

- a background of accumulating DNA methylation in normal and dysplastic mucosa. *Gut*; 56:13-9.
87. Yan PS, Venkataramu C, Ibrahim A, Liu JC, Shen RZ, Diaz NM, Centeno B, Weber F, Leu YW, Shapiro CL, Eng C, Yeatman TJ, Huang TH, 2006. Mapping geographic zones of cancer risk with epigenetic biomarkers in normal breast tissue. *Clin Cancer Res*; 12:6626-36.
 88. Arai E, Kanai Y, Ushijima S, Fujimoto H, Mukai K, Hirohashi S, 2006. Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding nontumorous renal tissues. *Int J Cancer*; 119:288-96.
 89. Dong CX, Deng DJ, Pan KF, Zhang L, Zhang Y, Zhou J, You WC, 2009. Promoter methylation of p16 associated with *Helicobacter pylori* infection in precancerous gastric lesions: A population-based study. *Int. J. Cancer*; 24:34-9.
 90. Tahara T, Arisawa T, Shibata T, Nakamura M, Yoshioka D, Okubo M, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Takahama K, Watanabe M, Yamashita H, Hirata I, 2009. Increased number of methylated CpG islands correlates with *Helicobacter pylori* infection, histological and serological severity of chronic gastritis. *Eur J of gastroen and Herat*; 21:613-9.
 91. Tahara T, Arisawa T, Shibata T, Wang FY, Nakamura M, Sakata M, Nagasaka M, Takagi T, Kamiya Y, Fujita H, Nakamura M, Hasegawa S, Iwata M, Takahama K, Watanabe M, Hirata I, Nakano H, 2007. Risk Prediction of Gastric Cancer by Analysis of Aberrant DNA Methylation in Non-Neoplastic Gastric Epithelium. *Digestion*; 75:54-61.
 92. Shin CM, Kim N, Park JH, Kang GH, Kim JS, Jung HC, Song IS, 2010. Role of *Helicobacter pylori* infection in aberrant DNA methylation along multistep gastric carcinogenesis. *Cancer Sci*; 101(6):1337-46.

Referencias

93. Kaneko Y, Sakurai S, Hironaka M, Sato S, Oguni S, Sakuma Y, Sato K, Sugano K, Saito K, 2003. Distinct methylated profiles in *Helicobacter pylori* dependent and independent gastric MALT lymphomas. *Gut.*; 52(5):641-6.
94. Min JO, Seo EJ, Kwon HJ, Lee EJ, Kim WI, Kang CS, kim KM, 2006. Methylation of p16^{INK4A} and p57^{KIP2} are involved in the development and progression of gastric MALT lymphomas. *Mod Pathol*; 19:141-8.
95. Kondo T, Oka T, Sato H, Shinnou Y, Washio K, Takano M, Morito T, Takata K, Ohara N, Ouchida M, Shimizu K, Yoshino T, 2009. Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by *Helicobacter pylori* infection promotes development and progression of gastric MALT lymphoma. *Int J Oncol.*; 35(3):547-57.
96. Chan AO, Peng JZ, Lam SK, Lai KC, Yuen MF, Cheung HK, Kwong YL, Rashid A, Chan CK, Wong BC, 2006. Eradication of *Helicobacter pylori* infection reverses E-cadherin promoter hypermethylation. *Gut.*; 55(4):463-8.
97. Leung WK, Man EP, Yu J, Go MY, To KF, Yamaoka Y, Cheng VY, Ng EK, Sung JJ, 2006. Effects of *Helicobacter pylori* eradication on methylation status of E-cadherin gene in noncancerous stomach. *Clin Cancer Res.*; 12(10):3216-21.
98. Nakajima T, Enomoto S, Yamashita S, Ando T, Nakanishi Y, Nakazawa K, Oda I, Gotoda T, Ushijima T, 2010. Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. *J Gastroenterol.*; 45(1):37-44.
99. Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M, Ushijima T, 2010. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res.*; 70(4):1430-40.
100. Perri F, Cotugno R, Piepoli A, Merla A, Quitadamo M, Gentile A, Pilotto A, Annese V, Andriulli A, 2007. Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of *H. Pylori* infected patients and effect of eradication. *Am J Gastroenterol.*; 102(7):1361-71.

101. Sepulveda AR, Yao Y, Yan W, Park DI, Kim JJ, Gooding W, Abudayyeh S, Graham DY, 2010. CpG Methylation and Reduced Expression of O(6)-Methylguanine DNA Methyltransferase is Associated with *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*; 138(5):1836-44.
102. Kim YS, Kim JS, Jung HC, Lee CH, Kim CW, Song IS, Kim CY, 2002. Regression of low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori*: possible association with p16 hypermethylation. *J Gastroenterol.*; 37(1):17-22.
103. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Benevento F, Scopece L, Mazzocchi V, Bacci A, Agati R, Calbucci F, Ermani M, 2009. Temozolomide Concomitant and Adjuvant to Radiotherapy in Elderly Patients with Glioblastoma. *Cancer*; 115(15):3512-8.
104. Mulero-Navarro S, Esteller M, 2008. Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now. *Crit Rev Oncol Hematol*; 68(1):1-11.
105. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Calasanz MJ, Garate L, San Jose-Eneriz E, Cordeu L, Prosper F, Heiniger A, Torres A, 2006. CpG IslandMethylator Phenotype Redefines the Prognostic Effect of t(12;21) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res*; 12(16):4845-50.
106. Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, de la Vega MF, Martin L, Roignot P, Rat P, Bouvier AM, Laurent-Puig P, Faivre J, Chapusot C, Piard F, 2008. Hypermethylator Phenotype in Sporadic Colon Cancer: Study on a Population-Based Series of 582 Cases. *Cancer Res*; 68(20):8541-6.
107. Lee SM, Lee AJ, Ko YH, Lee SH, Maeng L, Kim KM, 2009. Prognostic significance of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase and p57 methylation in patients with diffuse large B-cell lymphomas. *APMIS*; 117:87-94.
108. Amara K, Trimeche M, Ziadi S, Laatiri A, Hachana M, Korbi S, 2008. Prognostic significance of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol*; 19:1774-86.

Referencias

109. Shiozawa E, Takimoto M, Reiko M, Adachi D, Saito B, Yamochi-Onizuka T, Yamochi T, Shimozuma J, Maeda T, Kohno Y, Kawakami K, Nakamaki T, Tomoyasu S, Shiokawa A, Ota H, 2005. Hypermethylation of CpG island in p16 as a prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in a high-risk group. *Leuk Research*; 30:859-67.
110. Al-Kuraya K, Siraj AK, Bavi P, Al-Jomah N, El-Solh H, Ezzat A, Al-Dayel F, Belgaumi A, Al-Kofide A, Sabbah R, Sheikh S, Amr S, Simon R y Sauter G, 2006. High throughput tissue microarray analysis of FHIT expression in diffuse large cell B-cell lymphoma from Saudi Arabia. *Mod Pathol*; 19:1124-29.
111. Hagiwara K, Nagai H, Li Y, Ohashi H, Hotta T, Saito H, 2007. Frequent DNA methylation but not mutation of the ID4 gen on malignant lymphoma. *J Clin Exp Hematopathol*; 47(1):15-8.
112. Nakamichi I, Tomita Y, Zhang B, Sugiyama H, Kanakura Y, Fukuhara S, Hino M, Kanamaru A, Ogawa H, Aozasa K, 2007. Correlation between promoter hypermethylation of GSTP1 and response to chemotherapy in diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Hemato*; 86:557-64.
113. Daibata M, Nemoto Y, Bandobashi K, Kotani N, Kuroda M, Tsuchiya M, Okuda H, Takakuwa T, Imai S, Shuin T, Taguchi H, 2007. Promoter Hypermethylation of the Bone Morphogenetic Protein-6 Gene in Malignant Lymphoma. *Clin Cancer Res*; 13(12):3528-35.
114. Ohno T, Hiraga J, Ohashi H, Sugisaki C, Li E, Asano H, Ito T, Nagai H, Yamashita Y, Mori N, Kinoshita T, Naoe T, 2006. Loss of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression is a favourable prognostic marker in diffuse large B-cell lymphoma. *Int J Hematol*; 83:341-7.
115. Al-Kuraya K, Narayanappa R, Siraj AK, Al-Dayel F, Ezzat A, El Solh H, Al-Jommah N, Sauter G, Simon R, 2006. High frequency and Sorong prognostic relevante of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase silencing in diffuse large B-cell lymphomas from the Middle East. *Hum Pathol*; 37:742-8.

116. Esteller M, Gaidano G, Goodman SN, Zagonel V, Capello D, Botto B, Rossi D, Gloghini A, Vitolo U, Carbone A, Baylin SB, Herman JG, 2002. Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst*; 94:26-32.
117. Huang Q, Su X, Ai L, Li M, Fan CY, Weiss LM, 2007. Promoter hypermethylation of multiple genes in primary gastric lymphoma. *Leuk Lymphoma*; 23:1-9.
118. Okumura H, Ishii H, Pichiorri F, Croce CM, Mori M, Huebner K, 2009. Fragile gene product, Fhit, in oxidative and replicative stress responses. *Cancer Sci*; 100(7):1145-50.
119. Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, Hirata K, Imai K, Tokino T, Shinomura Y, 2009. Cancer epigenomics: Implications of DNA methylation in personalized cancer therapy. *Cancer Sci*; 100(5):787-91.
120. Bazas VM, Lukyanova NY, Demash DV, Galakhin JO, Myasoedov DV, 2008. Relation between cell-to-cell adhesion and angiogenesis and clinicomorphological prognostic factors in patients with gastric cancer. *Exp Oncol*; 30(3):235-9.
121. Wiesener MS, Maxwell PH, Eckardt KU, 2009. Novel insights into the role of the tumor suppressor von Hippel Lindau in cellular differentiation, ciliary biology, and cyst repression. *J Mol Med*; 87:871-7.
122. Liang Y, Lin SY, Brunnicardi FC, Goss J, Li K, 2009. DNA Damage Response pathways in Tumor Suppression and Cancer Treatment. *World J Surg*; 33:661-6.
123. Tomita N, Kodama F, Motomura S, Koharazawa H, Fujita H, Harano H, Kanamori H, Ishigatsubo Y, 2006. Prognostic Factors in Diffuse Large B-cell Lymphoma Treated by Risk-adopted Therapy. *Intern Med*; 45(5):247-52.
124. Guglielmi C, Martelli M, Federico M, Zinzani PL, Vitolo U, Bellesi G, Santini G, Tarella C, Zallio F, Pregno P, Di Renzo N, Resegotti L; Italian Intergroup for Lymphomas, 2001. Risk-assessment in diffuse large cell lymphoma at first

Referencias

- relapse. A study by the Italian Intergroup for Lymphomas. *Haematologica*; 86(9):941-50.
125. Litam P, Swan F, Cabanillas F, Tucker SL, McLaughlin P, Hagemeister FB, Rodriguez MA, Velasquez WS, 1991. Prognostic value of serum beta-2 microglobulin in low-grade lymphoma. *Ann Intern Med*; 114(10):855-60.
 126. Ke X, Wang J, Gao Z, Zhao L, Li M, Jing H, Wang J, Zhao W, Gilbert H, Yang XF, 2010. Clinical characteristics and prognostic analysis of Chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cells Mol Dis*; 44(1):55-61.
 127. Bari A, Marcheselli L, Sacchi S, Marcheselli R, Pozzi S, Ferri P, Balleari E, Musto P, Neri S, Aloe Spiriti MA, Cox MC, 2010. Prognostic models for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: a never-ending story. *Ann Oncol*; 21(7):1486-91.
 128. Rozen S, Skaletsky H, 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*; 132:365-86.
 129. Choi CH, Lee KM, Choi JJ, Kim TJ, Kim WY, Lee JW, Lee SJ, Lee JH, Bae DS, Kim BG, 2007. Hypermethylation and loss of heterozygosity of tumor suppressor genes on chromosome 3p in cervical cancer. *Cancer Lett*; 255(1):26-33.
 130. Zhang M, Wang Q, Yuan W, Yang S, Wang X, Yan JD, Du J, Yin J, Gao SY, Sun BC, Zhu TH, 2007. Epigenetic regulation of bone morphogenetic protein-6 gene expression in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 105(105):91-7.
 131. Rossi D, Capello D, Gloghini A, Franceschetti S, Paulli M, Bhatia K, Saglio G, Vitolo U, Pileri SA, Esteller M, Carbone A, Gaidano G, 2004. Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of B-cell neoplasia. *Haematologica*; 89(2):154-64.
 132. Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO, Uwaifo AO, Otegbayo JA, Ola SO, Coker AO, 2004. Comparison of three PCR methods

- for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol.*; 10(13):1958-60.
133. Sambrook and Russell. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Third edition, 2001. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
134. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA, 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*; 17:2257-317.
135. Schuler F, Dolken L, Hirt C, Kiefer T, Berg T, Fusch G, Weitmann K, Hoffmann W, Fusch C, Janz S, Rabkin CS, Dolken G, 2009. Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. *Int. J. Cancer*; 124:958-63.
136. Dai Z, Zhu WG, Morrison CD, 2003. A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes. *Hum Mol Genet.*; 12(7):791-801.