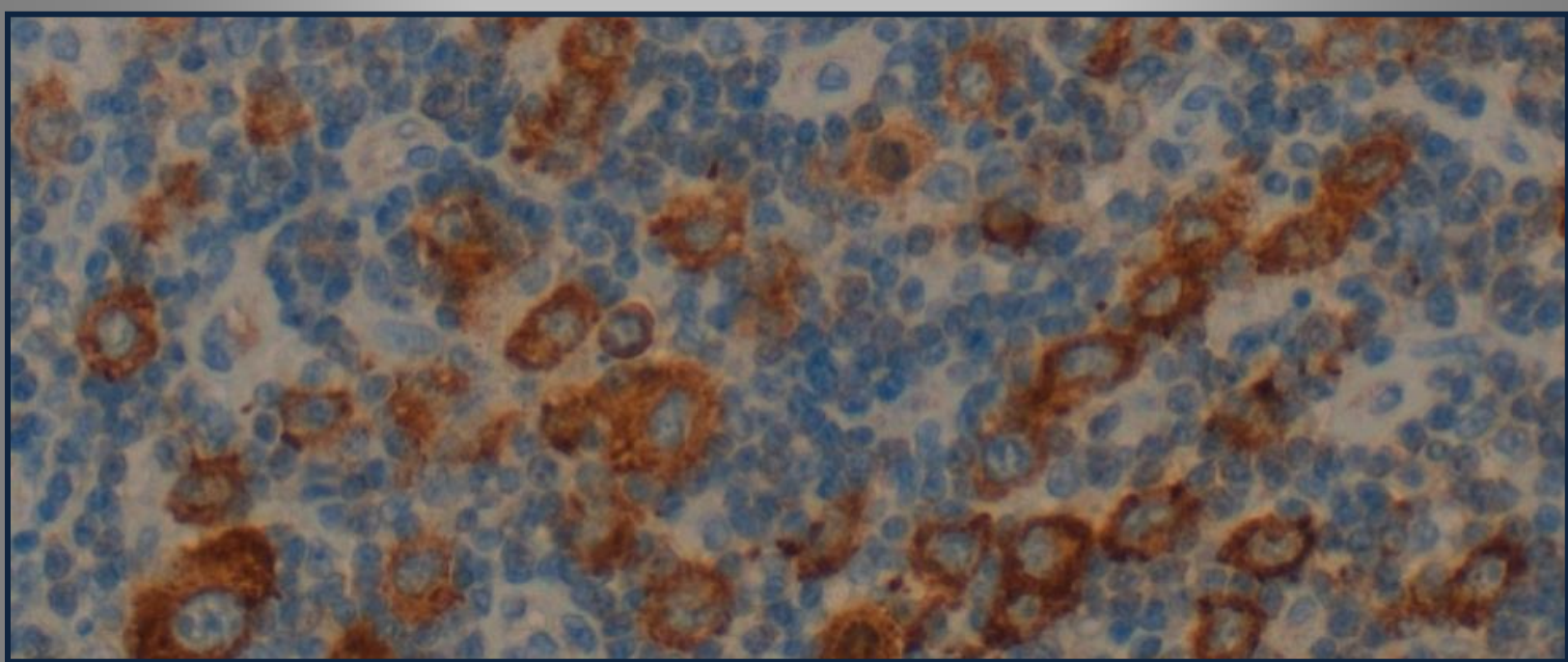


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCENCIAS MOLECULARES

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



Evaluación del impacto clínico de las alteraciones genéticas recurrentes en Linfoma de Hodgkin

Elena Mata Gómez

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCIENCIAS MOLECULARES

**Evaluación del impacto clínico de las alteraciones
genéticas recurrentes en Linfoma de Hodgkin**

Doctorando

Elena Mata Gómez, Licenciada en Bioquímica

Director

Juan Fernando García García

Madrid, 2017

Confirmando que el trabajo que contiene esta tesis doctoral ha sido desarrollado íntegramente por la Doctoranda Elena Mata Gómez y que cuenta con mi aprobación para su defensa ante el tribunal académico nombrado por la Universidad Autónoma de Madrid. La tesis supone el desarrollo y aplicación de técnicas de análisis molecular innovadoras a un modelo clínico complejo, y ha generado relevantes publicaciones internacionales con revisión por pares. Personalmente agradezco a la Doctoranda el esfuerzo realizado.

**Dr. Juan Fernando García
Jefe de Servicio de Anatomía Patológica
MD Anderson Cancer Center Madrid
Director Científico Fundación MDACC
Madrid**

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi director y tutora de tesis, Juan Fernando García y Gema Moreno, por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral, introducirme en el campo de la investigación traslacional y llevar a cabo este proyecto con todo su apoyo. Gracias a Juan Fernando por su optimismo ante mis resultados y por poder desarrollarlos de la mejor manera posible. Y a Gema, por su ayuda en todos los trámites administrativos eternos y por sus consejos genómicos cuando más los necesitaba.

Gracias a mis compañeros del laboratorio del MD Anderson, por aguantarme en mis momentos difíciles y por acompañarme en los buenos. A Pablo, por su constante ayuda en temas científicos y no tan científicos. A las chicas de biobanco y anatomía patológica, por ayudarme en ese fantástico mundo de búsqueda de muestras y elaboración de bases de datos. Gracias a las chicas de la fundación, en especial a Zaira, por su ayuda recibida desde el primer día hasta el último, por los buenos momentos que hemos pasado juntas, y por esos desayunos tan estupendos. A los chicos de la fundación Carolina, en especial a Juli, por ser como eres, una gran persona. No puedo dejar de agradecer con especial cariño a mis colegas del Eje, María y Alba, por ser mis compañeras, mis amigas y mi apoyo.

Gracias a la gente del CNIO, en especial a María, que con toda la paciencia del mundo me enseñó todos los trucos de microdissección posibles, por sus consejos y por su compañía en esos días interminables.

Quiero agradecer a mis amigos todo el apoyo recibido y su compañía en momentos de desconexión, en especial a mis Veros, María, Itziar, Laura y Arístides, por esas charlas interminables en las que parece que vamos a arreglar el mundo, pero nunca es así.

Para finalizar me reservo a los más importantes, GRACIAS a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermana Lara, por respetar mis decisiones y apoyarme de la mejor manera posible, por aguantar esas charlas, debates y ensayos interminables

Agradecimientos

(entendiendo poco) con tanta paciencia y cariño, y por enseñarme que con esfuerzo puedes conseguir todos tus propósitos.

Elena

RESUMEN/SUMMARY

El linfoma de Hodgkin clásico (LHc) es un linfoma de baja incidencia, aunque es el más prevalente en pacientes entre los 15 y los 19 años. Tiene su origen en linfocito B, que pierde la capacidad de expresar inmunoglobulinas (Ig) de superficie, a la vez que evita los mecanismos de control que conllevarían la muerte celular, transformándose las células de Hodgkin y Reed-Sternberg (HRS). Este clon neoplásico representa el 1-2% de la celularidad total en los ganglios tumorales, rodeados de un microambiente hasta ahora catalogado como no tumoral.

Esta enfermedad presenta una alta tasa de curación. Sin embargo, catalogamos a un 20% de los pacientes como no respondedores, al fracasar la primera línea de tratamiento. Por ello, en esta tesis doctoral se ha intentado determinar la firma genética, tanto de los pacientes respondedores, como en los no respondedores a la primera línea de tratamiento. Se han identificado genes de manera independiente como vías de señalización alteradas en LHc. La mayoría de ellos son genes ya descritos en otros tipos de linfomas, mientras que para LHc, estos genes no estaban determinados previamente, por lo que se abre el campo para profundizar en el origen y posible diagnóstico de este tipo tumoral. Se han identificado variantes tanto en las células tumorales como en las células del microambiente “no tumoral” (determinadas mediante inmunohistoquímica y fenotípicamente), comprobando que estas células presentan alteraciones en genes previamente descritos en las células tumorales.

A su vez, también se han identificado marcadores detectados en el microambiente “no tumoral” que se asocian con distintos parámetros relacionados con la supervivencia del paciente, identificando nuevos factores pronósticos que nos dan información tanto de una posible recaída como del exitus del paciente.

Para finalizar, se han ensayado nuevos tratamientos de acuerdo a los resultados obtenidos, a la vez que se han propuesto nuevas líneas de investigación para continuar con la descripción de este tipo tumoral en sus diferentes niveles, y el ensayo y posterior determinación de la terapia a seguir en función de su firma genética y la inmunohistoquímica asociada a cada paciente.

Classical Hodgkin Lymphoma (cHL) is a low rate disease, although it is the most relevant lymphoma in young adults. The origin of cHL is on B lymphocytes, which loss surface immunoglobulin expression, and scape cell death check points, becoming Hodgkin and Reed-Sternberg cells (HRS). This neoplastic clone represents about 1% of total cellularity, diluted in a reactive non tumour inflammatory background.

This disease has a high rate of survival. However, about 20% of patients diagnosed with this pathology fail to respond first-line therapy. For this reason, in this doctoral thesis we have aimed to determine the genetic signature in both types of patients, with or without a favourable response. Some of the genes identified in this study have previously found by other groups. Of these, the great majority has been described in other lymphoma types, while for cHL these genes are unknown. This fact opens the field to study the origin as well as new diagnosis methods in this type of lymphoma. In our study, variants have been identified in both HRS cells (characterized by standard CD30 immunostaining) and the reactive inflammatory microenvironment. In these non-tumour cells, we have identified variants in genes previously described as altered in tumour cells.

At the same time, mutated genes have been detected in non-tumour inflammatory background, some of them associated with parameters related to patient survival or treatment response. With this information, we have identified new prognosis factors that could give us knowledge about patient relapse or death.

Finally, we have tested new treatments according to our results. At the same time, we have proposed new research lines in order to continue with the description of this tumour type at several levels, including further determination of new therapy practice depending on genetic signature and immunostaining associated to each patient. These new findings open the door to a future personalized treatment of cHL in the era of personalized medicine.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Linfomas	9
1.2 Linfoma de Hodgkin.....	10
1.2.1 Clasificación	10
1.2.2 Epidemiología.....	11
1.2.3 Inmunofenotipo.	13
1.2.4 Aspectos clínicos y factores pronóstico asociados a LHc.....	14
1.2.5. Microambiente no tumoral asociado a LHc	16
1.2.6. Papel del virus Epstein-Barr en LHc.....	22
1.2.7. Tratamiento de LHc	23
1.3 Evolución en secuenciación y sus antecedentes en LHc	25
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1 Selección de muestras	35
3.2 Tratamiento de las muestras	36
3.2.1 Secuenciación de tumores primarios.....	36
3.2.2 Secuenciación de pacientes refractarios.....	36
3.3 Estudio 1: Enriquecimiento de la muestra tumoral mediante aguja para la elaboración de arrays de tejidos	38
3.3.1 Extracción de DNA de cilindros parafinados	38
3.3.2 Calidad y cantidad de DNA obtenido	38
3.4 Estudio 2: Microdissección de células tumorales.....	39
3.4.1 Extracción de DNA de células microdisecadas.....	39
3.4.2 Cuantificación del DNA extraído de células microdisecadas	39

3.5 Extracción de DNA a partir de mucosa bucal	40
3.6 Líneas celulares	40
3.7 Diseños utilizados en ambos estudios	41
3.7.1 Primer diseño de secuenciación.....	41
3.7.2 Segundo diseño de secuenciación	42
3.8 Secuenciación.....	43
3.8.1 Preparación de librerías	44
3.8.2 PCR de emulsión y enriquecimiento del producto	44
3.8.3 Secuenciación con la plataforma Ion Torrent.....	45
3.9 Análisis de resultados	45
3.10 Validación de las variantes por secuenciación de Sanger	46
3.11 Estudios funcionales	47
3.12 Análisis mediante una matriz de tejido (TMA, del inglés <i>Tissue Micro Array</i>)	48
3.13 Análisis estadístico	49
3.13.1 Criterios de valoración clínicos.....	49
3.13.2. Variables en el análisis de supervivencia	49
3.13.3. Curvas de supervivencia.....	50
RESULTADOS	51
4.1 Análisis del perfil mutacional de tumores primarios pre-tratamiento con el primer diseño.....	53
4.1.1 Clínica de la serie.....	53
4.1.2 Reproducibilidad y concordancia de la secuenciación en la serie	53
4.1.3 Análisis de las variantes detectadas en la primera serie de 57 pacientes diagnosticados con LHC.	55
4.1.4 Genes relevantes en este estudio	59

4.2 Análisis del perfil mutacional de las líneas celulares con el primer diseño de secuenciación	62
4.2.1 Valoración interna de la secuenciación en la serie de líneas celulares	63
4.2.2 Variantes identificadas en líneas celulares derivadas de Linfoma de Hodgkin ...	64
4.3 Validación funcional de las mutaciones detectadas	65
4.4 Expresión de BTK mediante IHQ y su asociación con supervivencia	69
4.5 Análisis de TMA y comparación con parámetros clínicos y genéticos de la serie ..	71
5.1 Análisis del perfil mutacional de muestras pareadas concernientes al tumor primario y a su recaída post-tratamiento.....	73
5.1.1 Clínica de la serie de casos	73
5.1.2 Reproducibilidad y concordancia de la secuenciación en la serie	74
5.1.3 Análisis de las variantes detectadas en la segunda serie de 12 pacientes diagnosticados con LHc y refractarios para la primera línea de tratamiento.	76
5.1.4 Análisis de valores pronóstico en pacientes refractarios de LHc.....	81
6. DISCUSIÓN	83
6.1 Rutas alteradas en LHc.....	87
6.2 Origen del tumor o mutaciones <i>driver</i> en LHc.....	94
6.3 IHQ asociada a LHc	97
7. CONCLUSIONES	101
8. BIBLIOGRAFÍA.....	105
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO	115
10. APÉNDICE	125

ABREVIATURAS

ABVD: Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina y Dacarbacina

ADNc: ADN complementario

ARF: Factor de ribosilación ADP

B2M: Beta-2-Microglobulina

BAX: Proteína X asociada a BCL2

BCL-10: Célula B CLL/Linfoma 10

BCR: Receptor de célula B

BEACOPP: Bleomicina, Etopósido, Doxorubicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbacin y Prednisona

BTK: Bruton Tirosina Kinasa

BV: Brentuximab vedotin

B-FGF: Factor de crecimiento de fibroblasto B

CIITA: Transactivador del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II

CARD11: Dominio de reclutamiento de caspasas miembro 11

CCL5: C-C Quimioquina ligando 5

CCL17: C-C ligando 17

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

COSMIC: Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer

CSF1: Factor estimulante de colonias

CSF2RB: Factor estimulante de colonias-2

CYLD: Cilindromatosis

DHAP: Dexametasona, Citarabina y Cisplatino

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco

EBNA1: Antígeno nuclear de Epstein Barr Nuclear 1

EBV: Virus de Epstein Barr

EP300: *E1A* Proteína de unión *P300*

FIB: Fibronectina tipo III

FFS: Supervivencia libre de fallo

FOXP-3: Caja en horquilla P3

GATA-3: Proteína de unión GATA 3

GSEA: Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes

GZB: Granzima B

HDACs: Deacetilasa de histonas

H.I FBS: Suero fetal bovino inactivado con calor

HRS: Células de Hodgkin y Reed-Sternberg

HSP90: Proteína de choque térmico 90

IARC: Agencia Internacional para la investigación contra el cáncer

IC₅₀: Concentración media inhibitoria

ICE: Fosfamida, Carboplatino y Etopósido

Ig: Inmunoglobulinas

IGV: Vista del genoma integral

IHQ: Inmunohistoquímico

IL-4: Interleuquina-4

IL-5: Interleuquina-5

IL6: Interleuquina-6

IL7: Interleuquina-7

IL13: Interleuquina 13

Indels: Inserciones y deleciones

IPS: Valor internacional de pronóstico

LBCG: Linfoma B de Célula Grande

LHc: Linfoma de Hodgkin clásico

LHPLN: Linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular

LMP1 y LMP2A: Proteína latente de membrana

LYZ: Lisocima

MMAE: Auristatina monometil E

NCI: Instituto Nacional de Cancer

NFBB: Factor Nuclear Kappa B

NK: Asesinas naturales

NOTCH1: Homólogo asociado a translocación Notch 1

OS: Supervivencia global

OMS: Organización Mundial de la Salud

P: Progresión de la enfermedad

PARP: Polimerasa Poli (ADP-Ribosa)

PAX-5: Caja emparejada 5

PD1: Muerte celular programada 1

PKC- β : Subunidad β de Fosfo Quinasa C

RP: Remisión parcial

RPMI: Medio instituto Roswell Park

SNVs: Variantes de cambio de nucleótido

TARC: Quimioquina de activación regulada en el timo

TBET: Caja-T 21

TGF- β : Factor transformador del crecimiento Beta

TIA1: Antígeno intracelular restrictivo a célula T

TMA: Matriz de tejido

TP53: Proteína tumoral P53

INTRODUCCIÓN

1.1 Linfomas

Los linfomas son neoplasias derivadas tanto de linfocitos B como de linfocitos T o células asesinas naturales (NK), representando alrededor del 4-5% de los cánceres diagnosticados en países industrializados, con una incidencia anual de 120.000 nuevos casos en Europa (alrededor de 7.000 casos en España) y 70.000 nuevos casos en Estados Unidos, según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI).

El término linfoma engloba a más de 40 tipos de enfermedades clasificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), teniendo en cuenta la morfología del tumor, inmunofenotipo y características genéticas. Esta clasificación, a parte de las características mencionadas, define el pronóstico y tratamiento a seguir por los facultativos [1].

Aunque la clasificación de este conjunto de patologías es muy amplia y está en continuo cambio, podemos hacer dos categorías:

- Linfomas No Hodgkin: constituyen la mayoría de los subtipos descritos (alrededor del 87%), incluyendo linfomas derivados de los 3 tipos celulares mencionados anteriormente, aunque los linfomas derivados de linfocito B constituyen la mayoría de los casos (alrededor del 90%).
- Linfoma de Hodgkin: fue el primer linfoma descrito, gracias a la tesis doctoral del patólogo inglés Thomas Hodgkin, en 1832.

Pese a la gran variedad de linfomas que en la actualidad se investigan en multitud de centros de investigación, esta tesis doctoral se centra en la caracterización genética de la forma clásica de Linfoma de Hodgkin, por lo que en los siguientes apartados de esta introducción se abordará en profundidad los aspectos relevantes de esta enfermedad.

1.2 Linfoma de Hodgkin

El linfoma de Hodgkin, denominado así gracias al patólogo inglés que lo describió en 1832, Thomas Hodgkin [2], es un tumor hematológico de baja incidencia, cada año se diagnostican 68.000 casos, según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (Agencia Internacional para la investigación contra el cáncer, IARC). Pese a ello, es el linfoma más frecuente en adolescentes entre 15 y 19 años (16% de los cánceres diagnosticados en este rango de edad) [3, 4].

Este linfoma se origina a partir de una población de linfocitos del centro folicular, en el que tienen lugar dos procesos en condiciones fisiológicas: generación de mutaciones somáticas y reordenamiento del gen de las inmunoglobulinas (Ig), para la maduración de linfocitos B [5]. En el caso en el que se produzcan mutaciones somáticas defectuosas, el pre-linfocito entraría en muerte celular vía apoptosis. Sin embargo, en algunas circunstancias todavía por definir, estas células evitan este mecanismo de control que conlleva la muerte celular, perdiendo la mayoría de los genes asociados a la diferenciación de linfocitos B, la capacidad de expresar Ig de superficie y la maquinaria de fabricación de éstas, adoptando formas citológicas inusuales, convirtiéndose en las células de Hodgkin y Reed-Sternberg (HRS) [6]. Este clon neoplásico representa el 1-2% de la celularidad total en la muestra tumoral (asociada a los ganglios linfáticos), estando rodeado de un microambiente no tumoral, compuesto principalmente por linfocitos, histiocitos, eosinófilos, células plasmáticas, fibroblastos, etc. [7].

1.2.1 Clasificación

Se han identificado dos tipos de enfermedad de Hodgkin, atendiendo a las diferencias encontradas en las características clínicas y biológicas, por lo que se deben considerar como entidades diferentes, reconociéndose en la actual clasificación de la OMS. En la tabla 1 observamos las características que diferencian al Linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular (LHPLN), frente al Linfoma de Hodgkin clásico (LHc), objeto de nuestro estudio [8].

LHPLN	LHc
Características clínicas	
Raro (<10%). En niños y adultos jóvenes	Cualquier edad (Picos de incidencia en la 2ª y 5ª década)
En estadios localizados	En cualquier estadio
Curso clínico indolente	Tumor agresivo, curso clínico fatal sin tratamiento
Algunos casos pueden progresar/transformarse en linfomas B difusos de célula grande	Transformación histológica extremadamente inusual
Patología	
Célula de origen: Linfocito B del Centro Germinal	Célula de origen: Linfocito B del Centro Germinal
Patrón nodular	Diferentes patrones histológicos
Clon tumoral: Celulas L&H, con fenotipo similar a linfocitos B normales del Centro Germinal (CD20+, CD79a+, Bcl6+, OCT2+, PAX5+, Ig+, Bcl2-)	Clon tumoral: células HRS, sin expresión de marcadores característicos de células B.
EMA+, CD30-, CD15-	PAX5+, CD30+, CD15+
Microambiente reactivo: nódulos de linfocitos B pequeños (IgD+) y abundantes linfocitos TFH (CD57+, PD1+)	Microambiente reactivo: polimorfo, linfocitos T, eosinófilos, macrófagos, fibroblastos, células plasmáticas, mastocitos, células dendríticas.
Nula asociación de EBV	Asociación con EBV: 40-70% (dependiendo de la incidencia poblacional del virus)

Tabla 1: Características diferenciales de los dos tipos de Linfoma de Hodgkin, Linfoma de Hodgkin de tipo predominio linfocítico nodular (LHPLN) y las formas asociadas a LHc.

El LHc se caracteriza por la presencia en el ganglio reactivo de un número reducido de células HRS son su fenotipo característico, y un fondo celular que desfigura la estructura ganglionar. Estas células HRS se caracterizan por tener un tamaño mayor que cualquier célula del microambiente no tumoral, son células bi o multinucleadas, con nucléolos grandes, siendo fácilmente reconocibles en cortes de tejido teñidos con hematoxilina-eosina. Atendiendo a las características del microambiente no tumoral asociado al LHc se llevó a cabo la clasificación de estos linfomas, encontrando 4 subtipos: Esclerosis nodular, célula mixta, rico en linfocitos o depleción linfoide [9]. En la tabla 2 podemos diferenciar estos subtipos histológicos en función de las características asociadas a cada uno.

1.2.2 Epidemiología

Podemos considerar el LHc como una enfermedad rara en niños o en personas mayores. Sin embargo, en países desarrollados podemos distinguir una distribución

bimodal atendiendo a la edad de esta enfermedad: el primer rango de edad en la que aparece es en adolescentes o adultos jóvenes, y encontramos una segunda modalidad que se detecta a partir de los 55 años [3].

Subtipo	Celularidad neoplásica	Microambiente reactivo	Fibrosis	Frecuencia poblacional
Esclerosis Nodular	Número variable de HRS Células lacunares	Linfocitos T, numerosos eosinófilos	Abundante Gruesas bandas de colágeno rodeando nódulos	50-70%
Celularidad Mixta	Abundantes células HRS típicas y variantes mononucleares Células mumificadas	Heterogéneo: histiocitos, eosinófilos, neutrófilos, células plasmáticas....	Ausente o intersticial	20-40%
Rico en linfocitos	Escasas células HRS típicas y variantes mononucleares	Nódulos de linfocitos B maduros, histiocitos	Habitualmente ausente, aunque puede existir en proporción baja	<5%
Depleción linfoide	Abundantes células HRS Pueden encontrarse células pleomórficas, fusiformes, etc.	Escaso	Ausente o fibrosis difusa	<5%

Tabla 2: Subtipos y características diferenciales de LHC.

La enfermedad típica que aparece en adultos tiene unas características similares a la que aparece en adolescentes, catalogándose dentro del mismo grupo, mientras que se hace una diferenciación distinta en el caso de niños o pacientes de elevada edad. En la tabla 3 se analiza la distribución de este tipo de linfoma en función de los distintos rangos de edad [3]. Podemos observar que en el rango de edad entre 15 a 54 años es donde

Variable	Niños	Adolescentes y adultos jóvenes	Adultos	Adultos mayores
Rango de edad	≤14 años	15-35 años	≥35 años	≥55 años
Prevalencia	10%-12%	50%		35%
Histología				
Esclerosis Nodular	40%-45%	65%-80%		35%-40%
Célula Mixta	30%-45%	10%-25%		35%-50%
Depleción linfocitaria	0%-3%	1%-5%		2%-6%
Asociado a EBV	27%-54%	20%-25%	34%-40%	50%-56%

Tabla 3: Epidemiología de LHC en función de la edad, observando que, tanto de manera general, como del subtipo histológico más frecuente, el rango de edad determinante lo encontramos entre los 15 y los 35 años, siendo el linfoma más prevalente en este rango de edad.

aparecen el 50% de los casos, rango seleccionado para el objeto de nuestro estudio.

1.2.3 Inmunofenotipo.

El diagnóstico de LHc se establece identificando las células tumorales HRS (reconocimiento morfológico), acompañado del estudio inmunohistoquímico (IHQ), que añade objetividad a la correcta identificación de las células tumorales. Las células HRS tienen un inmunofenotipo diferente al resto de las células hematopoyéticas. Estas células expresan marcadores de distintos tipos celulares, como de granulocitos (CD15), linfocitos T (perforina, Homólogo asociado a translocación Notch 1 (NOTCH1)), células B memoria (sindecano), y células dendríticas (fascina, C-C ligando 17(CCL17)); además, presentan marcadores asociados a linfocitos B, como caja emparejada 5 (PAX-5) (factor de transcripción específico de linfocitos B), que se expresa en la mayoría de los casos. Alrededor del 89% de los casos tienen una sobreexpresión de CD30, que se utiliza como identificador en el diagnóstico, siendo el marcador que utilizaremos en la separación de

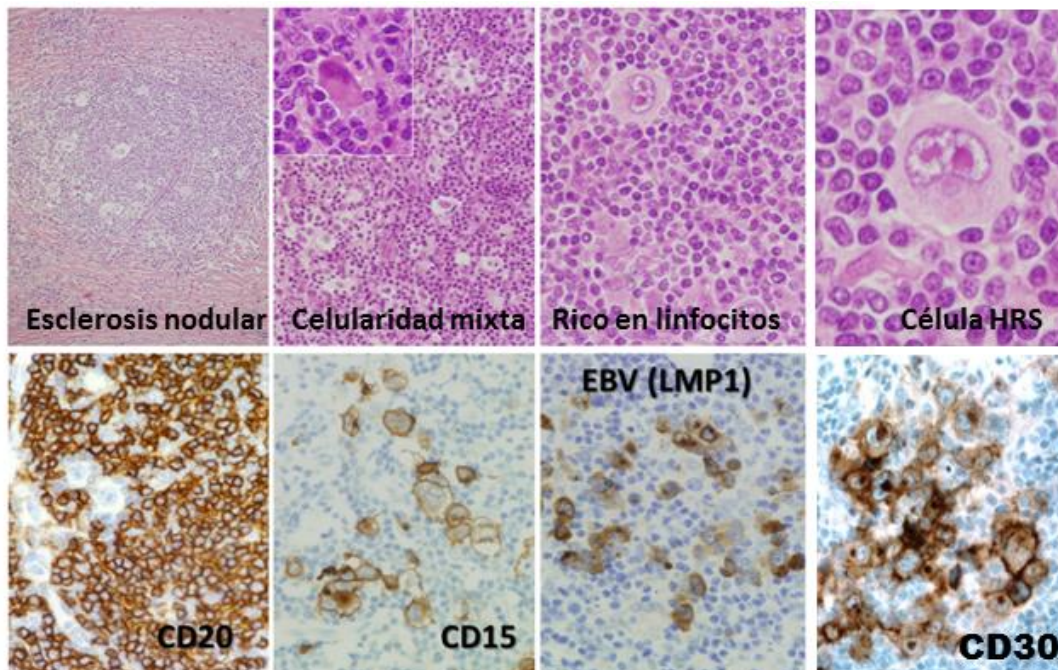


Figura 1: Características fenotípicas e histopatológicas fundamentales de LHc. Se muestran 4 ejemplos correspondientes a los distintos subtipos de LHc. El inmunofenotipo se caracteriza por una ausencia del marcador asociado a linfocito B CD20, una expresión habitual tanto de CD15 como de CD30, y la presencia variable (alrededor de un 40%, dependiendo de la prevalencia del virus en la población) de marcadores para el virus EBV.

las células tumorales [10]. En la figura 1 se muestran ejemplos de las secciones asociadas a distintos subtipos histológicos de LHC, además de su inmunofenotipo.

1.2.4 Aspectos clínicos y factores pronóstico asociados a LHC

Las alteraciones ocasionadas por las mutaciones somáticas introducidas en las células pre-tumorales tienen lugar en los ganglios linfáticos, y como consecuencia se generan la expansión clonal y las adenopatías asociadas a la masa tumoral. Este hecho es el síntoma predominante en dos tercios de los casos [11]. El segundo grupo de síntomas asociados a esta enfermedad son los causados por la liberación de quimioquinas y citoquinas producidas por las células HRS y componentes del microambiente, suprimiendo la respuesta Th1 y activando los factores de transcripción de la familia TNFR, que activan la vía *Nuclear Factor Kappa B* (NFkB), dando lugar a una alteración en la respuesta inmune, generando como consecuencia el auto-mantenimiento de las células HRS. Estas alteraciones también se ven afectadas con la presencia del virus de Epstein Barr (EBV), que se detecta en alrededor de un 40% de los casos (dependiendo de la prevalencia del virus en la población a estudio), y que contribuye a la alteración del equilibrio Th1/Th2 [12]. Estos síntomas suelen acompañar a la alteración ganglionar avanzada aunque, en ocasiones son el primer o único síntoma de la enfermedad. Estas manifestaciones son los

Estadíos	Descripción
Estadio I	Afectación de una región ganglionar única sin o con afectación por contigüidad de una afectación parenquimatosa
Estadio II	Afectación de dos o mas regiones ganglionares al mismo lado del diafragma, sin o con afectación localizada por contigüidad de una afectación parenquimatosa o del bazo o ambas
Estadio III	Afectación de regiones ganglionares a ambos lados del diafragma (III); puede incluir afectación localizada por contigüidad de afectación parenquimatosa (IIIE) o del bazo (IIIS) o ambas (IIISE)
Estadio IV	Afectación de uno o mas órganos extraganglionares (no por contigüidad) con o sin afectación ganglionar
Designaciones aplicables a cualquier estadio de la enfermedad	
A	No síntomas generales
B	Fiebre (>38°C), sudores nocturnos o pérdida inexplicable de peso > 10% en los 6 últimos meses

Tabla 4: Clasificación de Ann Arbor, utilizada en ambos estudios para la clasificación

síntomas B de la clasificación Ann Arbor, que incluyen fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), sudores nocturnos o pérdida inexplicable de peso, mayor del 10% en los últimos 6 meses [13].

Probablemente, el LHc aparece en un ganglio linfático aislado y, en una primera fase, se disemina a otras áreas linfáticas próximas y de éstas a otras contiguas. En la enfermedad avanzada se suele producir la diseminación hematológica (metástasis). Para valorar el grado de evolución de la enfermedad en cada paciente se utiliza la clasificación de Ann Arbor, establecida en 1971, en la que se separaron cuatro niveles de enfermedad, entre el estadio I al IV, y que refleja la cantidad de masa tumoral, condicionando el pronóstico y la intensidad de tratamiento a prescribir por parte del facultativo. La ausencia o presencia de síntomas sistémicos refleja la actividad funcional del tumor en el paciente y define los subgrupos A y B. En la tabla 4 encontramos los distintos estadios de esta enfermedad, que son los utilizados en la clínica asociada a nuestras series de casos, diferenciando esta clasificación en dos grupos: una baja masa tumoral, que se asocia a estadios I, II y III; y masas tumorales voluminosas, asociadas a estadio IV [13].

Para la estratificación del riesgo en los casos de LHc avanzado se utiliza el valor internacional de pronóstico (IPS), determinado por el *International Prognostic Factors Project of Advanced Hodgkin's Disease* [14]. Se estudió un grupo de 5.141 pacientes con LHc avanzado tratados con quimioterapia, con o sin radioterapia. En este ensayo se determinaron los parámetros clínicos y analíticos con influencia en la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años del diagnóstico. Estas variables fueron: sexo masculino, edad por encima de los 45 años, estadio IV, albúmina sérica mayor de 4 g/l, hemoglobina menor de 10,5 g/dl, leucocitosis $>15.000/\mu\text{l}$ y linfopenia $<600/\mu\text{l}$. Sumando el número de factores se puede obtener una escala del 0 al 7. Para este estudio, la agrupación que hemos llevado a cabo es de índices 0-2 y ≥ 3 , con 86% y 70% de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años. La validez de este factor pronóstico ha sido confirmada mediante otros estudios retrospectivos [15, 16], aunque estudios más recientes, considerando terapias modernas (quimioterapia y/o radioterapia), indican que solo alguno de estos factores tiene un peso mayor e independiente en la estratificación del riesgo [17, 18].

1.2.5. Microambiente no tumoral asociado a LHc

Como hemos mencionado anteriormente, el porcentaje de células tumorales reconocibles mediante microscopía e IHQ en este tipo de neoplasia es de alrededor del 1%, por lo que el conjunto de células que acompañan en los ganglios tumorales a las células HRS deben jugar un papel fundamental en el inicio, mantenimiento y desarrollo de la enfermedad. De hecho, cuando una célula HRS migra a otro órgano, sea linfoide o no, éstas necesitan reconstruir de nuevo su particular microambiente para su supervivencia. Este microambiente lo componen linfocitos T, linfocitos B funcionales, granulocitos, eosinófilos y células del estroma, entre otras [7]. Aunque este campo todavía es bastante desconocido, nuevas terapias contra este tipo de células favorecen la hipótesis de que juegan un papel fundamental en el crecimiento del tumor, escape a la respuesta inmune y supervivencia de la célula HRS, por lo que describiremos el papel de cada subtipo celular en el contexto inmunológico de la enfermedad. Además, se ha determinado que ciertos marcadores asociados a estos tipos celulares, pueden ayudarnos a determinar el pronóstico de manera individualizada en cada paciente.

- **Linfocitos T:** este tipo celular representa el mayoritario en el microambiente tumoral, diferenciándose en células Th2 o células T reguladoras. Las células HRS emiten atrayentes químicos, como Interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-5 (IL-5) o CCL17/Quimioquina de activación regulada en el timo (TARC), específicos para este tipo celular, viéndose en estos casos una menor respuesta a los tratamientos quimioterápicos (resistencia a la terapia mediada por linfocito T) [19]. Además, las células HRS también secretan factores que inducen la diferenciación del linfocito T en estos dos subtipos mencionados.

La regulación positiva del receptor PD-1 (del inglés *Programmed Dead-1*) se ha caracterizado tanto en modelos de infección viral como en múltiples linfomas como son el Linfoma B de Célula Grande (LBCG) o Linfoma Folicular. En LHc, la expresión constitutiva de este receptor en las células T provoca la activación constante de sus ligandos, PD-L1 y PD-L2 en las células HRS, fenómeno potenciado por la frecuente amplificación del locus

9p24.1. Atendiendo a este hecho, podemos utilizar como factor pronóstico la expresión de PD-1 en las células T tanto del microambiente asociado en el ganglio como en sangre periférica, asociándose a pronóstico desfavorable [20].

Otra característica en los linfocitos T en LHC es su imposibilidad por reconocer las células tumorales, debido a que éstas carecen del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), necesario para el reconocimiento vía antígeno. Este hecho ocurre debido a una mutación secundaria en los genes Beta-2-Microglobulina (*B2M*) y del Transactivador del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II (*CIITA*), o por vía epigenética disminuyendo la transcripción de *CIITA* [21, 22].

Por último, otro mecanismo a tener en cuenta, y del que hablaremos más adelante analizando los resultados, es que los linfocitos T promueven la supervivencia de las células HRS gracias a la activación de la vía NFκB mediante el ligando CD40. Esta señal de crecimiento tiene que ser particularmente importante en este tipo tumoral, aunque al ser un linfocito no tumoral, esta vía de señalización activada por el receptor de linfocito B (BCR) no debería de estar activa [23].

Los marcadores asociados a linfocito T que vamos a analizar en el microambiente de los casos seleccionados son los siguientes:

1. Caja en horquilla P3 (FOXP-3): regulador transcripcional que actúa de manera crucial en el desarrollo e inhibición de la función de linfocitos T reguladores. Juega un papel crucial en la regulación de la homeostasis del sistema inmune, modulando la expansión y función de este tipo celular. Se han realizado estudios *in vivo* en los que se demuestra que la depleción de este tipo celular se asocia a una regresión de la masa tumoral, por lo que su posible presencia en el ganglio tumoral suprime esta respuesta inmune frente al tumor. En los ensayos de IHQ estudiados, este marcador es el más robusto en cuanto a peores tasas de supervivencia asociada a mayor expresión del marcador en el microambiente [24].

2. Granzima B (GZB): marcador de linfocito T citotóxico, mediador de la inducción rápida de fragmentación del DNA y apoptosis en la célula diana. Se puede utilizar como factor pronóstico de manera individual, identificando un peor pronóstico de la enfermedad en presencia de un elevado porcentaje de este marcador en el ganglio tumoral, determinado mediante IHQ [25], o en su combinación con FOXP-3, mediante el cociente del porcentaje de células FOXP3 positivas entre el porcentaje de células GZB positivas [26].

3. Proteína de unión GATA 3 (GATA-3): es un factor de transcripción esencial en el desarrollo de linfocitos T, uniéndose a la secuencia consenso 5'-AGATAG-3'. Factor requerido para la diferenciación de linfocitos T *helper* Th2 en la respuesta inmune. La sobreexpresión de este marcador se ha asociado a un incremento en el crecimiento de células cancerosas pancreáticas, o a un mejor pronóstico en cáncer de mama [27]. En cuanto a tumores hematopoyéticos, también se ha determinado un peor pronóstico asociado a GATA3 en Linfoma T periférico [28, 29].

4. Caja-T 21 (TBET): es el factor de transcripción *T-box*, que controla la expresión de las citoquinas Th1 y el interferón-gamma. Se expresa en los linfocitos CD4+ en el desarrollo desde precursor al linfocito T *helper*, activando el programa de diferenciación hacia linfocito Th1 y reprimiendo el programa Th2 [30].

5. Antígeno intracelular restrictivo a célula T (TIA1): proteína relacionada con el splicing del pre-ARN y regula la translación del ARN mensajero por su unión a elementos ricos en los nucleótidos AU. Posee actividad nucleotídica en linfocitos T citotóxicos y se encuentra relacionada en procesos de apoptosis. Se ha determinado que elevados niveles de TIA1 detectados en el microambiente no tumoral en pacientes con LHc presentan peor pronóstico que los pacientes con niveles bajos de esta proteína [31, 32].

6. CD8: este antígeno CD8 es una glicoproteína de superficie de la mayoría de los linfocitos T citotóxicos y media la eficiencia de interacción célula-célula en el sistema inmune. Actúa como correceptor en el reconocimiento de antígeno mediante el complejo mayor de histocompatibilidad [33].

7. CD4: glicoproteína de membrana en los linfocitos T que interactúa con los antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II, además de ser el receptor del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Las células HRS atraen los linfocitos T CD4+ para escapar a la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8. Se están ensayando estudios preliminares para nuevas terapias dirigidas contra las células HRS basándose en esta interacción célula tumoral-linfocitos T CD4+ [34].

8. CD3: complejo de subunidades que forman el receptor CD3 de las células T, importante en los procesos de reconocimiento de antígeno y distintas vías de transducción de señales.

9. PD1: Receptor de superficie que actúa como inhibidor del linfocito T en procesos de inmunidad y tolerancia. Como se ha mencionado anteriormente, este marcador está asociado a peor pronóstico.

- **Linfocitos B:** en ganglios tumorales donde aparecen las células HRS también encontramos linfocitos B funcionales, como en un ganglio linfático normal. Una de las hipótesis que apuntan a promover la proliferación de las células HRS es la secreción por estas células de IL-10, suprimiendo la actividad antitumoral del linfocito T. Una nueva manera de tratar este tipo de patología es la combinación de rituximab (anticuerpo monoclonal específico para el marcador CD20, mediando lisis linfocitaria por múltiples mecanismos) con la quimioterapia convencional asociada a este linfoma (adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbacina (ABVD))[35].

- **Fibroblastos:** presentes mayoritariamente en el subtipo esclerosis nodular, responsables de la producción de citoquinas como interleuquina 13 (IL13), Factor transformador del crecimiento Beta (TGF- β), Factor de crecimiento de fibroblasto B (B-FGF) y CD40. Estos fibroblastos también son capaces de producir factores de crecimiento beneficiosos para la célula tumoral, como son interleuquina-6 (IL6) e interleuquina-7 (IL7) [36].

- **Mastocitos:** presentes en todos los subtipos histológicos de LHc, expresa CD30 ligando, estimulando la proliferación de células HRS mediante ensayos *in vitro* [37].

- **Eosinófilos:** como en el tipo celular anterior, expresa tanto CD30 como CD40 ligando (sus receptores están presentes en la célula HRS), promoviendo procesos de proliferación y antiapoptosis en la célula tumoral. Además de estos dos ligandos, también expresa TGF- β , por lo que está relacionado con procesos de fibrosis en este microambiente no tumoral.

Atendiendo a la relación del microambiente tan diverso, los linfocitos T *helper* expresan quemoquinas como C-C Quimioquina ligando 5 (CCL5), que tiene como finalidad el reclutamiento de eosinófilos y mastocitos en los alrededores de las células HRS [7].

- **Monocitos/Macrófagos:** este componente de microambiente ha sido calificado como un posible factor pronóstico de LHc. Se ha propuesto el uso de los marcadores CD68 y CD163 (marcadores de macrófagos) asociados a peor pronóstico, aunque sigue habiendo controversia sobre la estandarización de estas observaciones [38]. En relación a este hecho, se han detectado alteraciones en las líneas establecidas a partir de LHc que provocan una sobreexpresión de receptores del factor estimulante de colonias (CSF1), habitualmente expresado en macrófagos tisulares en respuesta inmune tipo M2 [39].

Los marcadores de monocitos y macrófagos que vamos a estudiar son los siguientes:

1. CD68: marcador de macrófagos asociados al tumor. Participa en la actividad fagocítica del macrófago, en el metabolismo lisosomal, y en la interacción de la célula con el patógeno. Ese marcador se ha visto asociado a peor pronóstico en distintos cánceres, incluyendo hematopoyéticos como el linfoma folicular. Se ha visto correlación estadísticamente significativa entre la elevada proporción de macrófagos asociados a tumor (marcados con CD68) en pacientes refractarios o con recaídas tempranas en comparación con los pacientes respondedores, que presenta menor proporción de macrófagos infiltrados en el ganglio [40].

2. CD163: marcador exclusivo de monocitos y macrófagos. Esta proteína actúa como sensor de la respuesta inmune innata contra bacterias e induce inflamación local. Se

pueden utilizar alternativamente los dos marcadores, tanto CD68 como CD163, aunque hay trabajos que sugieren que este marcador tiene un valor predictivo mayor que el anterior [41], en cuanto a peor pronóstico cuando encontramos gran número de macrófagos marcados con CD163 en el ganglio tumoral.

3. STAT1: esta proteína está codificada por un gen que pertenece a la familia STAT que, en presencia de citoquinas y factores de crecimiento, se fosforila por su receptor asociado a quinasa, formando homo o heterodímeros que son translocados al núcleo, actuando como activador transcripcional. Esta proteína media la expresión de varios genes importantes en viabilidad celular en respuesta a diferentes estímulos. STAT1 se expresa en macrófagos activadores de la respuesta inmune asociada a linfocitos T *helper* Th1, responsable de la actividad tumoricida [42].

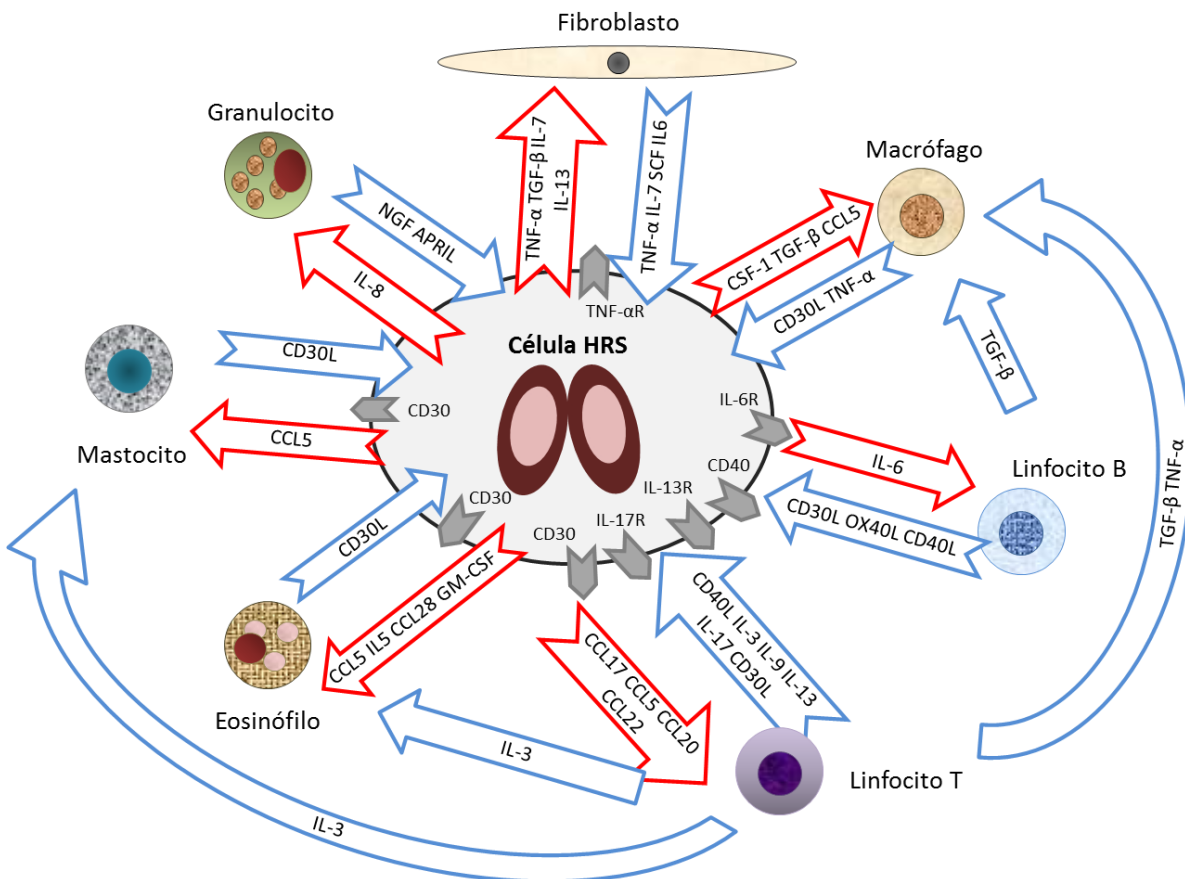


Figura 2: Microambiente asociado a LHC. Esquema que refleja la liberación mediante las células HRS de diversas quimioquinas y citoquinas que provocan una estimulación tanto autocrina como paracrina, definiendo el mecanismo esencial de proliferación y supervivencia.

4. Lisozima (LYZ): proteína expresada tanto en monocitos como en macrófagos activados, correlaciona con supervivencia libre de fallo prolongada y mejor pronóstico en algunos estudios realizados en este laboratorio [43].

- **Células dendríticas:** se han realizado estudios en otros tipos tumorales, identificando una mayor tasa de supervivencia en pacientes con una elevada carga de este tipo celular. Es el caso de Leucemia Linfática Crónica [44], como en otros tipos de linfoma, como son Linfoma Folicular [45] o Linfoma del Manto [46].

El marcador que vamos a utilizar para medir la proporción de estas células en los ganglios tumorales es CD23, soliendo estar localizado en la periferia del ganglio, asociándose a linfocitos B, raramente a células HRS [47, 48].

Como se muestra en la figura 2, se crea una interrelación bastante controlada entre los factores liberados, tanto por la célula HRS como por los tipos celulares descritos previamente, y cuya finalidad es la supervivencia de la célula tumoral.

1.2.6. Papel del virus Epstein-Barr en LHc

La infección del virus en pacientes diagnosticados de LHc varía en función de la prevalencia del mismo en la población a estudio, situándose en España en torno al 40%, teniendo una incidencia mayor en el subtipo célula mixta, depleción linfocitaria y en pacientes de edad avanzada.

Mediante estudios de hibridación *in situ* y Southern blot se ha demostrado que el EBV se asocia a las células HRS exclusivamente, integrándose de forma clonal en estas células tumorales [49]. Al estar ya integrado, la infección por el virus ocurre necesariamente antes de la expansión clonal que da lugar a la malignidad, apuntando a un papel patogénico (todavía no demostrado) en el desarrollo de esta neoplasia. Las células HRS infectadas presentan un patrón de expresión viral de los genes proteína latente de membrana (*LMP1* y *LMP2A*) y Antígeno nuclear de Epstein Barr Nuclear 1 (*EBNA1*) que persiste a lo largo del transcurso de la enfermedad, haciéndole a la célula tumoral

completamente independiente de señales de supervivencia implícitas en la célula. Las proteínas LMP1 y LMP2A contribuyen a la activación constitutiva de la vía de señalización NFκB (mediada por CD40), contribuyendo de manera sinérgica con los linfocitos T y las células dendríticas mencionadas anteriormente.

El valor predictivo de la presencia de EBV en LHc es aún controvertido. En algunos estudios, los casos EBV positivos parecen tener una tendencia a mayor respuesta terapéutica, aunque estas observaciones varían entre distintas series [50, 51]. Recientemente se ha clarificado esta cuestión al mostrar que las diferencias observadas dependen fundamentalmente de la edad de la población estudiada, considerándose un probable factor adverso en pacientes de edad avanzada, pero no así en la población más joven [52, 53].

1.2.7. Tratamiento de LHc

La primera línea de tratamiento para esta enfermedad varía dependiendo de si el diagnóstico es temprano o avanzado, y consiste en una combinación de quimioterapia en estadios tempranos de ABVD y otra combinación más intensa de 7 drogas para estadios más avanzados: bleomicina, etoposido, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbina y prednisona (BEACOPP). Estos tratamientos se pueden combinar o no con tratamiento radioterápico. Aproximadamente el 80% de los pacientes evolucionan hacia una remisión completa de la enfermedad después de esta primera línea de tratamiento. Algunos efectos secundarios asociados son los típicos relacionados con los tratamientos quimioterápicos, como son complicaciones cardiopulmonares, fatiga o infertilidad [54].

Un 20% de los pacientes no presentan remisión completa después de ser tratados con la primera línea de tratamiento, recayendo normalmente en los primeros 12 meses. Para estos pacientes, el protocolo a seguir es el tratamiento con regímenes quimioterápicos más intensos como son la combinación de fosfamida, carboplatino y etoposido (ICE) o dexametasona, citarabina y cisplatino (DHAP), seguido de un trasplante

autólogo. La supervivencia a 5 años para esta segunda línea de tratamiento está alrededor del 55% [55].

Se están intentando establecer nuevas líneas de tratamiento para estos pacientes refractarios, en los que su pronóstico es bastante desfavorable:

- Anticuerpos anti-CD30: Brentuximab vedotin (BV) es un anticuerpo conjugado que libera selectivamente en las células CD30 positivas auristatina monometil E (MMAE), un agente citotóxico antimicrotúbulo. El uso de BV como tratamiento de consolidación después del trasplante autólogo se ha estudiado en el ensayo AETHERA [56], observándose una mejora en la supervivencia total en pacientes diagnosticados con LHC que presentan riesgo elevado de recaída después del trasplante. Se han llevado a cabo otros ensayos en los que se administra BV como primera línea de tratamiento, solo o combinado con los tratamientos quimioterápicos estándar. Estos ensayos tienen unos resultados estadísticos poco robustos, y hay opiniones contradictorias en cuanto al balance del beneficio en la supervivencia y los efectos secundarios generados en el paciente, sobre todo afecciones pulmonares, neurológicas y gonadales [57].

- Inmunoterapia/fármacos bloqueantes: se basan en bloquear la actividad del eje PD-1/PD-L1/PD-L2, para potenciar la actividad antitumoral de las células T. Estos ensayos están todavía en fase I, siendo unos fármacos con efectos adversos tolerables, pero con resultados escasos en cuanto a efectividad de tratamiento, como es el caso de Nivolumab [58, 59].

Estudios farmacogenéticos en cáncer han demostrado el potencial de esta vía para hacer el tratamiento más seguro y efectivo. El análisis de vías de señalización, tanto en este estudio como en otros tantos que se están llevando a cabo, tiene como finalidad entender el fenotipo de la enfermedad, asociándolo con el genotipo, tanto de las células tumorales, como de sus células promotoras o de sustento. Estudiando cada gen independientemente puede llevar a la conclusión de que afectando distintos puntos de la misma ruta, tiene como consecuencia la alteración de la vía de señalización en la que intervienen, ocasionando el mismo fenotipo [60]. Uno de los puntos fuertes de esta tesis

doctoral es, de manera preliminar, poder asociar las alteraciones encontradas en genes de manera individual o en vías de señalización completas, tanto con la supervivencia de los pacientes tratados con la primera línea de tratamiento estándar, como con nuevos tratamientos ensayados en función de las dianas genéticas encontradas. En concreto, en este laboratorio se ha ensayado el potencial terapéutico de Ibrutinib en las líneas celulares establecidas a partir de pacientes con LHc. Ibrutinib es un fármaco inhibidor de la proteína Bruton Tirosina Kinasa (BTK), aceptado para el tratamiento de otros tumores asociados a linfocitos B, como pueden ser Leucemia Linfática Crónica, Linfoma del Manto o Macroglobulinemia de Waldenström. Este trabajo se ha realizado en paralelo con un estudio realizado por otro grupo, ya publicado, en el que se tratan con Ibrutinib pacientes refractarios diagnosticados con LHc [61].

1.3 Evolución en secuenciación y sus antecedentes en LHc

La revolución que se ha producido a finales del siglo XX y principios del siglo XXI en la caracterización de la estructura del ADN y su posterior proceso de secuenciación, se pueden resumir en distintos puntos de inflexión, hasta la llegada en 2006 de las técnicas de secuenciación de segunda y tercera generación, que permite analizar sin sesgos millones de muestras. Después de una década, las técnicas de secuenciación masiva se han convertido en una manera accesible para la secuenciación de muestras en paralelo en un solo secuenciador al mismo tiempo [62].

Esta revolución en las técnicas de biología molecular conlleva una traslación a la clínica en prácticamente todas las especialidades. El primer exoma en cáncer se secuenció dentro del Proyecto de Genoma Humano en 2001, cubriendo solo el 1% del genoma total (únicamente región codificante). A partir de la secuenciación de colecciones de tumores con clínica y fenotipo similar, o atendiendo a firmas genéticas similares en distintos cánceres, tanto sólidos como líquidos, se han desarrollado paneles de genes para casi cualquier tecnología de secuenciación, con los que se permite un cribado general, tanto a la hora del diagnóstico del mismo, como en la selección de terapia [63].

Atendiendo a LHC la situación es más complicada, debido a la escasa información al respecto. El bajo porcentaje de células HRS en el ganglio tumoral, se suma la imposibilidad de ensayos *in vitro* de cultivos primarios establecidos a partir de este tipo

Genes previamente descritos en LHC

Asociadas con la activación constitutiva de la vía NF- κ B:

NFKBIA (I κ B α), inactivada debido a la detección de variantes somáticas en 15-20% de los LHC. En L428 y KMH2, variantes en regiones intrónicas [64-66]

NFKBIE (I κ B ϵ), también se han identificado variantes en 1 de 6 casos analizados [67].

TNFAIP3 (A20), se han identificado variantes en 17 de 54 LHC analizados (células HRS microdisecadas) [68, 69].

TRAF3, detección de deleciones monoalélicas en 3 de 20 LHC analizados [70].

Asociadas a la activación de la vía de señalización JAK/STAT:

SOCS-1, variantes detectadas en 8 de 19 LHC analizados (células HRS microdisecadas) y en 3 de 5 líneas celulares [71].

Genes supresores:

TP53, variantes identificadas una pequeña fracción de la población analizada (3 de 34 casos en células HRS microdisecadas) [72, 73].

FAS/CD95, variantes identificadas en una baja frecuencia poblacional (2 de 10 casos en células HRS microdisecadas) [74].

Últimos resultados:

PTPN1, identificación de variantes en 6 de 30 pacientes LHC analizados [75].

B2M, identificación de alteraciones en 7 de 10 pacientes LHC (células HRS sorteadas mediante citometría de flujo) [21].

Tabla 5: Antecedentes bibliográficos en secuenciación de LHC.

celular, y el bajo rendimiento de experimentos de transfección celular en animales de experimentación.

En cuanto a la firma genética de LHC, se han detectado algunas vías alteradas, como puede ser la vía de señalización JAK/STAT como la vía NF κ B, aunque los artículos al respecto son bastante escasos. En la tabla 5 se resumen los hallazgos encontrados, tanto en células tumorales como en alguna línea celular, de los genes alterados, y la frecuencia poblacional hallada en la muestra estudiada. Hay que destacar que para la frecuencia detectada se ha realizado el sumatorio de los trabajos en los que se describen variantes en cada gen. Por ello, concluimos que estos trabajos son válidos como primera aproximación al estudio de secuenciación pero que, al no tener series grandes de pacientes, no se puede concluir una frecuencia poblacional clara de los genes alterados, ni una firma genética asociada a este tipo tumoral que nos pueda aportar información acerca de su origen, tanto en la formación de un tumor primario, como en la posterior recaída del mismo.

Para este proyecto hemos utilizado dos tipos de tecnologías diferentes. Para el análisis de posibles variantes en genes pre-seleccionados hemos utilizado la tecnología Ion Torrent, de la casa comercial Life Technologies [76]. Esta tecnología se basa en la detección de ADN clonal amplificado mediante la cuantificación, gracias a un sensor, de protones liberados durante la reacción de polimerasa. Cuando un nucleótido presente en el campo fluídico es complementario a la librería de cada muestra previamente generada, se incorpora a la hebra naciente gracias a la ADN polimerasa. Este hecho incrementa la longitud de los oligonucleótidos utilizados en una base, obteniendo como resultado la hidrólisis del nucleótido trifosfato correspondiente, provocando la liberación neta de un protón por cada nucleótido incorporado. La liberación de este protón ocasiona el cambio de pH en la solución proporcional al número de nucleótidos incorporados (0.02 unidades de pH por cada nucleótido). Este cambio de pH es detectado por un sensor insertado en cada pocillo (asociado a una secuencia monoclonal) del chip de carga de la muestra. Posteriormente, el software de detección de la señal convierte estos datos brutos de cambios de voltaje en una lectura, mediante un modelo físico que corrige variaciones de difusión de la muestra, influencia de las soluciones tamponadas utilizadas y ratio de la polimerasa utilizada (incluida en el kit de secuenciación). El asignador de bases (del inglés *base caller*) corrige la señal originada, dando como resultado la lectura de la secuencia a

analizar. Esta tecnología se lanzó al mercado en 2010, siendo el primer secuenciador comercial que no requiere fluorescencia y escáner, resultando en un método rápido, de bajo coste y de un tamaño adecuado para un laboratorio convencional [77].

Para detectar estos cambios y poder clasificar las variantes en función de su efecto, vamos a utilizar dos algoritmos predictores:

-SIFT: es un algoritmo de predicción que, analizando la información obtenida de los múltiples alineamientos para una misma secuencia, predice para cada posición leída un estatus tolerado o deletéreo. Para ello, dada la secuencia de la proteína resultante, el algoritmo sigue varios pasos en los que busca secuencias homólogas, obtiene múltiples alineamientos a partir de esas secuencias localizadas y calcula la probabilidad normalizada de todas las posibles sustituciones en cada posición de ese alineamiento. Partiendo de un punto de corte establecido, las sustituciones con una probabilidad menor de este punto se consideran variantes deletéreas, mientras que las que están por encima de ese punto serán variantes toleradas [78].

-POLYPHEN-2: es un valor predictor que se basa en varios factores, como son la utilización de 8 secuencias de referencia, seleccionadas automáticamente por el algoritmo ideado, comparando las propiedades de la secuencia del alelo normal y su correspondencia con el alelo alterado, definiendo el cambio de aminoácido correspondiente. Este algoritmo utiliza dos bases de datos de referencia, HumDiv/HumVar y UniProt. Para este valor cualitativo, el mismo algoritmo te lo transforma asociándolo a 3 categorías: probablemente perjudicial (mayor grado de predicción), posiblemente perjudicial (menor grado de predicción) y benigna (mayor determinación de que sea un falso positivo) [79].

El otro método utilizado en esta tesis, centrado en la validación de la técnica anterior, es la secuenciación tradicional de Sanger, método basado en la elongación de la cadena nucleotídica añadiendo nucleótidos carentes del grupo hidroxilo en el carbono 3', de manera que al incluirse este nucleótido truncante, la reacción de replicación del ADN finaliza [80].

OBJETIVOS

Asumimos que LHc es un linfoma curable, con una tasa de supervivencia cercana al 80%. Sin embargo, hay un porcentaje considerable de los pacientes diagnosticados con esta enfermedad que no responden a la terapia convencional basada en ABVD.

Por ello, consideramos que la caracterización de este tumor a nivel genético es primordial para el avance tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de estos pacientes.

La secuenciación de nueva generación nos permite una rápida caracterización de variantes en cáncer, permitiendo generar un mapa genético tanto en tumores sólidos como en enfermedades hematológicas. La caracterización de genes con significado biológico en el inicio o en la progresión de la enfermedad y su asociación con los parámetros clínicos asociados a cada paciente nos permitiría en un futuro poder generar un indicador genético del pronóstico de la enfermedad.

Los objetivos de este estudio son los siguientes:

- a. Identificación de variantes genéticas recurrentes en el tumor primario de pacientes diagnosticados con LHc y validación representativa de la reproducibilidad de la secuenciación.
- b. Validación de los resultados previos obtenidos mediante la secuenciación en las mismas condiciones de líneas celulares establecidas a partir de LHc.
- c. Estudios funcionales a partir de los resultados obtenidos anteriormente en el que se validan vías de señalización alteradas y estudio de posibles tratamientos.
- d. Caracterización genética de pacientes refractarios, en el que se estudian las células tumorales y el microambiente no tumoral, tanto en tumor primario como en la recaída después de la primera línea de tratamiento. Así mismo, obteniendo la firma genética de estos pacientes refractarios, evaluar la posible implicación de nuevos tratamientos en el protocolo terapéutico de este tipo de pacientes.
- e. Evaluación de la firma IHQ asociada al microambiente “no tumoral” en los pacientes seleccionados, y su asociación con la clínica del pacientes y los diferentes marcadores pronósticos ya establecidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Selección de muestras

En este trabajo de tesis doctoral se han recopilado diferentes grupos de biopsias de ganglios incluidos en parafina, todos procedentes de pacientes diagnosticados con LHc.

La colección de datos clínicos recopila los siguientes parámetros: hospital de origen, fecha de nacimiento, al diagnóstico del paciente y en la recaída, género, subtipo histológico, afección extramedular, presencia de masa *bulky* (ganglio o masa ganglionar mayor de 10 cm de diámetro en cualquier localización, excepto mediastino), estadio Ann Arbor, hemoglobina <10.5 g/dl, albúmina <4 g/dl, leucocitosis (leucocitos $\geq 1.5 \times 10^9/l$), linfopenia (linfocitos $\leq 0.6 \times 10^9/l$), IPS (calculado con los valores previamente definidos en la introducción), tipo de tratamiento, respuesta (remisión completa (RC), remisión parcial (RP), o progresión (P)). Además, tanto el valor IPS como el estadio Ann Arbor han sido codificados para determinar un punto de corte asumiendo un pronóstico favorable/no favorable en esta enfermedad (indicado en la introducción).

Las muestras han sido cedidas por 11 centros de investigación en España: Fundación Jiménez Díaz (Madrid), Hospital Gregorio Marañón (Madrid), Hospital Ramón y Cajal (Madrid), Hospital Virgen de la Arrixaca (Murcia), Hospital de Móstoles (Madrid), Hospital La Paz (Madrid), Hospital La Princesa (Madrid), Hospital Md Anderson Cancer Center (Madrid), Hospital Severo Ochoa (Madrid), Hospital de Cabueñes (Asturias) y Hospital Puerta del Hierro (Madrid).

Todas las muestras fueron recogidas siguiendo las indicaciones técnicas y éticas de la Red Nacional de Biobancos, incluyendo procesos de encriptación de las muestras y la firma del consentimiento informado correspondiente para su uso en investigación.

3.2 Tratamiento de las muestras

El ganglio linfático extraído fue fijado en formol neutro tamponado, deshidratado mediante la sucesión de varios lavados con soluciones a concentración decreciente de etanol e incluidos en bloques de parafina para su conservación. En este trabajo se utilizaron diferentes series de pacientes, que son las siguientes:

3.2.1 Secuenciación de tumores primarios

Para este primer proyecto se han seleccionado 57 biopsias de pacientes, en el momento previo al tratamiento. En todos los casos se ha confirmado el diagnóstico de LHc. En el 92.98% de los casos se ha determinado el subtipo histológico, mientras que en un 7.02% el patólogo correspondiente no lo ha especificado en la historia clínica asociada. Además de las muestras de pacientes, también se ha utilizado ADN genómico perteneciente a 6 líneas celulares derivadas de Linfoma de Hodgkin, que son L428, L1236, HDLM-2, L540, L591 y KMH-2.

Como control de filtrado de polimorfismos, para evitar la detección de variantes germinales no asociadas al diagnóstico de LHc y eludir la inclusión de falsos positivos asociados a la química del proceso de secuenciación, también se obtuvo ADN normal a través de la mucosa bucal de 5 pacientes de la serie anterior, reuniéndolos como un grupo control para su posterior filtrado en la tabla de resultados obtenida.

3.2.2 Secuenciación de pacientes refractarios

En este caso se han seleccionado un total de 12 pacientes en los que el tratamiento convencional para este tipo de linfoma ha fallado, es decir, la enfermedad ha progresado o el paciente ha recaído de forma precoz. Se obtienen muestras incluidas en parafina tanto del ganglio primario pre-tratado como de la primera recaída después del tratamiento habitual (quimioterapia ABVD).

Se han elaborado dos protocolos completamente diferentes según las necesidades requeridas en cada serie y según nuestros objetivos fijados. Estos diseños vienen indicados en la figura 3, y explicaremos los detalles de cada uno a continuación.

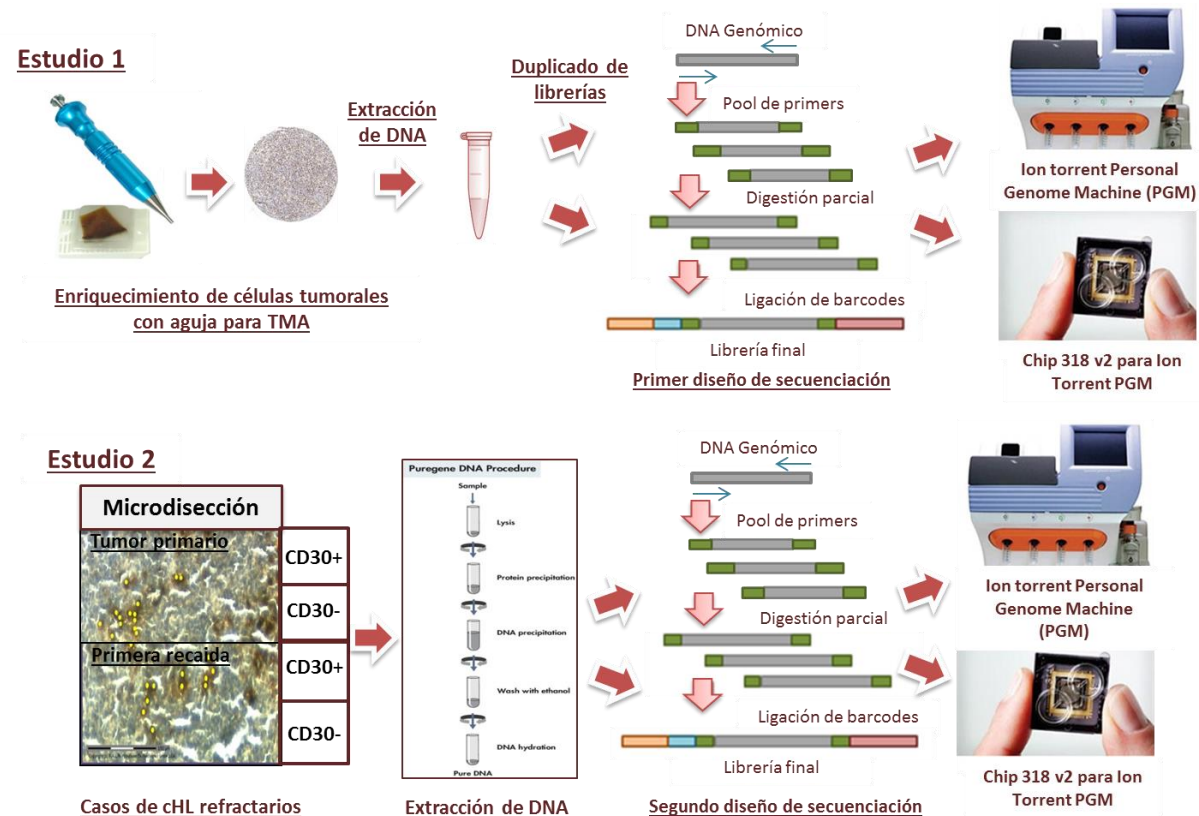


Figura 3: Esquemas de trabajo asociados a cada estudio. El gráfico del estudio 1 muestra como hemos conseguido enriquecer la muestra en células tumorales gracias a una aguja de TMA, y a partir del mismo ADN genómico se secuencia cada muestra por duplicado. Sin embargo, para el estudio 2 el proceso de enriquecimiento de la muestra se realiza mediante microdissección, siguiendo en los pasos posteriores a la extracción del ADN genómico el mismo protocolo.

3.3 Estudio 1: Enriquecimiento de la muestra tumoral mediante aguja para la elaboración de arrays de tejidos

En ambos proyectos se usaron métodos de enriquecimiento de células tumorales distintos. Para la primera serie, los bloques de parafina se seccionaron a un grosor de 2 μm para su evaluación histológica mediante tinción con Hematoxilina-Eosina. Se seleccionaron zonas del ganglio con un porcentaje de células tumorales en torno al 10% (porcentaje de células tumorales en el ganglio total alrededor del 1%), y se aislaron con aguja de tejido de 1 mm de diámetro (Quick-Ray Tissue Microarray System, IHC World, Woodstock, USA), obteniendo dos cilindros por ganglio incluido en parafina.

3.3.1 Extracción de ADN de cilindros parafinados

Partiendo de los 2 cilindros extraídos de cada bloque, se incuban durante 5 minutos a 95°C con 300 μl de buffer de lisis. Una vez enfriada la muestra, se añaden 30 μl de proteinasa K (Roche) y se incuban en agitación durante la noche a 55°C para la digestión del tejido. El ADN se extrae con el método estándar fenol-cloroformo, resuspendiéndolo en 50-100 μl de H₂O Braun (dependiendo de la cantidad aproximada de ADN obtenida).

3.3.2 Calidad y cantidad de ADN obtenido

Una vez obtenido el ADN, necesitamos medir la cantidad y calidad del mismo:

- Calidad: podemos determinar la integridad del material genético obtenido cargando un gel de agarosa al 1% 4 μl de ADN genómico + 1 μl de buffer de carga 6X. Otra forma de medir la calidad, al igual que la cantidad, a la que hemos recurrido es Agilent DNA kit y 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

- Cantidad: para la cuantificación del ADN obtenido hemos utilizado un espectrofotómetro Nanodrop (NanodropProducts, Wilmington, DE, USA), espectrofotómetro Qubit 2.0 Broad Range kit (Invitrogen Corporation), que es la

metodología recomendada para cuantificar ADN genómico, y el kit 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

3.4 Estudio 2: Microdissección de células tumorales

En la segunda serie se diferenciaron las células tumorales del microambiente no tumoral mediante microdissección láser [81]. Para ello se obtuvieron secciones de 5 μm de grosor, en las que se han diferenciado las células tumorales mediante la incubación a 1:250 con un anticuerpo específico para el receptor CD30 (clone Ber-H2, DAKO), marcador estandarizado para el reconocimiento de células HRS. Se microdisseccionaron células CD30 positivas (tumorales) y células CD30 negativas (microambiente presumiblemente no tumoral) de manera independiente, con el microdisector Palm Microbeam V4 (Carl Zeiss Inc., Germany), tanto del ganglio correspondiente al tumor primario como a la primera recaída, obteniendo muestras por duplicado representativas de ambos bloques parafinados. Se obtuvo una pureza en cada fracción celular en torno al 70-80%.

3.4.1 Extracción de ADN de células microdisecadas

Para extraer ADN parafinado de células microdisecadas utilizamos el Genra Puregene Tissue Kit (Qiagen), kit recomendado para la extracción de ADN y posterior secuenciación del mismo, añadiendo 1/3 del volumen recomendado en el protocolo, ya que el material de partida del que disponemos es escaso. El ADN se resuspende en 15 μl de la solución de hidratación proporcionada por el kit de extracción.

3.4.2 Cuantificación del ADN extraído de células microdisecadas

El ADN obtenido se cuantifica mediante Qubit 2.0 fluorometer utilizando el kit Broad Range (Invitrogen Corporation).

3.5 Extracción de ADN a partir de mucosa bucal

El enjuague del paciente con 10 ml de colutorio Listerine (Johnson & Johnson S.A.) se lava con PBS. La digestión celular y posterior extracción de ADN se realiza con el mismo método utilizado para la extracción de ADN de cilindros parafinados (método estándar fenol-cloroformo).

3.6 Líneas celulares

Se han utilizado 10 líneas celulares, 6 de las cuales han sido generadas a partir de muestras de pacientes con LHC y obtenidas de La Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Germany), mientras que las restantes están asociadas a otras patologías. Todas las líneas celulares fueron crecidas a 37°C y 5% de CO₂. En la tabla 6 se muestran las características de cada una y las condiciones para su crecimiento. Los medios de cultivo utilizados son Medio instituto Roswell Park (RPMI) y Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementados al 10% con suero fetal bobino inactivado con calor (h.i. FBS).

Línea celular	Patología	Tipo de muestra	Estadío	Subtipo Histológico	Cultivo	Origen	Virus
HDLM-2	Linfoma de Hodgkin	Derrame pleural	IV	Esclerosis Nodular	80% RPMI 1640 + 20% h.i. FBS	DSMZ	-
KM-H2	Linfoma de Hodgkin	Derrame pleural	IV	Celularidad Mixta	90% RPMI 1640 + 10% h.i. FBS	DSMZ	-
L-1236	Linfoma de Hodgkin	Sangre periférica	IV	Celularidad Mixta	90% RPMI 1640 + 10% h.i. FBS	DSMZ	-
L-428	Linfoma de Hodgkin	Derrame pleural	IVB	Esclerosis Nodular	90% RPMI 1640 + 10% h.i. FBS	DSMZ	-
L-540	Linfoma de Hodgkin	Médula ósea	IVB	Esclerosis Nodular	80% RPMI 1640 + 20% h.i. FBS	DSMZ	-
L-591	Linfoma de Hodgkin	Derrame pleural	IVB	Esclerosis Nodular	80% RPMI 1640 + 20% h.i. FBS	DSMZ	EBV +
HEK293T	-	Células embrionarias de riñón	-	-	90% DMEM + 10% h.i. FBS	-	SV-40 +
HeLa	Carcinoma de cérvix	Epitelio	-	-	90% RPMI 1640 + 10% h.i. FBS	DSMZ	HPV-18 +
HBL-1	Linfoma B de célula grande	Derrame pleural	-	-	80% RPMI 1640 + 20% h.i. FBS	-	-
DOHH2	Linfoma B de célula grande	Derrame pleural	-	-	90% RPMI 1640 + 10% h.i. FBS	DSMZ	EBV +

Tabla 6: Descripción de las líneas celulares, tanto establecidas a partir de LHC, como de otros tipos tumorales, utilizadas en este estudio.

3.7 Diseños utilizados en ambos estudios

Como antecedentes de esta tesis doctoral hay que destacar un estudio de secuenciación basado en el enriquecimiento de la muestra en regiones exónicas gracias al *SureSelect Target Enrichment System kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) en el que se incluyeron 519 genes relacionados en linfomagénesis y vías de señalización tanto de linfocito B como de linfocito T (tabla suplementaria 1). La secuenciación se llevó a cabo con Illumina GAIx Instrument (Illumina, San Diego, CA, USA). Se analizó el perfil genético de 4 pacientes, incluyendo como control ADN normal perteneciente a la mucosa bucal.

Para el diseño de ambos paneles se utilizó la aplicación web Ion Ampliseq™ Designer (Thermo Fisher Scientific), especificando la validez de ambos diseños para tejido paraafinado, con amplicones no superiores a 150 pares de bases (pb), especificando la secuenciación únicamente de las regiones codificantes de los genes.

3.7.1 Primer diseño de secuenciación

Para este primer diseño se incluyeron 36 genes, seleccionados según distintos criterios: resultados significativos de la secuenciación de cribado previa, genes que se han visto mutados previamente por otros grupos en LHc y en LBCG, o genes seleccionados por su posible relevancia biológica en este tipo de linfoma. En la tabla 7 mostramos los detalles de cobertura y criterios de selección en este diseño, en el que se han incluido 11 genes completos y 26 genes en los que solo se secuencian regiones específicas alteradas en la bibliografía, secuenciando un total de 357 amplicones. Cada amplicón tiene una longitud aproximada de 150 pares de bases, con una media de 97% de cobertura.

GEN	SECUENCIACIÓN	AMPLICONES	PARÁMETROS DE COBERTURA			LHc	CRITERIOS DE SELECCIÓN EN EL DISEÑO		
			BASES TOTALES	BASES SECUENCIADAS	COBERTURA DEL GEN (%)		SECUENCIACIÓN PREVIA	LBCG	RELEVANCIA BIOLÓGICA
B2M		6	393	393	100	X	X	X	
CARD11		49	3729	3674	98,52		X		
CASP8		23	2263	2232	98,63		X		
CSF1R		42	3150	3150	100		X		
BCL10		11	735	704	95,78		X		
NFKBIA	GENES COMPLETOS	14	1020	970	95,09	X	X		
STAT6		37	2795	2795	100		X		
BTK		28	2178	2153	98,85		X		
IL32		10	850	760	89,41		X		
MYB		34	2787	2721	97,63				X
SH3BP5		16	1502	1296	86,28		X		
ABL1		8	3393	431	12,7		X		
ADAM8		4	2229	178	8		X		
CD19		3	1674	144	8,6		X		
CD38		2	903	88	9,7		X		
NFKB2		5	2700	238	8,8		X		
PIK3CD		5	3135	205	6,5		X		
RET		8	3219	391	12,14		X		
TNFRSF14		1	852	58	6,8		X		
CSF2RB		4	2694	164	6	X	X		
FAS		1	7536	41	0,5	X			X
LCP1		1	1866	41	2,2				X
LTB	REGIONES	2	234	110	47		X		
MAPK3		2	1074	82	7,6		X		
MDM2		2	966	82	8,4				X
NUMA1		5	6306	205	3,2		X		
PLCG2		3	3798	131	3,4		X		
SMARCA4		7	4842	322	6,6		X		
NOTCH1		4	7668	269	3,5		X	X	
CREBBP		3	7215	252	3,4			X	
EP300		8	7245	460	6,3			X	
STAT3		1	2169	103	4,7			X	
MYC		2	1365	82	6			X	
EZH2		1	2214	25	1,1			X	
MYD88		1	480	44	9,1			X	

Tabla 7: Primer panel diseñado para Ampliseq (Life Technologies) en el que se seleccionaron 36 genes con posibles alteraciones patogénicas en este tipo tumoral.

3.7.2 Segundo diseño de secuenciación

Una vez analizados los resultados del ensayo anterior, se amplió el estudio analizando el tumor primario y la primera recaída de los pacientes refractarios al tratamiento. Para ello, se diseñó otro panel de genes en los que se incluyeron 35 genes completos, abarcando un total de 1214 amplicones. En la tabla 8 podemos ver el nuevo diseño, que cumple los siguientes criterios: genes con, al menos, una variante con indicadores *in silico* de daño para la proteína codificada en la serie de casos anterior y genes mutados en LHc detectados por otros grupos de investigación que no teníamos incluidos en el diseño anterior.

GEN	CROMOSOMA	AMPLICIONES	PARÁMETROS DE COBERTURA			CRITERIOS DE SELECCIÓN EN EL DISEÑO	
			BASES TOTALES	BASES SECUENCIADAS	COBERTURA DEL GEN (%)	SECUENCIACIÓN PREVIA EN NUESTRO LABORATORIO	SECUENCIACIÓN PREVIA EN OTRO LABORATORIO
ABL1	chr9	44	3649	3444	94,38	X	
B2M	chr15	6	390	390	100	X	X
BCL10	chr1	9	732	621	84,83	X	
BTK	chrX	29	2272	2272	100	X	
CARD11	chr7	53	3705	3418	92,25	X	
CASP8	chr2	24	1813	1801	99,33	X	
CD19	chr16	26	1814	1760	97,02	X	
CD38	chr4	18	983	983	100	X	
CREBBP	chr16	91	7639	6496	85,03	X	
CSF1R	chr5	47	3129	2877	91,94	X	
CSF2	chr5	7	475	433	91,15	X	
CSF2RB	chr22	36	2824	2486	88,03	X	
CYLD	chr16	41	3041	2953	97,11		X
EP300	chr22	90	7555	7143	94,54	X	
FAS	chr10	17	1098	1085	98,81	X	X
IL32	chr16	10	627	572	91,22	X	
LCP1	chr13	30	2034	2034	100	X	
MYB	chr6	34	2446	2413	98,65	X	
MYC	chr8	15	1395	1318	94,48	X	
NFKBIA	chr14	12	1014	841	82,93	X	X
NFKBIE	chr6	17	1563	1227	78,55		X
NOTCH1	chr9	95	8008	6527	81,5	X	
NUMA1	chr11	78	6598	6179	93,64	X	
PIK3CD	chr1	43	3355	2950	87,92	X	
PTPN1	chr20	21	1408	1403	99,64		X
REL	chr2	25	1970	1733	87,96	X	
RET	chr10	47	3577	3162	88,39	X	
SH3BP5	chr3	19	1458	1402	96,15	X	
SMARCA4	chr19	73	5399	5048	93,49	X	
SOCS1	chr16	6	646	520	80,12		X
STAT3	chr17	37	2543	2492	97,99	X	
STAT6	chr12	42	2754	2653	96,33	X	
TNFAIP3	chr6	29	2453	2367	96,49		X
TP53	chr17	22	1383	1351	97,68		X
TRAF3	chr14	21	1807	1704	94,29		X

Tabla 8: Segundo panel diseñado para Ampliseq (Life Technologies) en el que se han seleccionado genes con mutaciones descritas tanto en nuestro laboratorio como en estudios realizados por otros grupos.

3.8 Secuenciación

Tanto en ambas series incluidas en este proyecto, como para la secuenciación de las líneas celulares, la generación de las librerías y posterior secuenciación se ha llevado a cabo por duplicado, para poder descartar los falsos positivos originados en el mismo protocolo de secuenciación de las librerías o por su posterior análisis bioinformático. De esta manera podemos comparar los resultados obtenidos en todas las muestras incluidas.

3.8.1 Preparación de librerías

En todos los casos mencionados anteriormente, la preparación de las librerías se realizó siguiendo el protocolo recomendado por Ion Ampliseq™ Library Preparation Kit (Thermo Fisher Scientific). Partiendo de 10 ng de ADN genómico de cada muestra se procede con la primera reacción de amplificación, en la que se seleccionan las regiones incluidas en nuestro diseño. Dependiendo del número de amplicones de cada diseño y de la fijación del tejido de partida, las condiciones de la PCR varían, siguiendo las indicaciones del protocolo establecido por el fabricante.

En primera instancia, una vez finalizada la elaboración de las librerías, se mide la cantidad y la calidad mediante 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), ya que así podemos determinar que el tamaño de los fragmentos obtenidos sea el correcto, descartando la posible cuantificación de ADN genómico no apto para el proceso de secuenciación. Una vez que hemos comprobado que cada panel está bien diseñado, y que obtenemos el producto deseado, se pone a punto el protocolo de cuantificación de librerías mediante el espectrofotómetro *Qubit 2.0 High Sensitivity Kit* (Invitrogen Corporation), que es el kit indicado para cuantificar cantidades menores de material genético, ya que es más preciso, o mediante qPCR con *Ion Library Quantitation Kit* (Thermo Fisher Scientific).

3.8.2 PCR de emulsión y enriquecimiento del producto

Para la PCR de emulsión y enriquecimiento de la muestra se utilizan 2 kits diferentes para cada estudio. El primer estudio se llevó a cabo con *Ion PGM™ Template OT2 200 Kit* (Thermo Fisher Scientific), mientras que para el segundo estudio se utilizó *Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit* (Thermo Fisher Scientific). En ambos casos se siguieron las recomendaciones marcadas por el fabricante, empleando una concentración inicial de librería de cada muestra de 100 pM.

3.8.3 Secuenciación con la plataforma Ion Torrent

Para la secuenciación, igual que en el paso anterior, se han utilizado dos kits diferentes. Para el primer estudio se empleó *Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2* (Thermo Fisher Scientific), mientras que en el segundo estudio se utilizó *Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific). En ambos casos se siguieron las recomendaciones marcadas por el fabricante.

Previamente a la inicialización se ajusta tanto un plan de secuenciación, en el que el secuenciador ajusta las variables dependiendo del kit utilizado, como los parámetros requeridos para el análisis. Como en nuestro caso, sobre todo en el primer diseño, el porcentaje de células tumorales es bajo, nuestro objetivo es determinar variantes que se detecten en baja frecuencia alélica. Para ello, seleccionamos el plan indicado para identificar frecuencias ajustadas a variantes somáticas, seleccionando además baja rigurosidad (del inglés *Low Stringency*), ya que nuestro objetivo es que el algoritmo de análisis no descarte las variantes de muy baja frecuencia (descartables en otro tipo de estudios).

3.9 Análisis de resultados

La secuenciación de las librerías generadas por Ampliseq se analiza con el programa asignador de bases (del inglés *variant caller*) proporcionado por Ion Torrent. Restringimos el estudio a posiciones con un mínimo de 100 lecturas, y una mínima cobertura de la variante concreta de 10x. Al querer descartar variantes asociadas a la línea germinal, filtramos las variantes con una frecuencia alélica mayor del 40%. Para este estudio solo tenemos en cuenta las variantes encontradas en región codificante, descartando las variantes en regiones intrónicas, que corresponden en la mayoría de los casos con los extremos de los amplicones secuenciados. Para eliminar errores producidos por el algoritmo de análisis, todas las variantes han sido examinadas mediante el visualizador Vista del genoma integral (IGV) [82], comparando cada duplicado y

descartando las variantes no concordantes en la misma pareja. También descartamos las variantes encontradas solo en los extremos de los amplicones, seleccionando las variantes que aparecen en una lectura de secuenciación estable. Intentamos predecir la consecuencia funcional de la variante detectada mediante los algoritmos PROVEAN [83] y Alamut [84] que, entre otros, nos dan los valores predictores SIFT Y POLYPHEN-2, teniendo en cuenta para las conclusiones finales las variantes con posible alteración en la función de la proteína codificada. Se van a clasificar las variantes filtradas en dos categorías:

- Variantes probablemente patogénicas: los algoritmos *in silico* utilizados para el análisis de la variante detectada predicen un cambio en la conformación de la proteína resultante o su total inactivación (en el caso de las mutaciones sin sentido).
- Variantes patogénicas: además de que los algoritmos *in silico* detecten un cambio en la proteína, estas variantes están recogidas en la base de datos COSMIC (Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer), tanto en tumores hematopoyético y del tejido linfoide, como en otros tipos tumorales.

3.10 Validación de las variantes por secuenciación de Sanger

Un porcentaje representativo de variantes con elevada frecuencia alélica detectadas en líneas celulares derivadas de LHC se han validado por otra metodología de secuenciación, en este caso por secuenciación Sanger. Primero se generaron los fragmentos a secuenciar mediante amplificación por PCR. Los oligonucleótidos utilizados en esta validación son los empleados en la primera secuenciación con Ion Torrent y están detallados en la tabla 9. El proceso de secuenciación se llevó a cabo siguiendo la metodología estándar.

Gen	Primer Forward	Primer Reverse	Región genómica (hg19) in bp	Temperatura de anillamiento (°C)	Amplicón de PCR en bp
STAT6	CCCCTGTTCCCTCCAACCT	AACCCTGTCTCACCT	57496578-57496728	60	151
CSF2RB	AGCACCCACTGTCTCCTGA	AAACCTCTGGGCTCCACTTG	37325659-37325831	60	173
CARD11	CGGTAGGTGCTCCGGAGA	CAGGGCCTGACTGATTGATAAATCA	2956899-2957051	60	153
CARD11	CACCCTGGGGTATTCAGA	CAGGCCCTCACCTGGATG	2979372-2979581	60	210
NFKBIA	CACTCTGTGGCAGCATCTGAA	AAAATCCTGACCTGGTGTCACTC	35871656-35871823	60	168
B2M	GGCTGGGCACGCGTTAATATA	GGGTAGGAGAGACTCACGCT	45003669-45003828	60	160

Tabla 9: Condiciones de PCR indicadas para la validación de mutaciones detectadas en líneas celulares mediante secuenciación tradicional Sanger.

El análisis y visualización de las secuencias obtenidas se llevó a cabo gracias al programa Chromas Lite versión 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd).

3.11 Estudios funcionales

Para los estudios *in vitro* se utilizaron las líneas celulares previamente mencionadas en la tabla 6.

Los experimentos funcionales se llevaron a cabo tratando estas líneas con dos inhibidores selectivos de la proteína BTK, como son Ibrutinib (Selleckchem, Houston, TX) y AVL-292 (Medchem Express, Monmouth Junction, NJ). Para calcular la concentración máxima inhibitoria (IC₅₀) se han incubado 20.000 células con concentraciones crecientes de Ibrutinib durante 48 horas. El número de células viables se cuantificó con *Alamar Blue* (Fisher Scientific, Watham, MA) a 570/600 nm, siguiendo las indicaciones marcadas por el fabricante [85].

Los niveles de apoptosis se estimaron después de 8 horas de tratamiento a 37°C, analizando la escisión de la proteína Polimerasa Poli (ADP-Ribosa) PARP por Western blot [86] (siguiendo un método estándar). También se estudió la expresión de otras proteínas por Western blot, utilizando los anticuerpos monoclonales para Cilindromatosis (CYLD) amino terminal (ab153698) (ABCAM), BTK fosforilada (Tyr223), IκBα fosforilada (Ser32) (14D4) (Cell Signaling), BTK (7F12H4, Santa Cruz), NFκB p52 (MERCK) y tubulina-α (Sigma Aldrich).

Para el análisis de la expresión génica mediante GSEA, el RNA total de las líneas celulares HBL-1 y HDLM-2 fue extraído con Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), transcrito a ADN complementario (ADNc) siguiendo procedimientos estándar, y marcado para su posterior análisis. El kit *Agilent Sure Print G3 Gene Expression Human Microarrays* (GPL21185) se utilizó para la hibridación de microarrays siguiendo el protocolo marcado por el fabricante. La señal de hibridación se registró con el escáner Agilent G52565BA y el análisis se realizó con Feature Extraction 9.3 (Agilent Technologies). Para analizar la distribución coordinada de las dianas de BCR y NFκB en condiciones basales y después del

tratamiento con Ibrutinib utilizamos el programa *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA v2.0, <http://www.broad.mit.edu/gsea/>).

3.12 Análisis mediante una matriz de tejido (TMA, del inglés *Tissue Micro Array*)

Los TMAs permiten un análisis simultáneo de múltiples muestras de pacientes en una única sección para IHQ. Consiste en una disposición organizada de biopsias circulares (extraídas con una aguja para tejido de grosor determinado) pertenecientes a cada biopsia de diferentes muestras e insertadas en un único bloque. Esta técnica nos permite analizar un gran número de casos de manera simultánea, seleccionando las zonas más representativas de cada bloque, sin apenas destrucción de la muestra original.

Para las dos series que se han utilizado en este proyecto se han seleccionado áreas representativas del tumor de las muestras de cada caso incluidas en parafina y se han introducido por duplicado en dos bloques TMAs. Los análisis mediante IHQ se llevaron a cabo mediante procedimientos estándar, analizando la expresión de proteínas relacionadas con las células tumorales, en particular CD30 (BerH2, Dako), EBV a través del anticuerpo LMP-1 (CS1-4, Dako) y BTK (7F12H4, Santa Cruz), como las del microambiente no tumoral asociado, como son CD68 (clones KP1 y PGM1, DAKO, Glostrup, Dinamarca), CD163 (clon 10D6, Laboratorios Novacastra, Newcastle, UK), FOXP-3 (236A, Unidad de anticuerpos monoclonales, CNIO), GZB (Grb-7, DAKO), STAT1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), CD23 (SP23, Novacastra), CD8 (C8/144B, DAKO), CD4 (ab133616, Abcam), LYZ (DAKO), GATA-3 (HG3-31, Santa Cruz Biotechnology), TBET (H-210, Santa Cruz Biotechnology) o TIA-1 (2G9, Master Diagnostica).

Para la cuantificación de la expresión proteica se utilizó un escáner automático Chroma Vision System-ACIS III (DAKO, Glostrup, Denmark), como se ha descrito previamente [87].

3.13 Análisis estadístico

Para todos los análisis estadísticos se utilizó como valor significativo un p-valor menor de 0.05. Se llevaron a cabo con el programa SPSS versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Las curvas de supervivencia se establecieron por el método de Kaplan-Meier y los grupos de riesgo se compararon por el test Long-rank.

3.13.1 Criterios de valoración clínicos

Las diferencias en la distribución de parámetros clínicos de los pacientes de ambas series para los análisis independientes fueron evaluadas por el coeficiente de correlación de Pearson, que mide el grado de covariación entre distintas variantes relacionadas linealmente. Para este análisis podemos tener dos supuestos: una correlación es positiva cuando al ocurrir un evento, ocurre el otro evento con el que se relaciona; en cambio, podemos tener el caso contrario, una correlación negativa, cuando al ocurrir un evento con el que se relaciona tiene el comportamiento opuesto. Los parámetros que se han seleccionado para este estudio han sido randomizados a partir de un punto de corte independiente para cada uno, obteniendo una proporción en la serie de pronóstico favorable/no favorable para cada variable.

En nuestro caso, aparte de si encontramos correlación entre las variables analizadas, lo más importante es si esa correlación es significativa (coeficiente de significación o p -valor > 0.05) o si es debido al azar. Por ello, en los gráficos marcamos el tipo de correlación encontrada (positiva y negativa) y si esa correlación es estadísticamente significativa.

3.13.2. Variables en el análisis de supervivencia

Supervivencia libre de fallo (FFS): se define como el intervalo de tiempo entre el inicio del tratamiento y el fracaso del tratamiento o la pérdida de seguimiento. Fallo lo

podemos definir como que no se logre la remisión completa o la presencia de enfermedad progresiva, independientemente o no de que haya habido una remisión completa previa.

Supervivencia global (OS): se define como el intervalo de tiempo entre el diagnóstico y el exitus relacionado con el linfoma o con alguna otra causa independiente de esta enfermedad. Esta variable puede estar relacionada con el efecto o posibles complicaciones del tratamiento.

3.13.3. Curvas de supervivencia

Una curva de supervivencia mide la probabilidad de supervivencia acumulada frente al tiempo. La supervivencia se calculó aplicando el método Kaplan-Meier y comparando las variables con el test Long-rank, método más robusto de comparación entre 2 curvas de supervivencia. El test estadístico calcula para cada tiempo el número de eventos terminales que se esperan asumiendo que las diferencias entre ambos grupos son nulas. El valor final se compara con el método Chi-Cuadrado (χ^2), dándonos un p-valor que nos permite determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre ambas curvas. Para las representaciones gráficas, los análisis de supervivencia se llevaron a cabo aplicando el mismo método.

RESULTADOS

4.1 Análisis del perfil mutacional de tumores primarios pre-tratamiento con el primer diseño

4.1.1 Clínica de la serie

Las características clínicas de esta primera serie se muestran en la tabla 10. Cabe destacar que el 31.6% de los casos de esta serie son refractarios para LHC, y un 38.3% de los tumores son EBV positivos. Como es de esperar, el mayor porcentaje de pacientes tiene histología de esclerosis nodular (61.82%), y una menor proporción de ellos tiene un factor pronóstico desfavorable (IPS \geq 3 = 35.19%, estadio Ann Arbor \geq 4 = 32.08%). Remarcamos que, para los dos marcadores pronóstico de evolución de la enfermedad mencionados anteriormente, solo 4 de los pacientes analizados en este estudio (7% de la serie) presentan un pronóstico desfavorable, sufriendo remisión parcial o exitus derivado de la enfermedad o su tratamiento asociado con un factor de riesgo elevado.

4.1.2 Reproducibilidad y concordancia de la secuenciación en la serie

Como se ha mencionado en el apartado correspondiente de materiales y métodos, se ha realizado un análisis posterior de los datos preliminares volcados en el servidor asociado al secuenciador, en el que se han filtrado los posibles errores generados en el mismo proceso de secuenciación, como pueden ser los relacionados con la introducción de errores en el proceso de generación de

VARIABLE	N	%
Edad		
< 45	37	68.52
\geq 45	17	31.48
Género		
Hombre	26	48.15
Mujer	28	51.85
IPS		
0-2	35	64.81
\geq 3	19	35.19
Resultado		
Refractario	18	33.96
RC	35	66.04
Estadio Ann Arbor		
< IV	36	67.92
\geq IV	17	32.08
Histología		
Esclerosis nodular	34	59.64
Celularidad mixta	13	22.8
Rico en linfocitos	6	10.53
NA	4	7.03
Hemoglobina (g/dl)		
\geq 10.5	14	25.93
< 10.5	40	74.07
Albumina (g/dl)		
\geq 4	29	54.72
< 4	24	45.28
Leucocitosis		
< 1.5×10^9 /l	46	85.19
\geq 1.5×10^9 /l	8	14.81
Linfopenia		
< 0.6×10^9 /l	37	68.52
\geq 0.6×10^9 /l	17	31.48
EBV		
Positivo	15	28.30
Negativo	38	71.70

Tabla 10: Características clínicas de la serie de casos seleccionada para el primer estudio.

librerías mediante PCR, o como los ocasionados por el filtrado posterior por el algoritmo de análisis determinado para nuestra serie.

Para ajustar el proceso y descartar este tipo de errores, se realizaron duplicados a partir del mismo ADN genómico de todo el proceso, descartando las variantes no encontradas en ambos duplicados con los criterios de filtrado ya mencionados. Una vez obtenidos estos resultados de secuenciación en toda la serie, medimos la reproducibilidad del método de secuenciación de tumores hematológicos fijados en parafina con la tecnología Ion Torrent. Para ello se calculó el ratio de concordancia, ya que está reportado en la bibliografía que para las técnicas de secuenciación de nueva generación, la tasa de error de detección de variantes está en torno al 20%. Este ratio de concordancia es un valor que nos indica, tanto en términos absolutos como en porcentajes, la diferencia del número de variantes concordantes en un ensayo por duplicados frente a la media de variantes arrojadas por el secuenciador de cada duplicado [88]. En la figura 4 mostramos la distribución en el número de variantes de cada caso, y la concordancia de cada uno.

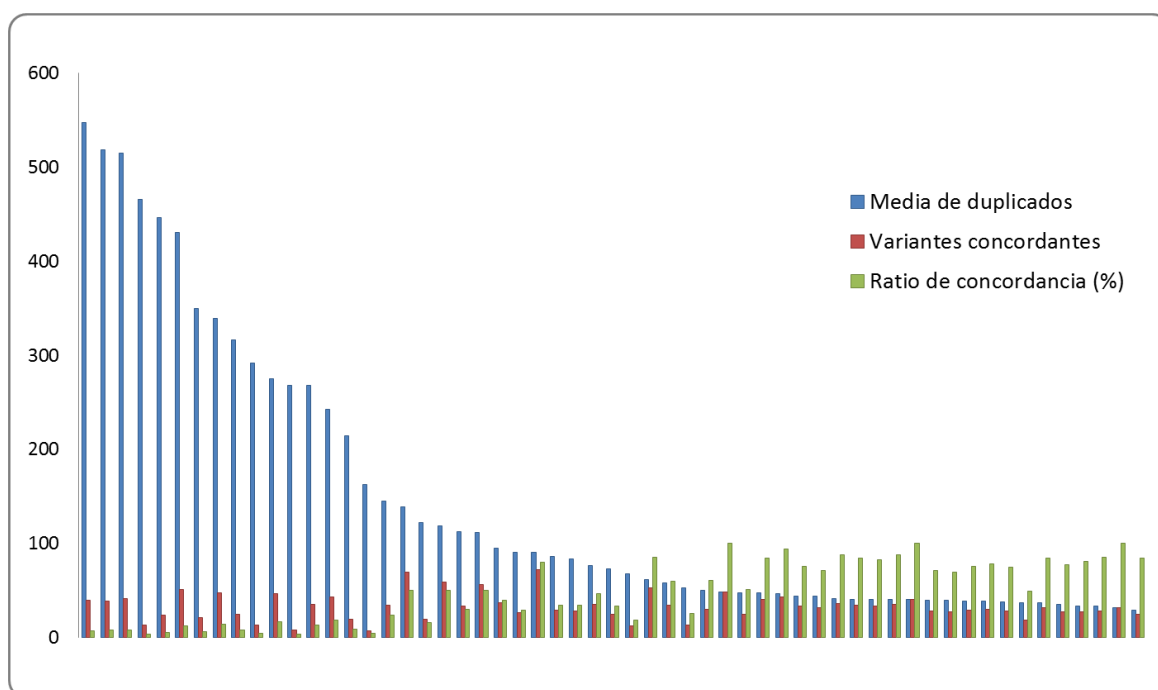


Figura 4: Ratio de concordancia aplicado a la detección de variantes en el estudio 1. La figura muestra las diferencias entre el número de variantes detectadas en cada caso, con un rango de 27-587, y un ratio (en porcentaje) de concordancia entre los duplicados de 3-100%. La cobertura media conseguida para la secuenciación de las regiones dianas seleccionadas en el diseño es de 927,5 lecturas y la media y desviación típica de la frecuencia alélica de la serie es de 16,34 ± 23,40.

Una conclusión que podemos sacar de este estudio es que cuanto menor sea el número de variantes arrojadas de inicio por el secuenciador, mayor será el ratio de concordancia (cerca al 100%).

Como podemos ver en la figura anterior, se han identificado casos en los que, debido al material de partida, déficit de fijación del tejido o su inclusión en parafina y a su interacción con la química del secuenciador, obtenemos un número irreal y bastante elevado de variantes de partida, identificando decenas de variantes asociadas a un único gen, en muchos de los casos asociadas a patogenicidad identificadas en distintos tipos de cáncer. La media de variantes concordantes que encontramos es de 32 variantes por caso, y al filtrar las variantes detectadas en estos casos en los que la calidad del ADN es baja, obtenemos un número bastante similar al obtenido en el resto de muestras, posiblemente indicando que se trata de errores que no debemos tener en cuenta en el análisis final.

4.1.3 Análisis de las variantes detectadas en la primera serie de 57 pacientes diagnosticados con LHC.

Utilizando el protocolo de secuenciación de nueva generación para dianas específicas con el diseño comentado previamente, en el que se han secuenciado un total de 36 genes, de los cuales 11 se ha seleccionado la región codificante completa, el número de SNVs detectadas por caso varía de 27 a 587 (sin tener en cuenta la concordancia entre los duplicados), determinando en un primer momento que la heterogeneidad detectada para este tipo tumoral podría ser elevada.

Al unificar todas las variantes volcadas por el algoritmo de secuenciación, se recogen un total de 1125 variantes concordantes en los 57 casos analizados. El criterio de filtrado que introducimos es eliminar las variantes localizadas en regiones intrónicas, ya que al diseñar un panel exclusivo para regiones exónicas, estas variantes están localizadas en los extremos de los amplicones, dando lugar a lecturas inestables asociadas a la identificación de falsos positivos. Aplicando este primer filtrado, obtenemos 513 variantes asociadas a la serie completa (57 pacientes). El segundo criterio de filtrado que aplicamos en este análisis es eliminar las variantes que tienen una frecuencia alélica menor del 1% y

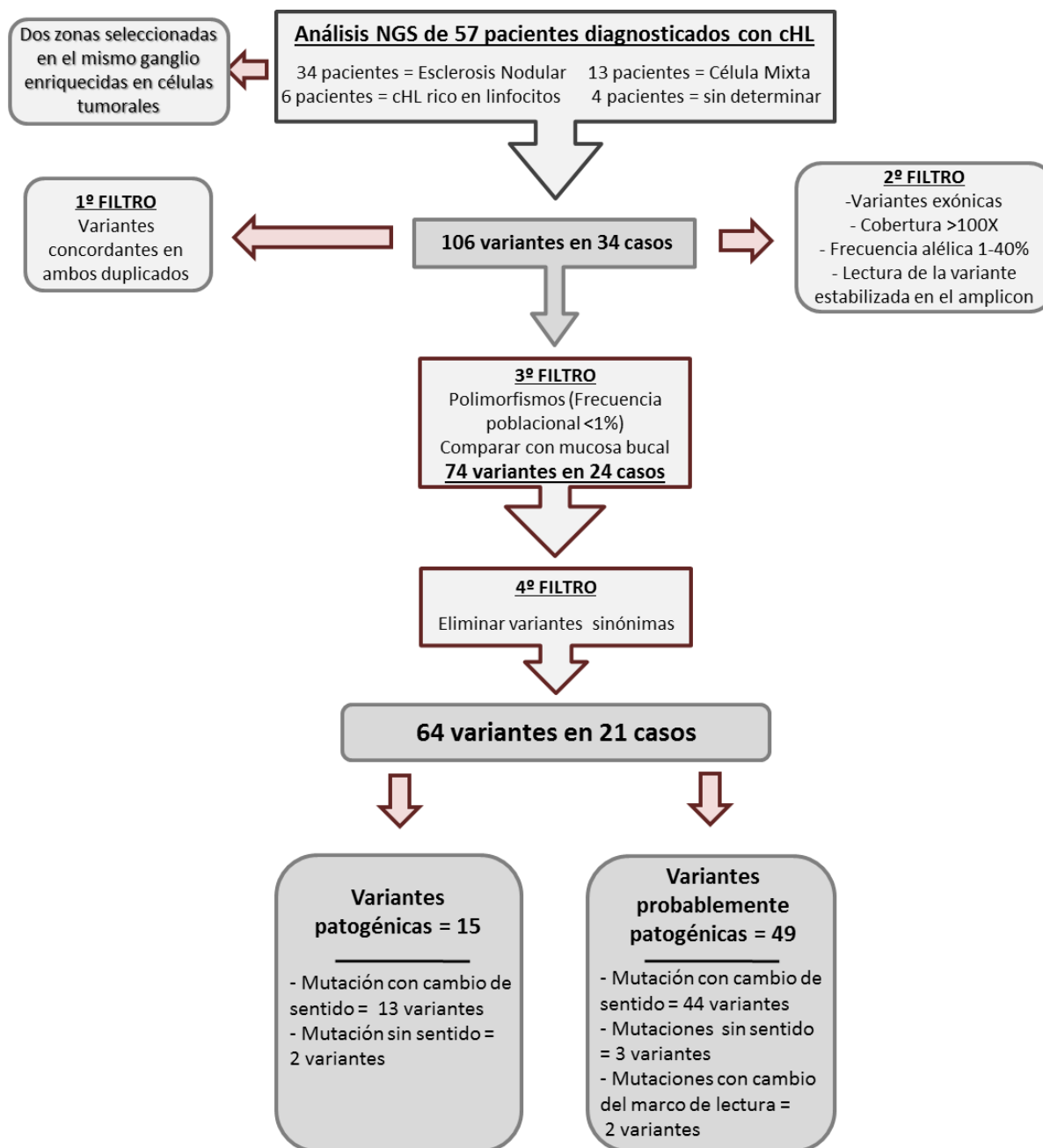


Figura 5: Organigrama del filtrado realizado en la primera serie analizada y distribución de las variantes identificadas.

mayor del 40%. Al haber enriquecido la carga tumoral de la muestra mediante selección de zonas ricas en células tumorales, concluimos que las variantes menores de 1% de frecuencia alélica podrían asociarse a falsos positivos. Las variantes con frecuencia alélica mayor al 40% estarían asociadas a la línea germinal del paciente, no estando relacionadas con la transformación de células tumorales, resultando irrelevantes en el desarrollo de la enfermedad y en nuestro estudio. Una vez aplicado este segundo filtrado, el número de

variantes desciende a 106 en 34 pacientes (en 23 pacientes solo se han detectado variantes con frecuencias alélicas fuera de este estudio). El tercer criterio que aplicamos en este análisis es eliminar los polimorfismos detectados, es decir, variantes con más de un 1% de frecuencia en la población general (valor identificado a partir de la base de datos de polimorfismos dbSNP). Determinamos que este tipo de variantes en ningún caso están asociadas al desarrollo de la enfermedad en estos pacientes. Además, filtramos el total de las variantes identificadas en estos pacientes con la totalidad de las variantes detectadas en el grupo control de mucosas bucales, con el mismo fin anterior (no son variantes somáticas). Con este filtrado obtenemos 74 variantes en 24 casos (en 10 pacientes solo se han detectado este tipo de variantes). El último filtrado que hemos establecido en este análisis es eliminar las variantes que no producen un cambio de aminoácido en la traducción de la proteína resultante. Además, este cambio debe producir un efecto deletéreo en la proteína resultante (determinado mediante predictores proteicos *in silico*). Una vez aplicado este último filtrado, determinamos que el número de variantes finales detectadas en nuestra serie con los criterios establecidos asciende a 64 variantes en 21 casos. En la figura 5 se muestra el esquema que hemos aplicado en el análisis detallado anteriormente. Las variantes implicadas en esta enfermedad detectadas en esta serie las hemos dividido en dos clases: variantes probablemente patogénicas y variantes patogénicas. De las 64 variantes finales, 15 de ellas las catalogamos como variantes patogénicas, apuntando también el sentido que tiene la variante en la codificación de la proteína: 13 variantes pertenecen al grupo de variantes con cambio de sentido, es decir, el cambio nucleotídico origina la inserción de un aminoácido distinto en el proceso de traducción; mientras que dos variantes las catalogamos como variantes sin sentido, ya que el cambio nucleotídico origina de manera prematura un codón de parada, por lo que la proteína resultante tiene un número menor de aminoácidos que la proteína nativa. Las 49 variantes restantes las catalogamos como variantes probablemente patogénicas, que a su vez se subdividen en: 44 variantes con cambio de sentido, 3 variantes con cambio sin sentido y 2 variantes con cambio en el marco de lectura.

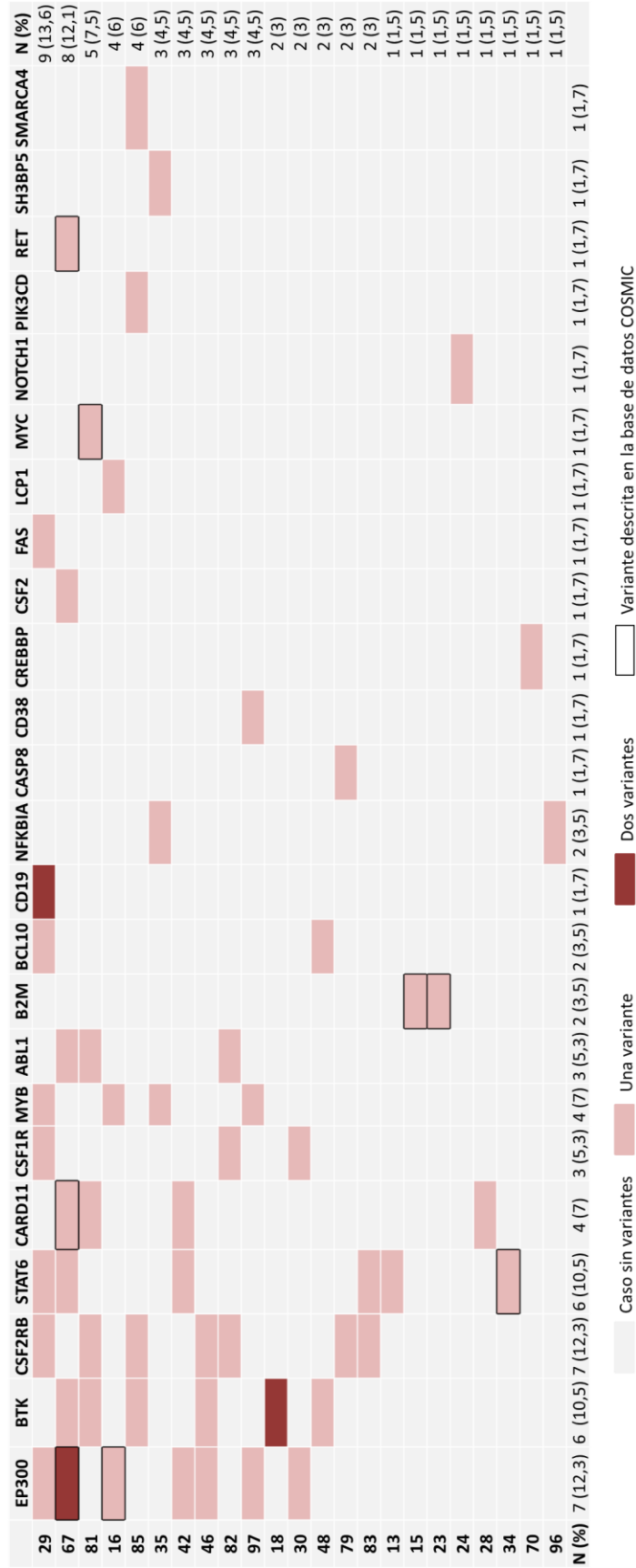


Figura 6: Perfil mutacional asociado a Linfoma de Hodgkin. Este diagrama muestra la distribución de variantes presente en cada gen. 40.35% de las muestras tienen al menos 1 variantes después del filtrado, e identificamos variantes en el 66.6% del diseño. Una variante presente en ese caso y en ese gen está indicada en rosa, mientras que genes con dos variantes en el mismo caso están indicados en rojo. El recuadro en la variante indica la concordancia de la misma mediante la reproducibilidad del resultado encontrado en la base de datos COSMIC. La columna final indica el número y porcentaje de genes mutados por caso, mientras que la última fila indica el número y porcentaje de casos con al menos una mutación en el gen asociado.

Podemos concluir que de los 57 pacientes incluidos en este primer estudio, en 36 de ellos (63%) no se han detectado variantes con implicación en la enfermedad estudiada, en el panel diseñado y con los criterios de filtrado establecidos.

La mayoría de las variantes seleccionadas después del filtrado son transiciones (87.5%). Este fenómeno está reportado en la bibliografía [89], y se debe al contexto de despirimidización ocasionado por la inclusión de las muestras fijadas en parafina, observando un 45% en el caso del cambio C>T.

La figura 6 y la tabla suplementaria 2 muestran los resultados obtenidos después del filtrado, en el que se han detectado finalmente 64 variantes concordantes en los 57 pacientes estudiados (aunque en alguno de ellos no hemos detectado variantes significativas, como se ha descrito previamente). La cobertura media que presenta la serie es de 927.5 lecturas. La frecuencia alélica media de las variantes es de 6.32% (2.86-40), identificando solo 5 variantes con frecuencias alélicas superiores al 10%. Estos datos son compatibles con la carga tumoral estimada en las muestras analizadas, y con el tipo de análisis que queríamos realizar, estudiando variantes con una baja frecuencia alélica.

Hemos encontrado variantes relevantes en 24 de los 36 genes analizados en el panel diseñado, por lo que se ha obtenido información de un 66.6% del diseño. Algunas de estas variantes ya están previamente descritas, como ya se ha comentado en la introducción, implicando a vías de señalización como JAK/STAT, o representando variantes en genes concretos, como es el caso de *NFKBIA* o *B2M*.

4.1.4 Genes relevantes en este estudio

De los 24 genes en los que se han identificado variantes que cumplen todos los criterios mencionados anteriormente, hay 4 genes que vamos a destacar de todos ellos. El motivo es que cada uno, de manera individual, tiene una frecuencia poblacional en nuestra serie superior al 10%. En la figura 7 se muestran los dominios que componen las proteínas codificadas asociadas a cada gen, con las variantes detectadas en cada una de ellas.

E1A Proteína de unión P300 (*EP300*) codifica para un coactivador transcripcional asociado al adenovirus E1A y actúa como acetiltransferasa de histonas, regulando la transcripción vía remodelación de la cromatina. La acetilación de histonas es una firma epigenética que conlleva la activación transcripcional. Media la regulación de genes cAMP por su unión específica a la proteína CRB fosforilada. Su función también implica la acetilación de otras dianas no histonas. Como se muestra en el apartado A) de la figura 7, las variantes en este gen representan el 12.3% de las alteraciones en nuestra serie, localizadas en el dominio de acetilación de histonas, como en LBCG o Linfoma Folicular [90-92].

BTK codifica para una proteína con actividad tirosina quinasa indispensable para el desarrollo de linfocitos B, su diferenciación y señalización. La unión de antígenos al receptor de linfocito B (BCR) dispara una vía de señalización que conlleva la activación del mismo. Este gen está implicado en la patogénesis de Leucemia Linfática Crónica y otras patologías hematopoyéticas asociadas a linfocito B. Hemos encontrado 7 variantes diferentes en 6 pacientes de la serie, obteniendo una frecuencia del 10.3%. Ibrutinib es un inhibidor irreversible de BTK, uniéndose a la cisteína 481 en el dominio tirosin quinasa (sitio de unión ATP) [93]. Este inhibidor está indicado para Linfoma del Manto, LBCG y Leucemia Linfática Crónica. Woyach y colaboradores [94] han identificado una mutación con cambio de cisteína a serina en la posición de unión que provoca la codificación de una proteína que solo puede ser inhibida de manera reversible, por lo que ha sido asociada con resistencia a la terapia. Como se muestra en la figura 7 apartado B), ninguna de las mutaciones detectadas en nuestra serie se localiza en el aminoácido de unión de este inhibidor.

El receptor del factor estimulante de colonias-2 (*CSF2RB*) codifica para un receptor de elevada afinidad de Interleuquina 3, Interleuquina 5 y factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos. Su función es crítica en la activación de las vías de señalización JAK/STAT y MAP Quinasa. Como vemos en la figura 7 apartado C), en este gen encontramos 7 alteraciones, todas ellas las catalogamos como variantes de baja frecuencia, encontradas en 7 casos, obteniendo una frecuencia poblacional del 12.3%.

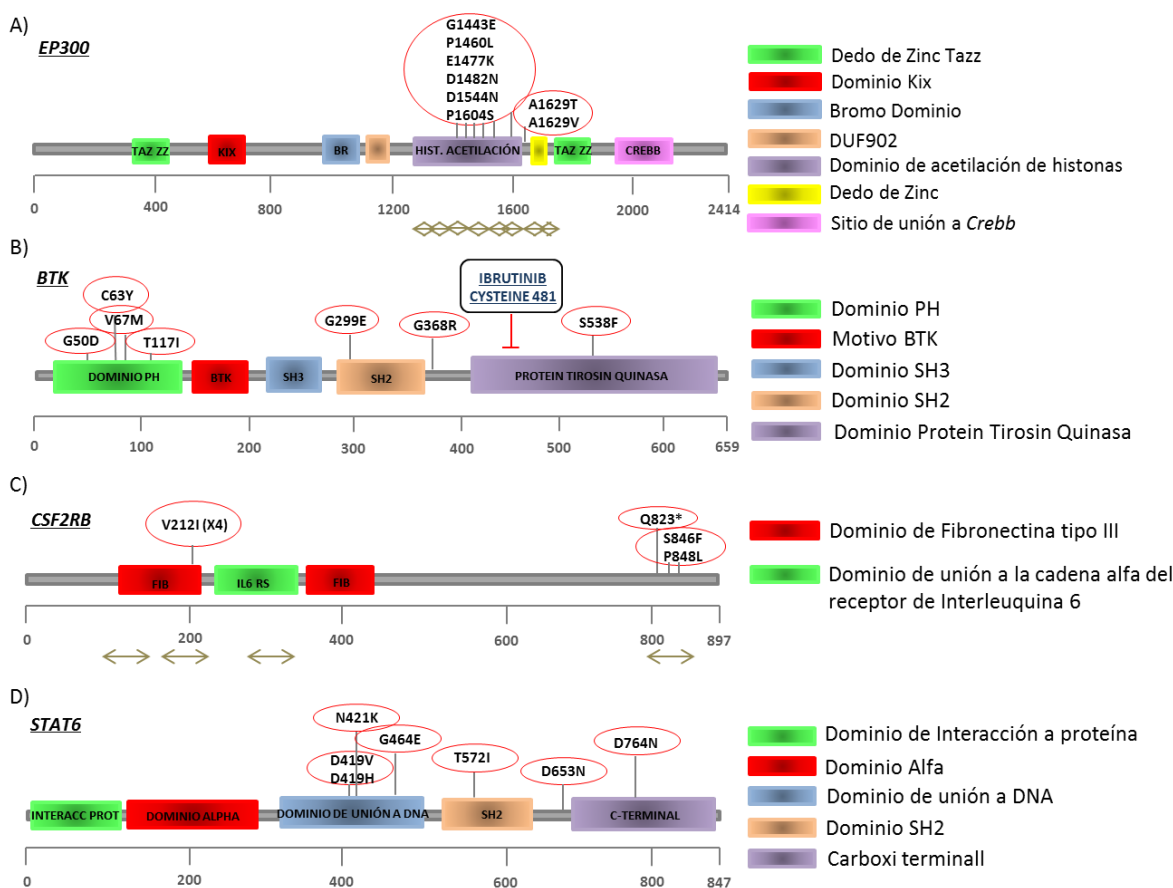


Figura 7: Mutaciones recurrentes en LHC. Representación esquemática de las alteraciones encontradas en *EP300*, *BTK*, *CSF2RB* y *STAT6*, destacados en el panel analizado ya que son los genes mutados en, al menos, un 10% de los casos. En *BTK*, Ibrutinib se une a la cisteína 481 en el sitio de unión a Adenosina Tri Fosfato (del inglés Adenosine Tri-Phosphate, ATP). Esta unión inhibe su fosforilación e interrumpe la señalización vía BCR. Las flechas marrones indican las regiones cubiertas por el diseño asociadas a cada gen (ya que estos genes no se seleccionaron para ser secuenciados de manera completa). En *STAT6* y *BTK* no se señala, ya que la cobertura de secuenciación en estos casos es de al menos un 98%.

Una alteración en particular, V212I, es recurrente en 4 casos con LHC, localizada en el dominio de fibronectina tipo III (FIB). La secuencia RGD (Arginina-Glicina-Ácido Aspártico), relacionada con la interacción con integrinas, está localizada en este dominio, y modula una variedad de eventos de adhesión celular asociados a trombosis, inflamación y metástasis tumoral [95].

STAT6 codifica para un miembro de la familia STAT de factores de transcripción, jugando un papel central en la respuesta biológica mediada por IL4, e induciendo la expresión de BCL2L1/BCL10 (L), responsables de la actividad antiapoptótica de IL4. En la figura 7 apartado C) localizamos las 7 variantes detectadas en 7 casos, obteniendo una frecuencia poblacional del 12.3%, situando la mayoría de ellas en el dominio de unión a ADN. Estudios funcionales en líneas celulares HEK (establecidas a partir de células embrionarias renales) han demostrado que las mutaciones encontradas en este dominio en estudios previos de LBCG reducen la capacidad de *STAT6* de unión a ADN [96].

4.2 Análisis del perfil mutacional de las líneas celulares con este primer diseño de secuenciación

Al querer obtener un perfil genético de este tipo de patología no nos podemos conformar con el tejido parafinado, ya que necesitamos obtener información de células vivas con las que luego podamos validar las alteraciones en vías de señalización concretas mediante estudios funcionales. Para ello se secuenciaron, con el mismo diseño descrito previamente para la serie de 57 tumores primarios pre-tratados, 6 líneas celulares generadas a partir de LHc, como son L-428, L-1236, HDLM-2, KM-H2, L-540 y L-591.

Como queremos comparar los resultados obtenidos en la secuenciación de las líneas con los obtenidos en la serie de pacientes, se han realizado los mismo duplicados, y el filtrado de las variantes se ha llevado a cabo aplicando los mismos criterios que los utilizados para el estudio en tejido parafinado, exceptuando el filtrado determinado por la frecuencia alélica encontrada, ya que son líneas clonales a partir de una minoría en el origen, y las frecuencias detectadas nunca puede ser comparable a las analizadas en una población tumoral minoritaria.

El objetivo de la secuenciación de líneas celulares establecidas a partir de LHc es validar los genes alterados identificados en la serie de pacientes, con el fin de poder utilizar estas células como modelos de aproximación para futuros ensayos con nuevas terapias en pacientes refractarios a la primera línea de tratamiento.

4.2.1 Valoración interna de la secuenciación en la serie de líneas celulares

En la figura 8 apartado A) mostramos el mismo histograma que para la serie de casos, en los que vemos la reproducibilidad observada en la secuenciación de líneas celulares. Pese a que no obtenemos líneas con un número de variantes tan elevado como en la serie de casos, debido posiblemente a que son líneas celulares que no están sometidas a ningún tipo de fijación química, observamos la misma distribución, es decir, cuando menor número de variantes arroja el algoritmo de análisis de Ion Torrent previo a nuestro filtrado, mayor es el ratio de concordancia de la secuenciación de la línea.

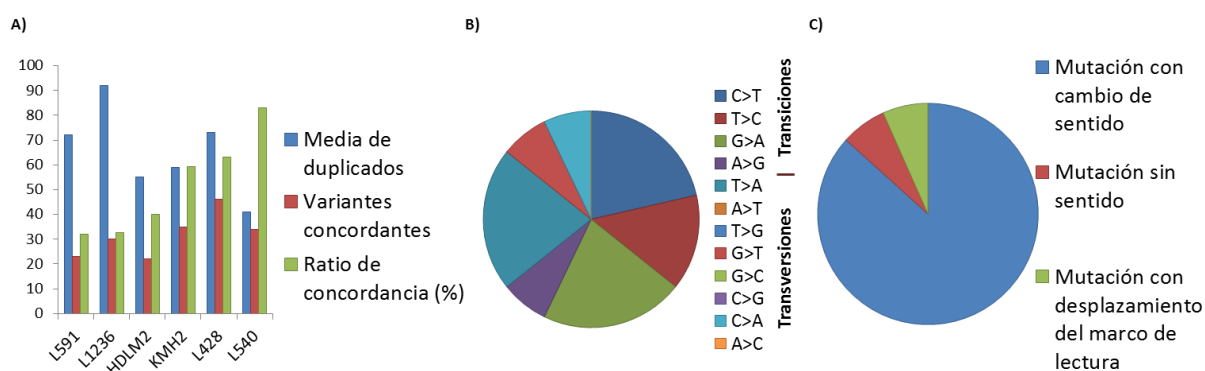


Figura 8: Ratio de concordancia y parámetros de detección asociados a la secuenciación. A) Esta figura muestra la relación que hay entre las variantes detectadas por el algoritmo de análisis empleado en la secuenciación, las variantes que seleccionamos después de analizar los duplicados y el ratio de concordancia que detectamos entre estas dos variables descritas anteriormente. B) Esquema que representa el porcentaje de cada cambio nucleotídico con respecto al total de las variantes detectadas, así como la proporción de transiciones y transversiones filtradas en las líneas celulares. C) Proporción del resultado originado por el cambio de aminoácido asociado a cada una de las variantes detectadas en la serie.

En los apartados B) y C) se analizan la proporción asociada al tipo de cambio detectado en la secuenciación, viendo unos resultados más homogéneos que en el caso de la serie. Esto es debido, como ya hemos explicado en la serie de pacientes, a la eliminación de la fijación química en los cultivos celulares, igualando el balance transiciones/transversiones. En el caso del efecto en la proteína de la variante, observamos que, como en la serie, la mayoría de las variantes son mutaciones con cambio de sentido, en las que como resultado hay un cambio de aminoácido que provoca un cambio en la estructura cuaternaria de la proteína.

4.2.2 Variantes identificadas en las líneas celulares derivadas de Linfoma de Hodgkin

Aplicamos los mismos criterios de filtrado mencionamos para la serie de casos, filtrando las variantes no concordantes, localizadas en regiones intrónicas, eliminando polimorfismos y variantes sin consecuencias funcionales para la proteína codificada. Al filtrar las variantes concordantes presentes en ambos duplicados de cada línea celular, y comprobando que las lecturas de las variantes válidas estén centradas en su amplicón correspondiente, nos quedamos con 128 variantes en las 6 líneas celulares. El siguiente paso a seguir es eliminar los polimorfismos con una frecuencia poblacional mayor del 1%, descartando un total de 106 variantes clasificadas como polimorfismos, quedándonos con 22 variantes en las líneas celulares testadas. Para terminar, el último filtrado que se ha realizado en este estudio es la eliminación de la lista de las variantes tanto localizadas en regiones intrónicas, como las variantes cuyo cambio nucleotídico no tiene efecto en el plegamiento de la estructura cuaternaria de la proteína. Después de este último filtrado, nos quedamos con un total de 12 variantes en 5 líneas celulares. En esta serie hemos detectado al menos una variante en cada línea celular, exceptuando en la línea L-540, en la que no se han detectado variantes asociadas a LHc en este diseño. En este estudio se ha obtenido una cobertura media de 3518 lecturas, y con unas frecuencias que van de 17.9-100%, siendo la media de 54.26%. Esta frecuencia alélica es bastante superior a la encontrada en la serie analizada anteriormente. Este hecho se debe a la pureza de la muestra, ya que las líneas celulares corresponden a una población de células tumorales generadas de manera clonal, mientras que el ADN analizado a partir de las biopsias asociadas a los pacientes proviene de una mezcla de diferentes tipos celulares, cada uno con su firma genética correspondiente.

En la figura 9 apartado A) mostramos la tabla en la que se describe de manera más detallada los resultados de secuenciación de las variantes detectadas en las líneas. Hay que destacar que, en ambos estudios, hemos comprobado que se identifican variantes

que ya han sido registradas en la base de datos COSMIC, todas ellas asociadas a tumores hematopoyéticos o linfoides.

En el apartado B) se muestra una figura resumen de esta selección, en el que vemos que aparecen los 3 de los 4 genes destacados en la serie de casos parafinados, junto con otros genes que están implicados en las mismas vías de señalización. De las 12 variantes que obtenemos como resultado, 7 de ellas han sido validadas mediante secuenciación Sanger, obteniendo una tasa de validación del 58.3%.

En el apartado C) se muestran las 2 representaciones obtenidas de una de las validaciones realizadas en las líneas celulares, la correspondiente a la variante c.2645T>A (p.D882V) en el gen de reclutamiento de caspasas miembro 11 (*CARD11*), hallada en la línea celular KM-H2. La primera imagen mostrada corresponde a la arrojada por IGV como consecuencia de la secuenciación mediante Ion Torrent. Con este programa podemos, aparte de ver la variante arrojada por el programa *variant caller*, obtener información del número de lecturas de cada nucleótido en esa posición, la frecuencia de la variante obtenida, la posición de la variante dentro del amplicón correspondiente y la distribución del número de lecturas de la hebra en las dos direcciones, tanto directo como reverso (término conocido en inglés como *strand bias*). La segunda imagen muestra el electroferograma resultante de la secuenciación de Sanger, en la que se pueden apreciar los dos picos en la posición correspondiente al cambio.

4.3 Validación funcional de las mutaciones detectadas

Como ya se ha explicado en los resultados asociados a las mutaciones, podemos asociar genes que están implicados en una misma vía de señalización, por lo que la alteración o conjunto de alteraciones relacionadas en una misma vía de señalización puede regularla a distintos niveles, impedir su actividad o potenciando la señalización de la misma.

A)

Línea celular	Cromosoma	Posición cromosómica	Cambio nucleotídico	Frecuencia alélica	Cobertura	Gen	Tipo de mutaciones	Cambio de aminoácido	Presencia en la base de datos COSMIC
KMH2	chr7	2978436	GTCTGA>	51.0	4935	CARD11	Delección	DS296.	-
KMH2	chr7	2956982	T>A	45.3	1029	CARD11	SNV	D882V	-
KMH2	chr16	3117390	G>A	25.2	5328	IL32	SNV	D10N	-
KMH2	chr22	37325765	G>A	48.4	3123	CSF2RB	SNV	V212I	-
KMH2	chr5	149450132	T>C	46.5	5884	CSF1R	SNV	H362R	-
HDLM2	chr17	40474420	C>A	50.0	814	STAT3	SNV	D661Y	Tejido linfoido y hematopoyético
HDLM2	chrX	100611835	A>G	17.9	280	BTK	SNV	I429T	-
L428	chr14	35871707	G>A	100.0	2653	NFKBIA	SNV	Q267*	-
L428	chr15	45003746	T>A	43.0	453	B2M	SNV	M1K	Tejido linfoido y hematopoyético
L1236	chr12	57496662	C>T	88.7	8647	STAT6	SNV	D419N	Tejido linfoido y hematopoyético
L1236	chr12	57496668	T>A	88.9	8580	STAT6	SNV	N417Y	-
L591	chr5	149450132	T>C	46.2	492	CSF1R	SNV	H362R	-

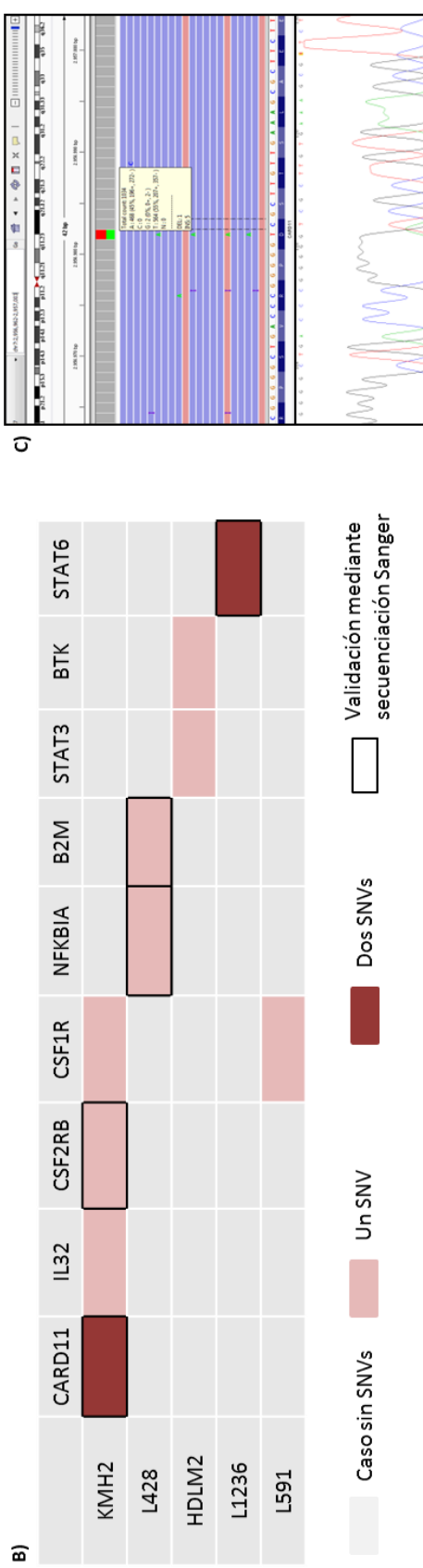


Figura 9: Perfil mutacional de las líneas celulares derivadas de Linfoma de Hodgkin y Validación mediante secuenciación de Sanger. A) Tabla con los parámetros de secuenciación obtenidos para cada variante después de aplicar todos los criterios de filtrado mencionados. B) El diagrama muestra la distribución de mutaciones en las líneas celulares. Una mutación se indica en rosa, mientras dos mutaciones en el mismo gen asociadas a la misma línea se muestran en rojo. Los recuadros negros corresponden a variantes que han sido validadas mediante secuenciación Sanger. B) Representación de la variante detectada de *CARD11* en la línea celular KM-H2 mediante secuenciación masiva y secuenciación Sanger.

Analizando las mutaciones detectadas en la serie de casos, hemos detectado una gran prevalencia de mutaciones en *BTK* (10.5%), y con la suma de las variantes detectadas en Célula B CLL/Linfoma 10 (*BCL-10*), *CARD11* y *NFKBIA* suman más de un 23%. Por este hecho, consideramos la vía de señalización del receptor de células B que, como consecuencia, activa la vía de señalización NF κ B, como la vía que puede estar regulada de manera distinta.

En las líneas celulares, salvo por el gen *BCL-10*, en el que no hemos descrito ninguna variante, para el resto de genes mencionados anteriormente, hemos encontrado una línea celular que tenga al menos una alteración en el mismo. Para el resto de genes analizados en el panel para esta vía, el 33.3% de las variantes detectadas están asociadas a los genes *BTK*, *CARD11* y *NFKBIA*. Estas observaciones sugieren que hay algún tipo de dependencia de las células tumorales asociadas a esta patología de la señal BCR, pese a que, como ya se mencionó en la introducción, las células HRS carecen de receptor de linfocitos B.

Para probar esta hipótesis, se utilizaron 6 líneas celulares establecidas a partir de LHc, dos líneas celulares derivadas de LBCG, y HEK293T y HeLa (controles negativos sin actividad linfocítica) para analizar la expresión de la vía de BCR y la sensibilidad al tratamiento de inhibidores de la misma.

La subunidad p52 del complejo NF κ B tiene una expresión elevada en todas las líneas derivadas de LHc y en ambas líneas de LBCG, proporcionándonos evidencias claras del papel de la vía NF κ B en la supervivencia de linfocitos (figura 10 apartado A). Como la activación de esta vía parece ser el resultado de la activación de otras vías de señalización, queremos analizar la expresión de varios intermediarios específicos de la vía BCR.

Hemos detectado expresión a niveles similares de la proteína BTK en todas las líneas celulares de LHc pero, al analizar la expresión de la forma fosforilada de BTK en la tirosina 223, solo detectamos expresión en las líneas derivadas de LBCG (HBL1 y DOHH2) y en algunas líneas derivadas de LHc (L-482 y HDLM-2) (figura 10 apartado A). Hay que destacar que los mayores niveles de expresión de BTK fosforilada aparecen en la línea

celular HDLM-2 (única línea con *BTK* alterado). Además del análisis de expresión de BTK, también se ha analizado la activación de NFκB vía señalización de BCR mediante el análisis de la expresión de la escisión de CYLD, una diana directa inmediatamente posterior de la vía de BCR. Se ha observado la escisión de CYLD por Western blot en todas las líneas celulares derivadas de LHC y en las derivadas de LBCG con niveles similares, resultados consistentes con la activación basal de la cascada en LHC.

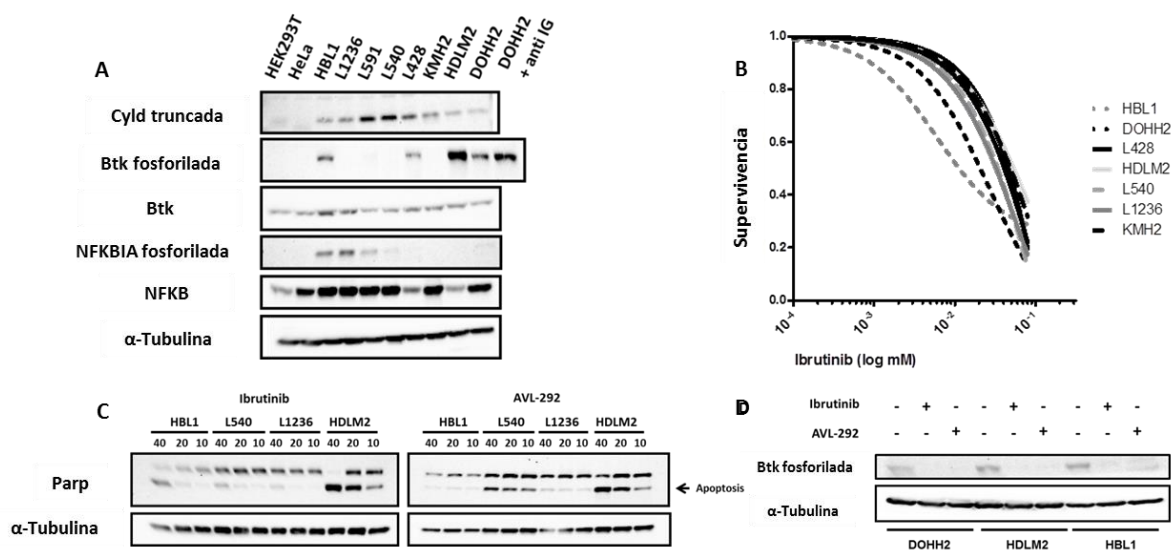


Figura 10: Estudios funcionales en líneas celulares generadas a partir de cHL y DLBCL. A) Análisis mediante Western blot de la escisión de CYLD, fosforilación de la Tirosina 223 en BTK y expresión de BTK total, la fosforilación de la subunidad NFKBIA y NFKB (isoforma p52). Como control de la carga del estudio se ha utilizado α-tubulina. B) Actividad del inhibidor selectivo para BTK, Ibrutinib, en las líneas celulares. Se calculó el índice IC₅₀ para las líneas celulares HBL1, HDLM2, L-540 y L-1236 en presencia de distintas concentraciones del inhibidor, pasados 48 horas. C) La inducción de apoptosis dependiendo de las concentraciones de los inhibidores se determinó mediante la escisión de PARP en las mismas líneas celulares del estudio anterior. Como control de carga se utiliza α-tubulina. D) Análisis mediante Western blot de la fosforilación de la tirosina 223 de la proteína BTK con el tratamiento de los dos inhibidores en líneas celulares de DLBCL y HDLM2.

Además de evaluar el estado de la vía en condiciones basales, se han querido testar la actividad de inhibidores específicos de BTK. Primero hemos utilizado Ibrutinib, un inhibidor específico de BTK aprobado para varias patologías asociadas a linfocitos B, en líneas celulares derivadas de LHC y como control utilizamos HBL-1. El rango de concentración media inhibitoria (IC₅₀) para las líneas celulares HBL-1, y DOHH2 es de 5-10 μM. Las líneas celulares derivadas de LHC presentan un rango de IC₅₀ de 10-20 μM (figura

10 apartado B). Se analizaron los niveles de apoptosis después de la incubación de las líneas celulares con estos inhibidores mediante la escisión de PARP, obteniendo unos resultados que reflejan unos niveles similares en las líneas celulares derivadas de LBCG y LHc (figura 10 apartado C). La única línea celular con *BTK* mutado, HDLM-2, es la más sensible a los dos tipos de inhibidores, Ibrutinib y AVL-292. Por último, hemos confirmado la reducción de los niveles de autofosforilación de BTK [97] después del tratamiento tanto con Ibrutinib como con AVL-292, demostrando el efecto directo de estos inhibidores en la señalización vía BTK (figura 10 apartado D)

En el punto en el que estamos, queremos confirmar la activación constitutiva de las vías mencionadas anteriormente en condiciones basales, y su posterior inhibición al mantener en contacto las líneas celulares con los inhibidores específicos. Para ello hemos seleccionado dos modelos celulares: HBL-1, línea celular derivada de LBCG [98], en la que se han realizado ensayos con inhibidores para asociarlos a este tipo de linfoma [99]; y HDLM-2, línea celular derivada de LHc en la que hemos detectado una variante en el gen *BTK*. Los estudios de expresión y análisis por GSEA revelan una activación basal de la vía BCR comparable a la activación asociada a las líneas celulares derivadas de LBCG, seguido de una fuerte inhibición debido al tratamiento de las células con inhibidores de BTK. Podemos observar el mismo patrón de expresión en la vía de señalización de NF κ B y en la señalización B y T dependiente de calcio (figura suplementaria 1).

El conjunto de datos analizados en estos estudios funcionales indican el requerimiento de la activación de la vía de señalización de BCR para la supervivencia y viabilidad de las líneas celulares derivadas de LHc.

4.4 Expresión de BTK mediante IHQ y su asociación con supervivencia

Para analizar los niveles de expresión proteica de dianas específicas relacionadas con las células tumorales y con el microambiente no tumoral se realizó un TMA en el que incluimos por duplicado zonas representativas (elevado porcentaje de células tumorales) de cada ganglio tumoral de esta primera serie. La primera proteína que queríamos

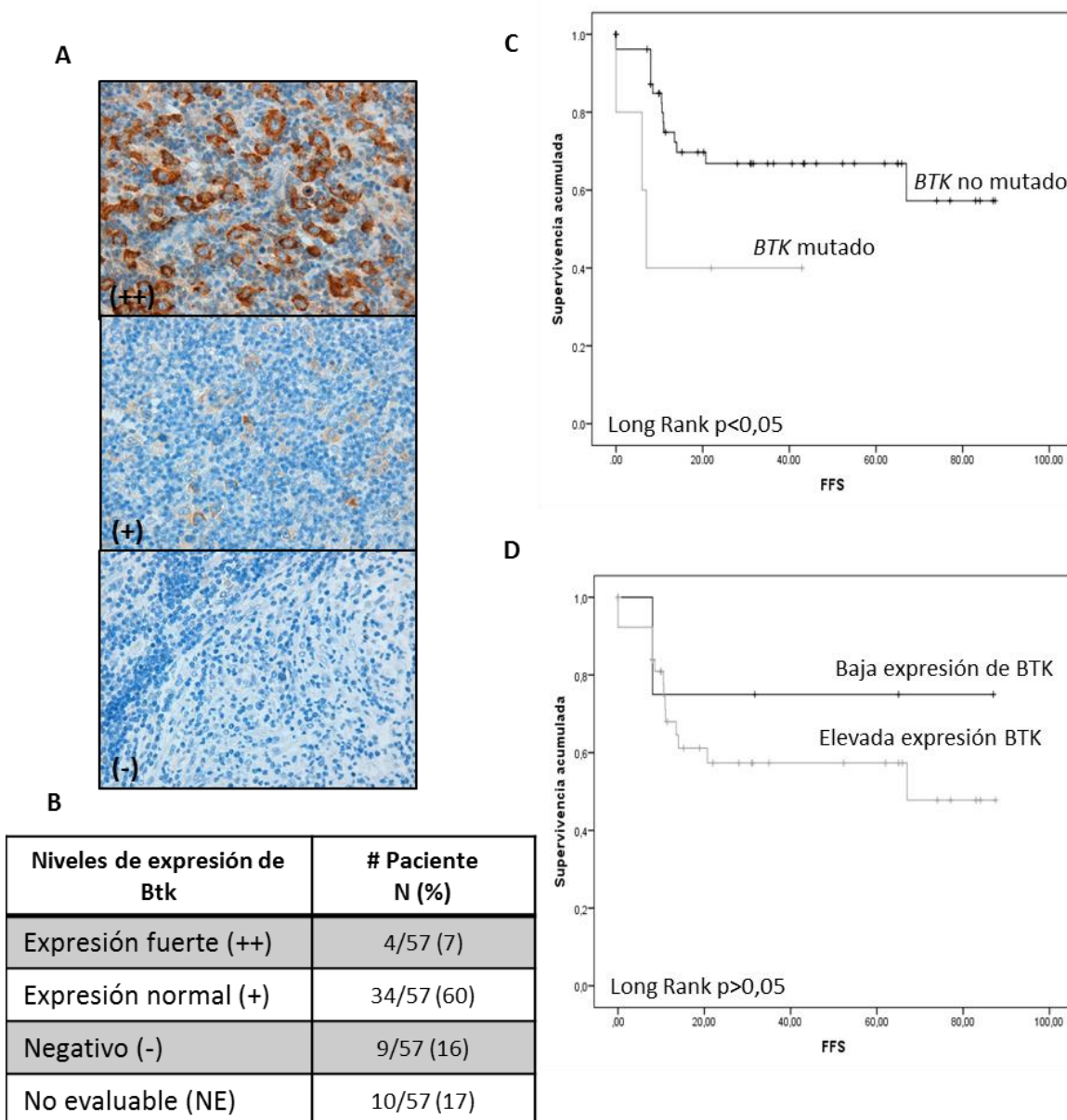


Figura 12: Expresión mediante IHQ de BTK y su correlación con supervivencia. A) Ejemplos representativos de la expresión de BTK en tejidos parafinados de LHc. B) Distribución de la expresión de BTK en nuestra serie. La positividad para este marcador se concluye comparando los niveles de expresión con los vistos en un centro germinal normal como referencia. C) Curva de supervivencia Kaplan-Meier que demuestra una mayor supervivencia en los casos en los que no está mutado *BTK* (p-valor<0.05). D) Curva de supervivencia Kaplan-Meier en los que se determina una menor supervivencia en los casos con menor expresión de BTK (p-valor>0.05).

analizar, debido a los resultados obtenidos en los apartados anteriores, fue BTK. Para ello, cuantificamos los niveles de expresión de la proteína en cada muestra, diferenciando 3 niveles de expresión: expresión fuerte de BTK, expresión normal o ausencia de expresión en el tejido. Ejemplos de cada nivel de expresión se pueden identificar en la figura 12

apartado A, al igual que las cuantificaciones realizadas. Hay que destacar que el 67% de los casos expresan BTK de manera constitutiva en sus células tumorales, mientras que el 11% de los casos no se han podido cuantificar (ausencia de muestra), por lo que, si se hubiese podido analizar toda la serie, estos porcentajes podrían haber variado (figura 12 apartado B).

Quisimos comprobar también la tendencia en la supervivencia si analizamos la distribución de las mutaciones detectadas en BTK, así como los niveles de expresión de esta proteína. Pese a que en el caso de la expresión de la proteína determinada por IHQ no obtenemos resultados significativos, vemos la misma tendencia en las dos curvas de supervivencia, detectando menos supervivencia libre de fallo cuando el gen esta alterado y la proteína se expresa de manera elevada (figura 12 apartados C y D).

4.5 Análisis de TMA y comparación con parámetros clínicos y genéticos de la serie

Al marcar los objetivos de esta tesis, se plantearon dos opciones: poder determinar factores pronósticos asociados a la firma genética del tumor y ensayar posibles tratamientos para pacientes en los que la primera línea de terapia no es válida.

Por ello, atendiendo al primer punto, en la tabla 11 se muestra el estudio de correlación de Pearson, en el que solo hemos tenido en cuenta los datos clínicos del paciente en cuanto a pronóstico, y los datos reales de supervivencia y no respuesta al tratamiento o recaída. Se ha marcado en gris los datos de correlación de los dos índices pronóstico utilizados en este estudio, que son el estadio de la enfermedad mayor o igual a 4 y el IPS mayor o igual a 3, viendo que no hay correlación estadísticamente significativa entre estos valores y los datos reales obtenidos de OS, FFS y sus marcadores binomiales *DEATH* (del inglés muerte, relacionado con OS) y *OUTCOME* (del inglés resultado, relacionado con FFS). En la tabla suplementaria 3 se puede ver la correlación de la firma IHQ del microambiente asociado a los distintos tumores en relación con la clínica. Cabe destacar la correlación negativa y estadísticamente significativa que encontramos entre el marcador de linfocito T CD4 y los dos valores de supervivencia analizados en la serie,

como son la supervivencia global y la supervivencia libre de fallo, es decir, cuanto más número de linfocitos CD4 positivos encontramos en el ganglio tumoral, menor será la supervivencia en términos absolutos o hasta el diagnóstico de una recaída o progresión de la enfermedad. Una proporción elevada de este subtipo de linfocito conlleva el escape de la respuesta citotóxica mediada por los linfocitos citotóxicos CD8 y, al no producirse respuesta citotóxica, la supervivencia de estos pacientes es menor (el tumor progresa).

Después de hacernos una idea de que puede estar relacionado de manera global, quisimos determinar de manera específica si había algún factor que esté, de manera estadísticamente significativo, correlacionado con la supervivencia de estos pacientes, tanto la supervivencia global como la no respuesta al tratamiento y posible recaída. Para ello, se han determinado las curvas de supervivencia, tanto para cada gen analizado en el panel secuenciado, como para agrupaciones de genes que están implicados en la misma vía de señalización, al igual que los factores inmunohistoquímicos determinados en el TMA.

	EBV									
HIST	- / 0,30	HIST								
ESTADÍO \geq 4	+ / 0,82	+ / 0,89	ESTADÍO \geq 4							
EDAD \geq 45	- / 0,70	+ / 0,80	+ / 0,26	EDAD \geq 45						
GÉNERO	+ / 0,21	- / 0,03	- / 0,38	+ / 0,84	GÉNERO					
IPS \geq 3	- / 0,47	- / 0,00	+ / 0,49	+ / 0,01	+ / 0,19	IPS \geq 3				
DEATH	- / 0,92	+ / 0,57	+ / 0,21	+ / 0,45	1,000	- / 0,62	DEATH			
OS	+ / 0,97	+ / 0,56	+ / 0,79	- / 0,92	- / 0,41	- / 0,90	- / 0,54	OS		
OUTCOME	- / 0,08	+ / 0,74	- / 0,40	+ / 0,37	- / 0,77	- / 0,18	+ / 0,00	- / 0,63	OUTCOME	
FFS	+ / 0,22	- / 0,87	+ / 0,58	- / 0,73	+ / 0,98	+ / 0,22	- / 0,35	+ / 0,00	- / 0,00	

Tabla 11: Correlación de Pearson entre factores clínicos y pronósticos. HIST: subtipo histológico distinto del más común esclerosis nodular.

Como se puede apreciar en la figura suplementaria 2, hay 2 genes en los que sus variantes están estadísticamente relacionadas con la supervivencia, y son *BCL-10*, atendiendo a supervivencia global, y *EP300* atendiendo a supervivencia libre de fallo. En todos los casos, la supervivencia cae drásticamente en los casos en los que estos genes están alterados, pudiendo abrir nuevos campos de estudio tanto para posibles valores pronósticos como dianas terapéuticas, tanto de manera individual atacando las proteínas estudiadas, como reprimiendo las vías de señalización en las que participan.

5.1 Análisis del perfil mutacional de muestras pareadas concernientes al tumor primario y a su recaída post-tratamiento

5.1.1 Clínica de la serie de casos

En este segundo proyecto se han seleccionado pacientes correspondientes a distintos centros, en los que se ha realizado un primer diagnóstico de LHC y, pese a la administración de los ciclos de tratamiento correspondientes de ABVD, y tras una revisión del estado del paciente, se ha diagnosticado una recaída del tumor primario. Para todos los casos, el subtipo histológico detectado en el tumor primario es el mismo que el diagnosticado en el tumor correspondiente a su recaída.

Las características clínicas de esta segunda serie se muestran en la tabla 12. Para esta serie hemos efectuado algunos cambios en esta tabla descriptiva ya que, como todos los casos son refractarios a la primera línea de tratamiento, no disponemos de ningún paciente con RC. Igual que en la serie anterior, sigue habiendo un mayor porcentaje de pacientes con subtipo EN, siendo el 58.3%, mientras que un 41.7% presentan el subtipo histológico CM. Sin embargo, no hay pacientes incluidos en esta serie que presente otro subtipo histológico, encontrando solo los dos más frecuentes en pacientes con LHC.

En cuanto a los factores pronósticos $IPS \geq 3$ y estadio Ann Arbor ≥ 4 y pese a que todos los pacientes deberían tener un factor pronóstico desfavorable, debido a que todos

VARIABLE	N	%
Edad		
< 45	9	75%
≥ 45	3	25%
Género		
Hombre	5	41.6%
Mujer	7	58.3%
IPS		
0-2	7	58.3%
≥ 3	5	41.6%
Estadio Ann Arbor		
< IV	10	83.3%
$\geq IV$	2	16.6%
Histología		
Esclerosis nodular	7	58.3%
Celularidad mixta	5	41.6%
Hemoglobina (g/dl)		
≥ 10.5	7	58.3%
< 10.5	5	41.6%
Albumina (g/dl)		
≥ 4	6	50%
< 4	6	50%
Leucocitosis		
$< 1.5 \times 10^9 / l$	6	50%
$\geq 1.5 \times 10^9 / l$	6	50%
Linfopenia		
$< 0.6 \times 10^9 / l$	7	58.3%
$\geq 0.6 \times 10^9 / l$	5	41.6%
EBV		
Positivo	10	83.3%
Negativo	2	16.6%

Tabla 12: Características clínicas de la serie de casos seleccionada para el primer estudio

muestran recaídas, detectamos todo lo contrario: solo un 16% de los pacientes presentan el estadio Ann Arbor ≥ 4 , mientras que un 41.6% de los pacientes presentan un $IPS \geq 3$.

Analizando la presencia de EBV en esta serie, observamos que la proporción en este estudio es menor que en la serie anterior, encontrando un 25% de los casos EBV positivos.

5.1.2 Reproducibilidad y concordancia de la secuenciación en la serie

Como hemos explicado en el apartado correspondiente a materiales y métodos, se han seleccionado poblaciones con una morfología e IHQ distinta mediante microdissección, obteniendo poblaciones independientes de células tumorales (anticuerpo anti-CD30 positivo) y de células “no tumorales” (anticuerpo anti-CD30 negativo), que asociamos al microambiente no tumoral. Por ello, tanto el método de enriquecimiento de las células tumorales utilizado en ambas series, como el protocolo utilizado para la rotura celular y extracción de ADN, son distintos.

Para esta serie se ha seguido manteniendo la elaboración de las librerías que se van a secuenciar por duplicado a partir del mismo ADN genómico microdisecado. De esta forma, se pueden descartar los errores cometidos por la ADN polimerasa en el proceso de generación de las librerías, además de otros errores generados.

En la figura 13 podemos observar la concordancia de nuestra serie, determinando un valor de reproducibilidad para la secuenciación a partir de ADN obtenido a partir de células parafinadas microdisecadas, mostrando la distribución del número de variantes en nuestra serie. En este caso, la media de variantes en los duplicados que encontramos por cada muestra asciende a 384 variantes, con un rango de 47-1658. Una vez analizadas las variantes que presentan un valor similar de frecuencia alélica en ambos duplicados, obtenemos una media de variantes concordantes de 7, con un rango entre 0-38. Al haber una detección de variantes mayor, el ratio de concordancia que encontramos entre los

duplicados disminuye drásticamente, siendo su media de 1.74, con un rango que alcanza entre 0.27-7.33%.

Al igual que en la serie anterior, hay un porcentaje de casos en los que la detección de variantes de partida es mayor y creemos que no corresponde con la realidad analizable en un panel de 36 genes completos. En estos casos encontramos varios factores que pueden justificar este hecho: el primero es que no podemos controlar la fijación del tejido que se hace en el laboratorio de origen, y que influirá en la fragmentación del ADN. El segundo factor a tener en cuenta es que, para la selección de las células, se utiliza un microdisector, que consiste en un láser que va atrapando las células seleccionadas. Este proceso fragmenta complemente las células de interés, por lo que el ADN de su interior también se ve afectado, disminuyendo la calidad del mismo.

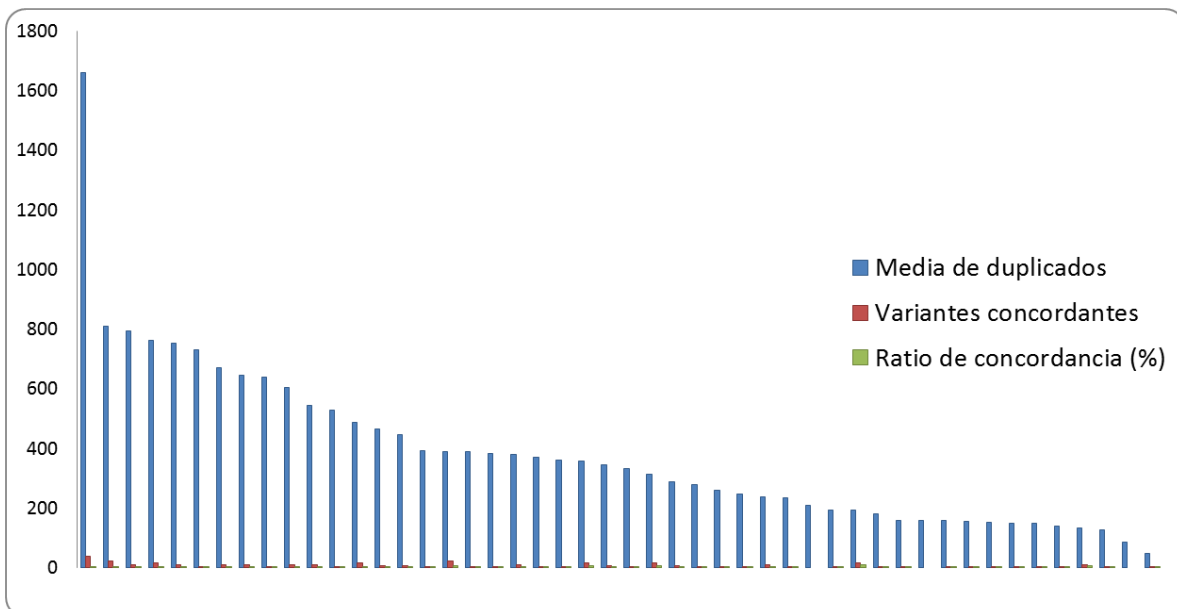


Figura 13: Ratio de concordancia aplicado a la detección de variantes en el estudio 2. La figura muestra las diferencias entre el número de variantes detectadas en cada caso, con un rango de 47-1658, y un porcentaje de concordancia entre los duplicados de 0.27-7.33%. La cobertura media conseguida para la secuenciación de las regiones dianas seleccionadas en el diseño es de 452 lecturas y la media y desviación típica de la frecuencia alélica de la serie es de 11.96 ± 8.78 .

5.1.3 Análisis de las variantes detectadas en la segunda serie de 12 pacientes diagnosticados con LHC y refractarios para la primera línea de tratamiento.

Con un protocolo de secuenciación mejorado, como es la tecnología Hi-Q para Ion Torrent, se han secuenciado 12 pacientes con muestras pareadas del tumor primario y de su recaída correspondiente. Además, para cada tumor se han separado mediante IHQ y microdissección las células CD30 positivas de las CD30 negativas, obteniendo 4 muestras a analizar por paciente. Teniendo en cuenta que para cada muestra se generan librerías por duplicado y se secuencian de manera independiente, obtenemos 8 conjuntos de librerías para cada paciente, analizándose en paralelo. Para este proyecto se ha diseñado un panel que engloba los genes en los que hemos visto alteraciones en el proyecto anterior, junto con genes en los que otros grupos de investigación han detectado variantes, estando reportados en la bibliografía y mostrándolos en el apartado de introducción. Por ello, el panel diseñado consiste en 36 genes secuenciados de manera completa. La cobertura media conseguida en el diseño, ya que es difícil conseguir el 100% de cobertura para un panel de varios genes completos, es del 93%, con un rango que fluctúa desde un 78,5% en el caso del gen *NFKBIE*, hasta un 100% en 4 de los genes incluidos. Esta cobertura está calculada analizando solo la región codificante, no teniendo en cuenta las regiones intrónicas adyacentes, siendo zonas que corresponden a regiones de ensamblaje de los oligonucleótidos empleados en la generación de las librerías, ni a las regiones intrónicas profundas, zonas sin interés en nuestro estudio.

Una vez obtenidos los resultados de variantes detectadas por el secuenciador, aplicamos los mismos criterios de filtrado que en el análisis anterior, mostrándose de manera más detallada en la figura 14. Una vez aplicados todos los criterios, identificamos 55 variantes totales, que están repartidas en 40 variantes en la fracción CD30 positiva y 15 variantes en la fracción CD30 negativa.

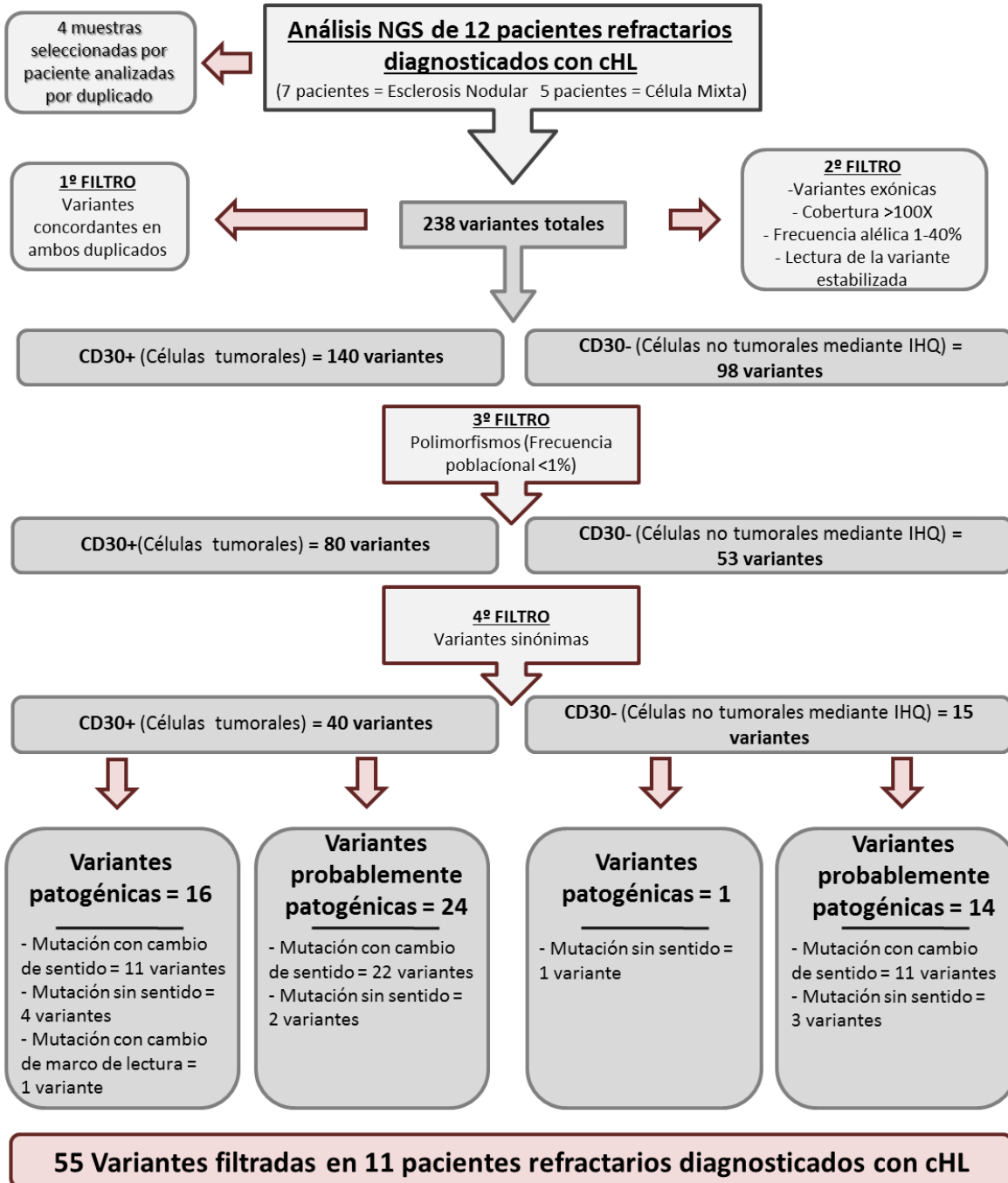


Figura 14: Organigrama del filtrado realizado en la segunda serie analizada y distribución de las variantes identificadas.

De todos los pacientes analizados, con sus muestras fraccionadas correspondientes, hemos detectado al menos una variante en alguna de sus correspondientes muestras en 11 de ellos, por lo que hay un paciente en el que no hemos

detectado variantes asociadas a este panel en ninguna de las muestras analizadas. Esto se puede deber, en primer lugar, a que no presente ninguna variante asociada a este panel o, en segundo lugar, que nuestros criterios de filtrado sean demasiado estrictos, eliminando variantes que pudieran ser de nuestro interés.

Como en el caso anterior, se han dividido las variantes en dos categorías: variantes patogénicas (ya asociadas a alguna otra patología) y variantes probablemente patogénicas (no han sido descritas previamente). En cuanto a las variantes patogénicas, se han detectado un total de 17 variantes, encontrando 16 en la fracción CD30 positiva, y 1 variante en la fracción CD30 negativa. En cuanto a las variantes probablemente patogénicas, globalmente encontramos 38 variantes, divididas en 24 variantes en la fracción CD30 positiva, mientras que detectamos 14 en la fracción CD30 negativa. Analizando el tipo de cambio que encontramos en estas 55 variantes, el 80% de ellas corresponden a variantes en las que el cambio de nucleótido origina el cambio de aminoácido codificante, mientras que el 18.1% de ellas son variantes en las que el cambio nucleotídico origina la codificación de un codón de parada, interrumpiéndose la traducción de la proteína de manera prematura. Tan solo un 1.9% de las variantes origina un cambio en el marco de lectura de la proteína. Al igual que en el caso anterior, hay un elevado porcentaje de transiciones C>T, debido a la inclusión del tejido en parafina.

La figura 15 y tabla suplementaria 4 muestra los resultados obtenidos después del filtrado, en el que se han detectado finalmente 55 variantes concordantes en los 12 pacientes estudiados (aunque uno de ellos no presente variantes, como se ha descrito previamente). La cobertura media (número de lecturas en la variante) que presenta la serie es de 452.7 lecturas. En esta figura se muestra esquemáticamente el número de variantes y los genes mutados en cada paciente de manera global, y una vez que vamos diferenciando en cada paciente, hasta obtener las 2 fracciones de los dos tumores analizados por caso. De esta manera podemos comparar los resultados obtenidos en la primera serie con los de este segundo proyecto, ya que pasamos a analizar el tumor de manera global.

Creemos que merece una mención especial las frecuencias alélicas encontrada en esta serie ya que, a priori, solo deberíamos encontrar variantes patogénicas o probablemente patogénicas en las fracciones CD30 positivas, correspondientes a las células tumorales. Sin embargo, el 27.3% de las variantes están identificadas en la fracción negativa, pensando que estas variantes también están implicadas en el mantenimiento de esta enfermedad. En la figura 15 apartado A) podemos ver un histograma en el que se representa cada variante asociada a su frecuencia alélica correspondiente. La media de la frecuencia alélica en el total de variantes es de 11.96%, y trazando una línea en la media y la desviación típica asociada ($\pm 8.78\%$), podemos ver que los genes que tienen una frecuencia alélica alejada de estos valores son *TP53*, *CREBBP*, *CSF1R*, *NUMA1* y *STAT3*. El 83% de estas variantes con una frecuencia alélica elevada están identificadas en la fracción CD30 positiva, encontrando tan solo una variante de *STAT3*, con una frecuencia alélica elevada, localizada en la fracción CD30 negativa.

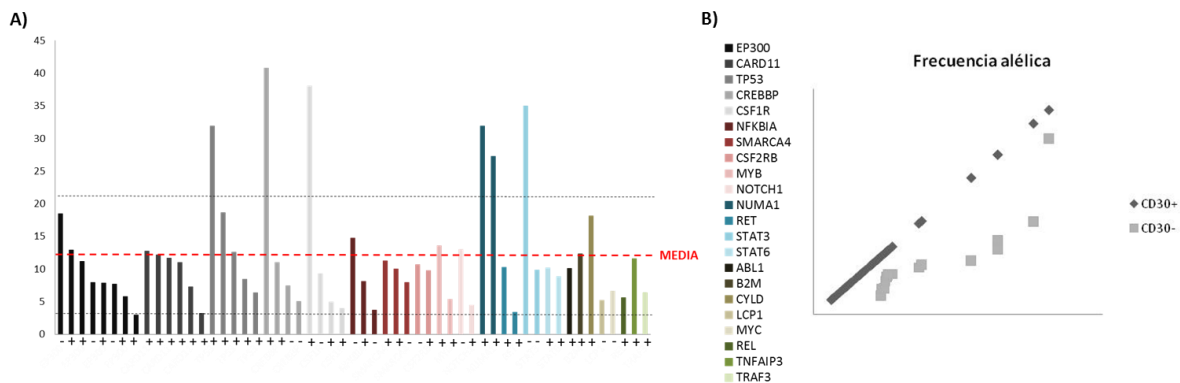


Figura 15: Frecuencia alélica identificada en las variantes somáticas asociadas a pacientes refractarios diagnosticados con LHC. A) La frecuencia alélica correspondiente a cada variante se muestra asociada al tipo celular correspondiente (+: células CD30 positivas; -: células CD30 negativas). B) Distribución de la frecuencia alélica en ambas fracciones celulares.

Atendiendo a las frecuencias alélicas y, queriendo analizar la totalidad de la fracción CD30 positiva o CD30 negativa, sí que podemos observar diferencias. En cuanto a la fracción CD30 positiva, la media de frecuencias alélicas detectada es de 12.38%, con una desviación estándar de $\pm 9.2\%$. Sin embargo, en la fracción CD30 negativa encontramos una media de frecuencia alélica de 10.86%, con una desviación estándar de ± 7.73 . Si ordenamos las variantes en función de la frecuencia alélica de manera ascendente podemos ver una tendencia, ilustrada en la figura 15 apartado B), en la que se

muestra como las frecuencias alélicas de las células CD30 positivas son relativamente mayores que las de las células CD30 negativas.

Hemos encontrado variantes relevantes en 22 de los 36 genes analizados en el panel diseñado, por lo que se ha obtenido información de un 66.1% del diseño. Algunas de estas variantes ya están previamente descritas, como ya se ha comentado en la introducción y en la serie anterior. Sin embargo, hay genes que están alterados en nuestra serie y no han sido descritos previamente en LHC, y que pasaremos a comentar en la discusión.

5.1.4 Análisis de valores pronóstico en pacientes refractarios de LHC

Como en el análisis anterior, y una vez que obtenemos una información a nivel genético de los tumores analizados, el siguiente paso es determinar si existe correlación entre los datos obtenidos mediante secuenciación, los datos clínicos proporcionados por el biobanco correspondiente, y los testados mediante IHQ con la realización del TMA asociado.

Como ilustramos en la figura 16 apartado A), se ha elaborado una tabla de correlación de Pearson en las que se incluyen las principales variables clínicas utilizadas en este estudio. Gracias a ella, y como en la serie anterior, podemos comprobar que los valores pronóstico utilizados habitualmente, como son $IPS \geq 3$ y $estadío \geq 4$, no se correlacionan de manera estadísticamente significativa con los valores reales de supervivencia global y supervivencia libre de fallo (el valor de *OUTCOME* no se muestra en este gráfico, ya que todos los pacientes muestran evento en supervivencia libre de fallo, debido a que todos tienen al menos una primera recaída después de la primera línea de tratamiento). La única correlación positiva y estadísticamente significativa, en la que consideramos que es válido el predictor, es el $estadío \geq 4$ con los pacientes que presentan una tercera recaída (valor sombreado en gris y remarcado en negrita). En el apartado B) se

DISCUSIÓN

Pese a que el LHc es una enfermedad con una tasa de curación bastante elevada (en torno al 80%), hay un porcentaje de pacientes que fallecen debido tanto al avance de la enfermedad como a los efectos tóxicos derivados del tratamiento quimioterápico aplicado a estos pacientes. Por ello, estimamos importante establecer las bases genéticas que conllevan a la aparición del tumor, su mantenimiento, y las posibles recaídas una vez que consideramos que la masa tumoral está eliminada. Así, cuantos más datos dispongamos en este ámbito, podremos aumentar la supervivencia de estos pacientes, proporcionando tratamientos adecuados en función de la firma genética de cada tumor de manera individualizada.

La secuenciación masiva se ha convertido en una revolución para la detección de variantes en cualquier área médica, aunque tiene el inconveniente, a parte de su complejidad técnica, el análisis posterior de los resultados. Los artefactos que se pueden originar en la lectura de las secuencias y el ruido generado pueden interferir en las conclusiones generadas a partir de este tipo de metodología [100]. Uno de nuestros objetivos en esta tesis doctoral es poder eliminar en la manera de lo posible los artefactos generados en los distintos niveles de procesamiento de la muestra y del análisis de resultados, para poder estandarizar el protocolo utilizado y que el mismo sea aplicable en la rutina clínica en la toma de decisiones de nueva terapia personalizada para cada paciente, en función de su firma genética.

Como se ha mencionado anteriormente, en esta tesis doctoral se ha dispuesto (debido a la disponibilidad de las muestras en los distintos hospitales) de ganglios tumorales sometidos a un proceso de fijación con formaldehído. Con este proceso se evita la lisis celular. Una vez fijado el material, se incluye cada muestra en parafina, que es una mezcla de hidrocarburos saturados con distintos puntos de fusión. Con este protocolo tiene lugar dos eventos contraproducentes para nuestros objetivos: en primer lugar, y pese a que las estructuras celulares conservan su morfología, el material genético perteneciente a estas células sufre un proceso de fragmentación y degradación. A ello hay

que sumarle la fragmentación posterior ocasionada por la microdissección para la separación de los distintos tipos celulares en el segundo estudio de esta tesis doctoral. El segundo lugar, se produce un fenómeno conocido como deaminación de citosinas, es decir, la pérdida del grupo amino de la citosina, convirtiéndose en uracilo. Este uracilo se empareja con adenina, produciéndose más transiciones GC>AT [101]. La primera consecuencia de este método de fijación se puede solventar adaptando las regiones de los genes a estudiar, diseñando amplicones de pequeño tamaño. Con ello, aunque la sensibilidad de la secuenciación nunca va ser del 100%, nos podemos acercar bastante a esa cifra. Sin embargo, para el segundo inconveniente no tenemos ninguna técnica que nos impida eliminar estas transiciones que no están presentes en el tumor original. Por ello, en el análisis final de los resultados, no podemos olvidarnos que este fenómeno influirá en las conclusiones finales. Cabe destacar que las variantes totales detectadas en las líneas celulares (en las que se han cultivado en medio RPMI y su ADN se ha extraído por el método convencional) tienen una distribución transiciones/transversiones equilibrada, por lo que se puede confirmar que estos errores producidos están determinados únicamente por el tipo de muestra a analizar y no por la metodología seleccionada.

En una primera aproximación para esclarecer la genética asociada a cada tumor, se seleccionaron una serie de 57 tumores primarios diagnosticados con LHC, asociados al grupo de edad mayoritario en el que se manifiesta esta enfermedad, y seleccionando regiones en las que el patólogo determinó que el porcentaje de células tumorales es mayor, consiguiendo enriquecer la muestra hasta un 10% de células tumorales en el tejido estudiado. Al aumentar el porcentaje de células HRS, ajustamos también el poder de detección del secuenciador seleccionado para la elaboración de este proyecto, como es el Ion Torrent ya que, pese a tener un umbral de detección suficiente para localizar variantes con una frecuencia alélica menor, evitamos la detección de una elevada fracción de variantes catalogadas como falsos positivos, pudiendo interferir en las conclusiones obtenidas. Una vez determinadas las dianas génicas posiblemente patogénicas en este estudio y bajo estas condiciones, se han llevado a cabo unos análisis funcionales de las

variantes detectadas en las líneas celulares derivadas a partir de LHc. La combinación de los dos tipos de experimentos permite validar que la alteración a nivel genético tiene una consecuencia a nivel funcional, dando más peso a los resultados obtenidos mediante secuenciación. Tenemos que destacar que gracias a estas herramientas bioinformáticas, que comparan tus resultados con secuencias homólogas de referencia, simplifica el proceso al determinar que alteraciones están implicadas en el desarrollo de la enfermedad y cuáles no. De no ser así, cualquier cambio nucleotídico en el que la consecuencia sea una alteración en la secuencia polipeptídica debería ser analizado mediante estudios funcionales para determinar la consecuencia generada en la proteína.

En el estudio posterior, y previo al diseño de un panel en el que se incluyen 36 genes en los que analizarán las regiones codificantes completas, se secuencian muestras de 12 pacientes en los que se han analizado el tumor primario y la primera recaída, separando en cada uno las células CD30 positivas de las CD30 negativas. De esta manera podemos seguir la evolución que manifiesta el tumor, analizando las vías de señalización que están alteradas en ambas situaciones de las que son distintivas de una de ellas.

6.1 Rutas alteradas en LHc

Al tener un número reducido de genes y, en uno de los paneles (en el primer diseño de secuenciación), solo se han secuenciado regiones concretas, creemos que es más interesante discutir los resultados agrupando genes que pueden estar incluidos en la misma vía de señalización o que puedan tener funciones comunes en el desarrollo del tumor. Por ello, atendiendo a estas agrupaciones de genes, encontramos 3 funciones alteradas: a la que más peso hemos dado en este trabajo, atendiendo únicamente a la frecuencia poblacional detectada, es la vía de señalización BCR que desemboca en la activación de la vía de señalización NF κ B; la segunda en importancia es el grupo de deacetilasa de histonas (HDACs); y, por último, incluyendo genes que a priori no dábamos tanta relevancia debido a su frecuencia poblacional analizada de manera individual, podemos establecer otro tercer grupo que comentaremos más adelante. En la figura 17 podemos identificar un resumen de los temas a desarrollar a continuación, las rutas

mayoritariamente alteradas en ambas series y la distribución de variantes en la segunda serie, atendiendo a la fracción analizada, determinado por el color de la flecha (negro: CD30 positiva; gris: CD30 negativa).

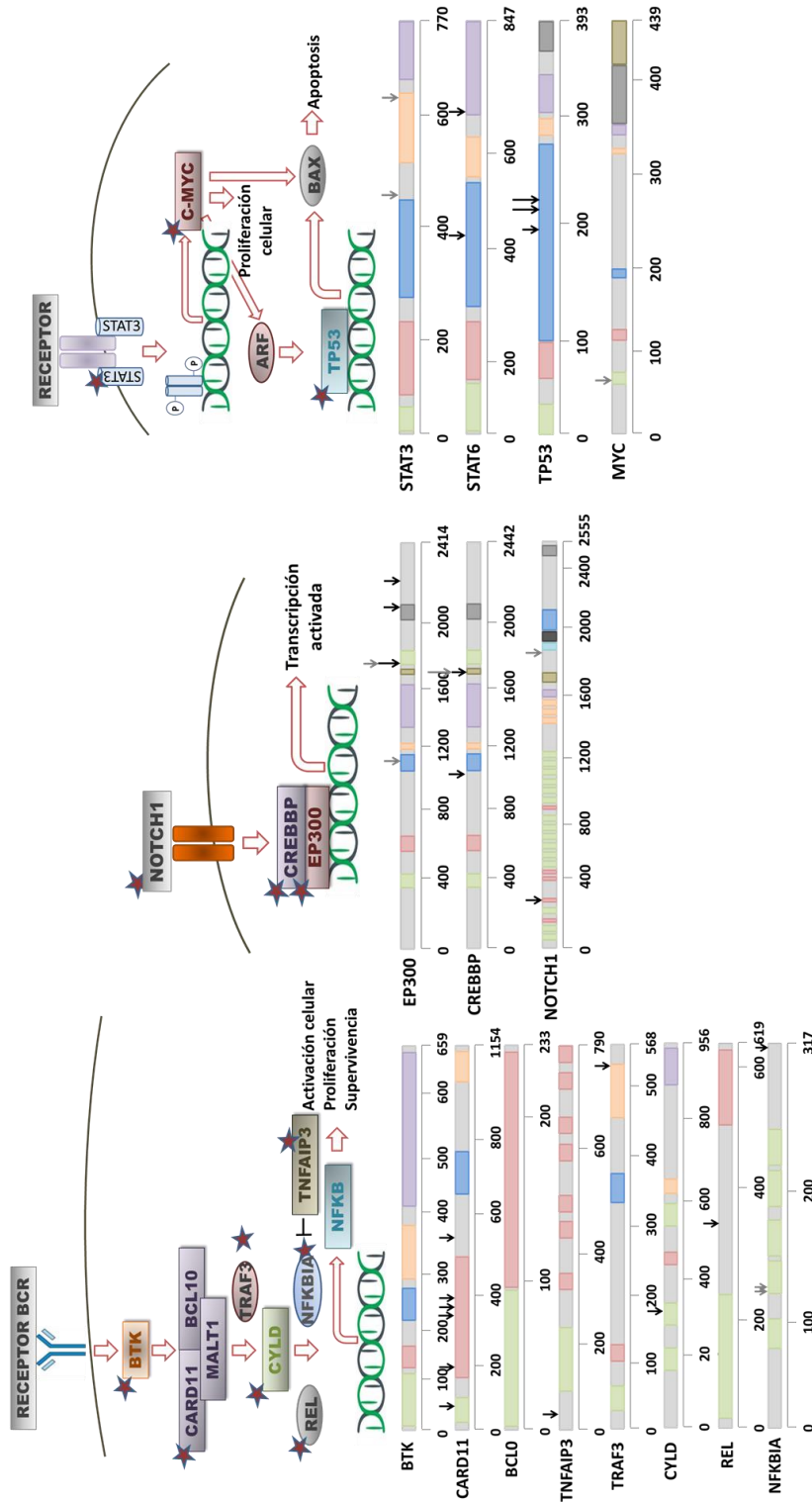


Figura 17: Esquemas de vías de señalización en las que englobamos los genes alterados y variantes identificadas en cada dominio de la proteína asociada. Las flechas negras representan variantes localizadas en la fracción CD30 positiva, mientras que las flechas grises indican una variante en la fracción CD30 negativa.

Analizando la vía de señalización iniciada por el reconocimiento de antígeno mediante el receptor BCR, que desemboca en la activación *downstream* de la vía de señalización NFκB, englobamos los genes *BTK*, *CARD11*, *NFKBIA* y *BCL-10* para la primera serie, mientras que para la segunda serie hemos añadido a los ya testados en el primer panel, los genes *REL*, *TRAF*, *TNFAIP3* y *CYLD*. La activación de esta vía tiene como consecuencia fenómenos en la célula tumoral como son su activación, proliferación, supervivencia y metástasis, angiogénesis e inflamación. Estos genes están alterados en el 21% de la primera serie, mientras que en la segunda serie el porcentaje de variantes varía dependiendo de si agrupamos cada muestra en un único paciente o si vamos separando las siguientes fracciones: si tenemos en cuenta la combinación de todas las muestras analizadas por paciente, 41% tienen esta ruta alterada en al menos una de sus muestras. Si analizamos las variantes separando el tumor primario de la primera recaída, el 54% de las variantes se encuentran en el tumor primario, mientras que el 46% se detectan en la primera recaída. Si vamos un paso más lejos y separamos las variantes que se sitúan en las células CD30 positivas de las que se encuentran en la fracción CD30 negativa, encontramos que más del 80% de las variantes se encuentran en las células CD30 positivas, fracción enriquecida en células tumorales, constatando que, pese a que la fracción negativa también tiene esta vía alterada, tiene una proporción bastante menor.

Queriendo profundizar en ello, se secuenciaron con el primer panel diseñado las líneas celulares, obteniendo variantes en alguno de estos genes en el 60% de ellas. A partir de ahí se diseñaron experimentos para corroborar la alteración de esta vía a nivel BTK y su activación *downstream*, midiendo su utilidad en protocolizar nuevas terapias.

Por Western-blot se determinó la expresión proteica de BTK, miembro de esta vía y alterado en el 10% de los casos, tanto de la forma nativa como de la forma fosforilada y activada, viendo las diferencias entre los distintos tipos celulares. Además, se quiso estudiar la expresión de una proteína relacionada con la vía de activación de NFκB, como es CYLD, y viendo el truncamiento y activación de la misma en todas las líneas celulares.

También se ha determinado la supervivencia y apoptosis de estas líneas celulares en presencia de dos inhibidores de BTK y por tanto, de la activación de la vía. Para finalizar, se analizó la expresión de manera global, de estas dos vías de manera independiente. Como se pueden ver en la figura suplementaria 1, ambas vías de señalización presentan unos niveles de expresión elevados de manera basal, mientras que están deprimidos en el contacto con los inhibidores. Para finalizar, se estudió la expresión mediante IHQ de BTK y se analizó si podía correlacionarse con la supervivencia de estos 10% de pacientes que tienen este gen alterado, viendo una relación estadísticamente significativa. Por lo tanto, se puede identificar una clara modificación, tanto de BTK en particular, como de la vía de activación de manera general, siendo una posible diana para futuros ensayos de nueva terapia, ya siendo con el caso de Ibrutinib en particular, como de otros inhibidores de la vía de BCR y NF κ B.

Aunque en este trabajo solo hemos ensayado Ibrutinib como terapia alternativa en pacientes refractarios, se han descrito otros fármacos que atacan esta ruta, pudiendo ser válidos para futuros ensayos preliminares. Algunos de ellos son Bortezomib (indicado para mieloma) que se une a los sitios activos del proteasoma bloqueando la activación de NF κ B, impidiendo la maduración del precursor inactivo p105 en la subunidad madura p50 [102]; Enzastaurina y Sotrastaurina, inhibidores de la subunidad β de Fosfo-Quinasa C (PKC- β), conector entre BTK y la vía NF κ B. En el caso de Sotrastaurina, se han descrito mutaciones en miembros de la vía que pueden modular la actividad de este inhibidor; También podemos incluir inhibidores de MALT1, que inhiben de manera selectiva la actividad proteolítica de MALT1, ya testados en líneas celulares de LBCG [103].

El segundo grupo en el que queremos profundizar es el que incluye los genes *EP300*, *CREBBP* (HDACs), y *NOTCH1*, receptor que activa una cascada de transcripción de diversos genes, regulada por la acetilación de la cromatina mediada por estas HDACs. El 16% de los casos seleccionados para este primer estudio tiene al menos una variante en alguno de estos genes. Para el segundo estudio, si analizamos cada paciente de manera global, el 50% de ellos tienen esta “función” alterada. Al desarrollar estos datos dependiendo de si estas variantes se encuentran en el tumor primario o en la recaída,

observamos que el 61% de estas variantes se encuentran localizadas en el tumor primario, mientras que el 39% pertenecen a la primera recaída. Cuando analizamos las variantes asociadas a los tipos celulares analizados, vemos que en el tumor primario el 57% de las variantes identificadas están asociadas a las células CD30 negativas (marcadas como no tumorales). Sin embargo, cuando analizamos la primera recaída, el 80% de las variantes están asociadas a la fracción CD30 positiva, encontrando solo una variante en la fracción negativa. Con estos resultados podemos desarrollar la hipótesis de que esta vía está alterada tanto en las células tumorales como en las células no fisiológicamente normales (precursores tumorales) pero que tanto fenotípicamente como mediante IHQ no somos capaces de distinguir. Estas células podrían ser las que, de manera posterior, pueden originar una progresión de la enfermedad pese al tratamiento del paciente, o acaben siendo células HRS reconocible por ambas metodologías en una futura recaída. Esta hipótesis tendrá que ser corroborada en estudios posteriores en los que se consiga una serie mayor de pacientes, y mediante estudios funcionales de las alteraciones identificadas.

Aunque en este trabajo no se ha realizado ningún experimento funcional relacionado con este grupo de genes, en la bibliografía se ha ensayado en líneas celulares de mieloma con inhibidores del dominio bromo de los genes *EP300* y *CREBBP*, cuya consecuencia es la inhibición de *MYC*, limitando la viabilidad de las células estudiadas. Este experimento es el primer paso para poder desarrollar esta idea en enfermedades en las que tengan estos genes alterados, y queda claro que LHc es una de ellas [104].

El último grupo de genes que queremos desarrollar es más heterogéneo, ya que los genes pertenecen a vías de señalización distintas pero que, en la homeostasis celular, están bastante relacionados. Los dos primeros genes incluidos en este grupo son *STAT3* y *STAT6*, ambos pertenecientes a la vía de señalización JAK/STAT, y cuya alteración está implicada en el crecimiento, diferenciación y supervivencia de forma anormal, determinándose una activación constitutiva de algunas proteínas pertenecientes a esta vía en pacientes con diversos tipos de cáncer. El oncogen *MYC* promueve la salida de la fase G1 del ciclo celular hacia la fase de síntesis (S), produciéndose fenómenos de

crecimiento celular, supervivencia, diferenciación y oncogénesis. La fosforilación y activación previa de STAT3 induce la expresión génica de *MYC*, obteniendo como resultado las consecuencias fisiológicas explicadas anteriormente [105]. Además, *MYC* activa la vía TP53 vía : Factor de ribosilación *ADP* (*ARF*), que conlleva la activación de la vía Proteína X asociada a BCL (*BAX*), favoreciendo la porosidad de la membrana mitocondrial, que conlleva la liberación del citocromo c, activación de caspasas, obteniendo como resultado final la apoptosis celular [106].

En el primer estudio hemos secuenciado a los 2 genes pertenecientes a la vía de señalización JAK/STAT y *MYC*. En el caso de *STAT6* y *MYC* sí que se han identificado variantes en la serie de casos, mientras que en el caso de *STAT3*, solo se han identificado variantes en una línea celular (HDLM-2). Pese a ello, detectamos una frecuencia poblacional de *STAT6+MYC* superior al 12%. Para el siguiente diseño, y pese a que en la bibliografía no se ha identificado frecuentemente alterado en LHc [72, 73], introducimos *TP53* en el estudio. Hemos identificado variantes en este gen en un 25% de los pacientes. Si analizamos este grupo de genes de manera global en los 12 pacientes estudiados en el segundo estudio, 5 de ellos presentan al menos una variante en alguna de sus muestras (42%). En cuanto al tumor primario y a su recaída, identificamos la misma proporción de variantes en ambos estados del paciente.; es más, si analizamos estas variantes en cuanto a si pertenecen a la fracción tumoral o a la no tumoral, detectamos el mismo número de alteraciones en el tumor primario y en la primera recaída, con 3 variantes en la fracción CD30 positiva y 3 variantes en la fracción CD30 negativa, por lo que vemos que este grupo que hemos estudiado está alterado de la misma manera en todas las muestras analizadas. Además, cuando analizamos las frecuencias alélicas de cada variante de este grupo, identificamos dos de ellas con una frecuencia elevada con respecto a la media identificada en la serie. Estas dos variantes corresponden a los genes *TP53* y *STAT3*, localizándose en la fracción CD30 positiva y CD30 negativa. Con todos estos datos podemos concluir que la alteración de este grupo está equilibrada en los distintos factores estudiados, y que puede ser un punto a tener en cuenta, tanto en estudios funcionales asociados a esta vía (debido a la prevalencia de variantes encontradas en los genes *TP53* y *MYC* en los distintos tipos

de cáncer), como ensayos de indicación de tratamiento, tanto en líneas celulares de LHC, como en otros tipos celulares asociados a enfermedades en las que estos genes sean claves.

En cuanto a los posibles fármacos que pueden ensayarse para regular la función de esta ruta, recientemente se ha publicado un artículo en el que se ensaya Varinostat, inhibidor de HDACs, en líneas celulares derivadas de LHC [107]. En este trabajo, al inhibir las HDACs, también se inhibe la transcripción de *STAT6*, obteniendo como consecuencia dos fenómenos: el primero es la inhibición de BCL-XL, llevando la célula tumoral a apoptosis: el segundo fenómeno es la disminución de la secreción de TARC, inhibiendo la quimiotaxis con los linfocitos Th2, mecanismo crucial de la supervivencia de las células HRS.

En cuanto a los inhibidores de *STAT3*, se han diseñado moléculas peptídicas y no peptídicas que se unen al dominio SH2 de la proteína resultante, impidiendo la dimerización de *STAT3* y su translocación al núcleo. Estos compuestos se han ensayado tanto in vitro como in vivo para diversos tipos de tumores, como pueden ser cáncer de mama o colon, o compuestos ensayados en tumores líquidos, como en leucemia mieloide crónica [108].

En el caso de *TP53*, y ya que es el gen con más mutaciones encontradas en los distintos tipos de cánceres (50% de las mutaciones están identificadas en este gen), los ensayos destinados a la normalización de la actividad del mismo son numerosos. Una de las teorías que se postulan acerca de la gran relación entre las mutaciones en *TP53* y la aparición de cáncer es que mutaciones en este gen facilitan la formación de agregados de esta proteína. Al utilizar inhibidores en la región concreta de la proteína mutada podemos evitar este proceso, disminuyendo drásticamente la actividad de la misma [109]. Utilizando el péptido ReACp53 (diseñado para la mutación R248Q), se consigue la disolución de estos agregados citoplásmicos, encontrándose la mayor cantidad de proteína en el núcleo. En futuros estudios farmacogenéticos, y dado la influencia de este gen en el desarrollo de la inmensa mayoría de los cánceres diagnosticados, sería

interesante el desarrollo de inhibidores personalizados de este gen en terapias neoadyuvantes.

En cuanto a *MYC*, se ha identificado su sobreexpresión en algunos tumores, ya sean tumores sólidos o líquidos. Se han utilizado diversas moléculas cuya función es inhibir la actividad de este oncogén. Entre ellas, se han diseñado moléculas que impiden la dimerización de *MYC* con *MAX*, y cuya consecuencia es la inhibición de la proliferación celular [110].

Para finalizar este apartado, se ha analizado la supervivencia tanto global como teniendo solo en cuenta la primera recaída en ambas series. En la primera serie se puede apreciar una clara disminución de la supervivencia cuando están alterados los genes *BTK* (figura 12 apartado C), *BCL-10* y *EP300* (figura suplementaria 2). Al analizar la correlación de Pearson cruzando las variables clínicas con las variantes identificadas mediante secuenciación, vemos que las variantes en los genes *BCL-10* y *CREBBP* se correlacionan de manera estadísticamente significativa con la supervivencia global, mientras que *EP300* se correlaciona estadísticamente significativa con la aparición de recaída en el paciente. Si analizamos la supervivencia en la segunda serie encontramos que, pese a que en algunos genes alterados detectamos una tendencia de supervivencia menor, debido al tamaño muestral inferior de la serie, no se han detectado diferencias estadísticamente significativas. En cambio, al analizar la correlación de Pearson como en la serie anterior, podemos apreciar que se correlacionan de manera significativas las variantes en los genes *EP300*, *ABL1*, *LCP1* y *MYC* con supervivencia global.

Destacando que tan solo en el 36% de la primera serie se han identificado variantes asociadas al panel diseñado, y que en la segunda serie se han identificado variantes en el 50% de las muestras analizadas, estas correlaciones entre las variables analizadas nos pueden dar alternativas para futuros ensayos, en los que incluiremos los genes con una frecuencia poblacional elevada, y un valor estadísticamente significativo en cuanto al pronóstico del paciente, con el fin de estandarizar un futuro tratamiento para estos pacientes en los que la terapia ABVD no es la adecuada.

6.2 Origen del tumor o mutaciones iniciadoras en LHc.

Al describir el repertorio de variantes somáticas identificadas en los distintos genes, o en las vías de señalización analizadas, podemos observar que no hay un candidato claro como mutación iniciadora o vía de señalización alterada en un porcentaje elevado de casos, al menos con los genes que hemos secuenciado hasta el momento. Por ello, consideramos que el origen genético de LHc es multifactorial, ya que no hay una vía alterada de forma clara en todos los pacientes estudiados (69 pacientes teniendo en cuenta ambos estudios).

El único gen que, de manera individual, presenta una elevada frecuencia poblacional en ambas series es *EP300*. Este gen se encuentra alterado en el 12.3% de los pacientes seleccionados para el primer estudio, y en un 25% de los tumores primarios pertenecientes a los 12 pacientes seleccionados en el segundo estudio. Cabe destacar que en el primer estudio solo se diseñaron 8 amplicones, que cubrían el 6% del gen. Con este diseño se secuenció la región correspondiente al dominio de acetilación de histonas, en el que se habían identificado variantes en LBCG [92]. Sin embargo, al secuenciar el gen completo en el segundo proyecto, encontramos este dominio intacto, mientras que identificamos mutaciones en otros dominios funcionales. Por ello, creemos que las variantes que podemos localizar en LHc no están localizadas en un dominio concreto, si no que se localizan repartidas a lo largo de todo el gen, afectando de distinta manera a la funcionalidad de la proteína. De igual manera, al analizar solo 8 amplicones, no podemos determinar con exactitud cuál sería la frecuencia poblacional de este gen al secuenciarlo en su totalidad, por lo que este valor en la primera serie podría variar. Una diana a tener en cuenta de este gen es *TP53*, promoviendo su actividad gracias a la acetilación mediada tanto por *EP300* como por *CREBBP*. Esta activación promueve la expresión de sus dianas génicas vía acetilación de la histona H4 [111]. Por ello, la desregulación de estos 3 genes parece tener un papel clave no solo en su actividad de manera individual, sino también en la cascada que pueden generar mediante su efectividad alterada.

Si analizamos los genes recurrentemente alterados en el segundo estudio, un dato a tener en cuenta es que en un 42% de los casos, genes que hemos identificado alterados en el tumor primario repiten la misma situación en la primera recaída, por lo que podemos definir esta tendencia de futuras recaídas hacia una misma alteración comparable. Los genes que presentan alteraciones mantenidas en ambas biopsias forman parte de los grupos mencionados en el apartado anterior, y son *CARD11*, *EP300*, *TP53*, *STAT3* y *SMARCA4*. Podemos diferenciar estos genes atendiendo a en que fracción se encuentran, identificando distintos patrones: *CARD11* y *TP53*, presentes en ambos bloques asociados al mismo paciente, presentan alteraciones únicamente en la fracción positiva de las células; sin embargo, para *STAT3* se han identificado alteraciones en ambas muestras del mismo paciente, pero se diferencian en la fracción CD30 negativa. Debido a este hecho, se puede identificar un patrón de alteración dependiendo del tipo celular analizado.

El último gen incluido en este grupo, *SMARCA4*, no lo habíamos mencionado previamente debido a que su frecuencia poblacional en ambas series no es destacada. Sin embargo, al estar alterado en ambas biopsias del mismo paciente, es un hecho a tener en cuenta. *SMARCA4* codifica para una proteína miembro de la familia SWI/SNF y regula la transcripción de sus dianas génicas alterando la estructura de la cromatina en las inmediaciones de estos genes. La desregulación de esta proteína, debido a alteraciones en la misma, provoca inestabilidad genómica y altera eventos celulares claves en la homeostasis celular. Se han descrito alteraciones en este gen en otros tipos de linfomas, como Linfoma del Manto, Linfoma de Burkitt o LBCG [112, 113]. Este gen se introdujo en el primer panel diseñado debido a la identificación de al menos una variante probablemente patogénica en los antecedentes de esta tesis mencionados previamente.

Si clasificamos los genes en función de las alteraciones encontradas en cada subtipo histológico (figura 17), con el fin de identificar marcadores genéticos asociados a cada fenotipo de LHc, podemos observar que solo los genes *B2M* y *NOTCH1* están asociados a un tipo histológico en concreto (subtipo Esclerosis Nodular), mientras que los demás genes, en función del proyecto en el que estemos, presentan un patrón de

alteración distinto. El único gen en el que hemos identificado alteraciones en los dos estudios realizados en todos los subtipos histológicos es *CSF1R*. La consecuencia de estas alteraciones puede ser la generación de una proteína no funcional, ya que las células HRS presentes en los tres subtipos histológicos no expresan *CSF1R* mediante IHQ [114]. En cuanto a *B2M*, se ha descrito la imposibilidad del reconocimiento de las células HRS mediante los linfocitos T citotóxicos provocado por la presencia de variantes en este gen [21]. Analizando este trabajo vemos que se han descrito variantes en el 70% de los pacientes estudiados, mientras que en nuestro caso, si analizamos las dos series de manera global, se han identificado alteraciones en este gen en el 4% de las muestras analizadas. Esta variación en la frecuencia poblacional de ambas series estudiadas puede deberse a que, como hemos mencionado anteriormente, en nuestro estudio identificamos alteraciones en *B2M* solo en el subtipo histológico esclerosis nodular, y en nuestra serie global la tasa de este subtipo histológico es del 63%. En cuanto al estudio mencionado previamente, los 10 pacientes analizados en ese trabajo presentan el subtipo histológico esclerosis nodular, confirmando que las alteraciones en este gen están asociadas a una histología determinada y que, dependiendo de los criterios de inclusión de cada paciente en el estudio, la frecuencia poblacional asociada a este gen puede variar considerablemente.

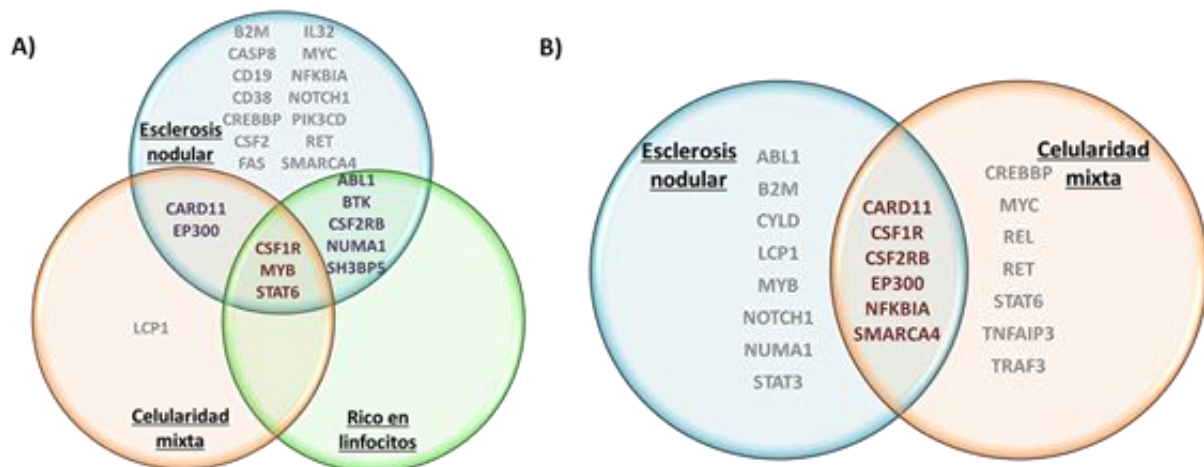


Figura 17: Alteraciones identificadas en función del subtipo histológico. A) Genes alterados en la primera serie, localizados en función del subtipo histológico determinado por el patólogo. B) Genes alterados en la segunda serie, localizados en función del subtipo histológico identificado por el patólogo responsable.

6.3 IHQ asociada a LHC

Para tener una idea global de cómo pueden afectar las alteraciones generadas tanto en las células tumorales HRS como en el microambiente asociado en el ganglio tumoral, se ha analizado mediante IHQ distintos marcadores asociados a los distintos subtipos celulares que interfieren en la supervivencia de las células tumorales. Además, al tener en cuenta el primer estudio, en el que *BTK* tenía una alta tasa de variantes en la serie, se estudió su expresión en las células HRS mediante IHQ, identificando una expresión elevada, relacionándolo una alteración en la funcionalidad de la misma, activando la vía de señalización posterior, favoreciendo fenómenos de proliferación y supervivencia.

En cuanto al microambiente asociado a esta patología, se han analizado marcadores que identifican distintos tipos celulares del microambiente. En la primera serie (tabla suplementaria 3) podemos identificar una correlación negativa entre el marcador PD1 con la supervivencia libre de fallo. Ocurre lo mismo con el marcador CD4 (receptor de linfocito T citotóxico), correlacionado de manera negativa con la supervivencia global y la recaída, por lo que un elevado marcaje de este receptor correlaciona con un menor tiempo de supervivencia previo a la primera recaída o exitus. Esta observación ya ha sido reportada en otros estudios, y tienen una explicación en el escape de las células HRS de la respuesta citotóxica de los linfocitos CD8 positivos, mediada por la presencia de los linfocitos CD4 [115]. Además, queremos destacar que hay una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el porcentaje de células CD4 positivas y PD1 positivas. Debido a este hecho, pensamos en el papel que puede tener Pembrolizumab en diseño de nuevas terapias personalizadas para estos pacientes con una IHQ en concreto [116]. Por último, se describió que el cociente entre el marcador FOXP3 (linfocito T regulador) y GZB (linfocito T citotóxico) tenía un valor pronóstico más robusto que si analizáramos estos dos marcadores por separado. Como se puede observar en la tabla, este cociente presenta una correlación positiva y significativa con el exitus del paciente, validando los resultados obtenidos por otros grupos de investigación [26].

Si analizamos mediante IHQ las biopsias secuenciadas de los pacientes seleccionados para el segundo estudio, se han identificado diversos marcadores que pueden tener relevancia en determinar el pronóstico asociado a estos pacientes. También hay que destacar un parámetro importante que hemos añadido en esta segunda serie, y es la asociación de cualquiera de las variables estudiadas con una tercera recaída del paciente. Pese a que no tenemos datos de esta variable en todos los pacientes, ya que en algún caso se ha perdido el seguimiento, puede ser un factor importante a tener en cuenta, ya que se puede concluir que el protocolo establecido para la segunda línea de tratamiento también ha fallado. Hemos identificado una correlación positiva y estadísticamente significativa de este parámetro en su asociación con EBV. Se ha descrito una asociación entre la infección de este virus y peor pronóstico en pacientes de edad avanzada [117]. Sin embargo, la media de edad de los pacientes incluidos en este segundo estudio es de 40 años, encontrando a la mayoría dentro del rango en el que la prevalencia de esta enfermedad es mayor. Por ello, consideramos este dato como una observación importante a tener en cuenta en futuros estudios en los que se evalúan nuevas terapias para estos pacientes. Recientemente se ha ensayado el compuesto Ganetespib, inhibidor de la chaperona de choque térmico 90 (HSP90), en estudios de inhibición de la viralidad de EBV, mediante la reducción de los niveles de EBNA-1 y LMP-1 en las células infectadas. Estos estudios pueden proporcionar alternativas en las enfermedades asociadas a la infección de este virus, como es el caso de LHc. Se han publicado estudios en otros tipos de cánceres, como en cáncer de pulmón [118] o de hígado [119].

Para terminar, en esta segunda serie se ha identificado una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el marcador de linfocito T GATA-3 y los parámetros de tercera recaída después de la segunda línea de tratamiento y con el exitus del paciente. Pese a que este marcador ya había sido asociado a peor pronóstico en otros tipos de linfomas, como es el caso de linfoma T periférico [28], no se había descrito con una evidencia clara en estudios realizados en LHc destacando, como en el caso anterior, que es un valor que nos puede dar información acerca de la elección de terapia, ya que queda demostrado que en este tipo de pacientes no es la adecuada.

CONCLUSIONES

1. En Linfoma de Hodgkin clásico es posible la identificación, en las células fenotípicamente tumorales, de variantes de baja frecuencia alélica mediante NGS en tejido parafinado. En función de la metodología utilizada para la fijación del tejido y la separación de las células de interés en la biopsia del paciente, la calidad del ADN genómico de partida será variable, por lo que la reproducibilidad de la técnica debe ser ajustada a cada situación experimental.

2. El Linfoma de Hodgkin clásico es un tumor heterogéneo que presenta un origen multifactorial, no habiéndose identificado una firma genética única en la serie de pacientes analizada.

3. El linfoma de Hodgkin clásico tiene una firma genética similar a la identificada en Linfoma B de célula grande, con variantes comunes en los genes *CARD11*, *NFKBIA*, *SMARCA4*, *EP300* o *CREBBP*.

4. Podemos determinar que los genes *BTK* y *EP300* (en los que no se han identificado variantes previamente en LHc) presentan una frecuencia de alteración elevada, por lo que consideramos las variantes en ambos genes como mutaciones iniciadoras en el tumor primario diagnosticado.

5. Se ha identificado un requerimiento de la activación de la vía de señalización mediada por BCR para la supervivencia y viabilidad de las líneas celulares derivadas de LHc.

6. Analizando mediante IHQ se ha corroborado la influencia del marcador PD1 en el pronóstico de pacientes diagnosticados con LHc. Además, otros dos factores estudiados, como es la infección del virus EBV en las células HRS o el aumento del marcador asociado a linfocito T GATA-3, pueden darnos información acerca de la quimiorresistencia en esta enfermedad y probabilidad de recaídas.

7. Una vez analizados los resultados de ambas series, se han identificado posibles alternativas en pacientes refractarios a la primera línea de tratamiento. A partir de estas

Conclusiones

observaciones, se pueden plantear nuevas líneas de investigación enfocadas al establecimiento de nuevas terapias en pacientes refractarios para LHC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Swerdlow, S.H., et al., *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*. Blood. **127**(20): p. 2375-90.
2. Wells, E., *Thomas Hodgkin (1798-1866)*. J Med Biogr.
3. Punnett, A., R.W. Tsang, and D.C. Hodgson, *Hodgkin lymphoma across the age spectrum: epidemiology, therapy, and late effects*. Semin Radiat Oncol. **20**(1): p. 30-44.
4. Brugieres, L. and P. Brice, *Lymphoma in Adolescents and Young Adults*. Prog Tumor Res. **43**: p. 101-14.
5. Schwering, I., et al., *Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1505-12.
6. Brauninger, A., et al., *Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma*. Int J Cancer, 2006. **118**(8): p. 1853-61.
7. Aldinucci, D., et al., *The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape*. J Pathol. **221**(3): p. 248-63.
8. Burns, B.F., T.V. Colby, and R.F. Dorfman, *Differential diagnostic features of nodular L & H Hodgkin's disease, including progressive transformation of germinal centers*. Am J Surg Pathol, 1984. **8**(4): p. 253-61.
9. Sabattini, E., et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview*. Pathologica. **102**(3): p. 83-7.
10. Pileri, S.A., et al., *Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint*. J Clin Pathol, 2002. **55**(3): p. 162-76.
11. Yung, L. and D. Linch, *Hodgkin's lymphoma*. Lancet, 2003. **361**(9361): p. 943-51.
12. Skinnider, B.F. and T.W. Mak, *The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4283-97.
13. Carbone, P.P., et al., *Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification*. Cancer Res, 1971. **31**(11): p. 1860-1.
14. Hasenclever, D. and V. Diehl, *A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease*. N Engl J Med, 1998. **339**(21): p. 1506-14.

15. Horning, S.J., et al., *Stanford V and radiotherapy for locally extensive and advanced Hodgkin's disease: mature results of a prospective clinical trial*. J Clin Oncol, 2002. **20**(3): p. 630-7.
16. Noordijk, E.M., et al., *Combined-modality therapy for clinical stage I or II Hodgkin's lymphoma: long-term results of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer H7 randomized controlled trials*. J Clin Oncol, 2006. **24**(19): p. 3128-35.
17. Guisado-Vasco, P., et al., *Stage IV and age over 45 years are the only prognostic factors of the International Prognostic Score for the outcome of advanced Hodgkin lymphoma in the Spanish Hodgkin Lymphoma Study Group series*. Leuk Lymphoma. **53**(5): p. 812-9.
18. Diefenbach, C.S., et al., *Evaluation of the International Prognostic Score (IPS-7) and a Simpler Prognostic Score (IPS-3) for advanced Hodgkin lymphoma in the modern era*. Br J Haematol. **171**(4): p. 530-8.
19. Sauer, M., et al., *Baseline serum TARC levels predict therapy outcome in patients with Hodgkin lymphoma*. Am J Hematol. **88**(2): p. 113-5.
20. Yamamoto, R., et al., *PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma*. Blood, 2008. **111**(6): p. 3220-4.
21. Reichel, J., et al., *Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. Blood. **125**(7): p. 1061-72.
22. Roemer, M.G., et al., *Classical Hodgkin Lymphoma with Reduced beta2M/MHC Class I Expression Is Associated with Inferior Outcome Independent of 9p24.1 Status*. Cancer Immunol Res. **4**(11): p. 910-916.
23. Annunziata, C.M., et al., *Hodgkin disease: pharmacologic intervention of the CD40-NF kappa B pathway by a protease inhibitor*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2841-8.
24. Greaves, P., et al., *Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is predictive of outcome*. J Clin Oncol. **31**(2): p. 256-62.

25. Oudejans, J.J., et al., *Activated cytotoxic T cells as prognostic marker in Hodgkin's disease*. *Blood*, 1997. **89**(4): p. 1376-82.
26. Kelley, T.W., et al., *The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression*. *Am J Clin Pathol*, 2007. **128**(6): p. 958-65.
27. Stanelle, J., et al., *Mechanisms of aberrant GATA3 expression in classical Hodgkin lymphoma and its consequences for the cytokine profile of Hodgkin and Reed/Sternberg cells*. *Blood*. **116**(20): p. 4202-11.
28. Zhang, W., et al., *GATA3 expression correlates with poor prognosis and tumor-associated macrophage infiltration in peripheral T cell lymphoma*. *Oncotarget*.
29. Manso, R., et al., *C-MYC is related to GATA3 expression and associated with poor prognosis in nodal peripheral T-cell lymphomas*. *Haematologica*. **101**(8): p. e336-8.
30. Greaves, P., et al., *Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells*. *Blood*. **122**(16): p. 2856-63.
31. Nguyen, T.T., et al., *Expression of TIA1 and PAX5 in Classical Hodgkin Lymphoma at Initial Diagnosis May Predict Clinical Outcome*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. **24**(6): p. 383-91.
32. Koreishi, A.F., et al., *The role of cytotoxic and regulatory T cells in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. **18**(3): p. 206-11.
33. Willenbrock, K., et al., *CD8(+) T cells in Hodgkin's disease tumor tissue are a polyclonal population with limited clonal expansion but little evidence of selection by antigen*. *Am J Pathol*, 2000. **157**(1): p. 171-5.
34. Rengstl, B., et al., *Tumor-infiltrating HLA-matched CD4(+) T cells retargeted against Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. *Oncoimmunology*. **5**(6): p. e1160186.
35. Vardhana, S. and A. Younes, *The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints*. *Haematologica*. **101**(7): p. 794-802.
36. Aldinucci, D., et al., *Interactions between tissue fibroblasts in lymph nodes and Hodgkin/Reed-Sternberg cells*. *Leuk Lymphoma*, 2004. **45**(9): p. 1731-9.

37. Molin, D., et al., *Mast cells express functional CD30 ligand and are the predominant CD30L-positive cells in Hodgkin's disease*. Br J Haematol, 2001. **114**(3): p. 616-23.
38. Steidl, C., et al., *Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma*. N Engl J Med. **362**(10): p. 875-85.
39. Chitu, V. and E.R. Stanley, *Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 39-48.
40. Deau, B., et al., *Macrophage, mast cell and T lymphocyte infiltrations are independent predictive biomarkers of primary refractoriness or early relapse in classical Hodgkin lymphoma*. Leuk Lymphoma. **54**(1): p. 41-5.
41. Klein, J.L., et al., *CD163 immunohistochemistry is superior to CD68 in predicting outcome in classical Hodgkin lymphoma*. Am J Clin Pathol. **141**(3): p. 381-7.
42. Barros, M.H., et al., *Macrophage polarization reflects T cell composition of tumor microenvironment in pediatric classical Hodgkin lymphoma and has impact on survival*. plos one. **10**(5): p. e0124531.
43. Sanchez-Espiridion, B., et al., *A molecular risk score based on 4 functional pathways for advanced classical Hodgkin lymphoma*. Blood. **116**(8): p. e12-7.
44. Jurisic, V., et al., *Analysis of CD23 antigen expression in B-chronic lymphocytic leukaemia and its correlation with clinical parameters*. Med Oncol, 2008. **25**(3): p. 315-22.
45. Olteanu, H., et al., *CD23 expression in follicular lymphoma: clinicopathologic correlations*. Am J Clin Pathol. **135**(1): p. 46-53.
46. Nishida, T., et al., *Rat liver canalicular membrane vesicles contain an ATP-dependent bile acid transport system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(15): p. 6590-4.
47. Tudor, C.S., et al., *Macrophages and dendritic cells as actors in the immune reaction of classical Hodgkin lymphoma*. plos one. **9**(12): p. e114345.
48. Leenman, E.E., et al., *[The place of dendritic cells in the microenvironment in Hodgkin's lymphoma]*. Arkh Patol. **72**(2): p. 3-7.
49. Garcia-Cosio, M., et al., *Analysis of Epstein-Barr virus strains and variants in classical Hodgkin's lymphoma by laser microdissection*. Histol Histopathol, 2008. **23**(2): p. 209-17.

50. Levine, P.H., et al., *Evaluation of Epstein-Barr virus antibody patterns and detection of viral markers in the biopsies of patients with Hodgkin's disease*. *Int J Cancer*, 1994. **59**(1): p. 48-50.
51. Montalban, C., et al., *Epstein-Barr virus-latent membrane protein 1 expression has a favorable influence in the outcome of patients with Hodgkin's Disease treated with chemotherapy*. *Leuk Lymphoma*, 2000. **39**(5-6): p. 563-72.
52. Diepstra, A., et al., *Latent Epstein-Barr virus infection of tumor cells in classical Hodgkin's lymphoma predicts adverse outcome in older adult patients*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(23): p. 3815-21.
53. Jarrett, R.F., et al., *Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study*. *Blood*, 2005. **106**(7): p. 2444-51.
54. Arulogun, S., M. Hertzberg, and M.K. Gandhi, *Recent treatment advances in Hodgkin Lymphoma: a concise review*. *Intern Med J*.
55. Schmitz, N., et al., *Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: a randomised trial*. *Lancet*, 2002. **359**(9323): p. 2065-71.
56. Moskowitz, C.H., et al., *Brentuximab vedotin as consolidation therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with Hodgkin's lymphoma at risk of relapse or progression (AETHERA): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. *Lancet*. **385**(9980): p. 1853-62.
57. Younes, A., et al., *Brentuximab vedotin combined with ABVD or AVD for patients with newly diagnosed Hodgkin's lymphoma: a phase 1, open-label, dose-escalation study*. *Lancet Oncol*. **14**(13): p. 1348-56.
58. Ansell, S.M., et al., *PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma*. *N Engl J Med*. **372**(4): p. 311-9.
59. Ansell, S.M., *Nivolumab in the Treatment of Hodgkin Lymphoma*. *Clin Cancer Res*.

60. Wheeler, H.E., et al., *Cancer pharmacogenomics: strategies and challenges*. Nat Rev Genet. **14**(1): p. 23-34.
61. Hamadani, M., S. Balasubramanian, and P.N. Hari, *Ibrutinib in Refractory Classic Hodgkin's Lymphoma*. N Engl J Med. **373**(14): p. 1381-2.
62. Levy, S.E. and R.M. Myers, *Advancements in Next-Generation Sequencing*. Annu Rev Genomics Hum Genet. **17**: p. 95-115.
63. Shen, T., et al., *Clinical applications of next generation sequencing in cancer: from panels, to exomes, to genomes*. Front Genet. **6**: p. 215.
64. Cabannes, E., et al., *Mutations in the IκBa gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IκappaBα*. Oncogene, 1999. **18**(20): p. 3063-70.
65. Emmerich, F., et al., *Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells*. Blood, 1999. **94**(9): p. 3129-34.
66. Jungnickel, B., et al., *Clonal deleterious mutations in the IκappaBα gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma*. J Exp Med, 2000. **191**(2): p. 395-402.
67. Emmerich, F., et al., *Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells*. J Pathol, 2003. **201**(3): p. 413-20.
68. Schmitz, R., et al., *TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma*. J Exp Med, 2009. **206**(5): p. 981-9.
69. Kato, M., et al., *Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas*. Nature, 2009. **459**(7247): p. 712-6.
70. Otto, C., et al., *Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma*. Br J Haematol. **157**(6): p. 702-8.
71. Weniger, M.A., et al., *[Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation]*. Verh Dtsch Ges Pathol, 2006. **90**: p. 210-5.
72. Montesinos-Rongen, M., et al., *Mutation of the p53 gene is not a typical feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease*. Blood, 1999. **94**(5): p. 1755-60.

73. Maggio, E.M., et al., *TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus*. *Int J Cancer*, 2001. **94**(1): p. 60-6.
74. Muschen, M., et al., *Somatic mutations of the CD95 gene in Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. *Cancer Res*, 2000. **60**(20): p. 5640-3.
75. Gunawardana, J., et al., *Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma*. *Nat Genet*. **46**(4): p. 329-35.
76. Rothberg, J.M., et al., *An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing*. *Nature*. **475**(7356): p. 348-52.
77. Liu, L., et al., *Comparison of next-generation sequencing systems*. *J Biomed Biotechnol*. **2012**: p. 251364.
78. Ng, P.C. and S. Henikoff, *Predicting deleterious amino acid substitutions*. *Genome Res*, 2001. **11**(5): p. 863-74.
79. Adzhubei, I.A., et al., *A method and server for predicting damaging missense mutations*. *Nat Methods*. **7**(4): p. 248-9.
80. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
81. Liu, H., et al., *Laser capture microdissection for the investigative pathologist*. *Vet Pathol*. **51**(1): p. 257-69.
82. Thorvaldsdottir, H., J.T. Robinson, and J.P. Mesirov, *Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration*. *Brief Bioinform*. **14**(2): p. 178-92.
83. Duzkale, H., et al., *A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants*. *Clin Genet*. **84**(5): p. 453-63.
84. Choi, Y., et al., *Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels*. *plos one*. **7**(10): p. e46688.
85. Stark, A.L., et al., *Heritable and non-genetic factors as variables of pharmacologic phenotypes in lymphoblastoid cell lines*. *Pharmacogenomics J*. **10**(6): p. 505-12.

- 86.** Beneke, R., et al., *DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to Poly(ADP-ribosylation) but have different requirements for p53*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(18): p. 6695-703.
- 87.** Sanchez-Espiridion, B., et al., *Immunohistochemical markers for tumor associated macrophages and survival in advanced classical Hodgkin's lymphoma*. Haematologica. **97**(7): p. 1080-4.
- 88.** Qi, Y., *Reproducibility of Variant Calls in Replicate Next Generation Sequencing Experiments*. Plos One, 2015.
- 89.** Choi, J., et al., *Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma*. Nat Genet. **47**(9): p. 1011-9.
- 90.** Pasqualucci, L., et al., *Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma*. Nature. **471**(7337): p. 189-95.
- 91.** Morin, R.D., et al., *Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma*. Nature. **476**(7360): p. 298-303.
- 92.** Andersen, C.L., et al., *Somatic mutations of the CREBBP and EP300 genes affect response to histone deacetylase inhibition in malignant DLBCL clones*. Leuk Res Rep. **2**(1): p. 1-3.
- 93.** Rossi, D. and G. Gaidano, *Lymphocytosis and ibrutinib treatment of CLL*. Blood. **123**(12): p. 1772-4.
- 94.** Woyach, J.A., et al., *Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib*. N Engl J Med. **370**(24): p. 2286-94.
- 95.** Leahy, D.J., I. Aukhil, and H.P. Erickson, *2.0 A crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region*. Cell, 1996. **84**(1): p. 155-64.
- 96.** Ritz, O., et al., *Recurrent mutations of the STAT6 DNA binding domain in primary mediastinal B-cell lymphoma*. Blood, 2009. **114**(6): p. 1236-42.
- 97.** Dinh, M., et al., *Activation mechanism and steady state kinetics of Bruton's tyrosine kinase*. J Biol Chem, 2007. **282**(12): p. 8768-76.

- 98.** Nozawa, Y., et al., *Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus negative B-cell lymphoma cell line and successful heterotransplantation*. *Tohoku J Exp Med*, 1988. **156**(4): p. 319-30.
- 99.** Mathews Griner, L.A., et al., *High-throughput combinatorial screening identifies drugs that cooperate with ibrutinib to kill activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **111**(6): p. 2349-54.
- 100.** Chen, G., et al., *Cytosine deamination is a major cause of baseline noise in next-generation sequencing*. *Mol Diagn Ther*. **18**(5): p. 587-93.
- 101.** Hofreiter, M., et al., *DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(23): p. 4793-9.
- 102.** Paramore, A. and S. Frantz, *Bortezomib*. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**(8): p. 611-2.
- 103.** Roschewski, M., L.M. Staudt, and W.H. Wilson, *Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era*. *Nat Rev Clin Oncol*. **11**(1): p. 12-23.
- 104.** Conery, A.R., et al., *Bromodomain inhibition of the transcriptional coactivators CBP/EP300 as a therapeutic strategy to target the IRF4 network in multiple myeloma*. *Elife*. **5**.
- 105.** Bowman, T., et al., *Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(13): p. 7319-24.
- 106.** Pelengaris, S., M. Khan, and G. Evan, *c-MYC: more than just a matter of life and death*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(10): p. 764-76.
- 107.** Buglio, D., et al., *Vorinostat inhibits STAT6-mediated TH2 cytokine and TARC production and induces cell death in Hodgkin lymphoma cell lines*. *Blood*, 2008. **112**(4): p. 1424-33.
- 108.** Furqan, M., et al., *STAT inhibitors for cancer therapy*. *J Hematol Oncol*. **6**: p. 90.
- 109.** Flemming, A., *Cancer: Mutant p53 rescued by aggregation inhibitor*. *Nat Rev Drug Discov*. **15**(2): p. 85.

- 110.** Chen, B.J., et al., *Small molecules targeting c-Myc oncogene: promising anti-cancer therapeutics*. Int J Biol Sci. **10**(10): p. 1084-96.
- 111.** Lunning, M.A. and M.R. Green, *Mutation of chromatin modifiers; an emerging hallmark of germinal center B-cell lymphomas*. Blood Cancer J. **5**: p. e361.
- 112.** Greenough, A. and S.S. Dave, *New clues to the molecular pathogenesis of Burkitt lymphoma revealed through next-generation sequencing*. Curr Opin Hematol. **21**(4): p. 326-32.
- 113.** Zhang, J., et al., *The genomic landscape of mantle cell lymphoma is related to the epigenetically determined chromatin state of normal B cells*. Blood. **123**(19): p. 2988-96.
- 114.** Martin-Moreno, A.M., et al., *CSF1R Protein Expression in Reactive Lymphoid Tissues and Lymphoma: Its Relevance in Classical Hodgkin Lymphoma*. PLoS One. **10**(6): p. e0125203.
- 115.** Alonso-Alvarez, S., et al., *The number of tumor infiltrating T-cell subsets in lymph nodes from patients with Hodgkin lymphoma is associated with the outcome after first line ABVD therapy*. Leuk Lymphoma: p. 1-9.
- 116.** Maly, J. and L. Alinari, *Pembrolizumab in classical Hodgkin's lymphoma*. Eur J Haematol. **97**(3): p. 219-27.
- 117.** Lee, J.H., et al., *Prevalence and prognostic significance of Epstein-Barr virus infection in classical Hodgkin's lymphoma: a meta-analysis*. Arch Med Res. **45**(5): p. 417-31.
- 118.** Gomez-Casal, R., et al., *Radioresistant human lung adenocarcinoma cells that survived multiple fractions of ionizing radiation are sensitive to HSP90 inhibition*. Oncotarget. **6**(42): p. 44306-22.
- 119.** Chettiar, S.T., et al., *Ganetespib radiosensitization for liver cancer therapy*. Cancer Biol Ther. **17**(4): p. 457-66.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Material Suplementario

Vía BCR			Vía DLBCL	Vía NFKB				Vía STAT		Vía TCR		Vía HL	
AKT1	JUN	PIK3CB	ADAM8	AHR	GADD45B	NFKB1	TNFAIP3	BCL2L1	IL6	CBL	MAPK3	TNFRSF5	CENPF
AKT2	KRAS	PIK3CD	AFMID	BAG4	ICAM1	NFKB2	TNFAIP6	IL10	IL6R	CBLB	NCK1	TNFSF5	MAPRE1
AKT3	LPL	PIK3CG	ARID3A	BANK1	ID2	NFKBIA	TNFRSF10A	IL10RA	IL6ST	CBLC	NCK2	CD80	BUB3
B2M	LYN	PIK3R1	BCL6	BATF	IGF1	NFKBIB	TNFRSF10B	IL10RB	IL7	CD247	PAK1	CD86	NBS1
BCL10	MAP2K3	PIK3R2	BCOR	BCL2	IKBKAP	NFKBIE	TNFRSF11A	IL11	IL7R	CD28	PAK2	FUT4	CCNH
BLNK	MAP2K4	PIK3R3	CD1A	BCL2A1	IKKBK	NFKBIL1	TNFRSF11B	IL11RA	IL9	CD3D	PAK3	FUT9	CSE1L
BTK	MAP2K7	PIK3R5	CKAP4	BCL3	IKBKE	NFKBIL2	TNFRSF12A	IL12A	IL9R	CD3E	PAK6	FUT7	NUMA1
CALM1	MAP3K13	PIM2	DGKG	BIRC2	IKBKG	NGFR	TNFRSF13B	IL12B	IRF9	CD3G	PAK7	FUT6	CDC2
CALM2	MAP3K3	PIM3	DUSP5	BIRC3	IL1A	PASK	TNFRSF13C	IL12RB1	JAK1	CD4	PDCD1	CASP8	HMMR
CALM3	MAP3K6	PLCG2	ENPP3	BIRC4	IL1B	PBEF1	TNFRSF14	IL12RB2	JAK2	CD8A	PDK1	CASP3	RSN
CARD11	MAP4K4	PRDM1	ERCC6L	BIRC5	IL1R1	PECAM1	TNFRSF17	IL13	JAK3	CD8B	PLCG1	CASP9	RAMP
CD19	MAPK8	PRKCB	EZH2	BIRC6	IL32	PLEK	TNFRSF18	IL13RA1	LIF	CDC42	PPP3CA	BAX	CCNH
CD22	MCL1	PRKD1	GSG2	BIRC7	IL8	PRKCA	TNFRSF19	IL13RA2	LIFR	CDK4	PPP3CB	BAK1	CDK7
CD27	MS4A1	PRKD3	IGLL1	BLK	IRAK1	PRKCD	TNFRSF1A	IL15	MPL	CSF2	PPP3CC	BID	CCNA2
CD38	MyD88	PTPN1	irak3	CCL2	IRF1	PRKCH	TNFRSF1B	IL15RA	MYC	CSK	PPP3R1	BIK	CDC6
CD5	NAIP	PTPRC	LFNG	CCL22	IRF3	PRKCI	TNFRSF21	IL19	PIAS1	CTLA4	PPP3R2	BCL2L11	CCNE2
CD70	NFAM1	RELT	LPP	CCL3	ITGAL	PRKCZ	TNFRSF25	IL2	PIAS2	DAPP1	PRKCQ	MCL1	CDC2
CD79A	NFAT5	RHOA	MME	CCL4	ITGAM	PTPN3	TNFRSF4	IL20	PIAS3	DOK1	PTEN	BCL2L10	BCCIP
CD79B	NFATC1	SMARCA4	NCF4	CCR4	JUNB	REL	TNFRSF6B	IL20RA	PIAS4	DOK2	PTPN7	BAD	CCNH
CD81	NFATC2	STK40	PECR	CCR7	KLF10	RELA	TNFRSF8	IL21	PIM1	ELK1	RAC1	CSF2RA	CDKN2C
CHP	NFATC2IP	SYK	PFTK1	CD36	LITAF	RELB	TNFRSF9	IL21R	PTPN6	FOS	RAF1	CSF3	H1FO
CHUK	NFATC3	TCL1A	PLTP	CD40	LSP1	RET	TNFSF10	IL22	SOCS1	GRAP2	RASA1	CSF2RB	H2AFX
CR2	NFATC4	TCL1B	PSTPIP2	CD40LG	LTA	RG51	TNFSF11	IL22RA1	SOCS2	GRB2	RASGRP1	CSF3R	HIST1H3D
CYLD	NFKBIZ	TLR2	PTK2	CD44	LTB	RIPK1	TNFSF12	IL22RA2	SOCS3	HRAS	SHC1	CSF1R	DKC
DAPP1	NRAS	TP53	PTPRO	CD82	LTBR	RIPK2	TNFSF13	IL23R	SOCS4	ICOS	SOS1	CSF2	RRM2
GSK3B	OASL	TTRAP	RAB7L1	CD83	MALT1	RIPK3	TNFSF13B	IL26	SOCS5	IFNG	SOS2	CSF1	TYMS
IL17D	PAG1	VAV1	RASL11A	CEP110	MAP3K1	RRAS2	TNFSF14	IL28A	SOCS6	ITK	TCRA	CD274	MLH1
IL1RAP	PAK4	VAV2	RC3H1	CFLAR	MAP3K14	SDC4	TNFSF15	IL28B	STAM	LAT	TCRB	PDCD1LG2	TOP2A
IL27RA	PELI1	VAV3	RRAGB	CRADD	MAP3K4	SELL	TNFSF18	IL28RA	STAM2	LCK	TEC	DNAJA2	GRB2
IL4RA	PIK3C2B	VPREB1	RRAS2	CX3CL1	MAP3K5	SMAD7	TNFSF4	IL29	STAT1	LCP2	UBASH3B	HSPA4	MAPK9
INPP5D	PIK3C3	VPREB3	S100A8	CXCL1	MAP3K7	SMARCA2	TNFSF8	IL2RA	STAT2	MAP2K1	ZAP70	HSP90AA1	MAPK6
IRF4	PIK3CA	WSB2	SERPINA9	CXCL10	MAP3K7IP1	SOD2	TNFSF9	IL2RB	STAT3	MAP4K1	NOTCH1	HSPA9B	SH2D1A
Vía Pathway			SH3BP5	CXCL13	MAP3K7IP2	SPI1	TRADD	IL2RG	STAT4	Otros		AURKA	ALDH1A1
ATM	CDKN2A	MDM2	TOX	CXCL2	MAP3K7IP3	SPIB	TRAF1	IL3	STAT5A	RYBP	MEL18	CENPE	ITGA4
BMI1	CEBPB	RB1	TPD52	CXCL9	MAP3K8	TANK	TRAF2	IL3RA	STAT5B	RNF2	GLI3	MAD2L1	LCP1
CCND1	CHEK1	SUZ12	ZBTB32	CXCR4	MAPK11	TBK1	TRAF3	IL4	STAT6	RING1		BUB1B	LGALS1
CDK6	CHEK2		ZNF185	CXCR7	MAPK12	TLR4	TRAF4	IL5	TSLP				
			ZNF230	FADD	MAPK13	TNF	TRAF5	IL5RA	TYK2				
			KLHL6	FAS	MAPK14	TNFAIP1	TRAF6						
				FYN	MYB	TNFAIP2							

Tabla suplementaria 1: Diseño de 519 genes implicados en activación y diferenciación de linfocito B seleccionados para la secuenciación de 4 casos mediante Illumina Hiseq y tecnología Sure Select.

Material Suplementario

Gen	Muestra	Cromosoma	Posición cromosómica	Cambio nucleotídico	Frecuencia alélica	Cobertura	Tipo de cambio	Cambio de aminoácido	Base de datos COSMIC
EP300	46	chr22	41566451	G>A	3,1	362	SNV	G1443E	Tracto urinario
EP300	67	chr22	41566502	C>T	4,7	1766	SNV	P1460L	
EP300	30	chr22	41566552	G>A	3,2	284	SNV	E1477K	
EP300	42	chr22	41566567	G>A	3,29	547	SNV	D1482N	
EP300	29	chr22	41569639	G>A	3,2	791	SNV	D1544N	Endometrio
EP300	97	chr22	41572281	C>T	4,9	487	SNV	P1604S	
EP300	16	chr22	41572356	G>A	4,02	1070	SNV	A1629T	Intestino
EP300	67	chr22	41572357	C>T	5,2	559	SNV	A1629V	
BTK	18	chrX	100609636	G>A	3	199	SNV	S538F	
BTK	67	chrX	100613298	C>T	5,2	517	SNV	G368R	
BTK	18	chrX	100613683	C>T	3,3	269	SNV	G299E	
BTK	85	chrX	100625027	G>A	3,3	424	SNV	T117I	
BTK	46	chrX	100629565	C>T	4,1	241	SNV	V67M	
BTK	81	chrX	100629576	C>T	3,5	742	SNV	C63Y	
BTK	48	chrX	100629615	C>T	3,18	440	SNV	G50D	
CSF2RB	83	chr22	37325765	G>A	8,3	103	SNV	V212I	
CSF2RB	81	chr22	37325765	G>A	4,1	369	SNV	V212I	
CSF2RB	82	chr22	37325765	G>A	11,5	103	SNV	V212I	
CSF2RB	79	chr22	37325765	G>A	40	153	SNV	V212I	
CSF2RB	29	chr22	37334299	C>T	4,4	720	SNV	Q823*	
CSF2RB	46	chr22	37334369	C>T	4,2	311	SNV	S846F	
CSF2RB	85	chr22	37334375	C>T	4,4	159	SNV	P848L	
STAT6	29	chr12	57492684	C>T	3,3	996	SNV	D653N	Linfoma
STAT6	42	chr12	57493579	G>A	3,02	1028	SNV	T572I	
STAT6	67	chr12	57496194	C>T	4	2851	SNV	G464E	
STAT6	83	chr12	57496654	A>T	6,9	853	SNV	N421K	
STAT6	13	chr12	57496661	T>A	4	3648	SNV	D419V	
STAT6	34	chr12	57496662	C>G	4,7	1710	SNV	D419H	
CARD11	28	chr7	2953029	A>C	5,7	212	SNV	C971G	Endometrio
CARD11	81	chr7	2959028	C>T	3,2	157	SNV	G830S	
CARD11	67	chr7	2962959	C>T	4,2	526	SNV	R650Q	
CARD11	42	chr7	2969639	G>A	4,08	515	SNV	S547F	
CSF1R	16	chr5	149433711	G>A	6,26	655	SNV	S947F	
CSF1R	29	chr5	149435793	C>T	3,9	840	SNV	V811I	
CSF1R	30	chr5	149440433	G>A	5,1	198	SNV	T654I	
CSF1R	82	chr5	149460452	G>A	4,1	122	SNV	S62F	
MYB	29	chr6	135509006	G>A	4,9	103	SNV	G59E	
MYB	97	chr6	135511360	G>A	3,7	163	SNV	W134*	
MYB	16	chr6	135515515	C>T	7,80	487	SNV	P289S	
MYB	35	chr6	135518109	C>T	3,21	1496	SNV	S405L	
ABL1	67	chr9	133738305	G>A	3,6	638	SNV	W254*	Linfoma/Pulmón
ABL1	81	chr9	133738340	A>G	7,6	1836	SNV	K266R	
ABL1	82	chr9	133738340	A>G	7,4	236	SNV	K266R	
B2M	15	chr15	45003746	T>C	2,9	2000	SNV	M1T	
B2M	23	chr15	45007811	C>G	3,7	349	SNV	Y86*	
BCL10	48	chr1	85733585	AATT>-	18,7	1919	Delección	-	
BCL10	29	chr1	85736499	C>T	3,7	216	SNV	E50K	Linfoma
CD19	29	chr16	28950202	C>T	3,6	1092	SNV	S531F	
CD19	29	chr16	28950268	C>T	3	1059	SNV	T553I	
NFKBIA	35	chr14	35871981	G>A	3,57	672	SNV	A211V	
NFKBIA	96	chr14	35872990	G>A	5,4	2844	SNV	A81V	
CASP8	79	chr2	202149992	C>T	9	1102	SNV	T478I	
CD38	97	chr4	15826622	G>A	6,6	136	SNV	G161D	
CREBBP	70	chr16	3781255	C>T	3,3	241	SNV	V1734I	
CSF2	67	chr5	131409526	C>T	3,7	406	SNV	Q4*	
FAS	29	chr10	90774035	G>A	3,8	132	SNV	R306H	
LCP1	16	chr13	46704953	C>T	3,96	1539	SNV	A583T	
MYC	81	chr8	128750632	C>T	4,7	105	SNV	P57S	
NOTCH1	24	chr9	139404248	C>CG	4,18	1291	Inserción	-	
PIK3CD	85	chr1	9775710	G>A	4,7	430	SNV	E85K	Mama
RET	67	chr10	43620335	C>T	36,1	551	SNV	R982C	
SH3BP5	35	chr3	15297639	C>T	4,38	776	SNV	G441E	
SMARCA4	85	chr19	11134230	C>T	3	266	SNV	R1030W	

Tabla suplementaria 2: Resumen de las variantes filtradas en la serie de 57 casos

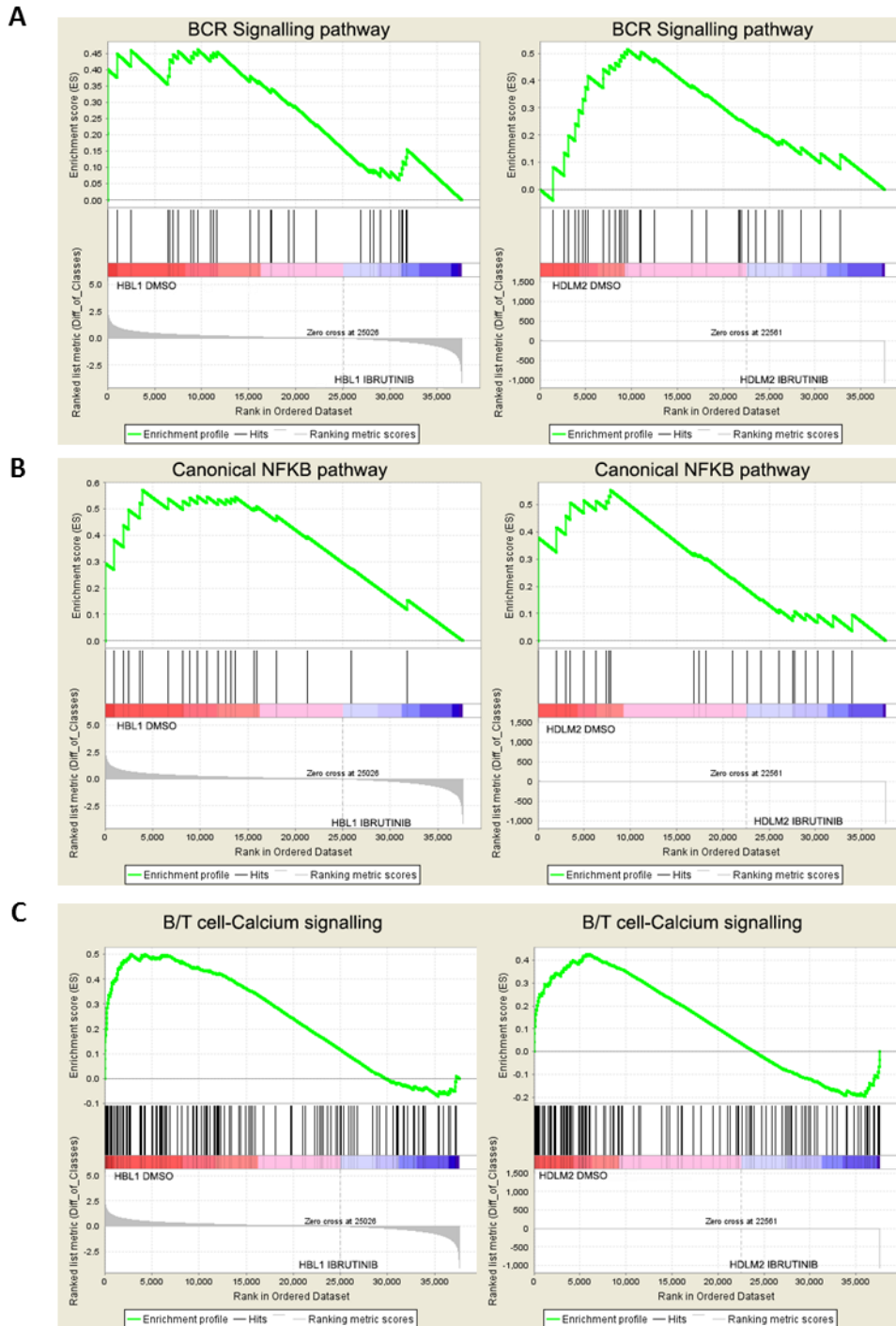


Figura suplementaria 1: Análisis de expresión de ARNm y análisis GSEA en las líneas celulares HBL1 y HDLM2. A) Análisis de la firma de expresión de la vía de señalización del receptor BCR, en condiciones basales (tratamiento con DMSO) y después de la incubación con Ibrutinib. B) Análisis de expresión de la vía de activación de NFKB en las mismas condiciones descritas anteriormente. C) Análisis de la vía de expresión de receptores para células B y T dependiente de calcio. Todos los experimentos revelan una activación basal seguido de una reducción significativa después de la inhibición de BTK (p -valor <0.000 en todos los casos) Todos los experimentos se han realizado por duplicado, encontrando los mismos resultados.

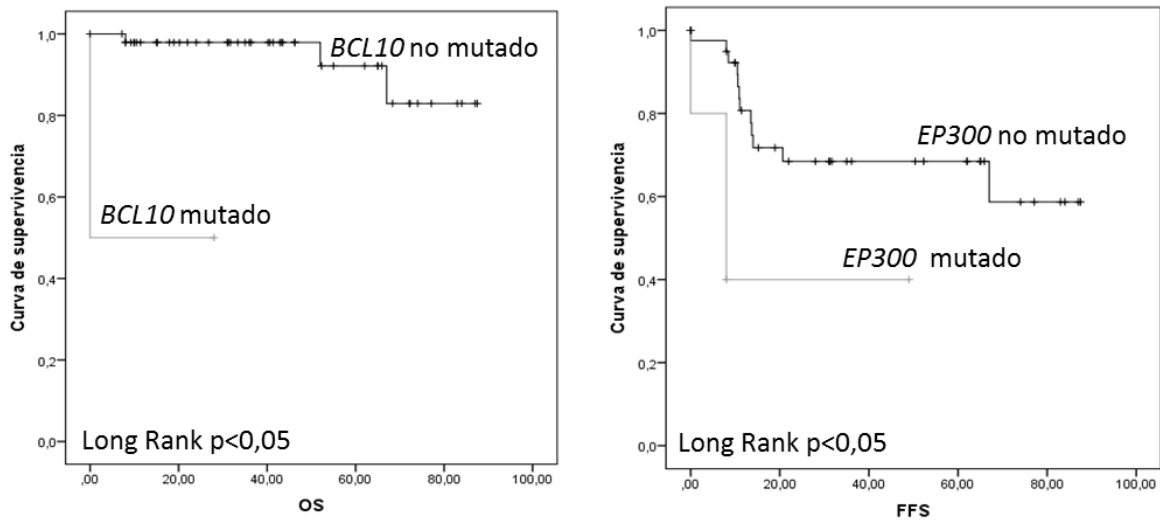


Figura suplementaria 2: Curvas de supervivencia de los genes alterados en la serie. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier que demuestran una mayor supervivencia en los casos en los que no están mutados los genes *BCL10*, *EP300* y *CASP8* (p -valor<0.05), para los parámetros de supervivencia global (OS) y supervivencia libre de fallo (FFS).

Muestra	Cromosoma	Posición cromosómica	Cambio nucleotídico	Frecuencia alélica	Cobertura	Gen	Cambio	Cambio de aminoácido	COSMIC
12B-	chr22	41553257	C>T	18,5	627	EP300	SNV	Q1116*	Linfoma/Intestino
2B+	chr22	41547886	C>T	12,9	171	EP300	SNV	S956F	-
2A+	chr22	41573936	T>C	11,2	160	EP300	SNV	L2074P	Digestivo
2A-	chr22	41572413	C>T	8	627	EP300	SNV	Q1648*	-
3A+	chr22	41574302	G>A	7,9	126	EP300	SNV	G2196E	-
2A-	chr22	41573041	A>C	7,7	298	EP300	SNV	N1776H	-
1A+	chr22	41573041	A>C	5,8	311	EP300	SNV	N1776H	-
2A+	chr22	41573041	A>C	3	885	EP300	SNV	N1776H	-
1B+	chr7	2978383	C>T	12,8	133	CARD11	SNV	R316K	-
4A+	chr7	2978351	G>A	12,2	123	CARD11	SNV	Q327*	-
1A+	chr7	2985542	A>G	11,7	206	CARD11	SNV	V90A	-
4A+	chr7	2977642	C>T	11	136	CARD11	SNV	E348K	-
1B+	chr7	2983941	C>T	7,3	165	CARD11	SNV	V197M	-
1A+	chr7	2968317	G>A	3,2	772	CARD11	SNV	R557C	-
1B+	chr17	7577568	C>T	31,9	367	TP53	SNV	C238Y	Ovario/Endometrio/Digestivo/Esófago/Hígado
6B+	chr17	7577568	C>T	18,7	1064	TP53	SNV	C238Y	Ovario/Endometrio/Digestivo/Esófago/Hígado
3A+	chr17	7577579	G>C	12,6	247	TP53	SNV	Y234*	Linfoma/Hígado/Mama/Digestivo/Ojo
6A+	chr17	7577579	G>C	8,5	528	TP53	SNV	Y234*	Linfoma/Hígado/Mama/Digestivo/Ojo
3A+	chr17	7578268	A>C	6,4	140	TP53	SNV	L194R	Intestino delgado/Estómago/Piel/Esófago/Pulmón
1B+	chr16	3817813	G>A	40,8	222	CREBBP	SNV	P1083L	Linfoma
1B+	chr16	3781305	G>A	11	162	CREBBP	SNV	S1717F	-
11A-	chr16	3781294	T>C	7,5	1050	CREBBP	SNV	M1721V	-
12B-	chr16	3781292	C>T	5,1	415	CREBBP	SNV	M1721I	-
1A+	chr5	149450132	T>C	38,1	428	CSF1R	SNV	H362R	-
6B-	chr5	149440491	T>C	9,3	279	CSF1R	SNV	K635E	-
7A+	chr5	149447806	AGC>-	5	1768	CSF1R	DEL	L531.	Estómago
1A+	chr5	149440443	C>T	4	693	CSF1R	SNV	G651R	Piel
12B-	chr14	35872550	G>A	14,8	1792	NFKBIA	SNV	A118V	-
3A+	chr14	35871233	G>A	8,1	262	NFKBIA	SNV	R314C	-
3A-	chr14	35872541	G>A	3,7	215	NFKBIA	SNV	T121I	-
1A+	chr19	11134254	C>A	11,3	266	SMARCA4	SNV	P1038T	-
1B+	chr19	11134254	C>A	10	1240	SMARCA4	SNV	P1038T	-
7A-	chr19	11134254	C>A	8	281	SMARCA4	SNV	P1038T	-
3B-	chr22	37325765	G>A	10,7	122	CSF2RB	SNV	V212I	-
1B+	chr22	37334416	C>T	9,8	502	CSF2RB	SNV	Q862*	-
7B+	chr6	135518445	C>T	13,6	301	MYB	SNV	P517L	Intestino delgado
8B+	chr6	135524425	C>T	5,4	295	MYB	SNV	T711I	-
8B-	chr9	139396319	T>C	13	339	NOTCH1	SNV	H1840R	-
3A+	chr9	139413157	C>T	4,5	823	NOTCH1	SNV	G329S	-
8B+	chr11	71717267	A>G	31,9	382	NUMA1	SNV	Y1836H	Tracto biliar
5B+	chr11	71727231	C>T	27,3	882	NUMA1	SNV	E440K	Intestino delgado
1B+	chr10	43622048	C>T	10,3	465	RET	SNV	T1022I	-
1A+	chr10	43619120	T>C	3,4	855	RET	SNV	W935R	-
4B-	chr17	40474420	C>A	35	256	STAT3	SNV	D661Y	-
4A-	chr17	40476800	C>T	9,9	161	STAT3	SNV	W510*	-
1B+	chr12	57496258	C>T	10,2	147	STAT6	SNV	A443T	Intestino delgado
1B+	chr12	57492671	G>A	8,9	189	STAT6	SNV	P657L	Intestino delgado
2B+	chr9	133730409	G>A	10,1	109	ABL1	SNV	G178S	-
5B+	chr15	45003808	C>T	12,4	1030	B2M	SNV	Q22*	Linfoma
5B+	chr16	50788275	C>T	18,2	482	CYLD	SNV	L285F	-
2B-	chr13	46721070	G>A	5,2	384	LCP1	SNV	Q383*	-
10A-	chr8	128750605	CAG>-	6,6	420	MYC	DEL	Q48.	-
1B+	chr2	61147736	G>A	5,6	266	REL	SNV	G349D	-
1B+	chr6	138192497	C>T	11,6	129	TNFAIP3	SNV	R45*	Estómago
1B+	chr14	103372023	T>G	6,4	204	TRAF3	SNV	F537V	-

Tabla suplementaria 4: Resumen de las variantes filtradas en la serie de 12 pacientes refractarios diagnosticados con LHc.

APÉNDICE

Publicaciones

Ana M. Martín-Moreno, Giovanna Roncador, Lorena Maestre, Elena Mata, Scherezade Jiménez, Jorge L Martínez-Torrecuadrada, Ana I. Reyes-García, Carmen Rubio, José F. Tomás, Mónica Estévez, Karen Pulford, Miguel A. Piris, Juan Fernando García.

CSF1R Protein Expression in Reactive Lymphoid Tissues and Lymphoma: Its Relevance in Classical Hodgkin Lymphoma.

Plos One. 2015 June 12; 10 (6): e0125203. PubMed PMID: 26066800.

Elena Mata, Antonio Díaz-López, Ana M. Martín-Moreno, Margarita Sánchez-Beato, Ignacio Varela, María J. Mestre, Carlos Santonja, Fernando Burgos, Javier Menárguez, Mónica Estévez, Beatriz Sánchez-Espiridión, Carlos Montalbán, Miguel A. Piris, Juan F. García.

Mutational Landscape of Classic Hodgkin Lymphoma Reveals a Potential Therapeutic Target in BTK Pathway Inhibition

Pendiente de revisión

Capítulo Libro

Martín Moreno Ana M; Mata Gómez Elena; Garcia Garcia JF.

Diagnóstico Biológico del Linfoma de Hodgkin.

En: Aproximación Diagnóstica y Terapéutica del paciente con Linfoma de Hodgkin.

Ed.: GRUPO Aula Médica 2016. ISBN 978-84-7885-585-8.

RESEARCH ARTICLE

CSF1R Protein Expression in Reactive Lymphoid Tissues and Lymphoma: Its Relevance in Classical Hodgkin Lymphoma


Ana M. Martín-Moreno^{1,4}, Giovanna Roncador^{2,4}, Lorena Maestre², Elena Mata¹, Scherezade Jiménez², Jorge L. Martínez-Torrecuadrada³, Ana I. Reyes-García², Carmen Rubio¹, José F. Tomás⁴, Mónica Estévez⁴, Karen Pulford⁵, Miguel A. Piris⁶, Juan F. García^{1*}

1 Pathology Department, MD Anderson Cancer Center, Madrid, Spain, **2** Monoclonal Antibodies Unit, Spanish National Cancer Centre (CNIO), Madrid, Spain, **3** Proteomics Unit, Spanish National Cancer Centre (CNIO), Madrid, Spain, **4** Haematology Department, MD Anderson Cancer Center, Madrid, Spain, **5** Nuffield Division of Clinical Laboratory Sciences, Radcliffe Department of Medicine, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom, **6** Pathology Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

* These authors contributed equally to this work.

* jfgarcia@mdanderson.es



 OPEN ACCESS

Citation: Martín-Moreno AM, Roncador G, Maestre L, Mata E, Jiménez S, Martínez-Torrecuadrada JL, et al. (2015) CSF1R Protein Expression in Reactive Lymphoid Tissues and Lymphoma: Its Relevance in Classical Hodgkin Lymphoma. *PLoS ONE* 10(6): e0125203. doi:10.1371/journal.pone.0125203

Academic Editor: Pankaj K Singh, University of Nebraska Medical Center, UNITED STATES

Received: October 7, 2014

Accepted: March 11, 2015

Published: June 12, 2015

Copyright: © 2015 Martín-Moreno et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias - Ministerio de Ciencia e Innovación (P112/1832), and Spanish Cancer Research Networks—RTICC (RD12/0036/0060), cofunded by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), and the Asociación Española Contra el Cáncer (AECC Scientific Foundation). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Tumour-associated macrophages (TAMs) have been associated with survival in classic Hodgkin lymphoma (cHL) and other lymphoma types. The maturation and differentiation of tissue macrophages depends upon interactions between colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) and its ligands. There remains, however, a lack of consistent information on CSF1R expression in TAMs. A new monoclonal antibody, FER216, was generated to investigate CSF1R protein distribution in formalin fixed tissue samples from 24 reactive lymphoid tissues and 187 different lymphoma types. We also analysed the distribution of CSF1R+, CD68+ and CD163+ macrophages by double immunostaining, and studied the relationship between CSF1R expression and survival in an independent series of 249 cHL patients. CSF1R+ TAMs were less frequent in B-cell lymphocytic leukaemia and lymphoblastic B-cell lymphoma than in diffuse large B-cell lymphoma, peripheral T-cell lymphoma, angioimmunoblastic T-cell lymphoma and cHL. HRS cells in cHL and, with the exception of three cases of anaplastic large cell lymphoma, the neoplastic cells in NHLs, lacked detectable CSF1R protein. A CSF1R+ enriched microenvironment in cHL was associated with shorter survival in an independent series of 249 cHL patients. CSF1R pathway activation was evident in the cHL and inactivation of this pathway could be a potential therapeutic target in cHL cases.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The presence of a characteristic inflammatory microenvironment is a fundamental component of the tumour mass in classical Hodgkin lymphoma (cHL) [1]. In most cases, the neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) cells are in a minority, being greatly outnumbered by non-neoplastic cells such as lymphocytes, macrophages, eosinophils, mast cells, fibroblasts, microvessels and other stromal elements.

In recent years this microenvironment, largely recruited by the HRS cells through the secretion of a variety of chemokines and cytokines, has been shown to play an essential role in pathogenesis [2,3]. It can supply the tumour cells with growth factors, inhibit antitumour immune responses, and in turn be perpetuated by additional factors secreted by other reactive cells. Consistent with this, there have been several reports of the association between specific cell subpopulations of the microenvironment and clinical outcome. For example, increased cytotoxic T cells (Granzyme B+ / TIA1+) [4] and polarized Th2 cells (PD-1+) [5] have been associated with worse outcome and shorter survival. In contrast, an increased number of FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) has been related to better outcome and longer survival [4,6].

Additionally, tumour-associated macrophages (TAMs) have been associated with clinical outcome and survival in cHL. Initial gene expression analyses indicated an association between macrophage signatures and treatment response [4,7,8,9]. Studies using both gene expression and immunohistochemical (IHC) techniques of macrophages have revealed a correlation between decreased TAM frequency and improved clinical outcome [10]. Although several further IHC articles have reported comparable results [11,12], others have found no association and highlighted problems arising from technical heterogeneity [13,14,15]. Variation in macrophage phenotypes, such as M1 and M2 [16] as well as other factors influencing the composition of the microenvironment, such as age and the presence of Epstein-Barr virus (EBV), may affect clinical presentation and outcome [8,12] and represent additional confounding factors.

The functional relevance of the microenvironment and the identification of prognostic biomarkers have also been described in non-Hodgkin lymphomas (NHLs), mainly in follicular lymphoma (FL) [6,17,18,19,20] and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) [6]. The majority of these studies rely on IHC analyses that use specific T-cell or macrophage markers. Despite these advances, there remains a lack of detailed functional descriptions of the interactions between tumour cells and immune elements of the microenvironment.

The maturation and differentiation of tissue macrophages depends upon the activation of tightly regulated pathways. Macrophage colony stimulating factor or colony stimulating factor-1 (CSF1) binds to the high-affinity receptor tyrosine kinase, the cFMS/CSF1 receptor (CSF1R) [21] and is a key cytokine involved in the recruitment and activation of tissue macrophages [22]. Aberrant expression of *CSF1R* mRNA has been described in cHL-derived cell lines using reverse transcription (RT)-PCR and mRNA *in situ* hybridization [23,24]. Since the CSF1/CSF1R pathway could be inhibited by small molecules [25,26] and some *in vitro* studies also suggest that CSF1R could be an interesting therapeutic target for cHL [25], further analyses of the cell elements involved in the pathway are essential.

Despite increasing evidence of the role of TAMs in the lymphoma microenvironment, there is a lack of consistent information about the distribution of the CSF1R protein in normal and neoplastic tissues. Here we describe for the first time, the protein expression and cell distribution of CSF1R using a thoroughly validated new monoclonal antibody (mAb) in a large series of normal lymphoid tissues and major lymphoma types, with particular emphasis on cHL.

Materials and Methods

Production of anti-CSF1R monoclonal antibody

A new anti-CSF1R mAb (clone FER216) was produced by immunizing BALB/c mice with the extracellular domain of CSF1R fused to Fc fragment (ecCSF1R-Fc) prepared using a mammalian cell expression system. Complete details of the various procedures for protein production, purification, mouse immunization, hybridoma production and clone selection are available in [S1 File](#).

An episomal expression system based on Epstein-Barr virus (EBV) components was used for recombinant CSF1R production in mammalian cells (HEK293). To this end, the sequence encoding the extracellular domain of CSF1R (NP_005202.2, residues 1–514) was fused to a C-terminal human IgG1 Fc sequence in a CMV-based pTT3 vector which features the EBV oriP replicator to allow episomal replication of the plasmid within cells. The protein was produced transiently in HEK293-EBNA cells, expressing the EBV nuclear antigen (EBNA). After 5 days post-transfection, secreted CSF1R-Fc was purified from the clarified growth media using a Protein A column (GE Healthcare) connected to an ÄKTA-prime system (GE Healthcare).

Two BALB/c mice were injected intraperitoneally (three times at 14-day intervals) with 100 µg of CSF1R-Fc fusion protein and Complete Freund's adjuvant (Difco).

The specificity of the mAb was confirmed by IHC and western blotting using either cytospin preparations or cell pellets of Fc-tagged human ecCSF1R expressed in HEK293 cells as described in [S1 File](#).

All the experimental procedures involving the use of mice have been done in compliance with the current directives of the Spanish real decree RD53/2013 of February 1 of 2013 that contains the basic guidelines to be applied for the protection of animal used for scientific research and education. All the experimental procedures performed in the present study have been evaluated and approved by the Internal Committee or Animal Care and Use (IACUC) of the CNIO, the external Ethical Committee of the Instituto de Salud Carlos III and the Comunidad Autonoma of Madrid.

The CNIO Animal Facility technicians and the members of the research team have an extended experience in the use of animal models for research and are familiarized with a proper implementation of the experimental work to reduce, refine and replace (RRR) the animal use. Humane endpoint criteria will be applied for animal sacrifice.

Lymphoma samples and cell lines

The CSF1R mAb was initially studied using 24 reactive lymphoid tissue (RLT) samples (lymph nodes, tonsils, bone marrow, thymus, and spleen) and 187 different lymphoma types: 10 cases of B-lymphoblastic lymphomas (B-LBL), 20 B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL), 18 follicular lymphomas (FCL), 20 mantle-cell lymphomas (MCL), 20 diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL), 19 Burkitt lymphomas (BL), 5 mucosa-associated lymphomas (MALT), 8 T-cell lymphoblastic lymphomas (T-LBL), 15 peripheral T-cell lymphomas (PTCL), 15 T-cell angioimmunoblastic lymphomas (AITL), 7 anaplastic large cell lymphomas (ALCL) and 35 cHL.

249 cHL cases were also studied in a tissue microarray (TMA) constructed with duplicate cores from selected areas of each case using a Tissue Arrayer Device (Beecher Instrument, Silver Spring, MD, USA). Clinical data and follow-up details were available for all cases (Table A in [S1 File](#)). All the normal and tumour samples were retrospectively collected from the Biobank of MDACC Madrid, in accordance with the technical and ethical procedures of the Spanish National Tumour Bank Network, including anonymization processes. Approval was obtained

from the institutional review board *Comite Ético de Investigación Clínica* (Ethical Committee of Clinical Research) from Ramon y Cajal Hospital, Madrid, Spain (ref. 354/12) and written informed consent was obtained following the protocol of the Declaration of Helsinki. All the patients had been treated with standard adriamycin-based regimens, mostly ABVD.

Five cHL-derived cell lines (L428, L1236, KMH2, L540 and HDLM2) and the HEK293 cell line (human embryonic kidney) used for transfection were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany).

Immunohistochemistry, double immunoenzymatic, double immunofluorescence and non-isotopic *in situ* hybridization

Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues from normal and tumour samples were included in several TMA blocks. IHC analyses and *in situ* hybridization for the Epstein-Barr virus (EBV) were performed on TMAs using heat-induced epitope retrieval and standard procedures. Antibodies sources and dilution are described in Table B in [S1 File](#). Protein expression was quantified using an automated scan, Chroma Vision Systems- ACIS III (DAKO, Glostrup, Denmark) as previously described [13]. For survival analyses, all IHC markers were categorized as high or low, using the median expression as the cut-off.

The Bond Polymer Refine detection system (Leica Biosystems, Solms, Germany) was used for single and double immunoenzymatic labelling of FFPE tissues, using several normal lymphoid tissues and 10 cases of cHL. Double labelling, using a double immunoperoxidase technique or the immunoperoxidase technique combined with immunofluorescence, was also performed to assess the relationship between CSF1R+, CD68+, CD163+ and CD30+ cells. Complete details of the protocol and antibodies are available in [S1 File](#).

Western blot and Immunoprecipitation and Q-PCR

All detailed methodology is described in [S1 File](#). Briefly, western blot (WB) analyses of CSF1R protein were performed using total protein extracted from normal tissues, cHL tumours and cHL cell lines, lysed in a buffer containing 50 mM Tris (tris (hydroxymethyl) aminomethane)-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Igepal (Sigma Chemical) and protease inhibitors (Roche, Mannheim, Germany). The total lysates of each cell line were denatured by heating in Laemmli sample buffer, resolved on a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose membranes for 2 h. Membranes were incubated overnight with blocking solution (5% milk in PBS) and immunoblotted for 1 h at room temperature with anti-CSF1R (FER216) (diluted 1:10), anti-CSF1R (61701) and α -tubulin monoclonal antibody (1:500) (CNIO), followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (DAKO, Glostrup, Denmark).

For Q-PCR, RNA was extracted from 5 cHL tumor samples and tonsils (frozen tissues), and cHL cell lines, using an RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, Limburg, Netherlands). Gene expression of CSF1R and CSF1 ligand were analyzed by using TagMan gene expression assays (CSF1L Hs00174164_m1; CSF1R Hs00911250_m1) and GUSB as endogenous control. All reactions were performed using a CFX96 thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

In-gel digestion and LC-MS/MS analysis

All methodology is described in [S1 File](#).

Analyses of the phosphorylation status of CSF1R

To demonstrate that the 150 kDa band detected in the cHL cases corresponded to a phosphorylated CSF1R protein we treated two cells extract of cHL cases and two tonsils extracts with lambda protein phosphatase. Detailed methodology is described in [S1 File](#).

Statistical analyses

The overall survival (OS) was estimated by the Kaplan–Meier method and the curves were compared using the log-rank test. Multivariate Cox regression models were used to establish independence.

Relationships between clinical parameters and the IHC variables were examined using either the Spearman test (continuous variables) or the Pearson chi-square test (categorical variables).

Differences were considered to be statistically significant for values of $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS version 17.0.

Results

Specificity of the anti-CSF1R FER216 mAb

IHC and WB studies showed the FER216 mAb recognised an Fc-tagged human ecCSF1R HEK293 transfectants ([Fig 1A and 1B](#)). In addition to the 100 kDa band in the transfectants, antibody FER216 also labelled a band of similar size in tonsil and three cHL cases. FER216 also strongly labelled a 150 kDa protein in the cHL cases ([Fig 1B](#)). Comparable results were obtained using the positive control antibody clone 61701 ([Fig 1B](#)). Sequential IP and WB studies demonstrating that FER216 recognised proteins immunoprecipitated by clone 61701 further confirmed the specificity of FER216 for CSF1R ([Fig 1C](#)). The 150 kDa was absent or very faint in tonsil ([Fig 1C](#)). Both the 100 and 150 kDa protein bands were confirmed as corresponding to CSF1R protein by in-gel digestion and LC-MS/MS analysis, followed by peptide fragmentation and sequencing.

Expression of CSF1R protein in normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's lymphomas

The range of expression of CSF1R in RLT varied considerably between the different functional tissue compartments. The higher frequency of CSF1R+ macrophages was detected in the paracortex of lymph nodes and tonsils, the red pulp of the spleen and the medulla of the thymus ([Fig 2](#), panels A–C). Double labelling studies confirm that while CSF1R was expressed in CD68+ macrophages ([Fig 2D](#)), only a subpopulation of the CSF1R+ cells also expressed CD163 ([Fig 2D](#)). This was more noticeable in the paracortical areas whereas germinal centre macrophages lacked CD163 ([Fig 2E](#)). This result is consistent with previous observations about monocyte differentiation, in which the *CSF1R* gene was not significantly differentially expressed between M1 versus M2 monocyte activation models [27].

The distribution of CSF1R protein in tonsil was also compared, using double immunoenzymatic labelling technique, with other markers of the microenvironment known to be associated with lymphoma pathogenesis, for example, FOXP3, PD-1 and the cytotoxic marker Granzyme B (Table C in [S1 File](#)). These analyses only revealed an association between CSF1R+ macrophages and FOXP3+ Tregs.

The distribution of CSF1R+ cells varied greatly between the different lymphoma types and was restricted to macrophages and other monocytic cells in the microenvironment ([Table 1](#); [Fig 3](#)). Automated quantification measurement showed fewer positive signals in B-CLL and

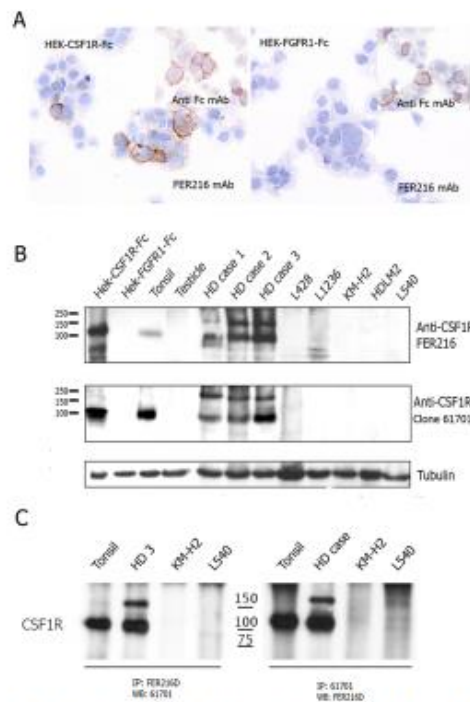


Fig 1. Immunohistochemistry, western blot and immunoprecipitation analyses of CSF1R. (A) IHC staining of antibody FER216 labelled the HEK-CSF1R-Fc transfectants expressing CSF1R but not the negative control HEK-FGFR1-Fc expressing Fc transfectants. The positive anti-Fc mAb control labelled both sets of transfectants. (B) Western blot analyses of CSF1R protein using protein extracts from HEK293 cells transfected with either CSF1R or a closely related protein (FGFR1) as a negative control, normal tissues, cHL tumour samples, and cHL-derived cell lines. Antibody FER216 recognised a band of 100 kDa in tonsil extracts and two bands of 100 and 150 kDa in extract from three cHL biopsies. Comparable results were obtained using the anti-CSF1R mAb clone 61701. The mAb to tubulin was used as the loading control. (C) IP followed by western blotting demonstrated comparable results using either the FER216 or Clone 61701. Both antibodies were able to immunoprecipitate bands of 100 kDa from tonsil and 100 and 150 kDa from a case of cHL.

doi:10.1371/journal.pone.0125203.g001

B- and T-LBL, whereas more signals were identified in the microenvironment of T-cell lymphomas (PTCL, AITL, and ALCL), and cHL. Overall, this result was concordant with the results of manual cell counting (arbitrary cut-offs: fewer than 10%, 10–25%, or more than 25% positive cells; see Table 1). In general, most low-grade lymphomas had fewer CSF1R+ TAMs macrophages in their microenvironment, whereas DLBCL, T-cell lymphomas and cHL had higher CSF1R+ cell counts. Three of the 7 ALCL cases expressed CSF1R protein in some neoplastic cells.

CSF1R expression in cHL

In cHL, CSF1R+ TAMs were most frequent in the nodular sclerosis and mixed cellularity subtypes, with lower frequencies observed in lymphocyte-rich cHL (Table 1, Fig 3). Interestingly, CSF1R+ cells were almost absent from the microenvironment of the two cases of nodular lymphocyte-predominant HL studied.

Detectable CSF1R was either absent or present at negligible levels in the HRS cells (Fig 3). Significant cytoplasmic expression of CSF1R in the HRS cells was only observed in 4 out of 284 cases analysed. This observation is consistent with the results from the WB studies which showed the absence of CSF1R protein in cell lines (Fig 1B). In view of the recent reports describing the expression of CSF1R protein in cell lines [24] and *CSF1R* mRNA in tumour cells of cHL cases [23], double immunoenzymatic and immunofluorescence labelling studies were also performed in cHL tumours (Fig 4A), showing that CD30+ HRS cells lack detectable CSF1R.

To evaluate functional interactions mediated by the receptor, we also compared the levels of CSF1R and CSF1 ligand in cHL cell lines and tumours using Q-PCR. Overall, all cHL cell lines expressed higher levels of *CSF1L* mRNA than *CSF1R* mRNA, in contrast with the whole-tissue sections of the cHL samples, which had higher levels of *CSF1R* mRNA (Figure A in S1 File). This is in agreement with the absence of protein expression observed in all the analysed cell lines (Figure A in S1 File).

The paired t-tests of individual variables were performed to evaluate the relationship between CSF1R+ macrophages and other microenvironment markers. The results are shown in

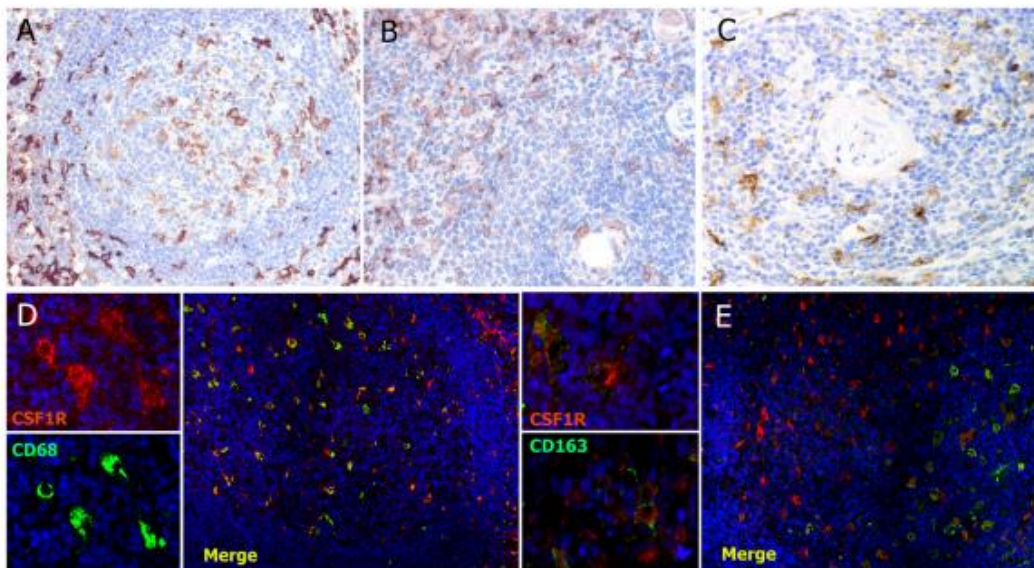


Fig 2. Immunohistochemical expression of CSF1R protein in normal lymphoid tissues. CSF1R+ macrophages (brown) are abundant in the paracortex of the lymph nodes (A), the red pulp of the spleen (B), and the medulla of the thymus (C). Panels D-E, double immunofluorescence experiments in tonsil: CSF1R (red) and CD68 (green) (D) and CSF1R (red) and CD163 (green) (E). It can be seen that while CSF1R+ cells also express CD68 (D), CD163 is limited to only a subpopulation of CSF1R+ cells (E).

doi:10.1371/journal.pone.0125203.g002

Table 1. Distribution of CSF1R immunohistochemical expression in lymphomas.

Diagnosis	N° cases	% Positive cells **	Low (<10%) *		Intermediate (10–25%) *		High (>25%) *	
			N° cases	%	N° cases	%	N° cases	%
Precursor Neoplasms								
Precursor B lymphoblastic lymphoma	10	21.1	4	40,0	3	30,0	3	30,0
Precursor T lymphoblastic lymphoma	8	19.1	2	25,0	3	37,5	3	37,5
Mature B Cell Neoplasms								
Chronic lymphocytic leukemia	20	11.7	10	50,0	7	35,0	3	15,0
Follicular lymphoma	17	29.4	10	58,8	2	11,8	5	29,4
Mantle cell lymphoma	20	38.2	7	35,0	3	15,0	10	50,0
Diffuse large B cell lymphoma	20	50.9	5	25,0	1	5,0	14	70,0
Burkitt lymphoma	19	39.2	6	31,6	5	26,3	8	42,1
MALT lymphoma	5	23.3	2	40,0	1	20,0	2	40,0
Mature T Cell Neoplasms								
Peripheral T cell lymphoma	15	59.2	1	6,7	2	13,3	12	80,0
Angioimmunoblastic T cell lymphoma	14	51.5	1	7,1	5	35,7	8	57,1
Anaplastic large cell lymphoma***	7	42.6	0	0,0	3	42,9	4	57,1
Hodgkin Lymphomas								
Nodular lymphocyte-predominant HL	2	3.4	2	100,0	0	0,0	0	0,0
Lymphocyte-rich classic cHL	9	30.4	2	22,2	5	55,6	2	22,2
Nodular sclerosis cHL	131	47.5	37	28,2	22	16,8	70	53,4
Mixed cellularity cHL	49	39.0	16	32,7	7	14,3	25	51,0
Total Hodgkin Lymphoma	191	39.1	57	29,8	34	17,8	97	50,8

* Manual cell counting.

** Mean of results obtained from automated scanning of protein expression.

*** CSF1R is expressed in the tumour cells in 3/7 cases.

doi:10.1371/journal.pone.0125203.t001

Table C in [S1 File](#). As expected, CSF1R IHC expression was associated with all the other macrophage markers (CD68, CD163, STAT1, and LYZ). Strikingly, CSF1R expression in cHL was also significantly associated with age and EBV status.

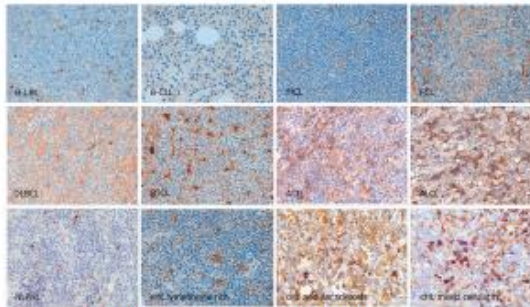


Fig 3. Immunohistochemical detection of CSF1R protein in different lymphoma types. CSF1R+ cells are less abundant in B-CLL and B- and T-LBL, and more frequent in the microenvironment of T-cell lymphomas (PTCL, AITL, and ALCL), and cHL.

doi:10.1371/journal.pone.0125203.g003

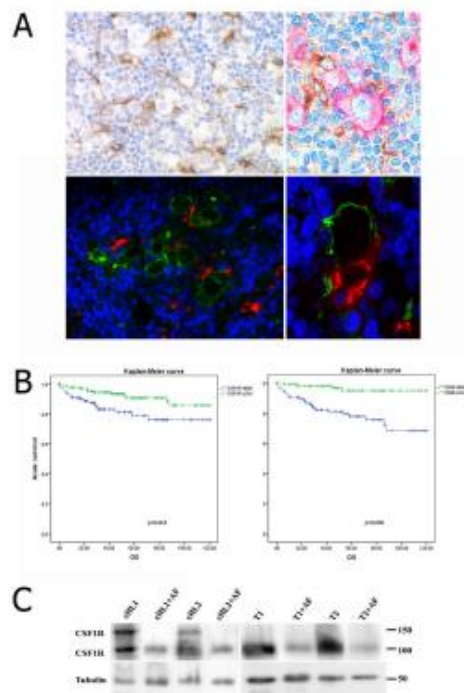


Fig 4. Functional analyses of CSF1R in cHL. (A) Interaction between CSF1R+ macrophages and HRS cells in cHL; above images corresponds to double immunostaining for CSF1R (brown) and CD30 (red), below images corresponds to double immunofluorescence for CSF1R (red) and CD30 (green). While CSF1R protein expression was observed in cells around HRS, CSF1R protein was not detected in the CD30+ HRS cells. (B) Kaplan–Meier analyses of survival for CD68 and CSF1R. (C) Western blot analyses of CSF1R protein before and after removal of phosphatase residues with lambda protein phosphatase (AF) using protein extracts from two nodular sclerosis cHL tumour samples and two tonsils. The 150 kDa protein band present in the cHL samples was lost after lambda protein phosphatase treatment.

doi:10.1371/journal.pone.0125203.g004

Finally, survival analyses showed that CD68 and CSF1R expression were associated with OS (Fig 4B), consistent with previous observations [10,13]. In the multivariate analyses, CD68 expression retained its significant association with OS, but CSF1R did not, using the median of protein expression as a cut-off (Table D in S1 File), further confirming that CSF1R+ cells represent a monocyte/macrophage subpopulation.

CSF1R pathway activation of cHL

It is of particular note that, in most cases, the CSF1R+ TAMs had a close relationship with the neoplastic HRS cells (Fig 4A), suggesting the existence of some interaction mediated by the receptor between these two cell populations. Of interest was the presence of the two CSF1R proteins of 100 and 150 kDa recognized by antibody FER216 in both WB and double IP experiments in cHL cases (Fig 1B and 1C), that could be related to higher levels of receptor activation in the tumour microenvironment than in that of RLT. To test whether the large sized

band in cHL was due to potential phosphorylation, we treated protein extracts from two cHL cases and two tonsils with lambda protein phosphatase prior to western blot. As shown in Fig 4C, this treatment resulted in the removal of the 150 kDa band and supported the phosphorylation of CSF1R.

Discussion

Despite improvements in treatment strategies more than 20–30% of patients with advanced-stage cHL continue to die from progressive disease. It is, therefore, essential to identify new prognostic markers and also improved therapeutic targets. TAMs have been recently proposed to be a factor that predicts survival in cHL [10,28] and FL [12,20]. An important approach to achieving this is the development and use of properly validated antibody reagents that can be used within a routine clinical context. The current study describes one such reagent recognising CSF1R, which could represent an important tool in the future study of cHL and other lymphomas.

TAMs are one of the many types of tumour-associated monocytic cells that have been described which play a role in tumour development. Others include tumour-infiltrating myeloid cells (TIMs), CD11b (ITGAM) (+) TIMs, and CD11b+ myeloid-derived suppressor cells (MDSC) [29,30]. Not only TAMs have been identified as regulators of solid tumour development based on their capacity to enhance the angiogenic, invasive and metastatic programming of neoplastic tissue [31,32] but the tumour cells themselves can attract peripheral macrophages and re-program these cells to become immunosuppressive cells favouring tumour development [33]. Other factors promoting tumour development include endothelial cells which also provide critical signals for the selective growth and differentiation of macrophages from several hematopoietic progenitors [34]. This endothelial niche for the differentiation and functional polarization of M2-like macrophages creates additional bidirectional links between angiogenesis, macrophage recruitment and polarization. Thus the composition of the tumour microenvironment plays a key role in tumour growth.

CSF1, a ligand of CSF1R, is the main cytokine involved in the recruitment, differentiation, and activation of tissue macrophages, and thus plays an essential role in the recruitment of TAMs [21]. Indeed, CSF1 has been implicated in the control of recruitment and polarization of macrophages in several solid cancers [35,36,37]. CSF1 stimulated cells were initially classified as M2-type cells in contrast to the M1-type macrophages differentiating in response to granulocyte/macrophage CSF with their mainly immunoregulatory roles [36]. However, the finding in this study that the CSF1R+ cell population only partially overlapped with the M2-type macrophages detected by CD163 expression is consistent with previous observations about monocyte differentiation, in which the *CSF1R* gene was not significantly differentially expressed between M1 versus M2 monocyte activation models [27]. The second CSF1R ligand, interleukin 34 (IL-34), also regulates macrophage recruitment to tissues but exhibits a different tissue distribution [38]. However, the exact role of the various ligands/receptor interactions of CSF1R pathway in cancer remains to be clarified.

Those cHL patients possessing a high TAM content, identified using CD68 or CSF1R, showed a trend toward reduced progression free survival and a significantly shorter OS in this study. Although other studies have also reported the value of several macrophage-associated antigens, including CD68, CD163 (marker of M2 macrophages), STAT1, and LYZ, as prognostic markers [10,11,12,23], others have described contradictory results. Such variation may reflect differences in techniques [13] as well as the intrinsic functional heterogeneity of the tissue macrophage populations [39]. Such discrepancies make it difficult to standardize methodologies for evaluating TAMs in clinical practice. A more detailed description of macrophage

differentiation and functionalities should help us better understand the pathogenesis of the disease and the biological basis of tumour-macrophage interactions.

No significant CSF1R protein expression was detected in the neoplastic HRS cells of cHLs or in HRS-derived cell lines using IHC, WB, or double IP. This is in accordance with previous reports describing CSF1 (ligand) expression in tumour cells but the receptor, CSF1R, in the surrounding TAM populations [40]. In contrast, a recent report describes some level of CSF1R protein expression in a fraction of HRS cells in cHL [41], but more generalized CSF1R protein expression was associated with the microenvironment, using a polyclonal antibody. Also, the presence of *CSF1R* transcripts have been described in the HRS cells [23,24]. Possible explanations for the differences between our results and those in previous studies include the use of reagents with different specificities and other methodologies as described above.

The results showing the presence of a hyperphosphorylated CSF1R protein in cHL cases highlight the importance of CSF1/CSF1R signalling in the recruitment of TAMs, and the importance of this pathway in the reciprocal crosstalk between tumour HRS cells and the microenvironment. Previous studies have detected anti-tumour activity after disrupting the CSF1/CSF1R signalling pathway, probably as a result of blocking the recruitment and inhibiting the activation of TAMs [42,43]. Indeed, small molecule anti-CSF1R drugs are now being tested in several tumour models [44,45]. Moreover, use of an anti-CSF1R antibody depletes TAMs in animal models and also in human tumours [46], also suggesting therapeutic potential in cancer. Results from the current paper showing evidence of close physical interactions between CSF1R+ TAMs and tumour HRS cells and phosphorylation, and therefore activation, of the CSF1R pathway in cHL tumour tissues provides further evidence of an important role for this pathway in cHL.

In conclusion, the use of a new completely validated mAb able to be used in routine laboratory procedures has enabled the study of CSF1R protein expression in normal lymphoid tissue, a variety of NHLs, and cHL. The expression of CD68 and CSF1R on TAMs was associated with decreased OS in cHL and CSF1R was found to be hyperphosphorylated in cHL. The availability of IHC techniques for detecting CSF1R protein and other members of the CSF1R/CSF pathway in tissues represent potential valuable approaches to identify future biomarkers and also therapeutic targets for high risk cHL.

Supporting Information

S1 File. Contains supplementary materials and results, organized in Tables A-D and Figure A, and supplementary references. Table A in S1 File. Clinical and pathological data of the cHL patients included in the survival analyses. Table B in S1 File. Antibodies used in the study. Table C in S1 File. Relationships between clinical characteristics and immunohistochemical variables. IHC protein expression was quantified using an automated scan, Chroma Vision Systems- ACIS III (DAKO, Glostrup, Denmark), analysing the whole area of representative tissue included in the TMAs. Associations were analysed using the Spearman test (continuous variables) or the Pearson chi-square test (categorical variables). P values are shown, grey boxes indicating significant associations ($p < 0.05$). EXTRANODAL: extranodal disease. IPS: International Prognostic Score. STAGE IV, stage IV disease (according to the Ann Arbor classification). HB: haemoglobin level < 10.5 g/dl. ALB: Serum albumin level < 4 g/dl. LEUK, leucocytosis (leukocyte count $> 15,000/\text{mm}^3$). LYMPH, lymphocytopenia (lymphocyte count $< 600/\text{mm}^3$, or 8% of the leukocyte count, or both). AGE: age 45 years or older. SEX: male. DOD, death from disease. OS, overall survival (months). FFS, failure-free survival (months). OUTCOME, unfavourable versus favourable treatment response (treatment failure of first line therapy versus complete remission without relapse). Table D in S1 File. Multivariate Cox

analyses. Figure A in S1 File. Western blot and Q-PCR analyses of CSF1R. (A) Western blot analyses of CSF1R protein using protein extracts from HEK293 cells transfected with either CSF1R or a closely related protein (FGFR1) as a negative control, normal tissues, cHL tumour samples, and cHL-derived cell lines. Antibody FER216 recognised a band of 100 kDa in tonsil extracts and two bands of 100 and 150 kDa in extracts from three cHL biopsies. The mAb to tubulin was used as the loading control. (B) Q-PCR detection of CSF1R and CSF1R ligand (CSF1L) mRNA from cHL tumour samples, and cHL-derived cell lines (the y-axis represents the normalized relative levels). (DOC)

Acknowledgments

The authors would like to thank the staff of the Spanish National Tumour Bank Network for their help in collecting and managing samples from the different hospitals. The authors express their gratitude to Fernando Garcia-Martinez of the Proteomics Unit of the CNIO for his technical contribution and assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAP JFG KP ME JFT GR. Performed the experiments: AMM-M LM AR EM SJ CR JLM-T. Analyzed the data: JFT AMM-M LM AR EM GR. Contributed reagents/materials/analysis tools: GR JLM-T. Wrote the paper: JFG GR MAP JFT KP ME AMM-M LM AR EM. Produced the monoclonal antibody by: GR.

References

1. Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*. 1996; 184: 1495–1505. PMID: [8879220](#)
2. Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD. Molecular Pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma: Increasing Evidence of the Importance of the Microenvironment. *J Clin Oncol*. 2011; 29:1812–26. doi: [10.1200/JCO.2010.32.8401](#) PMID: [21483001](#)
3. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002; 99: 4283–4297. PMID: [12036854](#)
4. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Bosch R, Garcia JF, Jaén J, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 1467–1473. PMID: [15746048](#)
5. Muenst S, Hoeller S, Dimhofer S, Tzankov A. Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Hum Pathol*. 2009; 40: 1715–1722. doi: [10.1016/j.humpath.2009.03.025](#) PMID: [19695683](#)
6. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dimhofer S. Correlation of high numbers of intra-tumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2008; 93: 193–200. doi: [10.3324/haematol.11702](#) PMID: [18223287](#)
7. Sanchez-Aguilera A, Montalban C, de la Cueva P, Sanchez-Verde L, Morente MM, Garcia-Cosío M, et al. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006; 108: 662–668. PMID: [16551964](#)
8. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, Esterni B, Stamatoullas A, Picquenot JM, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood*. 2009; 113: 2765–3775. doi: [10.1182/blood-2008-07-168096](#) PMID: [19096012](#)
9. Devillard E, Bertucci F, Trempat P, Bouabdallah R, Loriod B, Giaconia A, et al. Gene expression profiling defines molecular subtypes of classical Hodgkin's disease. *Oncogene*. 2002; 21: 3095–3102. PMID: [12082542](#)

10. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010; 362:875–85. doi: [10.1056/NEJMoa0905680](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905680) PMID: [20220182](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20220182/)
11. Jakovic LR, Mihaljevic BS, Perunic Jovanovic MD, Bogdanovic AD, Andjelic BM, Bumbasirevic VZ. The prognostic relevance of tumor associated macrophages in advanced stage classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2011; 52:1913–9. doi: [10.3109/10428194.2011.580026](https://doi.org/10.3109/10428194.2011.580026) PMID: [21663512](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21663512/)
12. Kamper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Honore B, Nyengaard JR, d'Amore F. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2011; 96:269–276. doi: [10.3324/haematol.2010.031542](https://doi.org/10.3324/haematol.2010.031542) PMID: [21071500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21071500/)
13. Sánchez-Espiridión B, Martín-Moreno AM, Montalbán C, Medeiros LJ, Vega F, Younes A, et al. Immunohistochemical markers for tumor associated macrophages and survival in advanced classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2012; 97:1080–1084. doi: [10.3324/haematol.2011.055459](https://doi.org/10.3324/haematol.2011.055459) PMID: [22315492](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22315492/)
14. Azambuja D, Natkunam Y, Biasoli I, Lossos IS, Anderson MW, Morais JC, et al. Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 2012; 23:736–42. doi: [10.1093/annonc/mdr157](https://doi.org/10.1093/annonc/mdr157) PMID: [21602260](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21602260/)
15. Agostinelli C, Gallamini A, Rigacci L, Vitolo U, Stracqualursi L, Piccaluga P, et al. The prognostic value of biologic markers in classical hodgkin lymphoma (CHL) patients. *Ann Oncol*. 2011; 22:153–154.
16. Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer metastasis rev*. 2006; 25:315–322. PMID: [16967326](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16967326/)
17. Alvaro T, Lejeune M, Camacho FI, Salvado MT, Sanchez L, Garcia JF, et al. The presence of STAT1-positive tumor-associated macrophages and their relation to outcome in patients with follicular lymphoma. *Haematologica*. 2006; 91:1605–1612. PMID: [17145596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17145596/)
18. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, Shumansky K, Spinelli JJ, Gill K, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood*. 2005; 106:2169–2174. PMID: [15933054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15933054/)
19. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004; 351:2159–2169. PMID: [15548776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15548776/)
20. Canioni D, Salles G, Mounier N, Brousse N, Keuppens M, Morchhauser F, et al. High numbers of tumor-associated macrophages have an adverse prognostic value that can be circumvented by rituximab in patients with follicular lymphoma enrolled onto the GELA-GOELAMS FL-2000 trial. *J Clin Oncol*. 2008; 26:440–446. PMID: [18086798](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18086798/)
21. Tang R, Beuvon F, Ojeda M, Mosseri V, Poullart P, Scholl S. M-CSF (monocyte colony stimulating factor) and M-CSF receptor expression by breast tumour cells: M-CSF mediated recruitment of tumour infiltrating monocytes?. *J Cell Biochem*. 1992; 50:350–356. PMID: [1334964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1334964/)
22. Pixley FJ, Stanley ER. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol*. 2004; 14:628–638. PMID: [15519652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15519652/)
23. Steidl C, Diepstra A, Lee T, Chan FC, Farinha P, Tan K, et al. Gene expression profiling of microdissected Hodgkin Reed Sternberg cells correlates with treatment outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2012; 120:3530–40. doi: [10.1182/blood-2012-06-439570](https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-439570) PMID: [22955918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22955918/)
24. Lamprecht B, Walter K, Kreher S, Kumar R, Hummel M, Lenze D, et al. Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. *Nat Med*. 2010; 16:571, 579. doi: [10.1038/nm.2129](https://doi.org/10.1038/nm.2129) PMID: [20436485](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20436485/)
25. Ullrich K, Wurster KD, Lamprecht B, Köchert K, Engert A, Dörken B, et al. BAY 43-9006/Sorafenib blocks CSF1R activity and induces apoptosis in various classical Hodgkin lymphoma cell lines. *Br J Haematol*. 2011; 155:398–402. doi: [10.1111/j.1365-2141.2011.08685.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08685.x) PMID: [21517818](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21517818/)
26. Madan B, Goh KC, Hart S, William AD, Jayaraman R, Ethirajulu K, et al. SB1578, a novel inhibitor of JAK2, FLT3, and c-Fms for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2012; 189:4123–4134. doi: [10.4049/jimmunol.1200675](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200675) PMID: [22962687](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22962687/)
27. Domínguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Pérez-Maceda B, Gómez-Aguado F, Corcuera MT, et al. Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin expression on M2-polarized and tumor-associated macrophages is macrophage-CSF dependent and enhanced by tumor-derived IL-6 and IL-10. *J Immunol*. 2011; 186:2192–2200. doi: [10.4049/jimmunol.1000475](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000475) PMID: [21239715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21239715/)
28. Tan KL, Scott DW, Hong F, Kahl BS, Fisher RI, Bartlett NL, et al. Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classical Hodgkin lymphoma: a correlative study from the E2496 Intergroup trial. *Blood*. 2012; 120:3280–7. doi: [10.1182/blood-2012-04-421057](https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-421057) PMID: [22948049](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22948049/)

29. Xu J, Escamilla J, Mok S, David J, Priceman S, West B, et al. CSF1R signaling blockade stanches tumor-infiltrating myeloid cells and improves the efficacy of radiotherapy in prostate cancer. *Cancer Res.* 2013; 73: 2782–2794. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-12-3981](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3981) PMID: [23416320](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23416320/)
30. He H, Xu J, Warren CM, Duan D, Li X, Wu L, et al. Endothelial cells provide an instructive niche for the differentiation and functional polarization of M2-like macrophages. *Blood.* 2012; 120: 3152–3162. doi: [10.1182/blood-2012-04-422758](https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-422758) PMID: [22919031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22919031/)
31. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 259–270. doi: [10.1038/nri2528](https://doi.org/10.1038/nri2528) PMID: [19262852](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19262852/)
32. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010; 141: 39–51. doi: [10.1016/j.cell.2010.03.014](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014) PMID: [20371344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20371344/)
33. Lamagna C, Aurrand-Lions M, Imhof BA. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 2006; 80: 705–713. PMID: [16864600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16864600/)
34. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013; 19: 1423–1437. doi: [10.1038/nm.3394](https://doi.org/10.1038/nm.3394) PMID: [24202395](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24202395/)
35. Sielska M, Przanowski P, Wylot B, Gabrusiewicz K, Maleszewska M, Kijewska M, et al. Distinct roles of CSF family cytokines in macrophage infiltration and activation in glioma progression and injury response. *J Pathol.* 2013; 230:310–21. doi: [10.1002/path.4192](https://doi.org/10.1002/path.4192) PMID: [23520016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23520016/)
36. Espinosa I, Edris B, Lee CH, Cheng HW, Gilks CB, Wang Y, et al. CSF1 expression in nongynecological leiomyosarcoma is associated with increased tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* 2011; 179: 2100–2107. doi: [10.1016/j.ajpath.2011.06.021](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.06.021) PMID: [21854753](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21854753/)
37. Espinosa I, Beck AH, Lee CH, Zhu S, Montgomery KD, Marinelli RJ, et al. Coordinate expression of colony-stimulating factor-1 and colony-stimulating factor-1-related proteins is associated with poor prognosis in gynecological and nongynecological leiomyosarcoma. *Am J Pathol.* 2009; 174: 2347–2356. doi: [10.2353/ajpath.2009.081037](https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.081037) PMID: [19443701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19443701/)
38. Wei S, Nandi S, Chitu V, Yeung YG, Yu W, Huang M, et al. Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J Leukoc Biol.* 2010; 88: 495–505. doi: [10.1189/jlb.1209822](https://doi.org/10.1189/jlb.1209822) PMID: [20504948](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20504948/)
39. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006; 66: 605–612. PMID: [16423985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16423985/)
40. Hsu PL, Lin YC, Hsu SM. Expression of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in two Hodgkin's Reed-Stenberg (H-RS) cell lines, HDLM-1 and KM-H2, and in H-RS cells in tissues. *Int J Hematol.* 1991; 54: 315–326. PMID: [1838015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1838015/)
41. Koh YW, Park C, Yoon DH, Suh C, Huh J. CSF-1R expression in tumor-associated macrophages is associated with worse prognosis in classical Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2014; 141: 573–583. doi: [10.1309/AJCPB92TDDFARISU](https://doi.org/10.1309/AJCPB92TDDFARISU) PMID: [24619759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24619759/)
42. MacDonald KP, Palmer JS, Cronau S, Seppanen E, Olver S, Raffelt NC, et al. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood.* 2010; 116: 3955–3963. doi: [10.1182/blood-2010-02-266296](https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-266296) PMID: [20682855](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20682855/)
43. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res.* 2004; 64: 7022–7029. PMID: [15466195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15466195/)
44. Mitchem JB, Brennan DJ, Knolhoff BL, Belt BA, Zhu Y, Sanford DE, et al. Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res.* 2013; 73: 1128–1141. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-12-2731](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2731) PMID: [23221383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23221383/)
45. Manthey CL, Johnson DL, Illig CR, Tuman RW, Zhou Z, Baker JF, et al. JNJ-28312141, a novel orally active colony-stimulating factor-1 receptor/FMS-related receptor tyrosine kinase-3 receptor tyrosine kinase inhibitor with potential utility in solid tumors, bone metastases, and acute myeloid leukemia. *Mol Cancer Ther.* 2009; 8: 3151–3161. doi: [10.1158/1535-7163.MCT-09-0255](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0255) PMID: [19887542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19887542/)
46. Ries CH, Cannarile MA, Hoves S, Benz J, Wartha K, Runza V, et al. Targeting Tumor-Associated Macrophages with Anti-CSF-1R Antibody Reveals a Strategy for Cancer Therapy. *Cancer Cell.* 2014; 25: 846–859. doi: [10.1016/j.ccr.2014.05.016](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.016) PMID: [24898549](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24898549/)