

El valor de la citometría de flujo y la genética en el estudio de síndromes Linfoproliferativos y la utilidad de la aplicación clínica de sus aportes.

Citometría de Flujo

La Citometría de Flujo esta consolidada como una herramienta muy útil tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de los pacientes afectados por neoplasias hematolinfoides. A su vez esta aplicación constituye uno de los aportes más importantes de dicha tecnología.

Su principal valor radica en la facultad para conjugar la lectura rápida y simultánea de varios y complejos parámetros de una manera objetiva y precisa en un muy alto número de células.

A la luz de las últimas clasificaciones de los linfomas, el empleo del inmunofenotipo resulta un paso ineludible en la evaluación diagnóstica de estos procesos ya que no solo consolida o corrige la impresión citomorfológica sino que muchas veces estando en acuerdo nosológico, aporta aspectos complementarios detectando variantes que tienen trascendencia pronóstica y aún terapéutica. Otro aspecto es la capacidad de esta tecnología para detectar la asociación de más de una entidad en el mismo paciente hecho documentado precisamente mediante su aplicación.

La Citometría de Flujo permite además combinar el estudio de la expresión antigénica y el contenido de ADN celular (ploidía, fase S) lo que demuestra las características del ciclo exclusivamente en las células tumorales y contribuye a estimar su potencial replicativo.

La moderna clasificación y diagnóstico de los linfomas sería imposible sin tener en cuenta la expresión antigénica que identifica el linaje y estadio madurativo celular. Ello se logra mediante el marcado con anticuerpos de identificación genérica (Marcadores pan B, pan T y NK) y también marcadores asociados a determinadas etapas madurativas como lo son TdT para los precursores (B y T), CD5 para las células Naive de línea B, CD10 y bcl6 para identificar células centrogerminales y CD38 y CD138 como identificadores de estadios postgerminales.

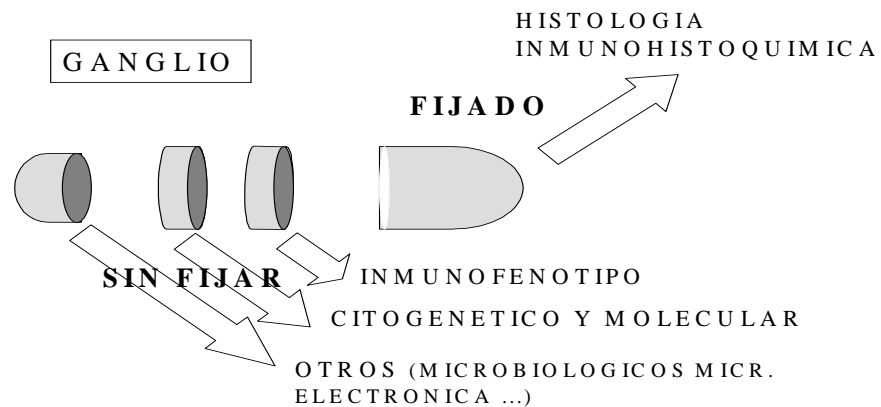
En la actualidad el manejo clínico de pacientes afectados por linfopatías tumorales requiere conjugar la morfología, la expresión génica normal reconocida mediante inmunofenotipo, alteraciones genéticas como lo son rearrreglos y/o mutaciones a nivel de receptores con aspectos clínicos para definir linaje y estadio de diferenciación de las células tumorales así como elementos que aporten datos de su potencial proliferativo.

Estadificación actual de los Linfomas



CUADRO 1 – PRINCIPALES AREAS PARA LA ACTUAL EVALUACION DIAGNOSTICA Y PRONOSTICA DE LOS LINFOMAS. (IPI = Indice Pronóstico Internacional).

Fraccionamiento en pieza de biopsia



CUADRO 2 – EL FRACCIONAMIENTO PARA ASEGURAR LA LLEGADA DE MUESTRA A CADA SECCION EN CONDICIONES OPTIMAS DEBE SER PROTOCOLIZADO Y ADECUADO A LAS DISPONIBILIDADES DE CADA CENTRO.

Los cuadros siguientes, extraídos de la publicación de M. Stetler-Stevenson and R. Braylan (18) sirven para ilustrar el empleo de los diferentes perfiles que identifican neoplasias B , T y NK. La metodología que aporta mejores resultados en la definición diagnóstica, es el análisis multiparamétrico que sea demostrativo de patrones de expresión característicos.

Table 2. T-Cell and NK Cell Neoplasms												
	TdT	CD1a	CD3	CD2	CD5	CD7	CD4/CD8	CD16	CD56	CD57	CD25	Other
Precursor T-cell neoplasm	+	+/-	+/- sCD3, + cCD3	+/-	+/-	+	double + or -	-/+	-	-/+		
Mature T-cell neoplasms												
T-CLL, T-PLL	-	-	+	+	+	+	CD4 ^{+/-} , CD4/CD8 ^{-/+}				-	
T-cell granular lymphocytic leukemia	-	-	+	+	+/-	+/-	CD8 ⁺ , CD4 ⁻	+/-	-/+	+	-	
Aggressive NK cell leukemia	-	-	-	+	-	-	CD8 ^{+/-} , CD4 ⁻	+/-	+	-		
Adult T-cell leukemia/lymphoma	-	-	+	+	+	-	CD4 ⁺				+ bright	
Enteropathy-type T-cell lymphoma	-	-	+			+	CD8 ^{+/-} , CD4 ⁻					CD103 ⁺
Hepatosplenic gamma delta T-cell lymphoma	-	-	+	+	-	+	CD8 ^{+/-} , CD4 ⁻	+	+	-	-	TCRγδ ⁺
Mycosis fungoides	-	-	+	+	+	-/+	CD4 ⁺				-/+	
AILD	-	-	+	+/-	+/-	+/-	CD4 ⁺					
ALCL	-	-	-/+	-/+	-/+	-/+					+/-	CD30 ⁺ , CD45 ^{+/-} , CD43 ^{-/+} , EMA ^{+/-} , CD15 ^{-/+} , CD68 ⁻ , Alk1 ⁺
PTL, unspelled	-	-	+/-	+/-	+/-	-/+	CD4>CD8					

NOTE. +, >90% of cases; +/-, >50% of cases; -/+, <50% of cases; -, <10% of cases.

Abbreviations: CLL, chronic lymphocytic leukemia; PLL, prolymphocytic leukemia; AILD; angioimmunoblastic T-cell lymphoma; ALCL, anaplastic large-cell lymphoma; PTL, peripheral T-cell lymphoma.

Table 1. B-Cell Neoplasms

	TdT	CD19	CD22	CD20	CD10	Ig(s)	CD5	CD23	CD11c	CD103	FMC7	Other
Precursor B-cell neoplasm	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-	-	CD34 ^{+/+} , CD13 or CD33 ^{+/+}
Peripheral B-cell neoplasms												
B-cell CLL/SLL	-	+	+ ^{dim}	+ ^{dim}	-	+ ^{dim}	+	+	-/+ ^{dim}	-	-	
PLL	-	+	+	+	-	+	-/+	-/+	-	-	+	
MCL	-	+	+	+	-/+	+	+	-	-	-	+	Cyclin D1
Marginal zone B-cell lymphoma	-	+	+	+	-	+	-	-	+/-	-	+	
FL	-	+	+	+	+	+	-	-/+	-	-	+/-	
HCL	-	+	+ ^{bright}	+ ^{bright}	-	+	-	-	+ ^{bright}	+	+	CD25 ^{bright}
LPL/Immunocytoma	-	+	+	+	-	+	-	-/+	-/+ ^{dim}	-	-	Ig(c)
Diffuse large B-cell lymphoma	-	+	+	+	-/+	+/-	-/+					
Primary mediastinal B-cell lymphoma	-	+	+	+		-	-					CD30 ^{+/+} , CD45 ^{+/+}
Burkitt's lymphoma	-	+	+	+	+	+	-	-	-/+			
Plasmacytoma	-	-	-	-	-	-	-	-				CD38 ^{+/bright} , EMA ^{-/+} , CD56 ⁺ , CD138 ⁺

NOTE. +, >90% of cases; +/-, >50% of cases; -/+, <50% of cases; -, <10% of cases.

Abbreviations: TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase; Ig, immunoglobulin; CLL, chronic lymphocytic leukemia; SLL, small lymphocytic lymphoma; PLL, prolymphocytic leukemia; MCL, mantle cell lymphoma; FL, follicular lymphoma; HCL, hairy cell leukemia; LPL, lymphoplasmacytic lymphoma.

Un aporte especial del inmunofenotipo es el seguimiento de este tipo de pacientes al monitorear la reducción de la masa tumoral y en la detección de EMR post quimioterapia o aún post TMO. Las estrategias modernas y perfeccionadas a estos efectos, con la adecuada combinación de anticuerpos logran excelentes resultados en la identificación de muy bajo número de células tumorales remanentes (1 en 10⁶).

Las limitaciones de esta tecnología refieren fundamentalmente a situaciones en las que el material a procesar contiene escasas células tumorales, las que en el transcurso del procesamiento resultan destruidas o eliminadas. Estas situaciones pueden provocar falsos negativos al determinar la existencia o no de compromiso linfomatoso de la pieza estudiada. Con las técnicas actuales resultan muy poco frecuentes estas situaciones y dependen más de fragilidad propia de algunos tipos celulares bien identificados.

Genética

El descubrimiento que la mayoría de las neoplasias de tipo linfóide presentan alteraciones genéticas específicas, generalmente translocaciones que involucran genes asociados a los procesos de proliferación y apoptosis ha contribuido a un mayor entendimiento de la patogénesis de los linfomas.

La asociación de algunos tipos de linfomas con marcadores genéticos específicos ha permitido la definición de distintas entidades patológicas y su clasificación. Tal es el caso de las translocaciones t(8;14) característica del linfoma de Burkitt, la t(14,18) del linfoma folicular, la t(11;14) del linfoma del manto así como la t(2,5) asociada al linfoma anaplásico a grandes células.

La detección de estas translocaciones se puede realizar mediante técnicas citogenéticas, citomoleculares (FISH) y moleculares (Southern-blot y reacción en cadena de la polimerasa PCR).

En los casos en que no se asocia una translocación específica la determinación de la clonalidad B/T mediante el establecimiento de los reordenamientos de los genes de las Ig o de los receptores T permite establecer el diagnóstico. Ello es especialmente relevante en casos de difícil definición de linajes B/T, para distinguir procesos reactivos atípicos de linfomas así como cuando la población de células tumorales es pequeña en la muestra y no permite su clasificación por métodos morfológicos o de inmunofenotipo.

Las técnicas moleculares además de contribuir al diagnóstico constituyen una importante herramienta para la detección de ERM lográndose la detección de una célula neoplásica en una población total de 10^6 .

Un ejemplo que resalta la importancia de la complementación de técnicas para que los hallazgos adquieran validez es la sobreexpresión de bcl2. El oncogene bcl2 es un inhibidor de la apoptosis y la sobreexpresión de la proteína bcl2 se puede detectar por inmunohistoquímica u otros métodos inmunológicos. La positividad de bcl2 puede observarse en diversos linfomas posean o no la t(14;18) pero cuando esta sobreexpresión adopta una disposición de patrón folicular corresponde sin duda a un linfoma folicular.

En el cuadro adjunto extraído de la publicación de Capello,D y Gaidano,G (6) se aprecia la frecuencia del hallazgo de alteraciones genéticas específicas empleando en cada caso la técnica que mejor se adapte.

	PAX-5	BCL-2	BCL-1	BCL-10	API12/MLT	ATM
B-CLL/SLL	-	-	-	-	-	20%
LPL	40%	-	-	-	-	-
FL	-	90%	-	-	-	-
MCL	-	-	80%	-	-	-
MALT-L	-	-	-	?	50%	-

Abbreviations: B-CLL/SLL: B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma; LPL: lymphoplasmacytoid lymphoma; FL: follicular lymphoma; MCL: mantle cell lymphoma; MALT-L: MALT-lymphoma; -: negative genetic lesion.

En el futuro los aportes de nuevas técnicas prometen mejorar la certeza diagnóstica y hacer más fácil el estudio de varias alteraciones genéticas simultáneamente con algunos ejemplos ya en marcha como los paneles de micro arrays.

Algoritmo diagnóstico modificado del propuesto por N. Lee Harris et al,(7)

MORFOLOGIA A
CELULAS PEQUEÑAS

→ Kappa / Lambda policlonal sin patrón folicular para bcl2
= proceso reactivo.

→ Kappa / Lambda clonal + patrón folicular
para bcl2 = linfoma de células pequeñas

LINFOMA DE CELULAS PEQUEÑAS

CD5+ CLL/SLL vs L DEL MANTO

CD23+ sIg debil y Ciclina D1 - = LLC/SLL
CD23- sIg ++ y Ciclina D1 + =L del Manto

CD5- L FOLICULAR vs L DE ZONA MARGINAL
(LZM)

CD10+ L FOLICULAR
CD10- L FOLICULAR CD10- vs LZM

BCL6+ BCL2+ CD43- = L FOLICULAR
BCL6- BCL2- CD43+ = LZM.

MORFOLOGIA A
GRANDES CELULAS

→ Linfoma vs Tumor no Linfoide

→ CD45+ = LINFOMA

→ CD45- = TUMOR NO LINFOIDE

Pan B Marcadores (CD20 CD79a+) = LINFOMA B

SIg+ LDGCB vs Burkitt

CD10+ BCL2- Ki67>99% = Burkitt

CD10- BCL2+ Ki67<99% = LDGCB

SIg- Maduro B vs Linfoblastico

TdT+ CD10+ = Linfoblastico B

TdT- CD10-/+= LDGCB

Pan T Marcadores (CD3 CD2 +) LINFOMA T/NK

TdT+ = Linfoblastico T

TdT- = Linfoma T/NK maduro

CD21 FDC CD10+ =L Angioinmunoblastico T

CD30+ ALK+ = L Anaplásico Grandes Células T

A modo de conclusión: es evidente que el empleo de técnicas inmunológicas y genéticas como complemento de los estudios morfológicos aportan precisión al diagnóstico y agregan factores pronósticos y de orientación terapéutica que se traducen en un manejo clínico más seguro de los pacientes afectados por este tipo de patología.

En nuestro medio y en especial teniendo en cuenta el cuidado de los recursos de todo el sistema de asistencia médica, es obligatorio ser cautos y racionalizar el empleo de estas técnicas. Racionalizar en nuestra opinión no siempre significa acotar al mínimo los recursos a emplear como forma de ahorro, sino que en gran parte de los casos el empleo de una técnica más, bien seleccionada reafirma un diagnóstico y provoca el verdadero ahorro significativo que es tratar desde el comienzo una entidad definida con protocolos de documentada eficacia.

Es válido por lo tanto valorar adecuadamente los estudios a emplear en cada caso en particular. Adoptar el empleo de rutina de las técnicas inmunológicas (inmunohistoquímica y/o inmunofenotipo) como complemento indispensable de la morfología aparece como la primera meta a consolidar.

Dr Hugo Giordano. Médico a cargo del sector Citometría de Flujo AEPSM

Dra Carina Di Matteo. Médica Anatómo Patóloga. Sector Citometría de Flujo AEPSM

Dra Rosario Uriarte . Directora del Laboratorio de Biología Molecular AEPSM

Dra Rossana Bonomi. Médica Hematóloga a cargo del sector Citogenética Hematológica AEPSM

BIBLIOGRAFIA .

1. Pagnuco G, Vanelli L, Gervasi F.- MULTIDIMENSIONAL FLOW CYTOMETRY IMMUNOPHENOTYPING OF HEMATOLOGIC MALIGNANCY. Ann N Y Acad Sci 2002 Jun;963 : 313-321.
2. Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R, Rothe G, Lacombe F, Lanza F, Papa S, Lucio P and San Miguel J. CLINICALLY USEFULL INFORMATION PROVIDED BY THE FLOW CYTOMETRY IMMUNOPHENOTYPING OF HEMATOLOGICAL MALIGNACIES: CURRENT STATUS AND FUTURE DIRECTIONS. Clinical Chemistry 45:10 1708-1717 (1999).
3. Dunphy Ch, Gardner L, Grosso L, Evans HL. FLOW CYTOMETRIC IMMUNOPHENOTYPING IN POSTTRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS. Am J Clin Pathol 117(1): 24-28, 2002.
4. Sanchez J, Serrano J, Garcia JM, Roman J, Casaño J, Torres A. FLOW CYTOMETRY OF CELLS SUSPENSIONS FROM LYMPH NODES: IMMUNOPHENOTYPE, DNA CONTENT AND PROLIFERATIVE RATE ARE STRONGLY CORRELATED WITH HISTOPATHOLOGY DIAGNOSIS. Haematologica vol. 84(8); Aug. 1999: 762-763.
5. Tura S, Zizani JP. INDOLENT LYMPHOMAS. Haematologica 2000; 85:113-114.
6. Capello D, Gaidano G. MOLECULAR PHATOPHYSIOLOGY OF INDOLENT LYMPHOMA. Haematologica 2000; 85: 195-201.
7. Lee Harris N, Stein H, Coupland S, Hummel M, Dalla Favera R, Pasqualucci L, Chan W. NEW APPROACHES TO LYMPHOMA DIAGNOSIS. Hematology 2001. ASH Education Program Book. 194-220.
8. Ghirardelli ML, Jemos V, Gobbi P. DIAGNOSTIC APPROACH TO LYMPH NODE ENLARGEMENT. Haematologica 1999; 84:242-247.
9. Cabezudo E, Carrara P, Morilla R, Matutes E. QUANTITATIVE ANÁLISIS OF CD79b, CD5 AND CD19 IN MATURE B CELLS LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS. Haematologica 1999; 84:413-418.
10. Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A. THE CRUCIAL ROLE OF IMMUNOPHENOTYPING IN HEMATOLOGY AND ONCOLOGY. Haematologica 2001; 86:673-674.
11. Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A. NEW METHODOLOGIC APPROACHES FOR IMMUNOPHENOTYPING ACUTE LEUKEMIA. Haematologica 2001; 86:675-692.
12. Pileri SA, Ascani S, Sabattini E, Fraternali-Orcioni G, Poggi S, Piccioli M, Piccaluga PP, Gamberi B, Zinzani PL, Leoncini L, Falini B. THE PHATOLOGIST VIEW POINT. PART I – INDOLENT LYMPHOMAS. Haematologica 2000; 85:1291-1307.
13. Pileri SA, Ascani S, Sabattini E, Fraternali-Orcioni G, Poggi S, Piccioli M, Piccaluga PP, Gamberi B, Zinzani PL, Leoncini L, Falini B. THE PHATOLOGIST VIEW POINT. PART II – AGGRESIVE LYMPHOMAS. Haematologica 2000; 85:1308-1321.
14. Martínez-Climent JA. APLICACIONES DE LA GENETICA MOLECULAR AL ESTUDIO DE LOS SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS. Hematologia Aran Ed S.A. Vol 1 N1 1998; 3-24.
15. Mollejo M, Lloret E, Sánchez-Mateo M, Piris MA. LINFOMA ESPLENICO DE LA ZONA MARGINAL. Hematologia – Aran Ed S.A. Vol 1 N1 1998: 25-38.
16. Terol Castera MJ. BASES BIOLÓGICAS E INMUNOLÓGICAS EN LINFOMAS. Hematologia – Aran Ed S.A. Vol2 N2 1999:131-152.
17. García-Conde J, Terol Castera MJ, Tormo M. PROYECCIÓN TERAPEUTICA DE LA CLASIFICACION R.E.A.L./OMS DE LOS SÍNDROMES LINFO-PROLIFERATIVOS. Hematologia – Aran Ed S.A. Vol2 N3 1999: 225-260.

18. Stetler-Stevenson M and Braylan R. FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF LYMPHOMAS AND LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS. *Seminars in Hematology*, Vol38, No2 (April). 2001: 111-123.
19. Jennings CD, Foon K. RECENT ADVANCES IN FLOW CYTOMETRY: APLICATION TO THE DIAGNOSIS OF HEMATOLOGIC MALIGNANCY. *Blood*, Vol90, No8 (Oct 15), 1997: 2863-2892.
20. Echeverri C, Fisher S, King D, Craig F. IMMUNOPHENOTYPIC VARIABILITY OF B-CELL NON-HODGKIN LYMPHOMA: A RETROSPECTIVE STUDY OF CASES ANALYZED BY FLOW CYTOMETRY. *Am J Clin Pathol* 117(4); 2002: 615-620.n
21. Ruiz-Arguelles A, Duque RE, Orfao A. REPORT ON THE LATIN AMERICAN CONSENSUS CONFERENCE FOR FLOW CYTOMETRIC IMMUNO PHENOTYPING OF LEUKEMIA. *Cytometry* 1998 (Feb)15;34(1) 39-42.
22. Ben-Ezra, J. B-CELLS LYMPHOPROLIFERTIVE DISORDERS. *Hematol Oncol Clin N Am* 16(2002) 321-337.
23. San Miguel, J, Orfao, A, Lopez Borrasca A. SÍNDROMES LINFO PROLIFERATIVOS CRÓNICOS NO LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA. *Hematología Clínica – Sans-Sabrafen, J. 4ta Ed. Edit Harcourt .Cap 22. 401-416.*
24. Sans-Sabrafen, J, Serrano, S, Besses, C y Dominguez, D. LINFOMAS NO HODGKINIANOS. BASES CITOEVOLUTIVAS Y FUNCIONALES. CLASIFICACION Y DESCRIPCIÓN DE SUS DISTINTAS VARIEDADES. *Hematología Clínica – Sans Sabrafen, J. 4ta Ed. Edit Harcourt. Cap 24 428-473.*