

República Dominicana  
Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Escuela de Medicina  
Hospital Dr. Salvador Bienvenido Gautier  
Residencia de Hematología Clínica

PERFIL INMUNOFENOTÍPICO DE LOS SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS  
CRÓNICOS EN EL HOSPITAL DOCTOR SALVADOR BIENVENIDO GAUTIER,  
2005- 2012.



Tesis de pos grado para optar por el título de especialista en:  
**HEMATOLOGÍA CLÍNICA**

Sustentante:

Dra. Martha Noemí Pérez Blan

Asesores:

Dra. Ana Nadal Ponce

Dra. Emidalis Romero

Los conceptos emitidos en la presente tesis de pos grado son de la exclusiva responsabilidad de la sustentante de la misma.

Distrito Nacional: 2013

## CONTENIDO

Dedicatorias

Resumen

Abstract

I. Introducción. . . . .	9
I.1. Antecedentes. . . . .	10
I.2. Justificación. . . . .	11
II. Planteamiento del Problema. . . . .	14
III. Objetivos. . . . .	15
III.1. General. . . . .	15
III.2. Específicos. . . . .	15
IV. Marco Teórico. . . . .	16
IV.1. Maduración linfoide. . . . .	16
IV.1.1. Características. . . . .	16
IV.1.1.1. Linfocitos B. . . . .	16
IV.1.1.2. Linfocitos T. . . . .	18
IV.1.1.3. Células NK. . . . .	19
IV.2. Síndrome linfoproliferativo crónico. . . . .	20
IV.2.1. Definición. . . . .	20
IV.2.2. Epidemiología. . . . .	20
IV.2.3. Etiología. . . . .	20
IV.3. Linfomagésnes. . . . .	22
IV.3.1. Estadiaje y estatificación del riesgo. . . . .	26
IV.3.2. Sistema de clasificación de Rai. . . . .	27
IV.3.3. Estatificación de Binet. . . . .	27
IV.4. Rastreo diagnóstico de clonalidad linfoide en SLPC. . . . .	28
IV.4.1. Rastreo de la clonalidad de células B. . . . .	28
IV.4.2. Rastreo de clonalidad T en el diagnóstico de SLPC. . . . .	30
IV.4.3. Rastreo de clonalidad NK en el diagnóstico de Síndrome linfoproliferativos crónicos. . . . .	31
IV.4.4. Clasificación de los síndromes linfoproliferativos crónicos. . . . .	32

IV.5. Características inmunofenotípicas de los síndromes linfoproliferativos	
Crónicos. . . . .	34
IV.5.1. Características inmunofenotípicas de los SLPC-B primariamente	
Leucémicos. . . . .	26
IV.5.1.1. Leucemia linfática crónica B y linfoma linfocítico de	
células B pequeñas (LLC-B/ LLCBP). . . . .	37
IV.5.1.2. Leucemia prolinfocítica B (LPL-B). . . . .	38
IV.5.1.3. Tricoleucemia (TL). . . . .	39
IV.5.2. Características inmunofenotípicas de los linfomas no	
Hodgkinianos B (LNHB) con expresión periférica. . . . .	40
IV.5.2.1. Linfoma de células del manto (LCM). . . . .	41
IV.5.2.2. Linfoma folicular (LF). . . . .	42
IV.5.2.3. Linfoma B difuso de célula grande (LBDCG). . . . .	43
IV.5.2.4. Linfoma de Burkitt (LB). . . . .	44
IV.5.2.5. Linfoma de la zona marginal esplénica y nodal,. . . . .	45
IV.5.2.6. Linfoma de la zona marginal extranodal del tejido	
Linfoide asociado a mucosas. . . . .	45
IV.5.2.7. Linfoma linfoplasmocítico y macroglobulinemia. . . . .	46
IV.5.2.8. Ganmapatías monoclonales y mieloma múltiple. . . . .	47
IV.5.3. Características fenotípicas de los SLPC-T y SLPC-NK. . . . .	47
IV.5.3.1. Leucemia prolinfocítica T. . . . .	48
IV.5.3.2. Leucemia/linfoma T del adulto. . . . .	48
IV.5.3.3. Leucemia de linfocitos T grandes granulares. . . . .	48
IV.5.3.4. Síndrome de Sézary y micosis fungoide. . . . .	50
IV.5.3.5. Linfoma T angioinmunoblástico. . . . .	50
IV.5.3.6. Linfoma T periférico NOS. . . . .	51
IV.5.3.7. Linfoma T hepatoesplénico. . . . .	51
IV.5.3.8. Linfoma T subcutáneo tipo paniculítico. . . . .	52
IV.5.3.9. Linfoma T/NK extranodal tipo nasal. . . . .	52
IV.5.3.10. Linfoma T asociado a enteropatía. . . . .	52
IV.5.3.11. Linfoma T anaplásico de células grandes, ALK+. . . . .	53

IV.5.3.12. Linfoma T anaplásico de células grandes ALK- . . . . .	53
IV.5.3.13. Síndrome linfoproliferativo crónico de células NK. . . . .	53
IV.5.3.14. Leucemia agresiva de células NK. . . . .	54
V. Hipótesis. . . . .	56
VI. Operacionalización de las variables . . . . .	57
VII. Material y Método. . . . .	58
VII.1. Tipo de estudio . . . . .	58
VII.2. Ubicación. . . . .	58
VII.3. Población y muestra. . . . .	59
VII.4. Criterios de inclusión . . . . .	59
VII.5. Criterios de exclusión . . . . .	59
VII.6. Instrumento de recolección de datos . . . . .	59
VII.7. Procedimientos. . . . .	59
VII.8. Tabulación y análisis . . . . .	59
VII.9. Presentación de los datos. . . . .	60
VII.10. Aspecto ético . . . . .	60
VIII. Resultados . . . . .	61
IX. Discusión. . . . .	69
X. Conclusiones . . . . .	72
XI. Recomendaciones . . . . .	74
XII. Referencias. . . . .	75
XIII. Anexos . . . . .	83
XIII.1. Cronograma. . . . .	83
XIII.2. Instrumento de recolección de los datos . . . . .	84
XIII.3. Costos y recursos. . . . .	85
XIII.4. Evaluación . . . . .	86

## **DEDICATORIAS.**

A mi Dios

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre Ramona.

Por haberme apoyado siempre, por sus consejos, sus valores, por la motivación que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su paciencia y amor.

A mi padre José Antonio.

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan, por su ayuda económica, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.  
A mis hermanos.

A mi hermana Darilina.

Por apoyarme en cada momento de mi vida y a la cual amo mucho; mis hermanos Nairobi, Henry y Ricardo por su ayuda y gran apoyo y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

A mis asesores

A la Dra Emidalis Romero y Dr. Rubén Darío Pimentel por su gran apoyo y motivación, por su paciencia y por impulsar el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeras de residencia, las cuales a pesar de nuestras diferencias complementaron este largo camino.

No puedo dejar de mencionar al maestro Castillo Vargas por su gran apoyo durante mi larga estancia en el Instituto Dominicano de seguros Sociales.

## RESUMEN.

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal con recolección retrospectiva de datos, con el objetivo de determinar el perfil inmunofenotípico de los síndromes proliferativos crónicos en el Hospital Doctor Salvador Bienvenido Gautier, 2005-2012. En lo respecta a la edad, el 23.7 por ciento de los pacientes con Inmunofenotipo B tenían edades entre 60-69 años; el 3.6 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipo T tenían edades entre 20-29 y 60-69 años; y el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipo NK tenían edades entre 20-29 años. En cuanto al sexo de los pacientes, el 61.8 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipo B pertenecen al sexo masculino; el 7.3 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipo T pertenecen al sexo masculino; y el 1.8 por ciento de los pacientes con Inmunofenotipo NK pertenecen al sexo femenino. El 85.5 por ciento de los pacientes pertenecen al Inmunofenotipo B; el 12.7 por ciento de los pacientes pertenecen al Inmunofenotipo T; y el 1.8 por ciento de los pacientes pertenecen al Inmunofenotipo NK. En cuanto al estadio clínico de los pacientes, el 30.9 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipos B estaban en estadio clínico grado 4; el 5.5 por ciento de los pacientes que presentaron inmunofenotipo T estaban en el estadio 4; y el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron inmunofenotipo NK se encontraban en el estadio 4. En lo que respecta a los marcadores B, el 41.8 por ciento de los pacientes que presentaron leucemia linfática crónica en los marcadores B son de CD20; el 5.5 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma folicular en los marcadores B se encuentran en el CD20, CD45, CD79 a, BCL2; el 5.5 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma malt en los marcadores B se encuentran en el CD20; el 3.6 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma de la zona marginal en los marcadores B se encuentran en el CD19, CD20, CD45, CD7; el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma Burkitt en los marcadores B se encuentran en el CD10, CD20, CD45, CD79; el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Linfomas de células manto en los marcadores B se encuentran en el CD5, CD19, CD38, CD43, CD45; y el 20.0 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma difuso de células grandes en los marcadores B se encuentran en el CD20. En cuanto a los

marcadores T/NK, el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma linfoblástico en los marcadores T/NK se encuentran en CD3, CD10, CD45; el 5.5 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma de células periféricas en los marcadores T/NK se encuentran en el CD3, CD45; el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Leucemia de linfocitos T granulares grandes en los marcadores T/NK se encuentran en el CD2 CD5, CD7, CD8, CD16, CD45, CD56, CD71, Alfa/Beta y el TKR; el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Micosis fungoides en los marcadores T/NK se encuentran en el CD2, CD3, CD4, CD5 y el CD45; el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Leucemia prolinfocítica crónica T en los marcadores T/NK se encuentran en el CD2, CD3, CD38 y el CD45; el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron NK Nasal en los T/NK se encuentran en el CD3, CD5, CD45, CD70 y el CD56.

**Palabra clave:** Síndrome Linfoproliferativo crónico, perfil Inmunofenotípico

## **ABSTRACT.**

We realized a cross-sectional descriptive research with retrospective data collection, in order to determine the immunophenotypic profile of chronic proliferative syndromes in the Hospital Doctor Salvador Bienvenido Gautier, 2005-2012. In terms of age, 23.7 percent of patients with B immunophenotype were 60-69 years old; 3.6 percent with T immunophenotype were 20-29 and 60-69 years old; and 1.8 percent with NK Immunophenotype were 20-29 years old. As for patients' sex, 61.8 percent who had Immunophenotype B were males, and 7.3 percent with T immunophenotype were males too, and 1.8 percent of patients with Immunophenotype NK were female. 85.5 percent belong to Immunophenotype B, 12.7 percent belong to Immunophenotyping T, and 1.8 percent belong to Immunophenotyping NK. Regarding the clinical stage of patients, 30.9 percent who had B immunophenotypes were at stage clinical grade 4; 5.5 percent with T immunophenotype were in stage 4; and 1.8 percent with NK immunophenotype were in stage 4. In respect to the markers B, 41.8 percent with chronic lymphocytic leukemia are B markers CD20; 5.5 percent with follicular lymphoma B markers are in the CD20 CD45, CD79 a, BCL2; 5.5 percent with lymphoma B malt in markers found in CD20; 3.6 percent with marginal zone lymphoma in markers B are in the CD19, CD20, CD45, CD7; 1.8 percent with Burkitt lymphoma B markers are on the CD10, CD20, CD45, CD7; 1.8 percent with mantle cell lymphoma in B markers are in CD5, CD19, CD38, CD43, CD45; 20.0 percent with diffuse large cell lymphoma in B markers found in CD20. As for the markers T / NK, 1.8 percent of patients had lymphoblastic lymphoma in markers T / NK are in CD3, CD10, CD45; 5.5 percent presented peripheral cell lymphoma in markers T / NK found in CD3, CD45; 1.8 percent with T-cell leukemia granulares large markers T / NK CD2 are in CD5, CD7, CD8, CD16, CD45, CD56, CD71, Alpha / Beta and TKR; 1.8 percent who had mycosis fungicides in markers T / NK found on CD2, CD3, CD4, CD5 and CD45; 1.8 percent who had chronic leukemia T prolinfoatica markers NK / T are in the CD2, CD3, CD38 and CD45; 1.8 percent with the T Nasal NK / NK found in CD3, CD5, CD45, CD70 and CD56.

**Key Word:** Chronic Lymphoproliferative Syndrome, profile Inmunofentipico



## I. INTRODUCCIÓN.

Los linfocitos son células del sistema inmune de origen hematopoyético, encargadas de reconocer y responder de forma específica y adaptada frente a distintos agentes extraños e inducir tolerancia frente a estructuras propias. En términos generales, dentro de los linfocitos se engloban dos grandes grupos dependiendo de su origen y función: los linfocitos T y los linfocitos B. Además, existe un tercer grupo de células de aspecto linfoide que comparten algunos mecanismos efectores de la respuesta inmune con los linfocitos T, las células *natural killer* (NK).

El término de síndromes linfoproliferativos crónicos engloba un grupo heterogéneo y amplio de hemopatías linfoides malignas, que se originan a partir de la expansión clonal de células B de aspecto maduro, o natural killer bloqueadas en estadios relativamente avanzados de diferenciación. Se originan en el tejido linfoide tanto central como periférico presentando diversas variedades morfológicas, inmunológicas, genéticas y clínicas. Estas características representan la expresión de la variedad citológica y de la diversidad de la función inmune que corresponde a las estructuras linfoides.

Tradicionalmente, el diagnóstico de los SLPC-B se fundamenta casi de forma exclusiva en técnicas citomorfológicas e histopatológicas convencionales, en conjunto información clínica obtenida de la anamnesis y exploración física del paciente. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que por sí solas, estas técnicas tienen una especificidad y sensibilidad limitadas, tanto al momento de detectar la presencia de enfermedad como de definir el subtipo diagnóstico concreto de la misma. Debido a esta situación, en los últimos años se han incorporado las técnicas inmunofenotípicas, genéticas y moleculares para el diagnóstico certero y clasificación de los síndromes linfoproliferativos propuesto la OMS.<sup>1</sup>

Desde el punto de vista fenotípico y de acuerdo con su origen, los SLPC se clasifican en SLPC-B, T y NK. No obstante, en la clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS),<sup>1</sup> los SLPC-T y NK se consideran frecuentemente de forma conjunta, debido a que algunos subtipos de SLPC-T y NK presentan características clínicas, morfológicas y evolutivas similares, independientemente de la naturaleza de la célula expandida, y claramente diferentes

de las neoplasias de linfocitos B maduros. Desde el punto de vista práctico, los SLPC B presentan una incidencia claramente superior a la de los SLPC-T, siendo raros los casos de SLPC-NK. Así, según diferentes autores, los SLPC-B representan más de 90-95 por ciento de todas las enfermedades linfoproliferativas crónicas de naturaleza neoplásica. Así mismo, merece destacar que los SLPC-B son un amplio grupo de entidades diferentes, clínica y biológicamente bien definidas, mientras que el número de SLPC-T y NK es significativamente más reducido.<sup>1</sup>

### I.1. Antecedentes.

Sánchez Segura Miriam, Rivero Jiménez René et. al. (2000)<sup>2</sup> realizaron el inmunofenotipaje de células procedentes de médula ósea y de sangre periférica en 217 pacientes con síndromes linfoproliferativos, a través del ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ). Del total de casos estudiados, 143 (62,44 %) fueron leucemias agudas (LA): 70 linfoides (LLA) y 38 mieloides (LMA). En 15 pacientes no se encontraron antígenos específicos de linaje y fueron clasificados como LA indiferenciadas. Entre las LLA, el 75,71 por ciento fueron de fenotipo B, y la común la más frecuente. En 17 pacientes (11,88 %) los blastos expresaron antígenos de células T; 66 enfermos (30,41 %) presentaron síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC), de estos, el 71,21 por ciento fueron de fenotipo B. La frecuencia encontrada de síndromes linfoproliferativos agudos y crónicos en los pacientes se comportó de acuerdo con lo descrito por otros autores.

María Elena Cabrera C. et. al. (2003)<sup>3</sup> la mayoría, 82 por ciento, mostró un inmunofenotipo B, mientras que 18 por ciento, un inmunofenotipo T (109 vs 23 casos). Considerando los SLPC de origen B, 55 por ciento (60) correspondió a una LLC y 38 por ciento (42) a linfomas leucemizados, en su mayoría linfoma folicular (LF) y linfoma del manto (LCM). Dentro del grupo de SLPC de origen T, destacó la elevada frecuencia de la LLTA, asociada al virus HTLV-1, correspondiendo a 48 por ciento de las neoplasias T (11 casos). Más de la mitad de los casos, 34 casos (57%) se presentó en estadio clínico temprano, A de Binet, 15 casos (25%). La biopsia medular en 13 casos, demostró una infiltración difusa en 6, nodular en 4 e intersticial en 3. La intensidad de la Ig de superficie fue débil en todos los casos en que se

observó la presencia de cadena ligera, en 16 casos no fue detectable. De acuerdo al sistema de puntuación de LLC, el estudio de inmunofenotipo demostró una puntuación («score») de 4-5 en 93 por ciento de los casos, a los que se aplicó un panel completo de marcadores inmunofenotípicos. En los 3 casos restantes el score fue 3, pero todos tenían una morfología celular típica de LLC.

Susana Barrera Delfa (2011),<sup>4</sup> del total de muestras discordantes por citología y citometría de flujo (n=22), 68 por ciento fueron inicialmente clasificadas correctamente por CMF, correspondiendo la mayoría de ellas a LNH: 7/11 LNH-B y 5/6 LNH-T. En cuanto a la comparación entre la citometría de flujo y la histología en la clasificación diagnóstica de los LNH-B, se observó un grado de concordancia global del 74 por ciento, correspondiendo el mayor grado de acuerdo al linfoma de células del manto (LCM; 100), a la leucemia linfática crónica/linfoma linfocítico de células pequeñas (LLC-B/LLBCP; 4/4), al linfoma folicular (LF; 81%), al linfoma B difuso de célula grande (LBDCG; 79%) y al linfoma de Burkitt (LB; 75%). Dentro de los casos discordantes por ambas técnicas, la citometría de flujo confirmó el diagnóstico de referencia en el 56 por ciento de los casos, frente al 38 por ciento de casos en los que éste correspondía al subtipo identificado por histología.

## I.2. Justificación.

Los síndromes linfoproliferativos crónicos representan el grupo de neoplasias hematológicas más prevalente en los países occidentales, por lo que resulta esencial en nuestro medio el poder disponer de técnicas eficaces para la identificación de las células B patológicas, que permitan establecer un diagnóstico precoz de la enfermedad.

Tradicionalmente, ante la sospecha de la posible existencia de un proceso leucémico y/o linfomatoso, el rastreo diagnóstico y la caracterización de hemopatías malignas se han fundamentado de forma casi exclusiva en los estudios citomorfológicos e histopatológicos de sangre periférica, medula ósea, órganos linfoides secundarios y otros tejidos sin embargo con estas técnicas se podía sobrestimar los diagnósticos de neoplasia, trayendo esto como consecuencia a aumento en costos en tratamientos innecesarios y la adicción de toxicidad asociada a

terapia antineoplásica, con su consecuente disminución de la calidad de vida de los individuos tratados.

El estudio inmunofenotípico permite establecer o descartar su naturaleza clonal, las expansiones de linfocitos de aspecto maduro, la clasificación actual de la Organización mundial de la Salud de las hemopatías malignas, la definición de la gran mayoría de las distintas entidades incluidas dentro de cada subgrupo de hemopatías clonales tenga en cuenta simultáneamente criterios citomorfológicos, histopatológicos, inmunofenotípicos y genético-moleculares, junto con el comportamiento clínico de la enfermedad.

El empleo sistemático de estas nuevas herramientas en la rutina diagnóstica, han propiciado que su aplicación se haya extendido desde una posición de herramienta diagnóstica de segunda línea (dirigida a confirmar la sospecha diagnóstica fundamentada en la observación citológica e histológica), al rastreo diagnóstico inicial y la monitorización del tratamiento de un número creciente de hemopatías malignas, lo cual permite detección temprana de enfermedad, clasificación del riesgo y por tanto aplicación de medidas terapéuticas de manera temprana.

El análisis inmunofenotípico en la clasificación de los SLPC-B y T, permite identificar la existencia de perfiles fenotípicos característicos de cada una de las distintas neoplasias.

Es conocido el desarrollo de terapias antineoplasias con *target* hacia diferentes marcadores celulares, lo cual permite mayor y más tempranas respuesta terapéuticas.

Ante estas características, el uso de los análisis multiparamétricos por citometría de flujo se extiende hoy día también al diagnóstico de *enfermedad mínima residual*, tanto en el contexto de una evaluación del grado de infiltración tumoral de un tejido y del grado de extensión de un tumor en el momento del diagnóstico (p.ej.: infiltración de LCR en linfomas no hodgkinianos B agresivos o con sospecha de infiltración leptomeníngea), como para monitorizar los efectos del tratamiento en situaciones donde la sensibilidad de las técnicas convencionales resulta insuficiente.

Dado la relevancia para el diagnóstico preciso, terapia adecuada expresada en una mayor tasa de remisión y supervivencia global; y por tanto disminución en costos es preciso la identificación del el inmufenotipo de las neoplasias linfocíticas crónicas.

Dado que no existen estudios en nuestro medio sobre la características inmunofenotípicas de los síndromes linfoproliferativos crónicos nos planteamos realizar este estudio.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las leucemias y linfomas del humano constituyen enfermedades heterogéneas, tanto clínica como morfológicamente, y se han utilizado varios sistemas de clasificación para dichas entidades, desde el propuesto por el grupo franco-americano-británico (FAB) para las leucemias en 1976 hasta la clasificación más reciente morfológica, inmunológica y citogenética.<sup>5, 6</sup>

Los procesos leucémicos son las enfermedades malignas más frecuentes de los tejidos hematopoyéticos, seguidos por los linfomas y constituyen las neoplasias la incidencia más alta en los primeros 15 años de la vida y del 6 al 7 por ciento de las neoplasias después de esa edad. Las leucemias son procesos neoplásicos en los que la médula ósea normal es invadida y desplazada por células malignas pertenecientes a diferentes líneas de células sanguíneas parcialmente diferenciadas o indiferenciadas y el tipo de célula afectada constituye la base para la clasificación inicial de estas enfermedades.

La linfocitosis sanguínea anormal es la característica fundamental de las enfermedades malignas crónicas de las células T y B, ya sean leucemias crónicas o linfomas no Hodgkin (LNHDG) de bajo grado.

La aplicación de los anticuerpos monoclonales al estudio y la clasificación de leucemias y linfomas ha logrado una transformación radical en la concepción y el manejo de estas patologías, desde el reconocimiento de nuevas entidades hasta el nacimiento de nuevas clasificaciones y nuevas estrategias terapéuticas con mejora en la respuesta al tratamiento y en la supervivencia global en los pacientes afectados.

La identificación del linaje específico que da origen a la neoplasia linfoide, así como la identificación de marcadores específicos de las células neoplásicas implicadas en los síndromes linfoproliferativos crónicos desempeñan un papel crucial para la adecuada clasificación, establecer el pronóstico y la aplicación de una terapia más efectiva y dirigida.<sup>7</sup>

Es por esto que nos proponemos responder a la siguiente interrogante: ¿Cuál es el perfil inmunofenotípico de los síndromes linfoproliferativos crónicos en el Hospital Doctor Salvador Bienvenido Gautier, 2005-2012?

### **III. OBJETIVOS.**

#### III.1. General.

1. Caracterizar el perfil inmunofenotípico de los síndromes linfoproliferativos crónicos en el Hospital Doctor Salvador Bienvenido Gautier, 2005- 2012.

#### III.2. Específicos.

1. Identificar la distribución de los inmunofenotipos del SLPC según la edad.
2. Identificar la distribución de los inmunofenotipos del SLPC según sexo.
3. Determinar el tipo de síndromes linfoproliferativo crónicos según el Inmunofenotipo.
4. Determinar los marcadores inmunofenotípicos más frecuentes de los SLPC-T/NK.
5. Caracterizar los marcadores inmunofenotípicos de los SLPC de origen B
6. Analizar la expresión y/o coexpresión aberrante de marcadores Inmunofenotípicos.
7. Establecer la relación entre el tipo inmunofenotípico y el estadio clínico al momento del diagnóstico.

## **IV. MARCO TEÓRICO.**

### IV.1. Maduración linfoide.

#### IV.1.1. Características inmunofenotípicas de las poblaciones linfoides

El sistema linfoide está formado por los órganos linfoides primarios o centrales y los órganos linfoides secundarios o periféricos. En el hombre, la médula ósea y el timo desempeñan el papel de órganos primarios. Los linfocitos que maduran en la médula ósea se denominan linfocitos B y son los responsables de producir anticuerpos como respuesta a un estímulo antigénico. Los que maduran en el timo se denominan linfocitos T y son los responsables de las respuestas inmunes producidas por células.

Los órganos linfoides secundarios corresponden a los ganglios linfáticos, el bazo, el tejido linfoide asociado a las mucosas, la piel y el tubo digestivo. En estos órganos, los linfocitos encuentran el ambiente adecuado para poder interactuar con los antígenos y con las células accesorias del sistema linfoide o células presentadoras de antígenos.<sup>8,9</sup>

#### IV.1.1.1. Linfocitos B

Los linfocitos B derivan de una célula germinal linfoide pluripotente y adquieren su competencia inmunológica en la médula ósea independientemente de la presencia de antígenos. Posteriormente, migran a órganos linfoides secundarios donde su diferenciación requiere la presencia de antígeno.<sup>10</sup>

Durante la ontogenia, las variaciones del fenotipo se pueden esquematizar en las siguientes etapas:

1. Célula Precursora B: células, denominadas por algunos autores células pre-pre B o células pro-B, expresan la molécula CD34, la enzima TdT y los antígenos HLA-DR, CD10, CD19, CD24. No poseen inmunoglobulinas de superficie, pero sí reordenamiento del gen de la cadena pesada  $\mu$  que representa la primera indicación de compromiso con el linaje B.
2. Célula Pre B: En este estadio todavía existe TdT y el antígeno CD10 y es positivo para el CD34. Además, expresa los antígenos HLA-DR, CD19, CD24 y aparece el antígeno CD20 y la molécula específica de linaje: CD22. Estas



células también expresan CD79a, molécula que se asocia con las inmunoglobulinas de superficie. En este estadio pueden identificarse cadenas pesadas  $\mu$  en el interior del citoplasma, en ausencia de cadenas livianas y de inmunoglobulinas de superficie.

3. Linfocito B inmaduro: A medida que la maduración progresa, se pierde el CD10, se reordenan los genes de las cadenas livianas que se transcriben, se sintetizan y ensamblan con las cadenas  $\mu$ . La célula pasa a expresar IgM de superficie.
4. Linfocito B maduro: Expresa los antígenos de membrana CD19, CD20, CD21, CD22 y CD24 y las inmunoglobulinas de superficie IgM e IgD.

Los linfocitos B maduros pasan de la médula ósea a la sangre periférica donde existe una subpoblación que expresa la molécula CD5. Posteriormente, migran a los órganos linfáticos periféricos, ubicándose en las zonas inmunológicamente B dependientes.

En el ganglio, cuando los linfocitos B son activados por antígenos, maduran a células formadoras de anticuerpos y a estadios maduros de célula plasmática, o evolucionan a células de memoria. Las células B vírgenes específicas de antígeno colonizan el folículo linfoide y cuando son estimuladas por el antígeno se transforman en células blásticas constituyendo el centro germinal. Los blastos del centro germinal proliferan y se transforman en centroblastos que expresan en su superficie los antígenos CD20, CD79a y CD10. No expresan en su superficie los antígenos CD5, CD21, CD23 y en su citoplasma no se detecta expresión de cadenas livianas de Igs. Los centroblastos dan origen a los centrocitos que expresan en su superficie los antígenos CD20, CD79a y, al igual que los centroblastos, no expresan CD5, CD21, CD23, ni cadenas livianas de Igs en su citoplasma. Después de ser estimulados por antígenos presentados por las células dendríticas foliculares, los centrocitos se activan y abandonan los folículos secundarios quedando como células de memoria o como precursores de células plasmáticas. Las células plasmáticas expresan los antígenos CD19, CD38 y CD138.<sup>11, 12</sup>

#### IV.1.1.2. Linfocitos T

Los linfocitos T proceden de la célula progenitora linfoide ubicada en la médula ósea. Estas células cuando llegan al timo sufren un proceso de maduración y adquieren inmunocompetencia. Posteriormente abandonan el timo y pasan a la sangre periférica y a los órganos linfáticos secundarios, transformándose en linfocitos T funcionalmente maduros. La madurez se alcanza con la expresión en la membrana citoplasmática de los receptores de células T (RCT). Existen dos tipos, uno constituido por las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (presente en la mayoría de los linfocitos T periféricos) y otro formado por las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$ .

Ambos receptores están asociados al complejo CD3. Las variaciones del fenotipo se pueden esquematizar en tres etapas:<sup>13</sup>

1. Fase de timocito inmaduro o pretimocito cortical blástico: en este estadio, las células expresan la enzima TdT y los antígenos CD2, CD5, CD7, CD25, CD45. Son negativos para los antígenos CD4 y CD8. En un período más avanzado de timocito inmaduro, se expresa el CD3 en el citoplasma, pero no en la superficie. En esta fase se pueden detectar algunos marcadores de proliferación como el CD38 y el receptor de la transferrina.
2. Fase de timocito intermedio o pretimocito cortical pequeño: se caracteriza por expresar los antígenos CD2, CD5, CD7, CD45 y por adquirir los antígenos CD4 y CD8. El complejo CD3-RCT se expresa en la superficie.
3. Fase de timocito maduro (medular): en este estadio se pierde la expresión de la enzima TdT y del CD1, expresa intensamente el complejo CD3-RCT y se diferencia en dos poblaciones, una que expresa el antígeno CD4 y otra el CD8, con expresión de CD2, CD5 y CD7. Todos los linfocitos maduros de la sangre periférica que emigran del timo expresan los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD7, CD5 y CD45RA. Entre un 45 por ciento y 65 por ciento expresan la molécula CD4 y entre un 25 por ciento y 35 por ciento expresan el antígeno CD8.

Los linfocitos T llegan con la sangre a los órganos linfoides periféricos, asentándose en localizaciones precisas: zona cortical profunda y área interfolicular de los ganglios linfáticos, manto periarteriolar de la pulpa blanca del bazo, áreas

interfoliculares de las placas de Peyer del intestino y órganos linfoides bucofaríngeos.<sup>13</sup>

#### IV.1.1.3. Células NK

Los Linfocitos Grandes Granulares (LGG) constituyen < 5 por ciento de las células mononucleares de sangre periférica. Existen dos poblaciones celulares fenotípicamente distintas de estas células: una CD3 positiva y otra CD3 negativa.

Los LGG CD3 negativos son las auténticas células NK. Las células NK se desarrollan a partir de una célula madre hematopoyética CD34+ en la médula ósea que se diferencia a progenitores mieloides y progenitores linfoides. El progenitor linfoide se diferencia a células B, células dendríticas, células T y células NK.<sup>14</sup>

La diferenciación NK ocurre a través de los siguientes estadios de diferenciación: estadio 1 o célula progenitora NK (pro-NK), estadio 2 o célula precursora NK (pre-NK), estadio 3 o célula inmadura comisionada NK (NK inmadura), estadio 4 o células NK madura con expresión intensa de CD56 y estadio final 5 o células NK madura con expresión débil de CD56. Las células del estadio 1 y estadio 2 también pueden diferenciarse en células T y células dendríticas y por ello son progenitores comunes tripotenciales T/NK/células dendríticas. Para el desarrollo de células NK, las células progenitoras linfoides circulan en sangre periférica y pasan a los nódulos linfáticos a través de las vénulas endoteliales altas ubicándose en el espacio parafolicular. Aquí las células progenitoras NK son activadas progresando a través de los distintos estadios de maduración. Las células NK maduras (estadio 5) retornan a circulación por el linfático eferente mientras que las células NK maduras (estadio 4) quedan dentro de tejido linfoide secundario para interactuar con las células dendríticas.<sup>14</sup>

Las células NK maduras (estadio 4) se caracterizan por expresar intensamente el antígeno CD56 y en menor intensidad el CD16. Además expresan CD2 y CD7. No expresan CD3, CD5 ni RCT.

## IV.2. Síndrome linfoproliferativo crónico.

### IV.2.1. Definición.

El término síndrome linfoproliferativoscrónicos (SLC) incluye una variedad de entidades clínico-biológicas que resultan de la proliferación clonal de un linfocito B o T maduro e inmunocompetente.

### IV.2.2. Epidemiología.

Los Linfomas No Hodgkin (LNH) son más frecuentes en adultos que en niños y tienen un incremento gradual con la edad, sobre todo a partir de los 50 años. La edad promedio al diagnóstico es de 45 a 55 años. Hay diferencias clinicopatológicas importantes en los LNH de la infancia con los de la edad adulta. En niños la incidencia es rara, tiene predominio extranodal, el 50-70 por ciento presentan inmunofenotipo B, es agresivo y se cura en el 70 al 90 por ciento de los casos. En adultos la incidencia es alta, tiene predominio nodal, el 70 al 90 por ciento corresponden a inmunofenotipo B, el curso clínico es variable y la tasa de curación es alrededor del 30 por ciento.

Con base en el registro de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Globocan 2002 la tasa de incidencia mundial de LNH en hombres fue de 5.6/100,000 y la tasa de mortalidad 3.2/100,000.

En mujeres las tasas de incidencia y mortalidad mundiales fueron menores con respecto a las de los varones: 4.1/100,000 y 2.4/100,000 respectivamente. Para México, los datos de Globocan 2002 para en hombres fueron: tasa de incidencia 4.5/100,000, tasa de mortalidad 2.1/100,000; y para el género femenino incidencia de 3.3/100,000 y mortalidad de 1.6/100,000.<sup>15</sup>

### IV.2.3. Etiología.

Los agentes infecciosos han contribuido con el desarrollo de varios tipos de linfomas de células B maduras, T y NK. Aproximadamente de manera global, el 25 por ciento de todas las malignidades malinas humanas son causadas por agentes infecciosos, ocurriendo el 10 por ciento de los casos en países en vía de desarrollo.

Estos tumores tienen característicamente un periodo de latencia entre la infección inicial y el desarrollo de la enfermedad.<sup>16</sup>

El virus del Epstein Barr está presente en cerca de 100 por ciento de linfoma de Burkitt endémico y 15 por ciento de los casos esporádicos y asociados a HIV, y está involucrado en muchos linfoma de células B en pacientes inmunosuprimidos y envejecientes. El Epstein Barr también ha sido asociado con linfoma T/NK extranodal y linfoma T pediátrico.<sup>17</sup>

La entidad conocida como Leucemia Linfoma de células T fue la primera malignidad conocida que era causada por el Virus Linfotrópico Humano (HTLV-1). Fue descrito por primera vez en el suroeste de Japón, el virus está presente en 15 a 20 millones en todo el mundo.<sup>16</sup> Este se integra dentro del genoma transformando clonalmente las células T<sup>17</sup>

El Herpes Virus-8 es encontrado en el linfoma primario de efusión y en el linfoma asociado a enfermedad de Castleman multicéntrica, principalmente en pacientes HIV positivos.<sup>17</sup>

Francia y Estados Unidos han confirmado una estadísticamente significativa asociación entre Hepatitis C y el desarrollo de linfomas de células B luego de un periodo de latencia.<sup>16</sup> Los más comúnmente asociados con linfoma linfoplasmocítico, crioglobulinemia tipo 2, linfoma de la zona marginal esplénica y linfoma de células B grande difusa.<sup>17</sup> Un estudio prospectivo en pacientes con linfoma de la zona marginal esplénica asociado a Hepatitis C, donde la mayoría de pacientes mostraron remisión con la terapia antiviral.<sup>16</sup>

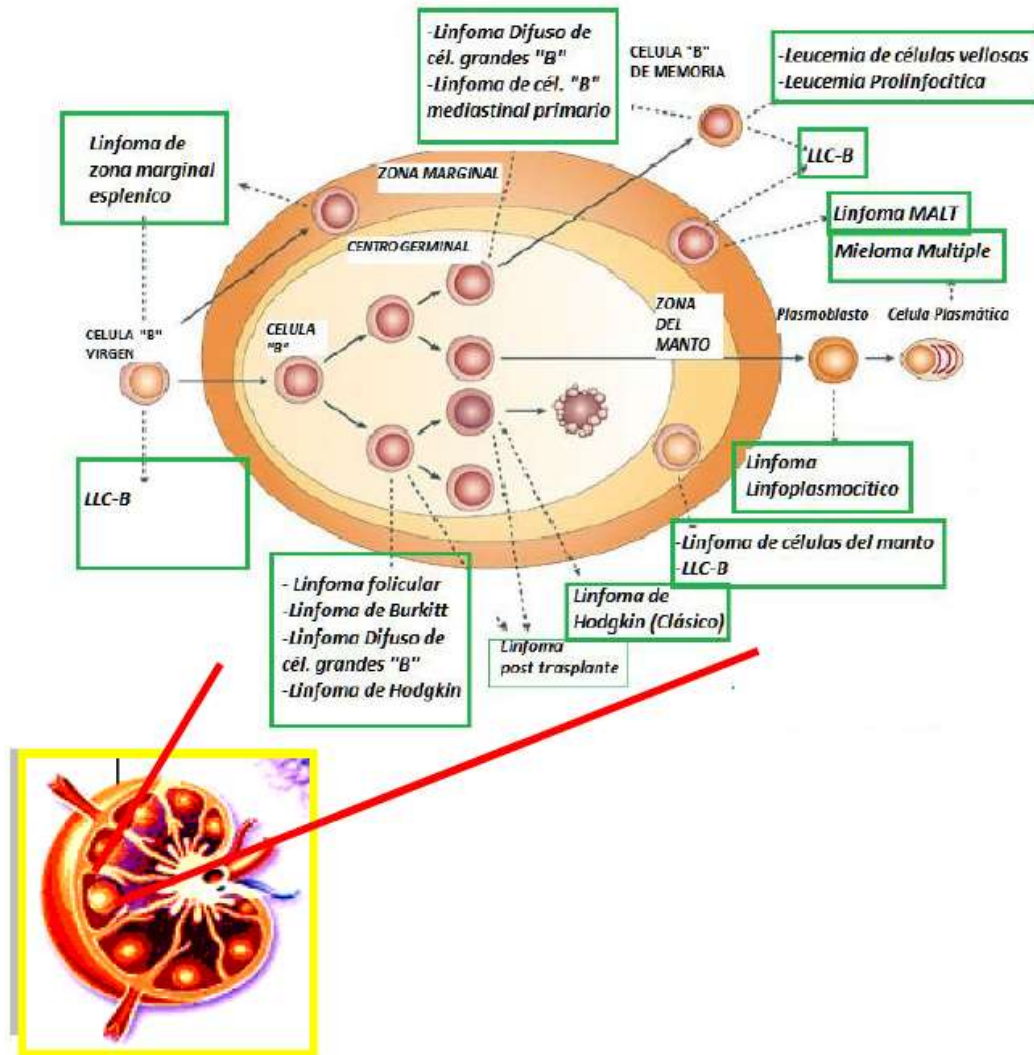
Algunas bacterias han sido involucradas con ontogenia de neoplasias de origen linfoide. Dentro de esta se incluyen el *Helicobacter pylori* asociado a linfomas del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) localización gástrica y linfoma de la zona marginal esplénica. El reconocimiento de la relación entre ambas entidades fue presentado por Parssonet y colaboradores quienes estudiaron 23,000 individuos, mostrando una odds Ratio de 6.3(1-19) entre serología positiva para *H. pylori* y linfoma gástrico.<sup>16,17</sup> Otras bacterias involucradas son la *B. Burgdorferi* con linfomas MALT cutáneo en Europa, *Chlamidia Psittaci*, *C. pneumoniae*, la *C. trachomatis* con

linfoma MALT ocular y el campilobacter jejuni con linfoma MALT intestinal y enfermedad de cadenas pesadas alfa.<sup>17</sup>

Estudios epidemiológicos han implicado la exposición a herbicidas y pesticidas con el desarrollo de linfoma folicular y difuso de células B grande. Exposición a tinte de pelo ha sido asociada pero no hay asociaciones estadísticas claramente demostrada.<sup>17</sup>

#### IV.3. Linfomagénesis.

Los linfomas derivan de células linfoides que se encuentran en distintas etapas de su desarrollo en órganos linfoides secundarios y que conservan las características biológicas de su contraparte celular normal. Por medio de la realización del análisis molecular de los genes de las inmunoglobulinas o del RCT se pueden determinar errores en la recombinación de distintos segmentos de estos genes que pueden causar traslocaciones cromosómicas aberrantes y, que por lo general, se encuentran yuxtapuestas a una variedad de oncogenes. De este modo, se pudo establecer el origen de la célula linfomatosa, y por lo tanto de los distintos tipos de linfomas B, en relación a su ubicación en centro pre - germinal, centro germinal o post-germinal (Fig.1.).<sup>18</sup>



**Fig.1.** Origen de distintos tipos de linfomas B a nivel del ganglio linfático

Fuente: O'Leary HM, Savage KJ. Update on the World Health Organization classification of peripheral T-cell lymphomas. *Curr Hematol Malig Rep.* 2009; 4(4):227-35.

Cuando se analizaron y secuenciaron los genes de la región variable de inmunoglobulinas de linfomas de células B en humanos, resultaron ser somáticamente mutado en la mayoría de los casos. Los linfomas de células B no Hodgkin, que demostraron mutaciones somáticas se encontraron : linfoma folicular, linfomas de Burkitt, Burkitt'slike, linfomas en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, linfomas de células grandes difusas (Incluyendo linfomas centroblásticas, inmunoblástico, linfomas de células T ricos en linfomas de células B, mediastínicos, esclerosantes, y anaplásicos de células grandes de tipo B), linfomas MALT (incluyendo monocitoides linfomas de células B y zona marginal),

linfomas esplénicos de linfocitos vellosos, prolinfocítica, leucemias de células peludas, linfomas linfoplasmocitoides, y algunas leucemias linfocítica crónica de células B.

Los genes de la región variable somáticamente mutado en un linfoma indican que se origina a partir de células B después del centro germinal, y el patrón de mutación somática puede permitir que estos dos posibilidades para ser distinguidos. La expresión de marcadores del centro germinal, junto a un patrón de crecimiento, identifica al linfoma folicular como un tumor de células B de centro germinal.

Mutación en curso en el clon tumoral también se produce en los linfomas linfoplasmocitoides y ocasionalmente en los linfomas Burkitt endémicos y esporádicos, linfomas de células grandes difusos, y los linfomas MALT.

La expresión de marcadores de superficie de células B centro germinal en células de linfoma de Burkitt confirma un origen en el centro germinal de la misma. Hay poca o ninguna evidencia de curso mutación en los otros tumores se ha mencionado anteriormente, pero pasos importantes de la transformación maligna puede muy bien se han producido en la etapa de centro germinal de desarrollo del precursor del tumor.

Entre los linfomas derivados de células B maduras, se ha encontrado que los genes mutados en la región variable sólo en los linfomas del manto de la zona y algunas leucemia linfocítica crónica de células B, ambos son tumores de células B CD5 +.

La derivación de la mayoría de humanos linfomas de células B de las células en el centro germinal o centro post- germinal, sugiere que transformación maligna a menudo se produce o se inicia en las células B del centro germinal. Esto es probablemente debido a peculiaridades de la diferenciación de células B en el microambiente del centro germinal. Por lo tanto, la vigorosa la expansión clonal de las células centro germinales puede por sí mismo representan un riesgo de transformación maligna.

Esta expansión proliferativa va de la mano con procesos moleculares que modifican el ADN germinal de las células B del centro e implican rupturas de cadenas de ADN a saber, el cambio de clase, hipermutación somática, y edición receptor de



membrana. Fallas ocasionales en el control de estos procesos parecen desempeñar un decisivo parte en la tumorigénesis de células B a través de la generación de translocaciones cromosómicas en loci de genes de las inmunoglobulinas.

En varios tipos de linfomas de células B, se han identificado translocaciones cromosómicas en cadena pesada de inmunoglobulina de, tales como translocación de *cmyc* en los linfomas de Burkitt, *bcl-6* en los linfomas difusos de células grandes, del receptor del factor de crecimiento 3 de los fibroblastos en el mieloma múltiple.<sup>18</sup>

Estas alteraciones cromosómicas son probablemente causados por incorrecta conmutación en el cambio de clase en las células germinales-B del centro. En el caso de las translocaciones en *bcl-2* en linfomas foliculares y *bcl-1* translocaciones en linfomas de zona del manto, los puntos de interrupción cromosómicas en el loci de la inmunoglobulina se encuentran en el extremo 5' de J o en segmentos génicos D de la cadena pesada. Estas translocaciones por lo tanto probablemente reflejan errores de la recombinación V (D) J, mediada por los genes para la recombinación-activación de proteínas.<sup>19, 20</sup>

Las translocaciones que resultan de recombinación aberrante V (D) J se piensa que está restringida a las células B precursoras de la médula ósea, pero tales reordenamientos podrán llevarse a cabo en algunas ocasiones en el centro germinal.

El proceso de hipermutación somática puede también ser responsable de la introducción de mutaciones puntuales en oncogenes. La hipermutación somática del gen *bcl-6* ha sido encontrado en diversos tipos de linfomas no-Hodgkin de células B y también en condiciones normales en el centro germinal y de células de memoria, independientemente de translocación cromosómica del *bcl-6* gene.<sup>21, 22</sup>

En la mayoría de los linfomas no Hodgkin de células B, las células expresan un patrón de mutación somática en el reordenamiento de genes de inmunoglobulinas de superficie, y que por tanto las células tumorales o sus precursores se seleccionaron para el reconocimiento de antígeno durante el proceso de mutación.

Estas características pueden a veces corresponden a la dependencia del crecimiento del tumor en la activación por un antígeno desconocido, un caso que ha sido fuertemente establecido para linfomas foliculares donde el antígeno

desencadenante puede mantener el crecimiento del tumor en los linfomas MALT gástricos que se produce regularmente en asociación con *Helicobacter pylori*.

#### IV.3.1. Estadaje y estatificación del riesgo.

Se utiliza la clasificación de Ann Arbor para la Enfermedad de Hodgkin de 1971. Para poder estudiar un linfoma se precisa de información de la historia clínica, exploración física, técnicas de diagnóstico por la imagen, análisis de sangre, informe de la biopsia inicial y de la médula ósea (Cuadro 1).<sup>23</sup>

Cuadro 1. Clasificación por estadíos del linfoma Hodgkin. Ann Arbor.

Estadio	Definición
I	Compromiso de una sola región de nódulos linfáticos (I) o de un sólo sitio u órgano extralinfático (IE).
II	Compromiso de dos ó más regiones de nódulos linfáticos en el mismo lado del diafragma (II) o compromiso localizado de un órgano o sitio extralinfático y una o más regiones de nódulos linfáticos en el mismo lado del diafragma (IIE).
III	Compromiso de regiones de nódulos linfáticos a ambos lados del diafragma (III), la cual puede acompañarse de por compromiso del bazo (IIIS) o por compromiso localizado en un órgano o sitio extralinfático (IIIE), u ambos (IIISE).
IV	Compromiso difuso o diseminado de uno ó más órganos o tejidos extralinfáticos con o sin compromiso asociado de nódulos linfáticos.
La ausencia o presencia de fiebre mayor de 38° C por tres días consecutivos, sudoración nocturna o pérdida de peso no explicada de 10 por ciento ó más del peso corporal en los 6 meses previos a la admisión, deben ser anotadas en todos los casos por los sufijos A ó B, respectivamente.	

Fuente: Fierro Ávila F, Álvarez López F, García Gutiérrez R. Oncología. Clasificación por Estadíos del Linfoma Hodgkin. Ann Arbor. Disponible en: [http://www.Sccp.org.co/plantilas/Libro %20SCCP/Lexias/tablas/oncologia/hodgkin\\_estadios.htm](http://www.Sccp.org.co/plantilas/Libro%20SCCP/Lexias/tablas/oncologia/hodgkin_estadios.htm) 2013.

#### IV.3.2. Sistema de clasificación de Rai.

La estadificación es útil en la leucemia linfocítica crónica (LLC) para predecir el pronóstico y también para estratificar a pacientes con el fin de lograr comparación a fin de interpretación de resultados de tratamiento específicos. La anemia y la trombocitopenia son las principales variables de pronóstico adverso.

La LLC no tiene sistema de estadificación estándar. El sistema de clasificación de Rai y la clasificación de Binet se presentan a continuación.<sup>24</sup> Un grupo de trabajo auspiciado por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) ha formulado normas estandarizadas de criterios relacionados con la idoneidad, la respuesta y los efectos tóxicos a ser utilizados en ensayos clínicos de LLC en el futuro (Cuadro 2).<sup>25</sup>

Cuadro 2. Sistema de clasificación de Rai.

Estadio	Definición
0	LLC en estadio 0 se caracteriza por linfocitosis absoluta ( $>15.000/\text{mm}^3$ ) sin adenopatía, hepatoesplenomegalia, anemia o trombocitopenia.
I	LLC en estadio I se caracteriza por una linfocitosis absoluta con linfadenopatía sin hepatoesplenomegalia, anemia o trombocitopenia.
II	LLC en estadio II se caracteriza por una linfocitosis absoluta, ya sea con hepatomegalia o esplenomegalia con linfadenopatía o sin esta.
III	LLC en estadio III se caracteriza por una linfocitosis absoluta y anemia (hemoglobina $<11$ g/dL) con linfadenopatía, hepatomegalia, esplenomegalia o sin estas.
IV	LLC en estadio IV se caracteriza por una linfocitosis absoluta y trombocitopenia ( $<100.000/\text{mm}^3$ ) con linfadenopatía, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia o sin estas.

Fuente: Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al.: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood 46 (2): 219-34, 1975.

#### IV.3.3. Estadificación de Binet

La estadificación Binet integra el número de grupos nodales comprometidos con la enfermedad, con la insuficiencia de médula ósea (Cuadro 3). Su beneficio principal se deriva del reconocimiento de una forma predominantemente esplénica de la

enfermedad, la cual puede tener un mejor pronóstico que en la estadificación Rai, y del reconocimiento que la presencia de anemia o trombocitopenia tiene un pronóstico similar y no amerita un estadio separado. Ninguno de los sistemas separa las causas inmunes de las causas no inmunes de la citopenia. Pacientes con trombocitopenia o anemia o ambos como resultado de infiltración extensa de la médula ósea y producción irregular (Rai III/IV, Binet C) tienen un pronóstico más precario que los pacientes con citopenias inmunes. El International Workshop on CLL ha recomendado la integración de la clasificación Rai y Binet de la siguiente manera: A(0), A(I), A(II); B(I), B(II); y C(III), C(IV). El grupo de trabajo auspiciado por el NCI ha publicado unas guías para el diagnóstico y tratamiento de LLC en ensayos clínicos y en la práctica general. El uso de estos sistemas permite la comparación de los resultados clínicos y el establecimiento de normas terapéuticas.<sup>5</sup>

Cuadro 3. Clasificación Binet

Estadio	Definición
A	LLC en estadio A se caracteriza por la ausencia de anemia o trombocitopenia y menos de tres áreas de compromiso linfóide (estadios Rai 0, I, y II).
B	LLC en estadio B se caracteriza por la ausencia de anemia o trombocitopenia con tres o más áreas de implicación linfóide (estadios Rai I y II).
C	LLC en estadio C se caracteriza por anemia o trombocitopenia independientemente del número de áreas con aumento de volumen linfóide (estadios Rai III y IV).

Fuente: Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT. The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia concordance among observers and clinical correlations. Br J Haematol 1981;47:553-61.

#### IV.4. Rastreo diagnóstico de clonalidad linfóide en SLPC

##### IV.4.1. Rastreo de la clonalidad de células B

La citometría de flujo permite distinguir las células B normales de las neoplásicas ya que en estas últimas se pueden identificar características fenotípicas aberrantes, inicialmente las técnicas inmunofenotípicas sólo se aplicaban al estudio de los

Síndrome linfoproliferativos crónicos de estirpe -B, cuando el diagnóstico de la enfermedad en estudio previamente se había establecido mediante métodos morfológicos y/o histopatológicos.

Las expansiones clonales de linfocitos B maduros se detectan habitualmente en medula ósea sangre periférica, los órganos linfoides, y/o de otros tejidos como el sistema nervioso central, la piel y las mucosas, entre otros. Establecer o descartar la naturaleza clonal de expansiones de linfocitos de aspecto maduro es uno de los principales objetivos del estudio fenotípico.

Tradicionalmente, las técnicas de fenotipado por citometría de flujo han demostrado ser de gran utilidad en el rastreo diagnóstico de clonalidad B. Durante muchos años el diagnóstico inmunofenotípico de clonalidad B se ha fundamentado de forma casi exclusiva en la existencia de un aumento en el número de células B que expresan de forma exclusiva en su membrana y/o citoplasma las cadenas ligeras de inmunoglobulinas  $\kappa$  o  $\lambda$  (Ig $\kappa$ + o Ig $\lambda$ +). Sin embargo, los últimos avances en el conocimiento de las diferencias fenotípicas existentes entre células B normales y neoplásicas, asociado con la disponibilidad de un gran número de fluorocromos y de equipos capaces de medir simultáneamente >2 fluorescencias diferentes, han modificado las estrategias empleadas para la identificación de clonalidad B, transformando el fenotipado por citometría de flujo en la técnica de elección para su rastreo diagnóstico.<sup>26</sup>

La citometría de flujo permite la identificación de la línea celular y estadio madurativo de la población de linfocitos expandida, empleando marcadores celulares en una sola medición. Su ampliación permite además la identificación de subpoblaciones celulares y fenotipos aberrantes. En su conjunto, este tipo de aproximaciones metodológicas proporcionan una sensibilidad y especificidad >95 por ciento cuando se comparan con los procedimientos convencionales, pudiendo además proporcionar resultados en un corto espacio de tiempo ante la sospecha de la presencia de células B clonales en la muestra, la identificación de la existencia de fenotipos aberrantes -presentes en la práctica totalidad de los SLPC-B-, constituye un signo inequívoco de clonalidad B, no requiriéndose habitualmente en esta situación de confirmación molecular. Además, la inclusión en el proceso de rastreo

diagnóstico de clonalidad B, de marcadores dirigidos a identificar las aberraciones fenotípicas más frecuentes en los SLPC-B más habituales, permite alcanzar una gran sensibilidad, que en la rutina diagnóstica se sitúa en niveles de  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ .<sup>26, 27</sup>

El rastreo inmunofenotípico por citometría de flujo, en los padecimientos proliferativos de estirpe B, suele proporcionar también información adicional, útil para la caracterización diagnóstica de las células B clonales; son ejemplos claros de ello i) la observación de células B de elevado tamaño y complejidad interna en los linfomas de células grandes y la tricoleucemia, ii), la expresión débil de CD20 y slg, y positividad de CD5, asociados a la leucemia linfática, la ausencia/disminución acentuada de expresión de CD19 en células de pequeño tamaño en el linfoma folicular y, la expresión elevada de CD38 en el linfoma de Burkitt (LB) y en el mieloma múltiple (MM) (asociada además a expresión débil de CD45, negatividad para CD19 y expresión de CD56 en una proporción significativa de casos). análisis inmunofenotípico constituye en la actualidad un pilar básico en el estudio SLPC-B debido a que estos muestran características fenotípicas únicas, que los diferencian de los demás subtipos diagnósticos de la enfermedad.

Es importante destacar que con relativa frecuencia -debido a la elevada sensibilidad de la citometría de flujo-, se detecta la presencia de dos o más clones diferentes (no relacionados) de células B en un mismo paciente, siendo su frecuencia de hasta un 5 por ciento de todos los SLPC-B leucemizados.<sup>27</sup>

#### IV.4.2. Rastreo de clonalidad T en el diagnóstico de SLPC

Tradicionalmente, la sospecha inmunofenotípica de clonalidad T se ha fundamentado en la observación de un desequilibrio entre distintas subpoblaciones de células T y la presencia de fenotipos T poco habituales o aberrantes. Con el transcurrir del tiempo se han incluido varios criterios inmunofenotípicos de sospecha de clonalidad T y la identificación de células T neoplásicas -T, como son 1) la ausencia o pérdida de expresión de una o más moléculas pan-T (p.ej.: CD7 en células de Sézary); 2) la sobre-expresión de un antígeno asociado a células T; 3) los asincronismos madurativos (perfil fenotípico de coexpresión de dos o más marcadores ausente en linfocitos T normales, como la expresión asincrónica de CD3

y TCR en la superficie celular) y; 4) la coexpresión de CD4 y CD8 o la ausencia de expresión de ambos marcadores en una proporción elevada de linfocitos T. al igual que los linfocitos T maduros normales, las células neoplásicas de los SLPC-T expresan en su mayoría las cadenas alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) o gama ( $\gamma$ ) y delta ( $\delta$ ) del TCR (TCR $\alpha\beta$  y TCR $\gamma\delta$ , respectivamente).

Las técnicas inmunofenotípicas, utilizan hoy una amplia batería de anticuerpos específicos dirigidos frente a gran parte de las distintas familias de las cadenas del TCR, especialmente de la cadena  $\beta$ . Con esta técnica se puede confirmar o excluir clonalidad T, mediante la demostración de la existencia de una expansión preferencial de una familia de regiones variables de las cadenas  $\alpha$  y/o  $\beta$  y  $\gamma$  y/o  $\delta$  del TCR. Esto resulta de gran utilidad útil en aquellos casos en los que carecemos de aberraciones fenotípicas evidentes y/o cuando no dispone de las técnicas moleculares. La selección del grupo control es esencial, ya hay una gran variedad de factores que pueden alterar las subpoblaciones de células T como son la raza, la edad, el tejido estudiado. En este sentido, en sujetos sanos pueden encontrarse expansiones de una o más familias, especialmente en los linfocitos T efectores de individuos de edad avanzada, o en individuos que padecen algunas enfermedades de naturaleza infecciosa, tumoral o autoinmune en las que pueden observarse expansiones oligoclonales de células T. En estas circunstancias, las expansiones no suelen superar el 40 por ciento de las células T CD4+ y/o CD8+ circulantes. El análisis del repertorio de las familias TCR en individuos con sospecha de infiltración por SLPC-T resulta de gran utilidad en el rastreo diagnóstico de clonalidad T, sobre en combinación con la identificación de fenotipos aberrantes para delimitar mejor la población tumoral y se observa por ejemplo, un uso restringido de una familia de la cadena  $\beta$  del TCR en más de 60 por ciento de las células T.<sup>27</sup>

#### IV.4.3. Rastreo de clonalidad NK en el diagnóstico de Síndrome linfoproliferativo crónico

En contraposición con lo que ocurre en individuos que presentan expansiones de linfocitos T o B maduros, la demostración de clonalidad sigue resultando difícil en los casos que tienen un aumento de células NK en sangre, exceptuando una pequeña

proporción de situaciones en los que se detectan alteraciones citogenéticas, o se demuestra la integración clonal de secuencias genómicas de origen vírico, o mujeres en las que se comprueba la existencia de un patrón clonal de inactivación del cromosoma X sobre células NK previamente purificadas.

De acuerdo a estudios fenotípicos, datos preliminares sugieren que el patrón de expresión de receptores tipo inmunoglobulina de las células NK (KIR) (en especial de CD158a y CD158b) podrían ser marcadores útiles para la detección de clonalidad NK.

No obstante, estos estudios resultan limitados por su baja sensibilidad y especificidad, en especialmente, cuando la población clonal de células NK está sobre un fondo de células NK policlonales residuales.<sup>27</sup>

#### IV.4.4. Clasificación de los síndromes linfoproliferativos crónicos

Los SLPC engloban a los linfomas no Hodgkin y al linfoma de Hodgkin. Los primeros comprenden una serie de entidades que pueden cursar con una importante expresión sanguínea y corresponden a la concepción clásica de SLPC con expresión periférica. La clasificación de los linfomas no Hodgkin ha sido, desde finales de la década de 1970 hasta finales de la década de 1990, uno de los campos de debate científico más intenso. La falta de acuerdo entre patólogos americanos y europeos tuvo como consecuencia la frustración en los clínicos que debían tratar a los enfermos.

En 1966, Rappaport,<sup>28</sup> publicó una clasificación basada en criterios citológicos y arquitecturales, pero con la novedad de que trataba de proporcionar criterios pronósticos. En 1974, dos norteamericanos, Lukes y Collins,<sup>29</sup> publicaron su clasificación funcional de los linfomas no Hodgkin, la cual presentaba la novedad de subdividir los linfomas en función de su fenotipo B o T, y de clasificarlos en función de su histogénesis. En el mismo año, un grupo de patólogos europeos, liderados por Lennert,<sup>30</sup> publicó el primer esbozo de la que sería conocida posteriormente como clasificación de Kiel.<sup>31</sup>

Primero era citológica y arquitectural, posteriormente incorporó el inmunofenotipo. La clasificación de Kiel, aunque muy parecida conceptualmente a la de Lukes y Collins, difería de la misma en la nomenclatura y en que estratificaba los



LNH en grados de malignidad. La falta de acuerdo entre las dos escuelas (Americana y Europea) condujo a que en 1982, el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos promoviera una clasificación de consenso conocida como Working Formulation.<sup>32</sup>

Esta clasificación estratificaba las entidades en grados de malignidad, y estaba basada en criterios citológicos y arquitecturales pero no tenía en cuenta la histogénesis. Fue considerada, por muchos patólogos como un paso atrás conceptual, pero fue aceptada, por la mayoría de los clínicos como una vía para lograr un «lenguaje común». En 1994, un segundo intento de consenso dio lugar a la clasificación propuesta por el Grupo internacional de estudio del linfoma denominada REAL (Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms) y basada en la identificación de entidades clínico-patológicas y adoptadas de manera progresiva por los patólogos y clínicos.<sup>33</sup> La clasificación REAL estratifica a las neoplasias hematológicas en función del linaje: mieloide, linfoide, células histiocíticas/dendríticas y células cebadas. En cada linaje, las distintas entidades se definen en función de una serie de características morfológicas, inmunofenotípicas, moleculares y clínicas. No se distribuyen en grupos en función de su grado de malignidad, pero sí de pronósticos favorables o desfavorables.

Por iniciativa de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las sociedades Americana y Europea de Hematopatología, junto con la participación de hematólogos y oncólogos de todo el mundo, reeditaron las entidades descritas en la clasificación REAL, y de esta manera, en el año 2001 surgió la clasificación de la OMS.<sup>34</sup>

La última modificación de esta clasificación fue realizada en el año 2008 (Cuadro 4).<sup>35</sup> En esta clasificación sólo se reconocen enfermedades con características morfológicas y clínicas diferenciales. Las variaciones del grado histológico o de agresividad de una misma enfermedad no se reconocen como enfermedades distintas. Asimismo, a la localización anatómica de los distintos linfomas se le da mucha relevancia. Dentro de las categorías de células B y células T y NK, se reconocen dos subdivisiones: neoplasias de precursores, que corresponden a los estadios más tempranos de diferenciación y neoplasias de células maduras.

Cuadro 4. Clasificación de origen linfoide de la OMS basado en estirpe celular y grado de diferenciación Lyon, 2008.

Linfomas no Hodgkin	Linaje B	Linaje T
<b>Células precursoras</b>	Linfoma/leucemia linfoblástico B	Linfoma/leucemia linfoblástico T
<b>Células maduras</b>	Linfoma linfocítico de células pequeñas	Leucemia Prolinfocítica T
	Leucemia Prolinfocítica B	Leucemia de células T grandes granulares
	Linfoma B esplénico de la zona marginal	Leucemia agresiva de células NK
	Leucemia de células peludas	Linfoma extraganglionar NK/T, tipo nasal
	Linfoma linfoplasmacítico	Micosis fungoide / Síndrome de Sezary
	Linfoma de células del manto	Desórdenes linfoproliferativos cutáneos de células CD30
<b>Células maduras</b>	Linfoma folicular	Linfoma anaplásico primario cutáneo
	Linfoma B de la zona marginal y MALT.	Papulosis linfomatoide
	Linfoma ganglionar de la zona marginal	Linfoma T cutáneo primario de células grandes anaplásico
	Linfoma B difuso células grandes: No Especificado	Linfoma T subcutáneo tipo-paniculítico
	Linfoma B de células grandes mediastínico	Linfoma T gd hepatoesplénico
	Linfoma B de células grandes intravascular	Linfoma T intestinal, tipo asociado a enteropatía
	Linfoma primario de efusiones	Linfoma blástico de células NK
	Linfoma de Burkitt	Linfoma T angioinmunoblástico
	Granulomatosis linfomatoide	Linfoma T periférico no especificado
	Mieloma múltiple	Linfoma/leucemia T del adulto (HTLV-1+)
<b>Neoplasias de plasmáticas:</b>	Plasmocitoma	Linfoma anaplásico de célula grande, sistémico
	Gammapatía monoclonal.	
	Enfermedades por depósito de inmunoglobulina	
	Amiloidosis y otras.	

Fuente: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al.: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, edn 4. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.

#### IV.5. Características inmunofenotípicas de los síndromes linfoproliferativos crónicos

Inicialmente, tras la obtención de los primeros antisueros policlonales y el desarrollo de anticuerpos monoclonales frente a células neoplásicas linfoides, se buscó con tesón la identificación de antígenos específicos de células tumorales. No obstante, estudios posteriores mostraron que de forma prácticamente sistemática las proteínas identificadas también estaban presentes -en menor o mayor proporción-, en células normales en distintos estadios madurativos. Estos hallazgos llevaron al concepto de que desde el punto de vista fenotípico, las células neoplásicas de pacientes con distintas hemopatías malignas, incluidos los SLPC, reflejaban las características de las células normales de distintas líneas linfoides, bloqueadas en estadios madurativos concretos. A partir de este momento, los estudios

inmunofenotípicos aplicados a los SLPC han estado dirigidos a la identificación de aquellas características fenotípicas de las células neoplásicas que, por su similitud con las células normales, permitieran establecer la línea T, B o NK de la célula expandida y su correspondiente estadio madurativo.<sup>36</sup>

Más recientemente se ha constatado que, pese a las similitudes fenotípicas existentes respecto a los linfocitos normales, las células neoplásicas con frecuencia muestran alteraciones en los patrones de expresión de proteínas normales -fenotipos aberrantes. En los SLPC estas alteraciones fenotípicas consisten habitualmente en:<sup>37</sup>

- 1) expresión asincrónica de proteínas asociadas a la maduración celular (asincronismos madurativos),
- 2) reactividad anormalmente elevada (sobre-expresión antigénica) o disminuida de un antígeno (sub-expresión antigénica),
- 3) fenotipos asociados a características alteradas de dispersión de luz (FSC: dispersión frontal de luz o tamaño celular, y; SSC: dispersión lateral de luz o complejidad interna de la célula) y/o 4) fenotipos ectópicos. A diferencia de lo que ocurre en las leucemias agudas, en los SLPC la expresión en las células neoplásicas de antígenos asociados a una línea celular distinta de la suya, constituye un hallazgo muy poco habitual.<sup>37</sup>

Por todo ello, actualmente la caracterización inmunofenotípica de los SLPC persigue la identificación, no solo de las similitudes existentes entre la célula neoplásica expandida y su contrapartida normal para la identificación de la línea celular y estadio madurativo de la misma, sino también de sus diferencias.<sup>38</sup>

Estudios recientes realizados en neoplasias de precursores B y algunos subtipos de SLPC-B sugieren que la expresión alterada de antígenos asociados a distintos estadios madurativos en las células de pacientes con SLPC podría reflejar las alteraciones genéticas subyacentes o anomalías en la comunicación entre la célula expandida y su micromedioambiente.<sup>38</sup>

Aunque disponemos de diferentes estrategias metodológicas para el estudio de las características fenotípicas de los SLPC, merece destacar que estas habitualmente proporcionan distinta información.<sup>39</sup> Mientras que las técnicas de inmunohistoquímica permiten conocer el estado de diferenciación e infiltración tisular

por parte de las células neoplásicas tras su identificación con anticuerpos asociados a las distintas líneas linfoides, el empleo de análisis multiparamétricos por citometría de flujo debe considerarse el método de elección para el estudio de las características fenotípicas de células individuales, incluso en aquellos SLPC que infiltran de forma exclusiva órganos linfoides secundarios como los ganglios, bazo o la piel, entre otros;<sup>40</sup> menor relevancia clínica tienen otras aproximaciones metodológicas, como las técnicas de Western-Blot o, más recientemente los arrays de anticuerpos.

Durante algún tiempo, los análisis inmunofenotípicos de los SLPC se han centrado de forma preferente en los SLPC de origen B, resultando particularmente útiles en la identificación de la LLC-B y la TL y su diagnóstico diferencial con otras neoplasias de células B maduras. Entre los antígenos estudiados hasta la fecha, algunos como CD5, CD19, sIg, CD20, CD23 y CD10 se consideran esenciales en la caracterización fenotípica de los SLPC-B. Además, otros antígenos como CD11c, CD22, CD25, CD30, CD38, CD79b, CD103, FMC7 y Cybc12, resultan de gran ayuda en la caracterización específica de algunas entidades. Finalmente, otros marcadores como Tdt, CD34 y CD45, pueden así mismo contribuir a diferenciar las neoplasias inmaduras de precursores B de los SLPC-B.<sup>41</sup>

Según hayan sufrido o no el proceso de hipermutación somática en los genes de las Ig, se considera que el origen de los SLPC-B se situaría en células B que no han pasado por el CG (carentes de mutaciones en los genes de las Ig) o de células B del CG o post-CG (células B que han pasado a través del CG y que presentan mutaciones en los genes de las Ig). Así mismo, de acuerdo con sus patrones de expresión génica, algunos SLPC-B como el LF, el LB y el LBDCG, muestran perfiles asociados con células B del CG, aunque existen casos de LBDCG cuyos perfiles de expresión génica se asemejan más a los de las células B activadas in vitro.<sup>42</sup> Desde el punto de vista práctico, en esta Introducción revisaremos primero las características fenotípicas de los SLPC-B primariamente leucémicos, para centrarnos posteriormente en los perfiles de expresión antigénica característicos de los linfomas no Hodgkin B con expresión leucémica.<sup>42</sup>

#### IV.5.1. Características inmunofenotípicas de los SLPC-B primariamente leucémicos

Bajo el término de SLPC-B primariamente leucémicos se incluyen, de acuerdo con la clasificación más reciente de la OMS,<sup>1</sup> la LLC-B, la leucemia prolinfocítica (LPL)-B y la TL, tanto en sus formas clásicas como atípicas o variantes.

#### IV.5.1.1. Leucemia linfática crónica B y linfoma linfocítico de células B pequeñas (LLC-B/ LLCBP)

La LLC-B es la leucemia más común en adultos en los países occidentales (2-6 casos/105 habitantes y año), aumentando su frecuencia con la edad. Desde hace tiempo se conoce que las células neoplásicas de la LLC-B muestran un fenotipo característico, aunque a la vez relativamente heterogéneo. Así, además de presentar reactividad débil (respecto a los linfocitos B maduros de sangre periférica normal), para CD20, CD22, CD79b, CD81 y slg, en ausencia de positividad para FMC7, la LLC-B típica presenta de forma constante expresión de CD5, CD23 y CD200 en células B neoplásicas CD19+, siendo este último marcador (CD200) clave junto con CD79b para diferenciar la LLC-B del LCM; además, las células B clonales de la LLC-B típica son positivas para CD21, CD24, CD25, CD27, CD39, CD40, CD45RA, CD62L, CXCR5 y slgM, y expresan de forma moderadamente intensa Bcl2 en el citoplasma. En las formas atípicas de la enfermedad, este patrón fenotípico puede verse modificado, adoptando distintos perfiles. Tanto en la LLC-B típica, como en las formas atípicas, el patrón de expresión de otros marcadores como CD11c, CD38, CD45RO, CD80, CD95, CD124, CD126, CD130 y CyZAP-70 es heterogéneo y variable de unos casos a otros.

Además, merece destacar que la reactividad para algunos de estos marcadores, como CD38 y CyZAP-70 (presente en casi la mitad de los casos), se ha asociado con el estado mutacional de los genes de las cadenas pesadas de las Ig (genes IGH) – ausencia de mutaciones somáticas- y/o un peor pronóstico de la enfermedad; a este respecto merece destacar que también la positividad para CD49d en LLCB no mutadas se ha asociado con un pronóstico peor.<sup>43</sup>

El linfoma linfocítico de células B pequeñas está íntimamente relacionado con la LLC-B, siendo superponible el fenotipo de los linfocitos B patológicos en ambas entidades.<sup>44</sup> Así mismo, recientemente se ha propuesto la denominación de

linfocitosis B monoclonal (MBL) para designar aquellos casos que, pese a presentar una expansión de células B monoclonales en SP con fenotipo superponible al de la LLC-B, el número de linfocitos B clonales es  $<5 \times 10^9/L$ , en ausencia de otros síntomas o signos de enfermedad.

Si bien se han barajado en el pasado diferentes posibilidades en lo que respecta a la posible contrapartida normal de estas células neoplásicas, actualmente se considera que las LLC-B que presentan genes IGVH mutados derivarían de linfocitos B de memoria presentes tanto en MO y SP como en los órganos linfoides secundarios, en los que el proceso de hipermutación somática ha tenido lugar; por el contrario, los casos no mutados tendrían su origen en células B naïve que no han pasado por el CG, correspondiendo a pacientes con un curso clínico más agresivo y menor supervivencia. Más recientemente, la demostración de la existencia de pequeños clones de células B fenotípicamente idénticas a las células B neoplásicas de la LLC-B en prácticamente todos (o una gran proporción) de adultos sanos  $>40$  años ha abierto nuevas perspectivas en la identificación de la posible contrapartida normal de la LLC-B.<sup>45</sup>

#### IV.5.1.2. Leucemia prolinfocítica B (LPL-B).

Durante años, el diagnóstico de sospecha de la LPL-B se ha basado en las manifestaciones clínico-hematológicas de la enfermedad: linfocitosis elevada (habitualmente  $>100 \times 10^9/L$ ) a expensas de una población de linfocitos B grandes con 46lignuc prominente –prolinfocitos-, asociada a esplenomegalia con o sin adenopatías evidentes. Desde el punto de vista fenotípico, los prolinfocitos B son CD19+, CD20+/FMC7+, CD22+, CD79b+ y expresan niveles elevados de sIgM y/o sIgD; además, respecto a la LLC-B, presentan menor reactividad para CD5 (20-30%), CD23 (10-20%) y CD25 ( $<50\%$ ), marcadores que con relativa frecuencia son negativos en la LPL-B. Así, en términos globales el prolinfocito muestra un fenotipo superponible al de un linfocito B activado de sangre periférica, en un estadio madurativo posterior al de la LLC-B. Aunque en algunos casos puede plantearse el diagnóstico diferencial con formas variantes de TL (TL-V), a diferencia de los tricoleucocitos, los prolinfocitos carecen de reactividad para CD103 y muestran una

menor expresión, aunque variable, de CD11c y CD305 (LAIR-1). Así mismo, debe realizarse el diagnóstico diferencial con el LCM que puede presentar un cuadro clínico y morfológico sugerente de LPL-B, aunque de forma característica las células B neoplásicas de estos pacientes son CD200- o + débil, CD23-, CD5++/CD43+ y presentan t(11;14)(q13;q32). Finalmente, desde hace tiempo se conoce la existencia de formas variantes de LPL-B con características intermedias entre la LLC-B y la LPL-B. Algunos de estos pacientes representan formas evolucionadas de LLC-B, mientras que otros presentan ya en el momento del diagnóstico un porcentaje variable de prolinfocitos (entre 11% y 55%) con características intermedias entre ambas entidades.<sup>1</sup> Por todo ello, ante la sospecha de una LPL-B, debe realizarse un cuidadoso diagnóstico diferencial con otros SLPC-B, especialmente con el LCM, la LLC-B y formas variantes de TL, siendo la verdadera incidencia de LPL-B claramente inferior a la descrita inicialmente.

La expresión de CyZAP-70 y CD38 en estos pacientes se da en alrededor del 50-60 por ciento de los casos, respectivamente; al contrario de lo que ocurre en la LLCB, esta expresión no está relacionada con el estado mutacional de los genes de las inmunoglobulinas.<sup>46</sup>

#### IV.5.1.3. Tricoleucemia (TL)

Pese a su morfología característica y a su fenotipo único, en la actualidad seguimos sin conocer cuál es la contrapartida normal del tricoleucocito; no obstante, se ha descrito que la célula neoplásica de la TL ha sufrido los procesos de recombinación IGH V(D)J e hipermutación somática<sup>47</sup> y que podría corresponder a una célula B de memoria activada y/o presentadora de antígenos. Los rasgos fenotípicos del tricoleucocito son altamente característicos, no planteándose habitualmente grandes problemas en el diagnóstico diferencial entre la TL y otros SLPC-B. Así, el tricoleucocito muestra características de dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) de luz anormalmente elevadas, reactividad elevada para los antígenos CD25, CD103, LAIR-1 (CD305), CD123, T-bet, anexina A1 y HC2, junto a sobre expresión de los marcadores CD72, CD11c, CD19, CD20 y CD22. Además, el tricoleucocito generalmente carece de reactividad para CD5, CD10, CD23 y CD24,

expresa FMC7 y es CD79b+; aunque generalmente expresa sIgM y/o sIgD, también puede ser positivo para sIgG y/o sIgA.<sup>1</sup>

Desde hace años se reconoce la existencia de una forma variante de la TL (TLV) en la que, al igual que ocurre en la TL clásica, en el momento del diagnóstico los pacientes suelen presentar esplenomegalia, anemia y trombocitopenia asociadas con leucocitosis, en ausencia de monocitopenia. A diferencia de lo que ocurre en las formas clásicas, en la TL-V, las células B neoplásicas generalmente no expresan los antígenos CD25 y HC2.

Aunque la ausencia de ambos marcadores puede plantear en ocasiones el diagnóstico diferencial con el linfoma de la zona marginal esplénica (LZME), a diferencia de esta entidad, la TL-V muestra expresión clara de CD103 y un patrón diferente de reactividad para CD24 y CD305.<sup>48</sup>

#### IV.5.2. Características inmunofenotípicas de los linfomas no hodgkinianos B (LNHB) con expresión periférica.

Inicialmente, los LNHB con expresión periférica se incluyeron bajo el término de leucemia de células linfo-sarcomatosas. No obstante, hoy se sabe que corresponden a formas leucemizadas de distintos subtipos de LNHB. En principio, todos los subtipos de LNHB descritos hasta la fecha pueden leucemizarse, si bien la expresión periférica es más frecuente en algunos subtipos de LNHB. Por ello, ante la sospecha de que una linfocitosis B clonal pueda corresponder a una fase de leucemización de un LNHB, es aconsejable realizar biopsia ganglionar para esclarecer el diagnóstico de LNHB y definir su correspondiente subtipo histológico. Por otra parte, dada la elevada sensibilidad de las técnicas de análisis fenotípico basadas en la citometría de flujo, cabe recordar que ante la presencia de una pequeña población de células B clonales en SP con fenotipo diferente de LLC-B, debe buscarse de manera sistemática realizar una confirmación histológica que permita establecer el diagnóstico diferencial entre infiltración por LNHB y MBL no-LLC-B.<sup>49</sup>



#### IV.5.2.1. Linfoma de células del manto (LCM)

El LCM representa alrededor de 5-10 por ciento de todos los LNH del adulto.<sup>50</sup> En la mayoría de los LCM, las células B neoplásicas presentan un tamaño pequeño o mediano y aspecto maduro, similar al de la LLC-B; a veces, el núcleo es hendido con contorno irregular, asociado o no a la presencia de lironucl evidentes con cromatina dispersa y escaso citoplasma, en ausencia de sombras de Gümprrecht. Aunque estos rasgos citológicos contribuyen al diagnóstico diferencial entre ambas entidades, para ello es clave el estudio histológico ganglionar, el análisis fenotípico de las células linfomatosas y la demostración de la t(11;14)(q13;q32).<sup>51</sup> Desde el punto de vista fenotípico, el LCM comparte características con la LLC-B, lo que sugiere que su origen podría ubicarse en un linfocito B en un estadio madurativo inmediatamente posterior al de la LLC-B, que histológicamente se localizaría en la zona del manto de los órganos linfoides secundarios. Aproximadamente el 25 por ciento de los pacientes con LCM presentan genes IGVH mutados, y esto ocurre con mayor frecuencia en los pacientes con enfermedad ganglionar (90% vs. 40%). A diferencia de la LLC-B, la presencia de mutaciones IGVH no se correlaciona con la supervivencia. El uso de IGHVH3-21, y posiblemente IGHVH4-59, podrían estar asociados con una mayor supervivencia de los pacientes.

En el LCM, las células B neoplásicas CD19+ habitualmente coexpresan CD5 y CD43, junto a otros marcadores pan-B como CD20, CD22 y CD24. Por el contrario, a diferencia de la LLC-B, generalmente carecen de reactividad clara para CD23 y CD200 y pueden presentar una positividad más intensa para sIgM y/o sIgD, CD18, CD20, FMC7, CD54 y, sobre todo, CD79b; la reactividad para CD38 es variable, aunque en términos generales es superior a la detectada en la LLC-B típica.<sup>1</sup>

La variante blástica del LCM, asociada o no a la presencia de prolinfocitos en sangre periférica, presenta un fenotipo superponible con la forma clásica de LCM, asociada con frecuencia a un mayor tamaño y complejidad interna de las células B clonales (FSC y SSC), además de expresión de CD10 en algunos casos y tetraploidia de ADN, lo que podría llegar a plantear el diagnóstico diferencial con el LBDCG;<sup>52</sup> a diferencia de éstos, los linfocitos B neoplásicos del LCM son bcl6 negativos.

#### IV.5.2.2. Linfoma folicular (LF)

De todos los linfomas primarios con infiltración de SP, el LF es el más frecuente. Aunque se ha estimado que la incidencia total de leucemización en el LF ocurre entre el 10 por ciento y el 40 por ciento de los casos, el uso de técnicas sensibles como el análisis multiparamétrico por citometría de flujo de la expresión de varios antígenos celulares y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), demuestran que las células B neoplásicas son detectables en la SP al diagnóstico o pueden aparecer después a lo largo de la evolución de la enfermedad, en una mayor proporción de casos.<sup>53</sup>

Estos cuadros pueden confundirse en ocasiones con la LLC-B, siendo útil para su diagnóstico diferencial la demostración de la existencia de linfocitos con núcleo hendido (centrocitos) y la presencia de cierto grado de polimorfismo celular, con la coexistencia de células pequeñas y grandes (centrocitos y centroblastos, respectivamente) en ausencia de sombras de Gümprrecht.<sup>52</sup> La histología ganglionar es esencial para el diagnóstico definitivo del LF.

Las células B neoplásicas del LF habitualmente muestran un fenotipo similar al del linfocito B del folículo linfoide normal. Así, además de presentar reactividad fuerte para slgM, CD20/FMC7, CD22 y CD79b, estas células coexpresan de forma prácticamente constante CD10, bcl6 y CD38 de intensidad intermedia. Por el contrario, generalmente son negativos para CD5, CD11c, CD23, CD43, CD103, CD200 y HC2 y algunos casos muestran negatividad o expresión anormalmente débil de CD19; de forma característica, se observa sobre-expresión de bcl2 a nivel citoplasmático. En la mayoría de los casos de LF las células B neoplásicas muestran pequeño tamaño (FSC) y escasa complejidad interna (SSC), aunque en ocasiones se observa la coexistencia –o incluso el predominio- de células B clonales de elevado FSC y SSC, que puede llegar a plantear el diagnóstico diferencial con algunas formas de LBDCG CD10+/CD200-. En la clasificación actual de la OMS<sup>1</sup> se incluye el LNH folicular cutáneo primario como un subtipo particular de linfoma centrofolicular. A diferencia del LF típico, las células neoplásicas de este subtipo suelen carecer de slg, con mayor frecuencia son CD10- y expresan Cybcl2 de forma menos intensa.

#### IV.5.2.3. Linfoma B difuso de célula grande (LBDCG)

El LBDCG constituye un grupo heterogéneo de linfomas en los que su descripción parte de criterios morfológicos e histológicos. Sólo una pequeña proporción de todos los LBDCG (<5%) presenta infiltración en SP al diagnóstico, generalmente asociada a la presencia de inmunoblastos grandes y/o centroblastos. En la mayoría de los casos las células B neoplásicas presentan reordenamiento de los genes de IG asociados a la existencia de mutación somática.<sup>50</sup> En la clasificación actual de la OMS<sup>1</sup> dentro del LBDCG se establecen múltiples variantes y subtipos, lo que refleja la gran heterogeneidad de este subgrupo de linfomas.

La heterogeneidad clínica del LBDCG podría ser un reflejo de su variabilidad genética, habiéndose identificado al menos dos subtipos principales de LBDCG de acuerdo a los perfiles de expresión genómica, correspondiendo cada subtipo a un origen celular diferente. Los LBDCG con un patrón de expresión del tipo CG se asocian con una supervivencia más larga de los pacientes que los LBDCG con un patrón de expresión de célula B activada (ABC). De esta manera, en relación con el patrón de expresión genómica los pacientes con LBDCG pueden agruparse de acuerdo con el origen celular y con su pronóstico según la expresión de distintos genes, de los que HGAL, BCL6, LMO2 y FN1 se asocian a una supervivencia favorable, y BCL2, SCYA3 y CCND2 a un peor pronóstico. Entre el 35 por ciento y el 65 por ciento de los casos expresan IRF4/MUM1.

En el LBDCG los linfocitos neoplásicos generalmente muestran características de dispersión de luz (FSC y SSC) anormalmente elevadas, asociadas a reactividad intensa para marcadores pan-B como CD19, CD20/FMC7, CD22, CD79b y slg, siendo una proporción elevada de casos CD10+/CD200-.<sup>1</sup> Entre estos últimos pacientes, se incluiría un subgrupo numeroso que además muestra sobre-expresión clara de Cybcl2, y que podría corresponder a aquellos casos que, de acuerdo con su patrón de expresión genómica estudiado con microarrays de 51lignucleótidos, muestran características de célula B del CG y t(14;18)(q32;q21). Tanto CD5 como CD23 suelen estar ausentes, aunque se han descrito casos con expresión variable de ambos marcadores que, en el caso de CD5, se ha asociado con un peor pronóstico de la enfermedad. Aquellos LBDCG que expresan CD5 se diferencian de

los casos diagnosticados como variante blástica de LCM en que no expresan ciclina D1 y carecen de la t(11;14)(q13;q32). Algunos LBDCG presentan un contenido de ADN aneuploide por citometría de flujo y generalmente tienen una tasa proliferativa intermedia o alta, lo que contribuye al diagnóstico diferencial con otros SLPC-B; a su vez, puede observarse expresión de CD30, especialmente en la variante anaplásica de LBDCG.<sup>54</sup>

#### IV.5.2.4. Linfoma de Burkitt (LB)

El LB es un linfoma B de células grandes, agresivo, que se asocia a estados de inmunodeficiencia grave y cuyo pronóstico se relaciona en gran medida con el grado de extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico.<sup>55</sup>

El fenotipo del LB es altamente característico y con frecuencia reproduce los rasgos de los linfocitos grandes centrolímbicos. Así, la célula B neoplásica del LB expresa marcadores pan-B como CD19, CD20, CD22 y CD79b, muestra reactividad para CD10, CD77, bcl6 y CD43, y positividad muy intensa para CD38; por el contrario, generalmente carece de expresión de CD5 y CD23 y expresa de forma débil bcl2 citoplasmático. Es característico el hallazgo de una elevada tasa proliferativa asociada a una mayor propensión a sufrir apoptosis espontáneamente in vitro por parte de las células B clonales. Las características de dispersión de luz corresponden a las de un linfocito grande, habitualmente en ausencia de aneuploidia de ADN que lo justifique. Se ha descrito una forma variante inicialmente conocida como linfoma Burkitt-like, con características histopatológicas intermedias entre las del LB y el LBDCG.<sup>1</sup> En la actualidad esta forma variante recibe varias denominaciones, como linfoma de célula B inclasificable<sup>1</sup> con características intermedias entre el LB y el LBDCG y formas genéticamente mixtas entre ambas entidades. Aunque las células B de estos pacientes expresan antígenos pan-B en ausencia de CD5, a diferencia del LB, suelen ser CD10- y muestran mayor expresión de Cybcl2, junto a positividad intensa para Ki67.<sup>1</sup>

#### IV.5.2.5. Linfoma de la zona marginal esplénica (LZME) y nodal

En la última década se ha acumulado gran cantidad de información acerca de las características clínicas y biológicas de los pacientes con LZME.

Clínicamente, el LZME presenta un curso benigno y los pacientes habitualmente no requieren tratamiento inmediato. En la SP los linfocitos B neoplásicos son morfológicamente más grandes que las células B normales, tienen un núcleo redondo, algo excéntrico, de contornos regulares, con cromatina condensada, a veces con nucléolo, junto a un citoplasma basófilo con proyecciones vellosas citoplasmáticas, generalmente dispuestas en un polo de la célula (menos numerosas, aunque más gruesas, largas y separadas, que las de las células B de la TL).

En el LZME las células B neoplásicas fenotípicamente muestran características que lo situarían en un estadio madurativo cercano al de la TL. En la mayoría de los casos las células B muestran un fenotipo relativamente homogéneo, consistente en expresión intensa de sIg y CD79b y positividad para CD19, CD20/FMC7 y CD22. Al igual que en la TL, las células B clonales expresan CD11c, que habitualmente no supera los niveles detectados en una pequeña subpoblación de células B (<5%) circulantes CD11c+, de tamaño intermedio. Por el contrario, con frecuencia carecen de reactividad para CD103, HC2 y CD25 y muestran un patrón de expresión de CD24 diferente del de los tricoleucocitos.<sup>1</sup> Otros antígenos característicos de algunos SLPC-B como CD5, CD10 y CD23 son generalmente negativos en el LZME, mientras que CD38 y CD43 se expresan únicamente en una pequeña proporción de casos (<25%) y no se observa reactividad para anexina A1, bcl6 o ciclina D1.<sup>1</sup>

Fenotípicamente, el LZME es muy similar al linfoma de zona marginal nodal, pero a diferencia de éste suele ser sIgD-.

#### IV.5.2.6. Linfoma de la zona marginal extranodal del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)

El linfoma tipo MALT comprende aproximadamente el 7-8 por ciento de todos los linfomas de células B y más del 50 por ciento de los linfomas gástricos primarios.

En estos pacientes, las células B expresan sIg (sIgM, sIgA o sIgG) y en muchos casos coexpresan Cylg del mismo isotipo y antígenos B como CD19, CD20, CD22,

CD79b y CXCR3, habitualmente en ausencia de positividad para CD5, CD23, CD10, CD27 y CD45RO. La expresión de CD11c y CD43 es variable. Algunos autores han asociado la expresión de CD5 con un comportamiento más agresivo y un peor pronóstico de la enfermedad.<sup>56</sup>

#### IV.5.2.7. Linfoma linfoplasmocítico (LLP) y macroglobulinemia de Waldenstrom (MW).

El LLP frecuentemente presenta infiltración de la MO; por el contrario, la presencia de células B clonales en SP es menos habitual en esta entidad. En las muestras infiltradas (tanto en SP como en MO) a menudo coexisten desde linfocitos pequeños clonales a linfoplasmocitos típicos y células plasmáticas que expresan el mismo isotipo de cadena ligera de Igs. En la mayoría de los casos se detecta un componente monoclonal, aunque a veces se necesitan métodos sensibles como la inmunofijación para su identificación. La MW es una variante de LLP caracterizada por la presencia de paraproteinemia IgM (que excede la concentración de 1,5 g/dL) y la acumulación de células linfoplasmocíticas en la MO. En los estadios avanzados de la enfermedad, los pacientes desarrollan organomegalias, anemia e hiperviscosidad sanguínea. La presencia de componente monoclonal IgM diferencia la MW de otras neoplasias con diferenciación plasmocitoide. Debido a sus características morfológicas e inmunofenotípicas, la MW se incluyó dentro del grupo más amplio de LLP, a partir de la clasificación REAL (Clasificación revisada Europea-Americana) de los linfomas y SLPC-B.

El perfil fenotípico de los linfocitos B neoplásicos de los pacientes con linfoma linfoplasmocítico generalmente es superponible al de los linfocitos B CD5-/CD23-maduros predominantes en sangre periférica: ausencia de reactividad para CD5, CD10 y CD23, expresión de marcadores pan-B (CD19+, CD20+/FMC7+, CD22+, CD24+), positividad constante para CD25 y CD54 y reactividad variable para CD38.<sup>1</sup> Característicamente, en la MW se observa expresión de sIgM en ausencia de sIgD asociada a un predominio de casos sIgκ+ sobre los sIgλ+ (cociente κ/λ: 5/1); además, en alrededor de la mitad de los casos de MW se detecta en la MO la coexistencia de células plasmáticas clonales CD38++, CD56-, CD19-/++ que

presentan coexpresión de CD20 e IgM de membrana y citoplasmática conjuntamente con los linfocitos B maduros clonales.<sup>57</sup>

#### IV.5.2.8. Gammapatías monoclonales (GM) y mieloma múltiple (MM)

En términos generales, las GM representan neoplasias de células B terminalmente diferenciadas –CP-. Desde el punto de vista fenotípico existe una gran similitud entre las CP clonales de las distintas formas de GM. Así, estas células carecen de forma característica de marcadores asociados a otras neoplasias B como CD22, CD5 y CD23, pudiendo presentar una pequeña proporción de casos reactividad débil para slg y CD20.<sup>1</sup> Al igual que las CP normales, presentan fuerte reactividad para CD38, expresión de CD138 y Cylg;<sup>1</sup> por el contrario, con frecuencia son CD45- y CD19-. En las GM de significado incierto (GMSI) y en el MM se detecta frecuentemente una fuerte reactividad para CD56, en presencia o ausencia de un patrón de expresión aberrante para CD117, CD27, CD28, CD33, CD81, CD126, CD229 y CD86. En la leucemia de células plasmáticas (LCP) puede observarse expresión de CD56, aunque su frecuencia es claramente inferior a la detectada en las GMSI y en el MM; por el contrario, en la LCP se detecta más frecuentemente reactividad para CD20 y positividad más intensa para CD27. Estudios recientes muestran además la existencia de un descenso progresivo en los niveles de expresión de CD38, CD40, CD63, HLA-I y beta-2-microglobulina desde la GMSI a la LCP, pasando por el MM.<sup>58</sup>

#### IV.5.3. Características fenotípicas de los SLPC-T y SLPC-NK

Actualmente, nuestro conocimiento acerca de las características fenotípicas de los SLPC-T es más limitado que el de los SLPC-B, debido en gran medida a la menor frecuencia de presentación de este grupo de enfermedades y a su mayor complejidad diagnóstica. Por el contrario, a pesar de que las neoplasias de células NK maduras son muy poco frecuentes, su diagnóstico no suele plantear grandes dificultades, salvo en el caso de las leucemias/linfocitosis clonales de linfocitos grandes granulares de origen NK, debido a la ausencia de marcadores de clonalidad (ausencia de reordenamientos de los genes IGH y TCR), particularmente en el caso

de los varones, donde la utilidad de los test moleculares de inactivación del cromosoma X para el diagnóstico de clonalidad es prácticamente nula.<sup>58</sup>

#### IV.5.3.1. Leucemia prolinfocítica T

Los prolinfocitos T se caracterizan por presentar un fenotipo T (CD2+, CD3+, CD5+) maduro (ausencia de expresión de CD34, Tdt y CD1a junto a expresión generalmente fuerte de CD45) asociado de forma habitual a una expresión elevada de CD7 y un fenotipo CD4+/CD8-, aunque se han descrito también fenotipos CD4+/CD8+ y CD4-/CD8+ en aproximadamente ¼ y 1/10 casos, respectivamente. Estas células muestran también reactividad intensa para CD52 (diana terapéutica), positividad débil y variable para CD25 y HLA-DR, junto con características de un linfocito T escasamente diferenciado, de fenotipo naïve en la mayor parte de los casos (CD45RA+, CCR7+, CD27+, CD45RO-, CD28+). De forma característica, en la mayoría de los casos (~80%) se observa expresión citoplasmática de TCL1, asociada a translocaciones que involucran este gen en el cromosoma 14q32.1.<sup>59</sup>

#### IV.5.3.2. Leucemia/linfoma T del adulto

La leucemia/linfoma T del adulto presenta un fenotipo T maduro correspondiente al de un linfocito T regulador CD4+/CD25++ con expresión de CCR4 y Foxp3; además de la expresión de marcadores pan-T como CD2 y CD5, con frecuencia las células T neoplásicas muestran expresión débil o incluso negatividad para CD7 y, en menor medida, para CD3 y TCRαβ+. El antígeno CD8, así como los marcadores asociados a célula citotóxica CD57, CD56, CD11b y CD11c son habitualmente negativos en las células T clonales de estos pacientes. A veces se observa expresión parcial de CD30 en ausencia de proteína ALK y enzimas citotóxicas.<sup>1</sup>

#### IV.5.3.3. Leucemia de linfocitos T grandes granulares

Las leucemias/linfocitosis clonales de linfocitos T grandes granulares (LLGG-T) son un grupo de entidades relativamente heterogéneo desde el punto de vista fenotípico. En la mayoría de los pacientes las células T clonales expandidas muestran un fenotipo CD3+/TCRαβ+/CD8+, pero también se ha descrito una



proporción significativa de casos en los que se acumulan en SP y otros tejidos linfocitos T CD3+/TCR $\gamma\delta$ + /CD4- o linfocitos T CD3+/TCR $\alpha\beta$ + /CD4+ asociado o no a expresión débil de CD8. De forma excepcional se detectan expansiones clonales de células T con aspecto de linfocito grande granular CD3+/TCR $\alpha\beta$ + /CD8- /CD4-.

Generalmente, las células T de los pacientes con LLGG-T tienen un fenotipo citotóxico efector, independientemente de su origen en distintas subpoblaciones de células T, detectándose expresión intracitoplasmática de proteínas citotóxicas, como granzima B y M y perforina, junto a una reactividad variable para las moléculas CD16, CD56, CD57, CD11c y CD94, expresión intensa de CD45RA en ausencia de reactividad para CCR7 y CD28 y positividad variable para CD45RO. Otras moléculas pan-T como CD5, CD7 y CD2, que habitualmente son positivas, en estas células pueden mostrar una intensidad de expresión variable, detectándose incluso en algunos pacientes dos o más subpoblaciones T patológicas con diferentes niveles de expresión para estos marcadores.

Un análisis más detallado de las características fenotípicas de cada uno de los distintos subgrupos de LLGG-T pone de manifiesto la existencia de rasgos particulares en cada uno de ellos; a modo de ejemplo, las LLGG-T CD3+/TCR $\alpha\beta$ + /CD4+ se asocian de forma prácticamente constante con coexpresión de marcadores T como CD2, CD7 y CD5, junto con reactividad para los antígenos CD56 y CD57, en ausencia de positividad para otros marcadores asociados a célula citotóxica como CD11c, CD11b, CD16, CD161, CD158 y CD94; un hallazgo interesante es que en una proporción elevada de estos casos las células clonales expresan la familia TCRV $\beta$ 13.1, asociada a la presencia del alelo HLA-DRB1\*0701 e infección por CMV, la cual probablemente constituye el estímulo antigénico concreto involucrado en estas expansiones clonales T.

Por su parte, las LLGG-T CD3+/TCR $\gamma\delta$ + /CD4- se caracterizan por su frecuente expresión de marcadores pan-T, expresión de intensidad variable de CD8, CD56 y CD57 y ausencia de reactividad para CD16, CD11b y CD11c; de forma similar a lo que ocurre con las células T TCR $\gamma\delta$ + de SP de adultos sanos, en las LLGG-T CD3+/TCR $\gamma\delta$ + se observa un predominio de expansiones TCRV $\gamma$ 9 + /TCRV $\delta$ 2+.

Respecto a los casos CD3+/TCR $\alpha\beta$ +/CD8+, merece resaltar que suelen expresar un repertorio de regiones TCRV $\beta$  similar al de las células T CD8+ de sujetos adultos sanos. Fenotípicamente, las células clonales de estos pacientes expresan antígenos pan-T habitualmente asociados a reactividad variable para CD57, CD11c y CD56. La intensidad de expresión de CD8 suele ser intensa, en ausencia de CD4.<sup>60</sup>

#### IV.5.3.4. Síndrome de Sézary y micosis fungoide

El linfocito T patológico de los pacientes con síndrome de Sézary y micosis fungoide muestra un fenotipo característico de una célula T CD4+ de memoria, habitualmente de memoria central. La gran mayoría de los casos son CD4+ en ausencia de CD8, siendo raros los casos que expresan CD8, que se comportan desde el punto de vista clínico de igual forma que los CD4+; con frecuencia este último fenotipo se describe en pacientes pediátricos. En la mayor parte de los casos (>95%), las células de Sézary expresan niveles bajos (respecto del linfocito T CD4+ circulante normal) de TCR $\alpha\beta$ /CD3 (94%), CD4 (94%), CD7 (100%) y/o CD2 (83%). Este patrón constituye el fenotipo aberrante característico de las células de Sézary, ausente en los linfocitos T de pacientes con eritrodermias reactivas. Además, las células de Sézary muestran reactividad para el antígeno CD28+, CD45RO+, CCR7+ (fenotipo de memoria central) y CD5+, en ausencia de expresión de marcadores asociados a células citotóxicas (CD8-, CD56-, CD57-, CD11b-, CD11c-, CD161-, CD158- y CD94-, entre otros).

Pese a poseer rasgos fenotípicos característicos, es frecuente que en un mismo paciente las células de Sézary sean fenotípicamente heterogéneas, e incluso que se detecten distintas subpoblaciones de células T neoplásicas con diferente tamaño y complejidad (FSC y SSC), contenido de ADN (diploide y tetraploide) y fenotipo (por ejemplo: coexistencia de subpoblaciones celulares CD7- y CD7+).<sup>61</sup>

#### IV.5.3.5. Linfoma T angioinmunoblástico

El linfoma T angioinmunoblástico muestra habitualmente un fenotipo típico (similar en la sangre periférica y en los ganglios linfáticos), caracterizado por la presencia de una o varias subpoblaciones de células T CD4+/CD8- con expresión

anormalmente disminuida y variable de CD3/TCR $\alpha\beta$ +, asociada o no a una expansión numérica de tipo policlonal de las células B. De forma característica, las células neoplásicas de prácticamente todos los pacientes con linfoma T angioinmunoblástico expresan los antígenos CD10, CXCL13, y PD-1 (CD279, miembro de la familia extendida CD28/CTLA-4), fenotipo similar al de la célula T colaboradora folicular CD4+ normal, de la que se ha propuesto recientemente que se originaría esta neoplasia.<sup>62</sup>

#### IV.5.3.6. Linfoma T periférico NOS («not otherwise specified»)

Este subgrupo de linfomas T comprende aproximadamente un 30 por ciento de los linfomas T periféricos, de manera que en la mayoría de las series representa el grupo más frecuente de todas las neoplasias T postímicas; en realidad, es un grupo muy heterogéneo, ya que en esta categoría se incluyen todos aquellos linfomas T periféricos que no pueden adscribirse a ninguna otra categoría de la OMS. Reflejo de ello es su gran heterogeneidad en lo que se refiere a la expresión de marcadores T, pudiendo ser positivos o negativos para los antígenos pan-T CD3, CD2, CD5 y CD7; además, estos linfomas pueden expresar niveles bajos de CD30, moléculas asociadas a citotoxicidad (granzima B, perforina, CD56 y CD57) e incluso marcadores asociados a célula T CD4+ colaboradora folicular (como PD-1). En la mayoría de los casos (65%) las células clonales son CD4+/CD8, aunque pueden detectarse también fenotipos CD4-/CD8+ (15% de los casos) y mas raramente CD4-/CD8- (10%) e incluso CD4+/CD8+ (10% de los casos). Suelen expresar la isoforma CD45RA del antígeno CD45, en ausencia de CD45RO.<sup>63</sup>

#### IV.5.3.7. Linfoma T hepatoesplénico

En la clasificación más reciente de la OMS se incluye el linfoma T hepatoesplénico como un nuevo subtipo de linfoma T, y es una neoplasia agresiva derivada de células T citotóxicas, que en la mayoría de los casos expresan el receptor TCR $\gamma\delta$ . Desde el punto de vista fenotípico el linfoma T hepatoesplénico se caracteriza por presentar un perfil en general superponible al de las expansiones clonales de linfocitos T $\gamma\delta$  tipo LLGG-T $\gamma\delta$  CD3+, TCR $\gamma\delta$ +, CD2+ y CD7+ asociados a una expresión variable de

CD5 y CD8 y positividad generalmente débil (e incluso a veces ausente) para enzimas citotóxicas (granzima B y perforina) y CD56, en ausencia de CD94 y otros receptores KIR.<sup>64</sup>

#### IV.5.3.8. Linfoma T subcutáneo tipo paniculítico

El linfoma T subcutáneo tipo paniculítico característicamente se asocia a una expansión clonal de células T TCR $\alpha\beta$ +, CD8+, con fenotipo citotóxico y expresión de  $\beta$ F1 en ausencia de CD56; este linfoma habitualmente infiltra el tejido subcutáneo en ausencia de diseminación periférica. En la nueva clasificación de la OMS<sup>1</sup> se excluye de esta entidad el linfoma T- $\gamma\delta$  cutáneo primario.<sup>64</sup>

#### IV.5.3.9. Linfoma T/NK extranodal, tipo nasal

El linfoma T/NK extranodal, tipo nasal representa una entidad rara en nuestro medio, que está asociada en la mayoría de los casos a infección por el virus de Epstein-Barr (EBV). Histológicamente se observa un infiltrado pleomórfico en la lesión tumoral, con destrucción vascular y necrosis asociada. Fenotípicamente, las células neoplásicas muestran rasgos típicos de células NK, tanto a nivel citoplasmático (TIA1+, granzima+, perforina+) como de membrana (CD56+, CD16-/+, CD2+, CD3-) asociado o no a expresión de CD30 y CD7, generalmente en ausencia de reactividad para CD57, HLA-DR, CD25 y CD95; en una minoría de los casos se observa un fenotipo de célula T citotóxica CD3+/CD56+.

Aquellos casos en los que se observa expresión de CD3 intracitoplasmático en ausencia de CD56 y que son EBV+, CyGranzima+ y CyPerforina+, se clasifican como linfoma T/NK extranodal, mostrando estos casos un comportamiento clínico similar al de los casos CD56+.<sup>64</sup>

#### IV.5.3.10. Linfoma T asociado a enteropatía

De forma característica, en el linfoma T asociado a enteropatía se detecta una expansión de linfocitos T CD7+, CD3+/TCR $\alpha\beta$ + en ausencia tanto de CD4 como CD8 o con expresión débil de este último marcador. Es típico que las células T

neoplásicas de estos pacientes coexpresen el antígeno CD103 y presenten reactividad variable para CD30, en ausencia de CD5.<sup>1</sup>

#### IV.5.3.11. Linfoma T anaplásico de células grandes, ALK+

El linfoma T anaplásico de células grandes ALK+ muestra un fenotipo característicamente CD30+, asociado a expresión variable de marcadores pan-T como CD3, CD7, CD2, y CD5, así como de CD25. Así mismo, en estos pacientes pueden ser positivos o negativos los antígenos EMA, CD15, CD43, CD45, CD45RO, en ausencia de CD68; de forma característica muestran expresión de la proteína ALK, asociada a las translocaciones que involucran este gen en el cromosoma 2p23, de las cuales la más frecuente de todas (84% de los casos) es la t(2;5)(p23;q53), que resulta en la generación de la proteína quimérica NPM-ALK.<sup>1</sup>

#### IV.5.3.12. Linfoma T anaplásico de células grandes ALK-

A diferencia de lo que ocurre en el linfoma T anaplásico de células grandes ALK+, este subtipo de linfoma T carece por definición de la expresión de ALK, asociada a positividad intensa para CD30 y pérdida de expresión de uno o múltiples antígenos pan-T; con relativa frecuencia se observa expresión de CD4 y raramente de CD8. Por el momento se trata de una entidad provisional en la nueva clasificación de la OMS, y el interés de su distinción de la forma ALK+ radica sobre todo en que tiene un pronóstico diferente, claramente peor.<sup>1</sup>

#### IV.5.3.13. Síndrome linfoproliferativo crónico de células NK (SLPC-NK)

El síndrome linfoproliferativo crónico de células NK (SLPC-NK) es el subgrupo de neoplasias/expansiones de células NK maduras más frecuente en los países occidentales. Esta nueva categoría (de momento provisional) ha sido propuesta por la OMS en su última clasificación, y ha venido a sustituir los nombres previos de «linfocitosis crónica de células NK», «leucemia crónica de células grandes granulares NK», y «leucemia/linfocitosis de LGG de células NK», entre otros, agrupando a todos ellos (leucemias y linfocitosis) bajo un término común, ya que en muchas ocasiones no es posible demostrar la naturaleza clonal de las células NK expandidas. Desde el

punto de vista práctico, las células NK de los SLPC-NK presentan un fenotipo de célula madura, similar al de su contrapartida normal: CD16+, CD3-, CD7+, Cygranxima+ y Cyperforina+. Según la expresión de CD56 y CD2 pueden definirse tres subtipos de SLPC-NK: 1) SLPC-NK de células CD56+/CD2+, 2) expansiones NK CD56+/CD2- y 3) SLPC-NK CD2+/CD56-/débil. El primer subgrupo es el más frecuente, ya que representa alrededor de 50 por ciento de los casos; a su vez los casos con expresión anormalmente descendida o ausente de CD56 representan alrededor de 40 por ciento de todos los SLPC-NK, mientras que los pacientes CD2-/CD56+ representarían el subgrupo menos frecuente (<10% de los casos). Estudios previos han demostrado el carácter clonal de las expansiones NK con expresión anormalmente baja o ausente de CD56 y CD2, pero también hay algunos casos en los que se ha podido comprobar que las células NK CD56-/débil expandidas son policlonales. Por su parte, el fenotipo de las células NK clonales CD56+/CD2+ es prácticamente idéntico al de las células NK maduras de SP, excepto en lo que se refiere a la positividad para CD94 y HLA-DR, que está significativamente incrementada, expresándose además CD94 de forma homogénea en las células NK patológicas. Aunque algunos autores han sugerido que el patrón de expresión de proteínas de algunos receptores NK como CD158, podría ser distinto en las células NK neoplásicas y en las reactivas, sus hallazgos no han podido ser confirmados posteriormente por otros grupos.<sup>65</sup>

#### IV.5.3.14. Leucemia agresiva de células NK

La leucemia agresiva de células NK constituye una entidad rara en nuestro medio, que afecta predominantemente a adultos jóvenes, casi siempre asociada a infección por EBV. Clínicamente estos pacientes presentan mal pronóstico y una evolución generalmente rápida asociada a fracaso terapéutico.<sup>1</sup> Habitualmente cursa como una enfermedad sistémica con hepatoesplenomegalia y afectación ganglionar asociadas a recuentos linfocitarios elevados. Aunque se han descrito algunas anomalías cromosómicas como del (6) (q21q25) y delección de 11q, no existe una alteración genética característica de esta enfermedad.

Fenotípicamente, las células tumorales muestran características superponibles a las de las células NK normales, con expresión de proteínas citotóxicas a nivel citoplasmático (TIA1+, granzima+, perforina+) junto con moléculas de membrana características de células NK maduras (CD56+, CD16+, CD7+, CD3-, CD8- o +), siendo habitual la expresión de CD95 en ausencia de CD57.<sup>66</sup>

## **V. HIPÓTESIS.**

- El perfil inmunofenotípicos de los síndromes linfoproliferativos crónicos, más frecuente se caracteriza por la expresión de marcadores de superficie de estirpe B.



## VI. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.

Variables	Definición	Indicador	Escala
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el momento de la entrevista de la paciente	Años cumplidos	Ordinal
Sexo	Género al que pertenece el paciente.	Masculino Femenino	Nominal
Tipo de síndrome	Tipo de síndrome identificado según el estudio clínico, patológico e inmunofenotípico.	Linfoma células B Linfoma células T Linfoma células NK	Nominal
Marcadores aberrantes	Marcador no característico de la línea celular afectada.	Referido en el expediente	Nominal
Inmunofenotípico	Son marcadores genéticos y hacen referencia a los CD (cluster differentiation) o grupos de diferenciación.	Marcador identificado mediante citometría de flujo referido en el expediente	Nominal
Estadío	Estadío clínico en que se encuentra la enfermedad al momento del diagnóstico	0 I II III IV	Nominal

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

### VII.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal con recolección retrospectiva de datos, con el objetivo de determinar el perfil inmunofenotípico de los síndromes proliferativos crónicos en el Hospital Doctor Salvador Bienvenido Gautier, 2005-2012. (Ver anexo XIII.1. Cronograma).

### VII.2. Ubicación

El Hospital Dr. Salvador B. Gautier está ubicado en la calle Alexander Fleming esquina Pepillo Salcedo, del Ensanche La Fe, del Distrito Nacional. Delimitación: Al Norte, la Calle Genard Pérez; al Sur, la calle Alexander Fleming; al Este, la Calle 37 y al Oeste, la Juan 23.



### VII.3. Población y muestra

La población de referencia estuvo constituida por todos pacientes con síndrome proliferativo crónico en el Hospital Doctor Salvador Bienvenido Gautier en el periodo 2005-2012.

### VII.4. Criterios de inclusión

La selección de la muestra de estudio tomó en cuenta los siguientes criterios:

- Todos los pacientes con síndrome proliferativo crónico.
- Expedientes completos.
- Pacientes atendidos dentro del periodo de estudio.

### VII.5. Criterios de exclusión

- Pacientes solo con estudio morfológicos e histopatológicos
- Pacientes con neoplasias linfoides de células inmaduras
- Pacientes con diagnóstico de linfoma de Hodgkin y gammopatías monoclonales

### VII.6. Instrumento de recolección de datos

Para la recolección de la información se aplicó un formulario a cada paciente que presentó síndrome linfoproliferativo crónico. El cual contiene la edad, sexo, tipo de síndrome linfoproliferativo, marcadores inmunofenotípicos, marcadores aberrantes y el estadio clínico. (Ver anexo VIII.2. Instrumento de recolección de datos).

### VII.7. Procedimiento

Los formularios fueron llenados por la sustentante, aplicándolo a todos los expedientes de los pacientes que presentaron síndrome proliferativo crónico en el Hospital Salvador B. Gautier durante el período 2005-2012.

### VII.8. Tabulación y análisis

La información obtenida fue procesada por el método de palotes. Y se presenta en frecuencia simple.

#### VII.9. Presentación de los datos.

Los datos fueron presentados en un documento escrito a computadora, a un espacio y serán ilustrados con cuadros y gráficos representativos de la investigación.

#### VII.10. Aspectos éticos

La información se manejó de manera estrictamente confidencial, así como los nombres de las pacientes involucrados en el estudio.

## VIII. RESULTADOS.

Cuadro 1. Perfil Inmunofenotipo de los síndromes proliferativos crónicos en el Hospital Doctor Salvador Bienvenido de Gautier 2005-2012. Según Edad e inmunofenotipo.

Edad								
Inmunofenotipo	B		T		Nk		Total	
	F	%	F	%	F	%	F	%
<20	1	1.8	0	0.0	0	0.0	1	1.8
20-29	0	0.0	2	3.6	1	1.8	3	5.5
30-39	7	12.7	1	1.8	0	0.0	8	14.5
40-49	5	9.1	1	1.8	0	0.0	6	10.9
50-59	7	12.7	1	1.8	0	0.0	8	14.5
60-69	13	23.7	2	3.6	0	0.0	15	27.3
70-79	9	16.4	0	0.0	0	0.0	9	16.4
80-89	4	7.3	0	0.0	0	0.0	4	7.3
≥90	1	1.8	0	0.0	0	0.0	1	1.8
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>85.5</b>	<b>7</b>	<b>12.7</b>	<b>1</b>	<b>1.8</b>	<b>55</b>	<b>100.0</b>

Fuente. Archivo. Hospital Doctor Salvador Bienvenido de Gautier.

El 23.7 por ciento de los pacientes con Inmunofenotipo B tenían edades entre 60-69 años, el 16.4 por ciento entre 70-79 años, el 12.7 por ciento entre 30-39 años, el 14.9 por ciento entre 50-59 años, el 9.1 por ciento entre 40-49, el 7.3 por ciento entre 80-89 años, el 1.8 por ciento menor a 20 años y mayor o igual a 70 años.

El 3.6 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipo T tenían edades entre 20-29 y 60-69 años, y el 1.8 por ciento entre 30-39, 40-49, y 50-59 años.

El 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipo NK tenían edades entre 20-29 años.

Cuadro 2. Perfil Inmunofenotipo de los síndromes proliferativos crónicos en el Hospital Doctor Salvador Bienvenido de Gautier 2005-2012. Según sexo e inmunofenotipo.

Inmunofenotipo								
Sexo	B		T		NK		Total	
	F	%	F	%	F	%	F	%
Masculino	34	61.8	4	7.3	0	0	38	69.1
Femenino	13	23.7	3	5.4	1	1.8	17	30.9
Total	47	85.5	7	12.7	1	1.8	55	100.0

Fuente. Archivo. Hospital Doctor Salvador Bienvenido de Gautier.

El 61.8 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipo B pertenecen al sexo masculino, y el 23.7 por ciento al sexo femenino.

El 7.3 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipo T pertenecen al sexo masculino, y el 5.4 por ciento al sexo femenino.

El 1.8 por ciento de los pacientes con Inmunofenotipo NK pertenecen al sexo femenino, y no se presentó ninguno en el sexo masculino.

Cuadro 3. Perfil Inmunofenotipo de los síndromes proliferativos crónicos en el Hospital Doctor Salvador Bienvenido de Gautier 2005-2012. Según. Inmunofenotipo.

Inmunofenotipo	Frecuencia	%
B	47	85.5
T	7	12.7
NK	1	1.8
Total	55	100.0

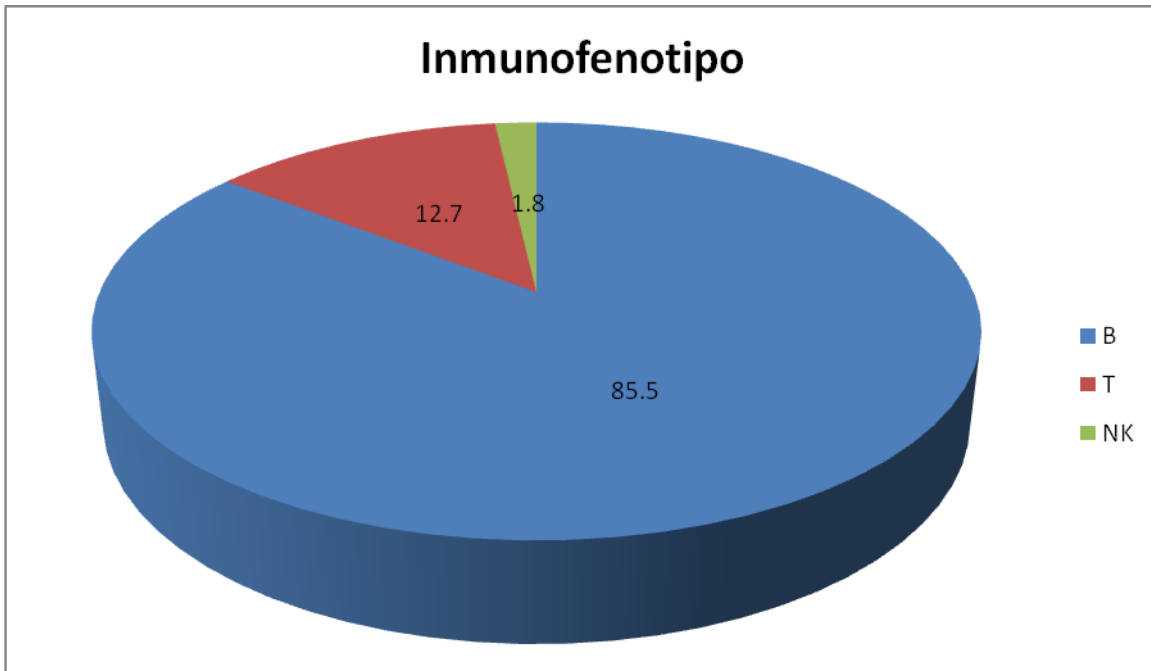
Fuente. Archivo. Hospital Doctor Salvador Bienvenido de Gautier.

El 85.5 por ciento de los pacientes pertenecen al Inmunofenotipo B.

El 12.7 por ciento de los pacientes pertenecen al Inmunofenotipo T.

El 1.8 por ciento de los pacientes pertenecen al Inmunofenotipo NK.

Gráfico 1: Perfil Inmunofenotipo de los síndromes proliferativos crónicos en el Hospital Doctor Salvador Bienvenido de Gautier 2005-2012. Según. Inmunofenotipo.



Fuente: Cuadro 3

Cuadro 4. Perfil Inmunofenotipo de los síndromes proliferativos crónicos en el Hospital Doctor Salvador Bienvenido de Gautier 2005-2012. Según estadio clínico e inmunofenotipo.

Estadio clínico	Inmunofenotipo							
	B		T		NK		Total	
	F	%	F	%	F	%	F	%
0	3	5.5	0	0.0	0	0.0	3	5.5
1	10	18.2	2	3.6	0	0.0	12	21.8
2	5	9.1	1	1.8	0	0.0	6	10.9
3	12	21.8	1	1.8	0	0.0	13	23.6
4	17	30.9	3	5.5	1	1.8	21	38.2
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>85.5</b>	<b>7</b>	<b>12.7</b>	<b>1</b>	<b>1.8</b>	<b>55</b>	<b>100.0</b>

Fuente. Archivo. Hospital Doctor Salvador Bienvenido de Gautier.

El 30.9 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipos B estaban en estadio clínico grado 4, el 21.8 por ciento estaban en estadio clínico grado 3, el 18.2 por ciento estaban en estadio clínico grado 1, el 9.1 por ciento estaban en estadio clínico grado 2, y el 5.5 por ciento estaban en estadio clínico grado 0.

El 5.5 por ciento de los pacientes que presentaron inmunofenotipo T estaban en el estadio 4; el 3.6 por ciento estaban en el estadio 1, y el 1.8 por ciento estaban en el estadio 2 o en el 3.

El 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron inmunofenotipo NK se encontraban en el estadio 4.



Cuadro 5. Perfil Inmunofenotipo de los síndromes proliferativos crónicos en el Hospital Doctor Salvador Bienvenido de Gautier 2005-2012. Según Marcadores de superficie en células B e histopatológicos.

Marcadores de superficie en células B	Leucemia linfática crónica		Linfoma folicular		Linfoma malt		Linfoma de la zona marginal		Linfoma Burkitt		Linfomas de células manto		Linfoma difuso de células grandes	
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
CD3	2	3.6	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8
CD5	22	40.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8	2	3.6
CD10	0	0.0	1	1.8	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	9	16.4
CD15	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CD17	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CD19	20	36.4	0	0.0	0	0.0	2	3.6	0	0.0	1	1.8	2	3.6
CD20	23	41.8	3	5.5	3	5.5	2	3.6	1	1.8	0	0.0	11	20.0
CD22	4	7.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8
CD23	20	36.4	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CD25	5	9.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CD38	2	3.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0
CD43	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0
CD45	17	30.9	3	5.5	2	3.6	2	3.6	1	1.8	1	1.8	10	18.2
CD52	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CD71	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	3.6	0	0.0	0	0.0	1	1.8
CD79 a	0	0.0	3	5.5	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	10	18.2
BCL2	0	0.0	3	5.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8
FMC7	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
ZAP70	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Cadenas Ligeras Kapp	16	29.1	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	1	1.8	1	1.8
HLADR	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
LAMBDA	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0

El 41.8 por ciento de los pacientes que presentaron leucemia linfática crónica en los marcadores B son de CD20, el 40.0 por ciento en los marcadores B son de CD5, el 36.4 por ciento en los marcadores B son de CD19 y CD23, el 30.9 por ciento en los marcadores B son de CD45, el 29.1 por ciento se encuentran en las Cadenas Ligeras Kapp, el 9.1 por ciento en los marcadores B se encuentran en CD25, el 7.3 por ciento en los marcadores B son de CD22, el 3.6 por ciento en los marcadores B son de CD38 y CD 3 y el 1.8 por cientos en los marcadores B son de CD15, CD17, CD52, FMC7, ZAP70, HDLAR y LAMBDA.

El 5.5 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma folicular en los marcadores B se encuentran en el CD20, CD45, CD79 a, BCL2, y el 1.8 por ciento en los marcadores B se encuentran en el CD3.

El 5.5 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma malt en los marcadores B se encuentran en el CD20, el 3.6 por ciento en los marcadores B se encuentran en el CD45, y el 1.8 por ciento en los marcadores B se encuentran en el CD43.

El 3.6 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma de la zona marginal en los marcadores B se encuentran en el CD19, CD20, CD45, CD71 y el 1.8 por ciento en los marcadores B se encuentran en las Cadenas Ligeras Kapp.

El 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma Burkitt en los marcadores B se encuentran en el CD10, CD20, CD45, CD79.

El 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Linfomas de células manto en los marcadores B se encuentran en el CD5, CD19, CD38, CD43, CD45, y Cadenas Ligeras Kapp.

El 20.0 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma difuso de células grandes en los marcadores B se encuentran en el CD20, el 18.2 por ciento de los marcadores B se encuentran en el CD45, CD79 a, el 16.4 por ciento en los marcadores B se encuentran en el CD10, el 3.6 por cientos de los marcadores B se encuentran en el CD5 y CD19, el 1.8 por ciento en los marcadores B se encuentran en el CD3, CD22, CD71, BL2 y Cadenas Ligeras Kapp, el 2.0 por ciento en los marcadores B son de CD71, CD22, CD3.

Cuadro 6. Perfil Inmunofenotipo de los síndromes proliferativos crónicos en el Hospital Doctor Salvador Bienvenido de Gautier 2005-2012.

Marcadores de superficie en células T/NK	Histopatológicos											
	Linfoma linfoblástico		Linfoma de células periféricas		Leucemia de linfocitos T gramilares grandes		Micosis fungidas		Leucemia prolinfática crónica T		NK Nasal	
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
CD2	0	0.0	1	1.8	1	1.8	1	1.8	1	1.8	0	0.0
CD3	1	1.8	3	5.5	0	0.0	1	1.8	1	1.8	1	1.8
CD4	0	0.0	2	3.6	0	0.0	1	1.8	0	0.0	0	0.0
CD5	0	0.0	1	1.8	1	1.8	1	1.8	0	0.0	1	1.8
CD7	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CD8	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CD10	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CD16	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CD38	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0
CD45	1	1.8	3	5.5	1	1.8	1	1.8	1	1.8	1	1.8
CD56	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CD71	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Alfa/Beta	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0
TKR	0	0.0	0	0.0	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0
TDT policlinal	1	1.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CD70	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8
CD56	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	1.8

El 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma linfoblástico en los marcadores T/NK se encuentran en CD3, CD10, CD45 y el TDT policlinal.

El 5.5 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma de células periféricas en los marcadores T/NK se encuentran en el CD3, CD45, el 3.6 por ciento en los marcadores T/NK se encuentran en el CD4, y el 1.8 por ciento en los marcadores T/NK se encuentran en el CD2 y el CD5.

El 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Leucemia de linfocitos T granulares grandes en los marcadores T/NK se encuentran en el CD2 CD5, CD7, CD8, CD16, CD45, CD56, CD71, Alfa/Beta y el TKR.

El 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Micosis fungidas en los marcadores T/NK se encuentran en el CD2, CD3, CD4, CD5 y el CD45.

El 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Leucemia prolinfoatica crónica T en los marcadores T/NK se encuentran en el CD2, CD3, CD38 y el CD45.

El 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron NK Nasal en los T/NK se encuentran en el CD3, CD5, CD45, CD70 y el CD56.

## **IX. DISCUSIÓN.**

La inmunofenotipificación ha demostrado ser de gran utilidad en oncohematología para la identificación de las células neoplásicas, la definición de las células leucémicas o linfomatosas y la subclasificación de las diversas enfermedades en base a la línea celular que les diera origen. Por ello, la citometría de flujo desde el punto de vista de su utilización diagnóstica, constituye un criterio objetivo que integrado con parámetros clínicos, biológicos y morfológicos permite arribar a un diagnóstico final.

A este respecto, la inmunofenotipificación asumió un rol importante en el diagnóstico correcto de los SLPC debido a que la diferenciación entre alguno de éstos síndromes puede complicarse por la similitud clínica y los rasgos morfológicos que manifiestan. Además, la inmunofenotipificación ha permitido la identificación de leucemias crónicas NK, de células T y de células vellosas B, así como también de algunos linfomas leucemizados. Por ello determinamos el perfil inmunofenotípico en una serie de SLPC con expresión hemoperiférica.

En lo que respecta a la edad de los pacientes de nuestro estudio, encontramos un porcentaje mayor pacientes mayores de 60 años y se presentó en su mayoría en el sexo masculino. Al comparar estos resultados con los obtenidos en estudio realizado por Rubiolo en Córdoba, Argentina, encontramos coincidencia dado que la mayoría de los pacientes en su estudio estaban en edades mayores a los 60 años, aunque no coincide en el sexo ya que las mujeres fueron predominantes en su estudio.<sup>67</sup>

El inmunofenotipo más frecuentes fue el B en un 85.5 por ciento de los pacientes, coincidiendo con los resultados de de Rubiolo y coincidiendo con lo descrito en la bibliografía.<sup>68</sup> Estas características correspondieron a la forma clásica de la LLC, que resultó ser la más frecuente al igual que en el estudio de Rubiolo. El estudio inmunofenotípico de éstas células permitió caracterizarlas como linfocitos B maduros que expresaron lo informado previamente.<sup>69</sup> Dentro de los marcadores encontramos una mayor identificación del CD20, CD5, CD19, CD23 y CD45. Nuestros resultados coinciden con los de Rubiolo, ya que en su estudio estuvieron presentes los mismos marcadores en proporciones elevadas.

En linfoma de la zona marginal representó 3.6 por ciento de los casos. El inmunofenotipo de las células linfoides se caracterizó por expresar CD19, CD20 y CD22 con ausencia de CD5, CD10 y CD23, coincidiendo con los resultados obtenidos por Rubiolo.<sup>67</sup>

En el linfoma del manto las células neoplásicas expresaron CD5, CD19, y FMC-7 con ausencia de CD10 y CD23, lo que permitió diferenciarla de la LLC-B, coincidiendo con los resultados de Rubiolo.<sup>67</sup>

En el Linfoma Folicular la leucemización no es tan frecuente como en la Leucemia linfática crónica y cuando se produce esta es escasa. En este estudio, las células linfoides de los pacientes con Linfoma folicular expresaron, CD20, CD45, CD79a BCL2, coincidiendo con Rubiolo, excepto en que nuestro estudio tuvo presencia en CD5 aunque en muy poca cantidad, lo que no estuvo presente en el estudio de Rubiolo. En este tipo de linfoma debe tenerse presente el tipo de muestra que se analiza para la correcta interpretación del fenotipo. En condiciones fisiológicas existen en ciertos tejidos, como la médula ósea, linfocitos B que expresan CD10.<sup>70,71</sup>

Con respecto a los Síndromes Linfoproliferativo Crónico -T/NK, la demostración de clonalidad es más dificultoso que para las células B debido a que no hay una analogía entre expresión del RCT y la expresión de cadenas livianas k o  $\lambda$ .<sup>69</sup> La característica más específica que indica proliferación clonal T es la ausencia de uno o más de los cuatro marcadores pan T (CD2, CD3, CD5, CD7) que puede impartir un fenotipo nulo y dificultar la asignación del linaje celular. Comúnmente es la ausencia de CD7, seguida por CD5 y CD2 y menos frecuentemente, pérdida de CD3.

Las neoplasias de células T/NK maduras son relativamente poco comunes. En un amplio estudio internacional, estas neoplasias sólo representaron el 12 por ciento de todos los Linfomas No Hodgkin.<sup>72</sup>

En nuestro estudio en las LPL-T incluidas encontramos la presencia de CD3, CD10, CD45, TDT policlonal, resultados que no coinciden con los obtenidos por Rubiolo en su estudio, ni por otros estudios realizados que se incluyen en la bibliográfica.<sup>73</sup> Las LPL-T incluidas en el trabajo de Rubiolo expresaron los marcadores CD2, CD5 y CD7. Se ha determinado que la expresión de CD3 puede

ser débil o aún ausente lo que indica que estas células se encuentran en un estadio de diferenciación intermedio entre células T tímicas y postímicas,<sup>73</sup> datos que, al encontrarse la presencia de estas células en nuestro estudio, significan que los pacientes que la presentaron ya sus células habían realizado esta transición. El 60 % de los pacientes tiene células que expresan CD4 pero no CD8, un 25 por ciento coexpresan CD4 y CD8, un 15 por ciento expresa CD8 pero no CD4.<sup>74,75</sup>

En este trabajo, las células de ninguno de los pacientes presentaron ni CD4 ni CD8. El diagnóstico de la LPL-T debe ser confirmado, además de la morfología y el inmunofenotipo, con las características clínicas y la demostración de la inv (14)(q11;q32) o la traslocación t(14;14)(q11;q32).<sup>76</sup>

La mayoría de los casos de MF provienen de células T CD4+ que evidencian pérdida de CD7 y bajos niveles de marcadores de activación, tales como CD25 y CD30. En nuestro estudio encontramos la presencia de células CD2, CD3, CD4, CD5, CD45, y ausencia de CD7 igual a lo descrito en la literatura. Recientemente se ha determinado que la MF es una neoplasia de células T de memoria efectoras residente de la piel.<sup>77</sup>

La enfermedad linfoproliferativa de Linfocitos Granulares Grandes es una linfocitosis clonal atípica relativamente rara que involucra a un fenotipo CD3+ o CD3-.<sup>78</sup> Por ello, las proliferaciones clonales de estas células han sido denominadas LLGG-T y LLGGNK, respectivamente. La demostración de clonalidad de los LGG es necesaria para establecer el diagnóstico.<sup>79</sup> Para ello, se puede utilizar el análisis del rearreglo de genes del RCT por reacción en cadena de la polimerasa o Southern blot.<sup>80</sup> El rol de la citometría de flujo para demostrar presencia de una población de LGG neoplásicos no ha sido aún totalmente establecido.

La característica de la LLGG-T es la expansión clonal de linfocitos CD8+ citolíticos en la sangre periférica y que presentan baja intensidad de coloración para CD5 o CD7.<sup>81</sup> Nuestro paciente presentó linfocitos CD2, CD5, CD7, CD8, CD16, CD45, CD56, CD71, Alfa/Beta, y TKR. La expansión monoclonal de LGG-T CD4+ ha sido informada en raras ocasiones.<sup>82</sup> En esta neoplasia, la expresión de CD56 es variable y se ha asociado con un curso clínico más agresivo.<sup>83</sup>

## **X. CONCLUSIONES.**

Analizados y discutidos los resultados hemos llegado a las siguientes conclusiones:

En lo respecta a la edad, el 23.7 por ciento de los pacientes con Inmunofenotipo B tenían edades entre 60-69 años; el 3.6 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipo T tenían edades entre 20-29 y 60-69 años; y el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipo NK tenían edades entre 20-29 años

En cuanto al sexo de los pacientes, el 61.8 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipo B pertenecen al sexo masculino; el 7.3 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipo T pertenecen al sexo masculino; y el 1.8 por ciento de los pacientes con Inmunofenotipo NK pertenecen al sexo femenino

El 85.5 por ciento de los pacientes pertenecen al Inmunofenotipo B; el 12.7 por ciento de los pacientes pertenecen al Inmunofenotipo T; y el 1.8 por ciento de los pacientes pertenecen al Inmunofenotipo NK.

En cuanto al estadio clínico de los pacientes, el 30.9 por ciento de los pacientes que presentaron Inmunofenotipos B estaban en estadio clínico grado 4; el 5.5 por ciento de los pacientes que presentaron inmunofenotipo T estaban en el estadio 4; y el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron inmunofenotipo NK se encontraban en el estadio 4.

En lo que respecta a los marcadores B, el 41.8 por ciento de los pacientes que presentaron leucemia linfática crónica en los marcadores B son de CD20; el 5.5 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma folicular en los marcadores B se encuentran en el CD20, CD45, CD79 a, BCL2; el 5.5 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma malt en los marcadores B se encuentran en el CD20; el 3.6 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma de la zona marginal en los marcadores B se encuentran en el CD19, CD20, CD45, CD7; el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma Burkitt en los marcadores B se encuentran en el CD10, CD20, CD45, CD79; el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Linfomas de células manto en los marcadores B se encuentran en el CD5, CD19, CD38, CD43, CD45; y el 20.0 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma difuso de células grandes en los marcadores B se encuentran en el CD20,



En cuanto a los marcadores T/NK, el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma linfoblástico en los marcadores T/NK se encuentran en CD3, CD10, CD45; el 5.5 por ciento de los pacientes que presentaron Linfoma de células periféricas en los marcadores T/NK se encuentran en el CD3, CD45; el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Leucemia de linfocitos T grandes en los marcadores T/NK se encuentran en el CD2, CD5, CD7, CD8, CD16, CD45, CD56, CD71, Alfa/Beta y el TKR; el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Micosis fungoides en los marcadores T/NK se encuentran en el CD2, CD3, CD4, CD5 y el CD45; el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron Leucemia prolinfocítica crónica T en los marcadores T/NK se encuentran en el CD2, CD3, CD38 y el CD45; el 1.8 por ciento de los pacientes que presentaron NK Nasal en los T/NK se encuentran en el CD3, CD5, CD45, CD70 y el CD56.

## **XI. RECOMENDACIONES.**

- Recomendamos el uso de CD38 en combinación con CD19, CD20 y CD10 ya que estos permiten la identificación de todos los casos de Linfoma Folicular, y los marcadores CD19, CD20 y CD10 solos o en combinación no permiten la identificación en un porcentaje significativo de los casos de Linfoma Folicular. Esto indica la utilidad de la inclusión de CD38 en el panel de anticuerpos para la evaluación de poblaciones de células B centro foliculares y la importancia de evaluaciones multiparamétricas para el diagnóstico de esta neoplasia.
- El diagnóstico de una población de células NK neoplásicas requiere la integración de la clínica, la morfología, el inmunofenotipo y el genotipo. Desde el punto de vista del inmunofenotipo, para el diagnóstico es necesaria: la expresión de al menos un marcador de célula NK (CD16, CD56 o CD57); es por esto que recomendamos que se empleen estas combinaciones en la evaluación de los pacientes para así determinar mas efectivamente estas neoplasias.

## XII. REFERENCIAS.

1. Swerdlow, S.H., Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4th ed). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2008.
2. Sánchez Segura Miriam, Rivero Jiménez René, Marsán Suárez Vianed, Martínez Machado Mercedes, Espinosa Martínez Edgardo, González Otero Alejandro et al . Inmunofenotipaje en el diagnóstico de síndromes linfocitos y mieloproliferativos. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2000 Dic ; 16(3): 198-205.
3. Cabrera CM, Marinov MN, Guerra C, Morilla R, Matutes E. Síndromes linfoproliferativos crónicos en Chile. Estudio prospectivo de 132 casos. Rev. méd. Chile v.131 n.3 Santiago mar. 2003
4. Barrera Delfe S. «Nuevas estrategias inmunofenotípicas aplicadas al diagnóstico y clasificación de síndromes linfoproliferativos crónicos». Tesis Doctoral. Salamanca. 2011.
5. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT. The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia concordance among observers and clinical correlations. Br J Haematol 1981;47:553-61.
6. Freedman A, Nadler L. Cell surface markers in hematologic malignances. Semin Oncol 1987;14:193-212.
7. Buccheri V, Shetty V, Yoshida N, Morilla R, Matutes E, Catovsky D. The role of an anti-myeloperoxidase antibody in the diagnosis and classification of acute leukaemia: a comparison with light and electron microscopy cytochemistry. Br J Haematol 1992;80:62-8.
8. Van Lochem, E.G., et al., Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. Cytometry B Clin Cytom, 2004. 60(1): p. 1-13.
9. Porwit-MacDonald, A., et al., BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a

- basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia*, 2000. 14(5): p. 816-25.
10. Nagasawa, T., Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(2): p. 107-16.
  11. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007. 18(1-2): p. 73-83.
  12. Egawa, T., et al., The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity*, 2001. 15(2): p. 323-34.
  13. de la Hera, A., et al., Function of CD44(Pgp-1) homing receptor in human T cell precursors. *Int Immunol*, 1989. 1(6): p. 598-604.
  14. Wu, L., T lineage progenitors: the earliest steps en route to T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 2006. 18(2): p. 121-6.
  15. Tirado L, Mohar A. Epidemiología de las Neoplasias Hematológicas. *Rev Inst Nal Cancerol*. 2007; 2: 109-120.
  16. Newland AC. *Hematology*. Vol. 17, Supplement 1, 2012; 87-88.
  17. Ravandi, F. and S. O'Brien, Chronic lymphoid leukemias other than chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*, 2005. 80(12): p. 1660-74.
  18. O'Leary HM, Savage KJ. Update on the World Health Organization classification of peripheral T-cell lymphomas. *Curr Hematol Malig Rep*. 2009; 4(4):227-35.
  19. Ginaldi L, Matutes E, Farahat N, De Martinis M, Morilla R, Catovsky D. Differential expression of CD3 and CD7 in T-cell malignancies: a quantitative study by flow cytometry. *Br J Haematol*. 1996;93:921-27.
  20. Cady FM, Morice WG. Flow cytometric assessment of T-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Med*. 2007;27:513-32.
  21. Foucar K. Mature T-cell leukemias including Tprolymphocytic leukemia, adult T-cell leukemia/lymphoma, and Sezary syndrome. *Am J Clin Pathol*. 2007;127:496-10.

22. Morice WG, Katzmann JA, Pittelkow MR, el-Azhary RA, Gibson LE et al. A comparison of morphologic features, flow cytometry, TCR-V $\beta$  analysis, and TCR-PCR in qualitative and quantitative assessment of peripheral blood involvement by Sézary syndrome. *Am J Clin Pathol.* 2006;125:364-74.
23. Fierro Ávila F, Álvarez López F, García Gutiérrez R. Oncología. Clasificación por Estadios del Linfoma Hodgkin. *Ann Arbor.* Disponible en: [http://www.sccp.org.co/plantilas/Libro%20SCCP/Lexias/tablas/oncologia/hodgkin\\_estadios.htm](http://www.sccp.org.co/plantilas/Libro%20SCCP/Lexias/tablas/oncologia/hodgkin_estadios.htm) 2013.
24. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al.: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46 (2): 219-34, 1975.
25. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al.: Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111 (12): 5446-56, 2008.
26. Sanchez, M.L., et al., Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia*, 2002. 16(8): p. 1460-9.
27. Montillo, M., T. Schinkoethe, and T. Elter, Eradication of minimal residual disease with alemtuzumab in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) patients: the need for a standard method of detection and the potential impact of bone marrow clearance on disease outcome. *Cancer Invest*, 2005. 23(6): p. 488-96.
28. Rappaport H. Tumors of the hematopoietic system. Washington ,DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1966.
29. Lukes RF, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 1974;34:1488-1503.47
30. Lennert K, Mohri N, Stein H, Kaiserling E. The histopathology of malignant lymphomas. *Br J Haematol* 1975;31 (suppl):193-203.
31. Stansfeld A, Diebold J, Kapanci Y, Kelenyi G, Lennert K, Mioduszezwska O et al. Updated Kiel classification of lymphomas. *Lancet* 1988;1:292-3.

32. The Non-Hodgkin's Lymphomas Classification Project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 1982;49:2112-35.
33. Harris N, Jaffe E, Stein H, Banks PM, Cahn JK, Cleary ML et al.: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994, 84:1361-92.
34. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al.: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001.
35. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al.: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, edn 4. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
36. Anderson, K.C., et al., Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood*, 1984. 63(6): p. 1424-33.
37. Wells, D.A., et al., Occult B cell malignancies can be detected by three-color flow cytometry in patients with cytopenias. *Leukemia*, 1998. 12(12): p. 2015-23.
38. Orfao A, A.J., Sánchez ML, San Miguel J. , Immunophenotypic diagnosis of leukemic B cell chronic lymphoproliferative disorders other than chronic lymphocytic leukemia. GB Faget, Eds: Chronic lymphocytic leukemia: Molecular Genetics, Biology, Diagnosis and Management. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 2003: p. 173-199.
39. DiGiuseppe, J.A. and M.J. Borowitz, Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. *Semin Oncol*, 1998. 25(1): p. 6-10.
40. NCCLS.H42-1--Clinical Applications of Flow Cytometry: quality assurance and immunophenotype of lymphocytes; approved Guideline. NCCLS document H42-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1998 2006.

41. Braylan, R.C., et al., Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry*, 2001. 46(1): p. 23-7.
42. Alizadeh, A.A. and L.M. Staudt, Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells. *Curr Opin Immunol*, 2000. 12(2): p. 219-25.
43. Zucchetto, A., et al., CD49d in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlated expression with CD38 and prognostic relevance. *Leukemia*, 2006. 20(3): p. 523-5; author reply 528-9.
44. San Miguel, J., G.M.O.A.y.c. En: *Tratado de Alergología e Inmunología Clínica. Vol II: Inmunopatología General*. Ed Sociedad Española de Inmunología Clínica, ed. L. SA. 1995.
45. Almeida, J., et al., CLL-like B-lymphocytes are systematically present at very low numbers in peripheral blood of healthy adults. *Leukemia*, 2011.
46. Del Giudice, I., et al., IgVH genes mutation and usage, ZAP-70 and CD38 expression provide new insights on B-cell prolymphocytic leukemia (B-PLL). *Leukemia*, 2006. 20(7): p. 1231-7.
47. Forconi, F., et al., Hairy cell leukemia: at the crossroad of somatic mutation and isotype switch. *Blood*, 2004. 104(10): p. 3312-7.
48. Troussard, X., F. Maloisel, and G. Flandrin, Hairy cell leukemia. What is new forty years after the first description? *Hematol Cell Ther*, 1998. 40(4): p. 139-48.
49. Nieto, W.G., et al., Non-CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis in the general population: prevalence and phenotypic/genetic characteristics. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010. 78 Suppl 1: p. S24-34.
50. Bench, A.J., et al., Molecular genetic analysis of haematological malignancies II: Mature lymphoid neoplasms. *Int J Lab Hematol*, 2007. 29(4): p. 229-60.
51. Jaffe, E.S., M.A. Bookman, and D.L. Longo, Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation--mantle zone lymphoma: a distinct subtype of B-cell lymphoma. *Hum Pathol*, 1987. 18(9): p. 877-80.

52. Goy, A., et al., Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line M-1. *Leuk Lymphoma*, 2004. 45(6): p. 1255-60.
53. Lopez-Guillermo, A., et al., Molecular response assessed by PCR is the most important factor predicting failure-free survival in indolent follicular lymphoma: update of the MDACC series. *Ann Oncol*, 2000. 11 Suppl 1: p. 137-40.
54. Piris, M., et al., CD30 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*, 1990. 17(3): p. 211-8.
55. Blum, K.A., G. Lozanski, and J.C. Byrd, Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*, 2004. 104(10): p. 3009-20
56. Wenzel, C., et al., CD5 expression in a lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type as a marker for early dissemination and aggressive clinical behaviour. *Leuk Lymphoma*, 2001. 42(4): p. 823-9.
57. San Miguel, J.F., et al., Immunophenotypic analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol*, 2003. 30(2): p. 187-95.
58. Perez-Andres, M., et al., Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia*, 2005. 19(3): p. 449-55.
59. Pekarsky, Y., et al., Abnormalities at 14q32.1 in T cell malignancies involve two oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(6): p. 2949-51.
60. Wlodarski, M.W., et al., Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. *Blood*, 2005. 106(8): p. 2769-80.
61. Limon, J., et al., Chromosome aberrations, spontaneous SCE, and growth kinetics in PHA-stimulated lymphocytes of five cases with Sezary syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*, 1995. 83(1): p. 75-81.
62. Baseggio, L., et al., Identification of circulating CD10 positive T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia*, 2006. 20(2): p. 296-303.



63. Belhadj, K., et al., Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients. *Blood*, 2003. 102(13): p. 4261-9.
64. Ng, S.B., et al., Nasal-type extranodal natural killer/T-cell lymphomas: a clinicopathologic and genotypic study of 42 cases in Singapore. *Mod Pathol*, 2004. 17(9): p. 1097-107.
65. Melioli, G., et al., Expansion of natural killer cells in patients with head and neck cancer: detection of «noninhibitory» (activating) killer Ig-like receptors on circulating natural killer cells. *Head Neck*, 2003. 25(4): p. 297-305.
66. Oshimi, K., Lymphoproliferative disorders of natural killer cells. *Int J Hematol*, 1996. 63(4): p. 279-90.
67. Rubiolo, Susana. Perfil Inmunofenotípico de Síndromes Linfoproliferativos Crónicos. Universidad Católica de Córdoba. Facultad de ciencias Químicas, área de Hematología. 2011. Ver en: [http://www.fpmlab.org.ar/investigacion/t\\_final\\_bioq\\_rubiolo.pdf](http://www.fpmlab.org.ar/investigacion/t_final_bioq_rubiolo.pdf)
68. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; 333:1052-6.
69. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111:3941-67.
70. Villamor N. Citofluorometría en el diagnóstico y evaluación de los síndromes linfoproliferativos crónicos. *Haematol* 2005;90 (supl 1):410-17.
71. Kristin Mantei and Brent L. Wood. Flow Cytometric Evaluation of CD38 Expression Assists in Distinguishing Follicular Hyperplasia from Follicular Lymphoma. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2009;76B:315–20.
72. O'Leary HM, Savage KJ. Update on the World Health Organization classification of peripheral T-cell lymphomas. *Curr Hematol Malig Rep.* 2009; 4(4):227-35.
73. Ginaldi L, Matutes E, Farahat N, De Martinis M, Morilla R, Catovsky D. Differential expression of CD3 and CD7 in T-cell malignancies: a quantitative study by flow cytometry. *Br J Haematol.* 1996;93:921-27.

74. Cady FM, Morice WG. Flow cytometric assessment of T-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Med.* 2007;27:513-32.
75. Foucar K. Mature T-cell leukemias including Tprolymphocytic leukemia, adult T-cell leukemia/lymphoma, and Sezary syndrome. *Am J Clin Pathol.* 2007;127:496-10.
76. Dürig J, Bug S, Klein-Hitpass L, Boes T, Jöns T, Martin-Subero JI, et al. Combined single nucleotide polymorphism-based genomic mapping and global gene expression profiling identifies novel chromosomal imbalances, mechanisms and candidate genes important in the pathogenesis of T-cell prolymphocytic leukemia with inv(14)(q11q32). *Leukemia* 2007;21(10):2153-63.
77. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood.* 2010 Aug 5;116(5):767-71
78. Loughran TP Jr. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood.* 1993;82:1-14.
79. Semenzato G, Zambello R, Starkebaum G, Oshimi K, Loughran TP Jr. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood.* 1997;89:256-60.
80. Hodges E, Krishna MT, Pickard C, Smith JL. Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes. *J Clin Pathol.* 2003;56:1-11.
81. Lundell R, Hartung L, Hill S, Perkins SL, Bahler DW. T-cell large granular lymphocyte leukemias have multiple phenotypic abnormalities involving pan-Tcell antigens and receptors for MHC molecules. *Am J Clin Pathol.* 2005;124:937-946.
82. Dadu T, Rangan A, Bhargava M. CD4+/NKa +/CD8(dim+) T-cell large granular lymphocytic leukemia: a rare entity. *J Postgrad Med.* 2010;56(3):223-4.
83. Dearden C. Large granular lymphocytic leukaemia pathogenesis and management. *Br J Haematol.* 2011;152(3):273-83.

### XIII. ANEXOS

#### XIII.1. Cronograma

<b>Variables</b>	<b>Tiempo: 2013</b>	
Selección del tema	2013	Marzo
Búsqueda de referencias		Marzo
Elaboración del anteproyecto		Abril
Sometimiento y aprobación		Mayo
Revisión de expedientes clínicos		Junio
Tabulación y análisis de la información		Junio
Redacción del informe		Julio
Revisión del informe		Julio
Encuadernación		Agosto
Presentación		Agosto

XIII.2. Instrumento de recolección de los datos.

PERFIL INMUNOFENOTÍPICO DE LOS SÍNDROMES PROLIFERATIVOS CRÓNICOS EN EL HOSPITAL DOCTOR SALVADOR BIENVENIDO GAUTIER, 2005- 2012.

Expediente No. \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

1. Edad: \_\_\_\_\_ años

2. Sexo: F  M

3. Tipo de síndrome: Linfoma células B  Linfoma células T  Linfoma células NK

4. Marcadores Inmunofenotipico: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

5. Marcadores aberrantes: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

6. Estadío: 0  I  II  III  IV

### XIII.3. Costos y recursos

XIII. 3.1. Humanos			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Una sustentante o investigadora</li> <li>• Un profesor</li> <li>• Personal médico calificado en número de cuatro</li> <li>• Personas que participaron en el estudio</li> </ul>			
XIII.3.2. Equipos y materiales	Cantidad	Precio	Total
Papel bond 20 (8 1/2 x 11)	1 resmas	80.00	240.00
Papel Mistique	1 resmas	180.00	540.00
Lápices	2 unidades	3.00	36.00
Borras	2 unidades	4.00	24.00
Bolígrafos	2 unidades	3.00	36.00
Sacapuntas	2 unidades		18.00
Computador Hardware: Pentium III 700 Mhz; 128 MB RAM; 20 GB H.D.;CD-ROM 52x Impresora HP 932c Scanner: Microteck 3700 Software: Microsoft Windows XP Microsoft Office XP MSN internet service Omnipage Pro 10 Dragon Naturally Speaking Easy CD Creator 2.0 Presentación: Sony SVGA VPL-SC2 Digital data projector		3.00	
Cartuchos HP 45 A y 78 D	2 unidades	600.00	1,200.00
Calculadoras	2 unidades	75.00	150.00
XIII.3.3. Información			
Adquisición de libros Revistas Otros documentos Referencias bibliográficas (ver listado de referencias)			
XIII.3.4. Económicos*			
Papelería (copias )	1200 copias	00.35	420.00
Encuadernación	12 informes	80.00	960.00
Alimentación			1,200.00
Transporte			5,000.00
Imprevistos			2,000.00
<b>Total</b>			<b>\$11,824.00</b>

\* Los costos totales de la investigación fueron cubiertos por la sustentante

XII. Evaluación

Sustentante:

---

Dra. Martha Noemí Pérez Blan

Asesores:

---

Dra. Emidalis Romero

---

Dra. Ana Nadal Ponce

Jurado:

---

Dr. Cesar Matos

---

Dr. Arlene Castillo

Autoridades:

---

Dra. Emidalis Romero  
Coordinadora de la residencia

---

Dr. Cesar Matos  
Jefe del departamento

---

Dr. John González  
Jefe de enseñanza e investigaciones  
Científicas

---

Dra. Claridania Rodríguez Berroa  
Coordinadora Unidad Postgrado y  
Residencias Médica (UNPHU)

---

Dr. Williams Duke  
Decano de la Facultad de Ciencias  
De la Salud

Fecha de presentación: \_\_\_\_\_

Calificación: \_\_\_\_\_