

VALOR DE LA INMUNOHISTOQUIMICA EN LA DETERMINACION DEL INMUNOFENOTIPO EN LAS NEOPLASIAS SOLIDAS HEMATOPOYETICAS.

Dra. Gabriela Gualco *, **Dr. Gonzálo Ardao ****.

* Patólogo Asistente. Encargada del Laboratorio de Inmunohistoquímica. Servicio de Anatomía Patológica, HCFFAA.

** Director. Servicio de Anatomía Patológica. HCFFAA

ggualco@adinet.com.uy

INTRODUCCION

Las neoplasias malignas hematopoyéticas presentan un espectro muy variado, tanto del punto de vista clínico como morfológico. Hace más de tres décadas se reconoció el hecho que las células linfoides pertenecen a distintos subgrupos, con expresión diferente de antígenos, tanto de superficie como citoplasmáticos y con funciones inmunológicas distintas. Esto posibilitó el inicio de los estudios de inmunofenotipo en células malignas (1, 2, 2^a, 3, 4, 5, 6). Los mismos fueron hechos con técnicas de inmunología celular, costosas, complejas y muy difíciles de estandarizar (1,5). Alrededor de 1980 la situación cambió gracias al desarrollo, caracterización, y distribución comercial de anticuerpos poli y monoclonales capaces de detectar antígenos asociados con el linaje celular. Estos se utilizaban con técnicas de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica (IHQ), en cortes a congelación (1,5,6). Posteriormente, la aparición de anticuerpos que detectan antígenos en el tejido que fue fijado e incluido en parafina dio un vuelco enorme a toda esta tecnología. Llegando actualmente a la automatización en el procedimiento (1,2,3,5,6,7).

Todos estos estudios permitieron arribar a la conclusión que el análisis del inmunofenotipo es útil, necesario y actualmente, luego de la última clasificación de linfomas de la OMS en 1999 (8), imprescindible adjuntarlo al diagnóstico morfológico. La interpretación del inmunofenotipo debe realizarse siempre, como respuesta a las interrogantes planteadas por los hallazgos clínicos y morfológicos. El estudio de un único marcador linfoide o un grupo, seleccionado en forma azarosa y no adecuado, de los mismos puede dar origen a confusión y a errores. Es algo que debe evitarse.

El estudio del inmunofenotipo mejora la eficacia diagnóstica entre 10% y 45% para los tipos mas frecuentes de linfomas (7,9).

Además de la importancia diagnóstica también resulta de gran utilidad para comprender la histogenesis de leucemias y linfomas.

Se considera que para determinar el inmunofenotipo se cuenta con tres tipos de métodos distintos: la **citometría de flujo** en suspensiones celulares, la **inmunohistoquímica en material fresco** en cortes a congelación y la **inmunohistoquímica en material fijado** ya sea citológico o histológico incluido en parafina. Los distintos antígenos que se detectan se pueden dividir en dos grandes grupos: los de superficie o receptores y los citoplasmáticos y/o nucleares. Los primeros se alteran o enmascaran cuando el tejido se fija y se incluye en parafina, mientras que los segundos se preservan más. Hasta mediados de los años 80 era impensable utilizar este tipo de material para análisis de inmunofenotipo, pero en 10 años se desarrollaron y caracterizaron gran cantidad de anticuerpos mono y policlonales que detectan antígenos de línea B, T, histiocitos y otros en tejido incluido en parafina (1,2,3,4,5). El desarrollo de la IHQ como **disciplina diagnóstica** ha estado íntimamente ligado a la hematopatología ya que la profundización en el conocimiento del desarrollo linfoide así como de la nosología de los linfomas creo la necesidad de desarrollar mayor número de reactivos, que rápidamente se expandieron permitiendo distinciones finas entre los linfomas (Dabas). Además el advenimiento de los métodos de recuperación antigénica, permite actualmente la aplicación de la inmunohistoquímica a casi cualquier tejido para resolver problemas de diagnóstico (10,11). Las situaciones en

las que esta puede ser aplicada son diversas: para diagnóstico diferencial de neoplasias malignas pobremente diferenciadas, (melanoma maligno, carcinoma poco diferenciado, sarcoma o linfoma pleomórfico o de grandes células), para separar linfomas no Hodgkin y enfermedad de Hodgkin, o distintos tipos de linfoma no Hodgkin entre si, así como el diagnóstico diferencial entre un proceso benigno, como una hiperplasia linfoide ganglionar (postviral, enfermedad de Kikuchi, etc) y un linfoma.

La principal ventaja de esta técnica es la capacidad de ser usada en material fijado y procesado de forma rutinaria. Se puede aplicar en material de archivo de años anteriores. El hecho que pueda correlacionarse el resultado de la técnica con la histomorfología es también una característica importante ya que se puede estar seguro que los hallazgos que se interpretan como positivos o negativos están realmente asentando en las células tumorales o problemáticas, esto es una ventaja sobre los procedimientos que trabajan con suspensiones de células. Además en comparación con los laboratorios de citometría de flujo, los costos de mantenimiento del laboratorio de inmunohistoquímica son inferiores (12,13). Como desventaja se debe recordar la susceptibilidad variable de los distintos antígenos a los procedimientos de fijación e inclusión y aun con las técnicas de recuperación antigénica no siempre es posible desenmascararlos, por lo que debe estandarizarse el método para cada anticuerpo, en cada laboratorio de anatomía patológica.

La expresión de antígenos (Ag) relacionados con el linaje es un principio fundamental del **inmunofenotipaje de neoplasias hematopoyéticas**. La histodiferenciación de estas neoplasias corre paralela a la diferenciación normal, lo que implica que se espera que neoplasias de células B expresen antígeno B, como CD20 y CD79a. La maduración de la neoplasia se detiene en cualquier momento de la diferenciación y la expresión de antígenos específicos de linaje varía dependiendo del grado de maduración (Gualco). Existen neoplasias que pierden Ag de diferenciación o que adquieren expresión aberrante de Ag de otros linajes. Se ha determinado que las neoplasias, sobre todo B tienen anomalías

genéticas que resultan en la sobreexpresión de proteínas, por ejemplo bcl-1, bcl-2. Por otro lado una neoplasia hematopoyética dada muestra constantes y consistentes defectos moleculares y expresa un grupo de antígenos constantes. La demostración de restricción en las cadenas livianas kappa y lambda son buen indicador de monoclonalidad en un proceso B (1,4,5,6).

La interpretación de la inmunohistoquímica se basa en la distribución microanatómica de la coloración, su intensidad, la proporción de células positivas y análisis semicuantitativo mediante conteos para algunos marcadores. Estos parámetros deben ser razonablemente reproducibles. Para la inmunohistoquímica cuantitativa se requieren controles con cantidades predefinidas de los antígenos. Estos elementos ayudan a la estandarización, que es fundamental para comunicarse en el mismo lenguaje en esta disciplina (1,7^a,7b).

GENERALIDADES SOBRE ANTIGENOS DETECTABLES EN PARAFINA

ALK

Kinasa del linfoma anaplásico. Es una proteína que se sobreexpresa cuando existe t(2:5) p23q35 (p80). Se ve en el linfoma de grandes células anaplásicas (LGCA) y lo define en el 80% de los casos, sobre todo en niños.

Los linfomas ALK positivos tienen mucho mejor pronóstico que los ALK negativos. La identificación de células ALK positivas indica malignidad ya que no se expresa en ninguna célula normal fuera del SNC (1,4).

Casi todos los casos de linfoma anaplásico ALK positivos son también CD30 positivos, EMA positivos, CD15 negativos. Se detecta también por técnica de FISH (hibridización in situ con fluorescencia) y rtPCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa), esta última demuestra ser superior que la IHQ en parafina.

El anticuerpo (Ac) ALK es útil en el diagnóstico de linfoma anaplásico en sitios extranodales (ejemplo en médula ósea), útil también para el diagnóstico diferencial con la enfermedad de Hodgkin rica en células RS.

Existen casos de neoplasia de células B sin la t(2:5) que expresan altos niveles ALK se consideran linfomas difusos B de células grandes. También algunos linfomas anaplásicos que tienen la t(2:5) no expresan ALK. Otras anomalías citogenéticas que involucran al gen ALK y determinan sobreexpresión de la proteína están en el Cr2 t(1:2). Se considera de mucha utilidad para el diagnóstico de la variante a células pequeñas del linfoma anaplásico. Es negativo en las formas cutáneas de este linfoma.

El tumor miofibroblástico inflamatorio con rearrreglo genético 2p23 es positivo para ALK en la inmunohistoquímica, por lo tanto este no es un marcador exclusivo de linfoma anaplásico (1,4,5,14,15).

BCL-1 /CICLINA D1 (PRAD 1)

La sobreexpresión de la proteína ciclina D1 (también conocida como bcl-1) esta relacionada con t(11:14) q13 p32. La familia de las ciclinas D regulan la actividad de las proteínas- quinasas en la fase G1 del ciclo celular (1,4).

La detección en núcleos de células neoplásicas se considera un marcador sensible (70-100%) y específico para linfoma del manto (16,17, 17a). También se expresa en 25% de las neoplasias de células plasmáticas y 10% de las leucemias de células peludas, aunque con una señal más débil (Dabbs).

Dentro de un mismo tumor la intensidad de positividad nuclear varía entre las células neoplásicas. La tinción citoplasmática se considera inespecífica.

Bcl-2

Es la primera proteína identificada en linfomas asociada a una translocación t(14,18). Esta translocación yuxtapone el gen bcl-2 y el gen de la cadena pesada de Ig determinando una sobreexpresión de la proteína bcl-2 que disminuye la tasa de muerte celular afectando la apoptosis.

La sobreexpresión de proteína bcl-2 está presente en una amplia variedad de células neoplásicas hematolinfoides y no hematolinfoides (18,19).

La tinción es citoplasmática en patrón membranoso a pesar que el Ag es citoplasmático.

Esta presente normalmente a nivel de los foliculos linfoides en las células B de la zona del manto, en numerosos linfocitos T (Dabbs), y en centros germinales (CG) reactivos (menos de 10 células teñidas /CGA), por lo que su interpretación debe ser muy cuidadosa ya que toda esta tinción debe considerarse negativa para linfoma.

Es **positivo en 85% de linfomas foliculares**, su positividad en otros linfomas estaría vinculada a una alteración de la regulación y no a la presencia de la translocación ya que se observa en 97% de linfomas de bajo grado B.

Bcl-2 es negativo en células B monocitoides reactivas, pero es positivo en 60 a 80% de linfomas de zona marginal (células B).

También se ve inmunomarcación en el linfoma B difuso de células grandes (20-40%) donde tien un valor pronóstico peyorativo.

Se observa reactividad en menor proporción en otros linfomas como manto y Burkitt símil.

Es negativo en linfoma de Burkitt.

Es útil para el diagnóstico diferencial entre hiperplasia folicular o monocitoide versus linfoma, salvo en el bazo (1,4,5,18).

Bcl-2 es positivo en 80% de carcinomas de tiroides pobremente diferenciados (insular), en otros carcinomas así como en un tercio de los tumores benignos y malignos de la vaina del nervio periférico entre otros tumores mesenquimáticos, destacándose que presentan positividad nuclear.

Bcl-6

La proteína bcl-6 tiene una función reguladora de la transcripción y se expresa habitualmente en células B del centro germinal normal en un patrón reciproco al de bcl-2. En los **linfomas B** tiene una localización en el núcleo de las células neoplásicas originadas del centro germinal o post-centro germinal (20), se pierde con la progresión del linfoma folicular (2a). Se reconoce en 18 a 45 % de los LBDGC (5), en linfomas foliculares, Burkitt y en 50% de linfomas linfocíticos.

Bcl-6 esta ausente en leucemia linfoblástica B, linfoma del manto, linfoplasmocitico, células plasmáticas neoplásicas.

La expresión de proteína bcl-6 no se correlaciona con el resultado de rearrreglo genético. El 100% de los linfomas foliculares expresan bcl-6, pero solo 10-20% tienen rearrreglo genético y 30% tienen rearrreglo pero no expresión de bcl-6 por inmunohistoquímica.

La variante Predominio linfocitario de la **enfermedad de Hodgkin** es positiva, mientras que las formas clásicas son negativas.

En los **linfomas de células T** el bcl-6 es positivo en 45% del linfoma anaplásico células grandes pero es negativo en otros tipos, (1,4,20).

CD 1a

Antígeno normalmente presente en la membrana de células Langerhans y en timocitos corticales (inmaduros) en corteza tímica normal, hiperplasia tímica y timoma benigno. No se ve en células dendríticas interdigitadas ni foliculares (1,5). Es un marcador bastante específico para histiocitosis de células de Langerhans. También es positivo en un grupo de Leucemia T linfoblástica aguda.

CD3

Reconoce una proteína de superficie asociada al receptor de células T presente en células T maduras. Las células T inmaduras carecen de rearrreglos del gen de receptor de células T y son negativas para CD3 en superficie pero pueden presentar positividad citoplasmática cuando se usan anticuerpos policlonales (21). Es positivo el 75-80% de los linfomas T, en un pequeño porcentaje de células Reed Sternberg con un patrón paranuclear y es negativo en linfomas B.

Los neoplasmas de precursores de células T presentan positividad citoplasmática, los neoplasmas de células T periféricas tienen positividad de membrana. Pero se destaca que 60% de linfomas T post tímicos tienen pérdida aberrante de CD3. La pérdida es menos frecuente en los linfomas T cutáneos.

La **tinción de membrana es específica para linfomas de células T** pero la tinción citoplasmática no es específica, se ve en los NK, etc.

La sensibilidad del Ac policlonal es cercana al 97% y es un marcador muy específico de línea T. También existe Ac monoclonal (P51) que para algunos autores es superior al policlonal, pero esta opinión no es unánime (1,2,21,17a).

CD4

Este marcador, recientemente disponible para material fijado e incluido en parafina., es positivo en linfocitos T helper/inductores, monocitos, macrófagos, células de Langerhans, cel. dendríticas. Negativo en células B.

La expresión aberrante CD4-CD8 positivo o CD4-CD8 negativo- es diagnóstica de neoplasma células T, cuando está presente en una proliferación de células T maduras, excepto en el timo donde pueden existir poblaciones CD4, CD8, tdt positivas.

CD5

Es una molécula involucrada en la traducción de señales presente en la superficie de la mayoría de los timocitos y células T periféricas inmaduras. También se detecta en un subgrupo de células B, y es en las neoplasias originadas de estas, LL/LLC, y linfoma del manto, es donde adquiere mayor valor.

Observandose 80 – 90% de casos positivos en la leucemia linfocítica crónica y el linfoma linfocítico (LLC/SLL) y más del 90% de los linfomas de manto. Es positivo en 10% de los linfomas foliculares. Es negativo en el Burkitt, leucemia aguda linfoblástica B, tricoleucemia, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple y neoplasias de células NK (1,5,22). Es relativamente reciente la aparición este marcador para tejido incluido en parafina.

CD7

Es un antígeno de membrana. Es el primer antígeno específico de células T, que aparece en células T inmaduras. Es el Ag que se pierde mas frecuentemente en linfomas T excepto en el linfoblástico. Se observa también en neoplasias de células NK y mieloides. Recientemente se han desarrollado buenos marcadores para tejido fijado e incluido en parafina.

CD8

Son positivos los linfomas T citotóxico/supresores y un subgrupo de células NK. Las células CD8 positivas rodean los adipocitos en el linfoma paniculitis like. Marcador disponible recientemente en parafina con una sensibilidad similar a la citometría de flujo (5).

CD10

(También conocido como CALLA o Ag común de leucemia linfoblástica aguda). Es una metalopeptidasa que se expresa en progenitores linfoides precoces y células normales del centro germinal.

Existen múltiples anticuerpos monoclonales que detectan el mismo epítipo o relacionados, la mayoría funcionan en tejido fresco, pero se han desarrollado algunos que lo hacen en parafina con buenos resultados.

Positivo en el 90% de leucemia linfoblástica aguda de células B y en la LMC en crisis blástica linfoide. También positivo en 94% de linfomas de Burkitt, Burkitt like y linfoblástico B.

Es positivo en 60% de los casos de linfoma folicular. La positividad es variable en linfoma difuso B de células grandes y en el mieloma múltiple.

Se puede ver inmunomarcación en otros tejidos como: células mioepiteliales de mama, conductos biliares, carcinoma células renales, carcinoma de pulmón, mesotelioma, melanoma maligno, sarcoma del estroma endometrial.

Con la excepción de la leucemia linfoblástica T, la expresión de CD10 en neoplasias T es muy infrecuente (1, 2, 5, 23).

CD15

(Leu – M1)

Reacciona con Ag presentes en neutrófilos maduros, monocitos y subgrupos de células T. Es reconocido como marcador de células de Reed-Sternberg en Enfermedad de Hodgkin clásica, no se observa en el PL nodular.

Es negativo en la mayoría de los linfomas no Hodgkin con la excepción de algunos linfomas anaplásicos de células grandes sobre todo cutáneos y algunos linfomas T periféricos. Se observa marcación en 60% de los adenocarcinomas, (24,25). El patrón de tinción es de membrana y del Golgi (DABBS).

CD20

Antígeno B de membrana que es adquirido tardíamente en estadios pre B de maduración y permanece en las células en el resto de su vida madura. Se pierde en la etapa de diferenciación terminal de células B a células plasmáticas. Es positivo en un subgrupo de células T. No en células mieloides. El anticuerpo que funciona mejor en parafina es la clona L26, tiene actividad citoplasmática predominante y en menor grado de membrana.

Es positivo en 95% a 98% de los linfomas de células B maduras, el linfoma-leucemia linfoblástico se marca solo en 50%. Es positivo en la tricoleucemia, leucemia prolinfocítica.

El linfoma inmunoblástico plasmocitoide y mieloma / plasmocítico son neoplasmas de células B maduras que frecuentemente son negativos. Sin embargo se ha registrado un 20% de positividad en casos de mieloma múltiple, que han demostrado ser más agresivos.

La expresión de CD20 es débil en el linfoma Linfocítico y la LLC. Es negativo para los Linfomas T, solo raros casos muestran positividad (26, 17a).

CD20 es positivo en 90 % de la Enfermedad de Hodgkin predominio linfocitario nodular y solo en un subgrupo de células de Reed- Sternberg (RS) en enfermedad de Hodgkin (EH) clásica con patrón de membrana fuerte y paranuclear (27).

Con recuperación antigénica aparece una positividad nucleolar que se considera inespecífica. Se pierde reactividad con la fijación con licor de Bouin. Se recomienda no fijar con Zenker para hacer IHQ con este anticuerpo.

Es importante que en las recaídas postratamiento con anticuerpo CD20, este se negativiza en la citometría de flujo y se hace débil en la detección

inmunohistoquímica (13). Siempre hay que complementar con el uso de otros Pan B como CD79a, CD22.

CD21 / CD35

Son anticuerpos que reaccionan con receptores del complemento C3d, C3b y se marcan las células foliculares dendríticas y sus neoplasias.

CD21 también marca un grupo de células B y marca células de RS (1).

Pueden ser útiles para delinear la red de células foliculares dendríticas en un linfoma folicular o identificar grupos hiperplásicos de células dendríticas en la linfoma T angioinmunoblástico (Dabas)

CD23

Es un antígeno de membrana de células B maduras y células reticulares dendríticas. Es un buen marcador B para CLL/ SLL y continua expresándose luego de ocurrir transformación de células grandes de estos.

Es negativo en el linfoma del Manto.

Es útil para diferenciar las proliferaciones de células linfoides pequeñas, CD5 positivas como CLL/SLL, del linfoma del manto y el Richter de la variante blástica del L del manto (28,29).

CD30

Reconoce una proteína de activación, miembro de la familia del factor de necrosis tumoral. En parafina funciona la clona BerH2, en congelación la Ki-1, la tinción es de membrana o paranuclear en la zona del Golgi o ambas. La positividad difusa citoplasmática puede verse junto a las anteriores, si está sola no debe considerarse como verdadera. Es un marcador no específico de linfoma ni tampoco específico de tumor.

En el tejido linfoide normal o reactivo pueden verse células CD30 positivas, grandes (inmunoblastos) y linfocitos pequeños activados, en el borde de los centros germinales de los folículos o entre ellos.

Casi 100% linfomas anaplásicos son positivos y fueron inicialmente definidos por esta reactividad como Ki-1. También lo es la papulosis linfomatoide.

Pero frecuentemente existen focos de células positivas en todos los linfomas no anaplásicos de células grandes.

El CD30 marca la célula de RS en el 90% EH clásica, con su patrón característico de membrana y paranuclear.

Se ha encontrado positividad en neoplasias no hematolinfoides como el carcinoma embrionario y el melanoma maligno (DABBS). También es positivo en el citoplasma de las células plasmáticas. Generalmente se ve con recuperación antigénica con HIER (heat induced antigen retrieval) (27,30).

CD34

Es una glicoproteína de superficie de células madre (^stem^) hematopoyéticas. Normalmente solo existe un 1.5% de células positivas en la médula ósea y menos del 0,5% en sangre periférica (1, 2, 4).

Los precursores eritroides, mieloides y megacariocíticos son CD34 positivos.

Las células linfoides inmaduras tdt positivas, también son CD34 positivas, por lo que es un buen marcador para leucemias agudas y células precursoras colectadas para trasplante de médula ósea.

El CD34 esta presente en células endoteliales de vasos pequeños (excepto placenta y bazo).

Tiene un patrón de tinción de membrana en el 40% de las leucemias mieloides agudas y 70% de las leucemias linfoblásticas en niños (31).

Existe gran variedad de tumores benignos y malignos que muestran positividad. Todos los que contienen células endoteliales (Kaposi, angiosarcomas, hemangiomas), los que tienen fibroblastos como el tumor fibroso solitario, lipoma de células fusiformes, dermatofibroma, fibroblastoma de células gigantes, miofibroblastoma de mama, tumores estromales gastrointestinales (GIST), neoplasias de músculo liso, neurofibroma, schwannoma.

CD 43

(Leu 22, MT1, OFT1) reconoce una proteína de superficie presente en la mayoría de las células mieloides y células T con patrón de membrana. Las células B no neoplásicas son usualmente negativas, aunque células B activadas (productoras de Ig) y células B inmaduras pueden ser positivas.

Identifica virtualmente todos los casos de linfomas T y de células NK (1,2). Tiene una excelente correlación de expresión con el CD5, por lo que la mayoría de los linfomas T y un grupo de neoplasias maduras de células B (LL/LLC, manto, L prolinfocítica) son frecuentemente positivas, determinando una coexpresión aberrante con CD20. Menos del 10% de los linfomas foliculares son positivos.

No puede ser usado como un Ac específico de linaje por su amplia expresividad en la mayoría de los leucocitos (32,33).

Es un indicador sensible de poblaciones B aberrantes y por lo tanto útil para establecer diagnóstico de linfoma no Hodgkin (33). Las células de RS son negativas.

CD45

(ACL) Son un conjunto de proteínas tirosinfosfatasa que se expresan prácticamente en todas las células hematolinfoides y sus precursores. No se expresa en células no hematolinfoides. Los anticuerpos conocidos como antígeno común leucocitario identifican múltiples isoformas de la proteína, cuyo patrón de positividad es de membrana y a veces paranuclear.

Existen varios subgrupos: CD45 RA que identifica sobre todo algunas células B

CD45 RO sobre todo células T , mieloides y un subgrupo de células B.

CD45 RB es un marcador pan-leucocito aunque su espectro no es tan amplio como el ACL.

Se expresa en la inmensa mayoría de los linfomas no Hodgkin, 97% de linfomas de células B y 90% de linfomas T son positivos. Es negativo en células de RS, linfoma linfoblástico, en 30 % del linfoma anaplásico y en las neoplasias de células plasmáticas (1,2,4,5,6,34).

CD56

(Neural Cell Adhesión Molecule N-CAM). Es el prototipo de marcador de células NK. También se ve en subgrupo de células T activadas CD4 o CD8, en neuronas, astrocitos, células Schwann,

Se observa en linfomas T periféricos extranodales, incluyendo al paniculitis like y en la leucemia mieloide aguda.

CD57

(Leu 7) marca células NK normales y un subgrupo células T con patrón de membrana. Las enfermedades malignas que son CD57+ son una minoría de linfomas-leucemias linfobásticos T, la mayoría de las leucemias de grandes linfocitos T granulares y solo una minoría de linfomas de células NK ya que sorprendentemente el fenotipo típico de estas es CD3-, CD5-, CD56+, CD57-. Se reconoce un anillo de células T positivas alrededor de las células neoplásicas en la EH PL, lo que es muy útil para su diagnóstico.

Se expresa también en: tumores neuroendócrinos, oligodendrogliomas, carcinoides, carcinoma de próstata y tiroides (1, 2, 5).

CD61

Leucemia aguda megacarioblástica

CD68

(KP1, PG-M1) reacciona con una glicoproteína asociada con lisosomas por lo tanto tiene tinción citoplasmática. Se observa en todas las células de linaje monocito /macrófago y sus correspondientes neoplasias.

Las células reticulares dendríticas, interdigitadas y Langerhans son generalmente negativas(1,2).

Son positivos: la leucemia mieloide aguda, un subgrupo de linfomas no Hodgkin con tinción en patrón punto. Además se ve en el tumor de células granulares, Schwannoma, fibroxantoma atípico y lesiones de los mastocitos.

Es útil para evaluar la distribución de histiocitos en cualquier proliferación linfoide (35).

CD79a

Reconoce una proteína del receptor de células B asociado con la expresión de superficie de inmunoglobulinas.

Se expresa en un amplio rango de maduración B desde las células más inmaduras a las células plasmáticas (1, 2, 4, 5, 6).

Tiene un patrón de tinción citoplasmática débil en células B inmaduras.

Reconoce prácticamente todos los neoplasmas de células B tanto maduros como inmaduros y solo 50% de los neoplasmas de células plasmáticas.

La mayoría de linfomas T y neoplasmas no linfoides son negativos (36).

CD99

El producto del gen MIC2, p30/32, es una glicoproteína de superficie que se identifica con el CD99.

Es un marcador sensible para tumores neuroectodérmicos primitivos, PNET/Ewing.

La distribución de positividad CD99 en proliferaciones hematopoyéticas es amplia.

Se ve en 70% de linfomas linfoblásticos y leucemias linfoblástica agudas. También 40% de los linfoma no Hodgkin de bajo grado B se marcan (Dabas).

Los linfocitos tímicos son CD99 positivos (1,2,4).

Además se expresa en una variedad de tumores sólidos: del ovario, tumores de células fusiformes como el tumor fibroso solitario, hemangioma, sarcoma sinovial, meningiomas y otros como el tumor desmoplásico abdominal de células redondas (37).

CD117

(producto del gen c-kit) Proteína receptor tipo tirosinquinasa expresada células mieloides, eritroides y mastocitos.

Muchos tumores lo expresan: GIST (tumor estromal gastrointestinal), de células germinales, carcinoma de endometrio, carcinoma papilar y folicular de tiroides (38).

La carencia de especificidad tumoral y expresión débil del antígeno en muchos otros tumores limita su utilidad diagnóstica. Se ve intensa positividad de membrana en mastocitos y sus neoplasias.

CD138

Se reconoce positividad en células preB, plasmocitos productores de Inmunoglobulinas tanto normales como neoplásicos.

Negativo en células T, mieloides, eritroides.

Es útil para identificar plasmocitos en gamapatías monoclonales de significado indeterminado y mieloma múltiple (1, 2, 39).

DBA 44

Marca un grupo de linfocitos B de la zona del manto folicular, inmunoblastos reactivos, células B monocitoides. Es altamente sensible para tricoleucemia, con tinción citoplasmática, aunque no es específico ya que también tiñe las células del linfoma de la zona marginal y 35% de linfomas B de células grandes. La LLC es usualmente negativa. A diferencia del CD20 se puede usar Zenker (1, 2, 5).

LMP-1

Proteína latente de membrana del virus de Epstein Barr , es una proteína viral que protege a las células infectadas de la apoptosis por desregulación de bcl-2.

La tinción es citoplasmática con acentuación paranuclear y a veces de membrana. Tiene muy buena correlación con la detección de ARn viral por hibridización in situ (HIS). Se detecta en EH, mononucleosis, SIDA, linfomas no Hodgkin. La inmunohistoquímica tiene menos sensibilidad en los carcinomas nasofaríngeos y linfomas T/NK, en relación con la HIS (1, 2, 5).

MARCADORES EPITELIALES

Raramente ocurre expresión de **Citoqueratinas (CK)** en linfomas. Cuando se ve es tinción paranuclear en "punto" en el linfoma anaplásico y el mieloma anaplásico. Las células dendríticas del ganglio linfático pueden ser positivas.

El **antígeno de membrana epitelial (EMA)**, es positivo en células linfoides mucho más frecuentemente, 95% de los linfomas anaplásicos son positivos (sobre todo los que son ALK y CD30 positivo). Con mayor frecuencia se ve en linfomas anaplásicos extranodales, sobre todo gastrointestinal y piel.

85% de las neoplasias de células plasmáticas son positivas para EMA.

60% de la EH predominio linfocitario nodular es positiva y mucho menos frecuente en la EH clásica.

Pueden ser positivos algunos casos de ___Linfoma B rico en T

___Linfoma B difuso de células grandes

___Leucemia megacariocítica

(1,2,4,5,6,40).

FASCINA

Proteína de unión con actina expresada fundamentalmente por células dendríticas incluyendo a las células dendríticas medulares del timo, células reticulares interdigitadas y células foliculares dendríticas de ganglios reactivos y de la pulpa blanca del bazo, células que revisten sinusoides esplénicas de la pulpa roja.

Son negativos: Linfocitos, células mieloides, plasmocitos.

Es útil en el diagnóstico diferencial de linfoma folicular versus hiperplasia folicular reactiva, porque el linfoma revela disminución o ausencia de células dendríticas.

La Fascina es positiva en el centro germinal.

La sobreexpresión se observa en hiperplasia relacionada con HIV, Castleman y otros tipos de hiperplasia.

Son positivas las células de RS y sus variantes en la EH. La variante LH es negativa. Esto hace que FASCINA sea de valor potencial en el diagnóstico del Hodgkin. Las perforinas y granzimas-B están presentes en linfocitos T citotóxicos

y células NK, su expresión indica un estado activado. Se expresan en linfoma T paniculitis simil, linfomas T/NK extranodales, leucemia NK (1,2,,41,42,43).

Hemoglobina A

Marca solo células eritroides en diferentes etapas madurativas.

Es negativo en series blanca y megacariocítica, así como linfocitos y plasmocitos.

Inmunoglobulinas

Se detectan en forma más confiable por citometría de flujo o por inmunohistoquímica en congelación. La expresión de cadena liviana puede detectarse en parafina con HIER. La expresión citoplasmática se detecta bien en células plasmáticas y sus neoplasmas, así como en casi todos los linfomas plasmocitoides.

Las cadenas livianas pueden ser detectadas teóricamente en secciones en parafina en la mayoría de los casos de hiperplasia folicular reactiva y en 50% de linfomas foliculares. También en un subgrupo significativo de linfomas B difusos que no tienen diferenciación plasmocitoide (1,2,3,4,5,6).

La tinción de la Ig debe ser evaluada cuidadosamente porque puede verse positividad artefactual citoplasmática, así como positividad difusa citoplasmática en macrófagos, células de RS y células degenerativas en las que las Ig penetran en forma pasiva. Para disminuir o eliminar este problema se recomienda hacer más cantidad de lavados previo a la incubación del primer Ac.

Ki67

Marcador de proliferación tumoral reconoce un Ag nuclear expresado en todos los estados del ciclo celular excepto G0.

En linfomas, puede ser útil para obtener un estimado global del grado de agresividad del linfoma, que generalmente es paralelo al porcentaje de células Ki67 positivas. Otra forma de cuantificarlo es la fracción de crecimiento, que se calcula dividiendo el número de células positivas entre el número total de células.

Se adjudica valor pronóstico ejemplo en el LB difuso de células grandes (1,2,44).

Lisozima

Marcador sensible y altamente específico para histiocitos, células mieloides y sus neoplasias. La tinción es citoplasmática (1).

Mieloperoxidasa

Marcador muy sensible y específico para leucemia aguda mieloide. Presenta tinción citoplasmática. Los precursores eritroides, de megacariocito, linfocitos, plasmocitos, son negativos.

Células monocíticas son negativas o débilmente positivas (1,2).

S100

Es positiva en células de Langerhans, células dendríticas interdigitadas, a veces células foliculares dendríticas. La tinción nuclear con o sin tinción citoplasmática se considera positivo verdadero. Es un buen marcador de histiocitosis de células de Langerhans, histiocitosis sinusal con linfadenopatía masiva y a/v sarcoma células dendríticas foliculares (1,2,4,5). También es positivo en células no hemotolinfoides (adipocitos, células névicas, de schwann, melanoma malignos , etc).

Tdt (desoxinucleotidil transferasa terminal)

Es una polimerasa de ADN que es activa en etapas tempranas. Marca una población de células T y B inmaduras que es el 2% de la población de la médula ósea normal adulta y algo mayor en niños.

La positividad es nuclear y se ve en los timocitos precursores corticales. La existencia de marcación citoplasmática sin marcación nuclear se debe considerar artefacto (1, 2, 45).

Es un marcador sensible y específico para neoplasmas linfoblásticos T y B. Se expresa también en la leucemia mieloide en crisis blástica linfoide.

Existen tumores de células pequeñas redondas y azules de la infancia que pueden ser positivos para tdt como: -meduloblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma de Ewing y timomas.

MANIPULACION Y PROCESAMIENTO DE LOS ESPECIMENES.

Los tejidos hematolinfoides deben ser cuidadosamente manipulados. Lo ideal es recibir el material en fresco y realizar improntas, obtener con material estéril muestras para cultivos y reservar tejido fresco o congelado para estudios citogénéticos, así como para determinación de inmunofenotipo por citometría(46). Es conveniente coordinar al patólogo en bloc quirúrgico, para establecer la suficiencia del material, sobre todo en ganglios profundos y para realizar los cortes correspondientes que permitan una adecuada fijación del mismo. Es conveniente seleccionar fragmentos lejos de las áreas de necrosis para la inclusión en parafina (2,7^a,7b).

Tanto para el diagnóstico convencional como para la realización de técnicas de inmunohistoquímica son fundamentales los cortes de buena calidad. Los cortes gruesos pueden conducir a errores con falsos positivos y negativos.

El método de fijación es de gran importancia, los fijadores mercurícos como el B5 o el Zenker, dan excelente morfología pero precipitan e interfieren con la inmunohistoquímica. El liquido de Bouin tiene ácido pícrico, el cual también deja cristales de picrato, que le da una tonalidad amarilla a la IHQ. Se obtiene mejores resultado con fijadores con zinc (formol-zinc). Pero el formol tamponado al 10% es práctico, económico y da excelentes resultado para estas técnicas, incluso en tejidos linfoides, por lo que es recomendable (2,7^a).

Las fallas en la fijación provienen fundamentalmente de retrasos en colocar el material en el fijador, poco tiempo de exposición al mismo o sobrefijación. Todos estos afectan los resultados de la IHQ. El retraso determina que se seca el material en la superficie, con pobre morfología en el centro y tinción falso positivo en la periferia. La inadecuada penetración del fijador determina una tinción débil o nula. La sobrefijación puede determinar una perdida de antigenicidad o problemas

de "fondo sucio", en estos casos la inmunohistoquímica frecuentemente es reactiva y más confiable en el centro y no en la periferia del tejido.

La recuperación antigénica, sobre todo con el método de inducción por calor (HIER) para el tejido fijado en formol e incluido en parafina ha mejorado notoriamente la calidad de las tinciones para muchos anticuerpos, especialmente en tejidos con problemas de fijación (2,11).

Los protocolos son variados y deben estandarizarse para cada laboratorio y anticuerpo.

INMUNOFENOTIPO DE LAS PRINCIPALES CATEGORIAS DE NEOPLASIAS
SOLIDAS HEMATOPOYETICAS

A- LINFOMAS NO HODGKIN

1. Neoplasmas de precursores B Linfoblásticos

Estos tumores tienen fenotipos que imitan las etapas normales de desarrollo B. Son positivos para Tdt.

Son positivos para marcadores de línea B como CD79a, pero debido a que las células son inmaduras solo 40-50% de los casos son CD20 positivo.

Las Ig citoplasmáticas pueden o no ser positivas, las de superficie son negativas.

CD34, CD10 son frecuentemente positivos (1, 2, 3). También co-expresan con frecuencia CD43 (Dabas).

También se observa paralelamente a la expresión de Tdt marcación para CD99 de localización de membrana más que nuclear. Pueden expresar bcl-2 en el citoplasma que los separa del Burkitt , debe interpretarse dentro de todo el panel ya que la variante blástica del manto también es bcl-2 +.

2. LLC/ Linfoma Linfocítico B

CD20 positivo débil, CD79a positivo. 96% tienen coexpresión aberrante de CD43/CD20. El CD23 y el CD5 son usualmente positivos.

Las Ig son negativas en parafina, frecuentemente se expresan en congelación (1, 2, 28, 47). Un resultado negativo de CD5 por citometría de flujo obliga a revisar el diagnóstico, lo mismo no se aplica a la inmunohistoquímica ya que con expresión de CD23 y negatividad para ciclina D1 se puede excluir el linfoma del manto y la negatividad de CD10 excluye al linfoma folicular.

3. Linfoma Linfoplasmocítico

Estos linfomas tienen restricción de cadenas livianas monotípicas intracitoplasmáticas, que son usualmente positivas en parafina.

La cadena pesada es más comúnmente IgM a diferencia de las lesiones de células plasmáticas que es IgG o IgA.

CD20 generalmente positivo, CD79a es positivo, coexpresan CD43 en 22% de los casos. CD5, CD23, CD10 son por lo general negativos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 47). CD138 (Syndecan) es negativo (Dabas). 80% de los casos expresan bcl-2.

4. Linfoma del manto

Es positivo para CD20, CD79a. Las Ig en parafina usualmente son negativas. En congelación se ve restricción lambda con mayor frecuencia.

94% presentan coexpresión aberrante de CD43 y 80 a 100% tienen coexpresión aberrante CD5, en algunos casos es muy débil.

CD10, CD23 son usualmente negativos.

Una característica frecuente y específica para el diagnóstico es la positividad nuclear para ciclina D1 (bcl-1), con 75% a 100% de sensibilidad en parafina (1,2,4,5,16,17,29). La expresión para ciclina D1 ayuda a diferenciar la variante blástica del manto del linfoma linfoblástico (17^a). Esta variante también es negativa para Tdt y CD99.

5. Linfoma Folicular

Es positivo para CD 20 y CD79a.

CD10 positivo en la mayoría.

Raramente existe coexpresión aberrante con CD43 o CD5. 90% de los casos son bcl-2 positivo, con un patrón diferente a la hiperplasia folicular. En el subtipo a células grandes (grupo III) solo 74% presentan positividad para bcl-2 (1, 2, 4, 5, 18, 19). La mayoría de los linfomas foliculares expresan también bcl-6 y su transformación en un linfoma de células grandes se acompaña de disminución de la misma (Dabas).

El bcl-2 se utiliza como marcador de enfermedad residual en la médula ósea de pacientes tratados por este tipo de linfomas, cuando la expresión es intensa y uniforme.

6. Linfoma B de Zona Marginal

Por definición es línea B con CD20 y CD79a positivo.

Pueden tener Ig monotípica en parafina cuando tiene características plasmocitoides. En congelación se detectan inmunoglobulinas en todos.

60 a 80% son bcl-2 positivos a diferencia de las hiperplasias B monocitoides, excepto la hiperplasia de la zona marginal del bazo.

Se ve en un tercio de los casos coexpresión aberrante de CD43. Son negativos para CD5, CD10, CD23 y ciclina D1 (1,2,3,28,47). A pesar de tener un fenotipo similar a la leucemia de células peludas raramente expresan DBA-44.

7. Linfoma de células grandes

Es una mezcla heterogénea de diferentes tipos de linfomas morfológicamente similares. Al menos 80% son de línea B, son los **linfomas difusos B de células grandes**, todos los cuales se marcan para CD20, CD79a. Existe un espectro morfológico muy variado dentro de este grupo que se acompaña de variaciones en el inmunofenotipo. En general se puede decir que en su mayoría son positivos para CD45 RB excepto el mediastinal y la variante anaplásica. Aquellos con caracteres de inmunoblastos plasmocitoides tienen Ig citoplasmática, en general IgM. Son CD10 positivos en casi la mitad de los casos.

Tienen expresión aberrante CD43 o CD5 en un porcentaje no mayor al 20% (22,23, Dabbs).

La forma mediastinal (tímica) es usualmente negativa para Ig y CD10, casi nunca tiene coexpresión aberrante CD43 o CD5.

50 a 80% de los casos son bcl 6 positivo (20). Entre 20 y 74% expresan bcl-2 que esta asociada a un pronóstico peyorativo (1, 4, 5, 17^a, DAbbs).

El índice de proliferación con Ki-67 es mayor que en los linfomas de células pequeñas.

Se pueden ver células CD30 positivas dispersas y no se les atribuye valor pronóstico, sobre todo en la forma mediastinal donde adopta un patrón citoplasmático difuso..

Menos de 20% de los linfomas de células grandes son **linfomas T periféricos** (1, 2, 3, 4, 5, 9, 30, 32, 36).

8. Linfoma Tipo Burkitt y Linfoma Burkitt simil

Son linfomas B que incluyen LLA L3 con expresión CD20, CD79a en parafina, frecuentemente expresión aberrante CD43.

95% o más de células positivas para Ki 67.

Son tdt negativos a diferencia del linfoma linfoblástico.

Linfoma tipo Burkitt frecuentemente CD10 positivo, CD43 positivo, bcl-2 negativo.

Linfoma Burkitt like frecuentemente CD10 negativo, CD43 positivo en menos del 50% y bcl-2 positivo.

O sea la expresión de bcl-2 es al revés entre ellos.

En todos el CD5 y CD23 son negativos (1, 2, 3, 22, 23, 33, 45).

9. Linfomas T periféricos

90% de los linfomas T periféricos expresan CD45/ CD45RB.

Por definición estos linfomas expresan uno o más marcadores T definitivos y no tienen marcadores restringidos de línea B (CD20-CD79a).

Expresan marcadores de línea T como CD3 o marcadores asociados con línea T como CD45 RO, CD43, CD5, todos o alguno son positivos en 80 a 90% de LT (1,33). No hay ningún marcador conocido de clonalidad para las células T.

La proteína betaF1 asociada al receptor de células T se expresa en 75% de los casos en congelación y en menor porcentaje en parafina.

La mayoría de los casos expresan un fenotipo helper CD4 positivo CD8 negativo, pero existen casos CD4 negativos, CD8 positivos o con fenotipo aberrantes CD4 negativo, CD8 negativos, CD4 positivo, CD8 positivo (1).

60% tienen la pérdida aberrante de uno o más marcadores pan T o T asociados, como CD2, CD3, CD5, o CD7.

Los distintos subtipos de linfomas T periféricos tiene peculiaridades en su inmunofenotipo y siempre deben valorarse en conjunto con la morfología y con otras técnicas como citometría, biología y genética molecular.

La pérdida de CD7 es muy común en la Micosis fungoide.

En linfomas angiocéntricos sobre todo nasal hay ausencia de marcadores T y son CD56 positivo lo que sugiere que es una neoplasia NK (1, 41, 42, 43).

Los linfomas T intestinales usualmente expresan CD103 que es un antígeno de lugar.

CD25 es característico del linfoma- leucemia T del adulto.

En el linfoma T hepato – esplénico es negativo BetaF1 y es positivo gamma/delta.

En un 15% de los LT periféricos se ve CD15 positivo, la tinción es focal, granular y citoplasmática diferente a la tinción paranuclear y membranosa de la EH. Existe un subgrupo de Linfomas T periféricos que también expresan S100 y Vimentina.

10. Linfoma de células grandes anaplásicas

Es un tipo peculiar de linfoma T que agrupa a entidades morfológica y clínicamente heterogéneas. Exhiben marcadores de activación linfocítica CD30 (lo define para algunos). Esta tinción es fuerte y está presente en la mayoría de las células neoplásicas a diferencia de otros tipos de linfomas que la presentan donde es focal, tiene un patrón de distribución celular característico.

Dos tercios de los casos son positivos para CD45/45RB, es la más baja tasa de positividad de todos los linfomas no Hodgkin. Por lo tanto, siempre hacer CD30 en proliferaciones CD45 negativa de células grandes.

En la clasificación OMS el LAGC de línea B se considera un subtipo de linfoma B de células grandes. La mayoría de LAGC son T, son CD43 positivo, CD3 positivo, el resto son nulos. Cuando se hacen estudios a congelación se encuentra frecuentemente fenotipos T aberrantes.

EJ: 1/3 son nulos. CD3 negativos y PANT negativo pero son CD43 positivos.

EMA es positiva en 60- 70% de los casos excepto los primitivos de piel.

Son CD15 negativos.

Son ALK positivos en 50 a 75% de los casos, los cutáneos que son siempre negativos. La expresión de ALK se correlaciona directamente con la de EMA y se asocia con mejor pronóstico.

11- Linfoma Linfoblástico T.

Todos son Tdt positivos.

80% son positivo para CD45 / CD45 RB (se considera un bajo porcentaje entre los linfomas no Hodgkin). Casi todos son CD43 positivos, CD2 positivos y CD3 positivos citoplasmático.

50% son CD45RO positivo.

Existe un subgrupo con coexpresión de CD16, CD57 positivo.

B- ENFERMEDAD DE HODKGIN.

1- Enfermedad de Hodgkin clásica.

El inmunofenotipo característico de las células de Reed- Sternberg es: CD15, CD30 positivo, CD45/45RB (ACL) negativo.

El CD20 es positivo solo en 20% de los casos y sería el único marcador específico de linaje en las células de RS.

Además frecuentemente son positivas para restina, fascina (proteínas asociadas a filamentos intermedios).

En el ambiente inmunoreactivo predominan los linfocitos T helper.

2- Tipo Predominio Linfocitario.

El fenotipo característico de las células grandes es: CD20, CD45/RB positivos. EMA es positivo en 60%, bcl-2 positivo en 100%. Se expresa CD30 y CD15 solo 10% con digestión.

Existe un fondo de linfocitos B, CD57 positivo que se disponen alrededor de células L y H.

RESUMEN

La inmunohistoquímica ha transformado a la anatomía patológica "de algo muy parecido a un arte en algo más cercano a una ciencia como lo ha afirmado Taylor. Juega un rol muy importante en el diagnóstico y clasificación de las neoplasias hematolinfoides. Constantemente aparecen nuevos marcadores celulares y de línea de diferenciación, que pueden aplicarse en material fijado y procesado en forma rutinaria con inclusión en parafina. En esta puesta al día describimos las características y las aplicaciones de los marcadores mas usados y otros recientemente descriptos para estas neoplasias. El estudio histopatológico convencional es la base del diagnóstico y continua siendo la "regla de oro" del mismo. En base a los hallazgos morfológicos, se plantean los posibles diagnósticos diferenciales y en base a esto se realiza la selección de los paneles de anticuerpos a utilizar.

Bibliografía

- 1- Chu P, Chang K, Arber D, Weiss L. Immunophenotyping of Hematopoietic neoplasms. *Sem diag pathol* 2000, 17 (3): 236- 256.
- 2- Bacchi C, Bacchi M Imunoematopathology. markers in paraffin sections. *J Histotechnol* 1999, 22:195 – 205.
- 2a- Gualco G, Ardao G. *Arch Med Int* 23(4): 195-205, 2001.
- 3- Abbondanzo S. Inmunohistochemistry in the diagnosis of hematolymphoid lesions AFIP course, Bs As, 2000
- 4- Knowles D. Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and clasification of hematopoietic neoplasms. En *Neoplastic hematopathology*, Krowles D Lippincott W.W. Philadelphia, 2001, Cap 3:93 –226.

- 5- Waarnker R, Isaacson P. Immunohistochemical Analysis of Lymphoid tissue. In Neoplastic hematopathology. Knowles D. Lippincott W.W. Philadelphia,2001, Cap 4:227-253.
- 6- Chu P, Chang K, Arber D, Weiss L. Practical applications of immunohistochemistry in hematolymphoid neoplasms. Ann Diagn Pathol 1999, 3: 104-133.
- 7- Knowles D. Lymphoid cell markers their distribution and usefulness in the immunophenotypic analyses of lymphoid neoplasm. Am J Surg Pathol 1985, 9: 85-108.
- 7a- Seidal T, Balaton A, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. Am J Surg Pathol 2001,25(9): 1204-1207.
- 7b- Wick M, Mills S. Consensus interpretative guidelines for diagnostic immunohistochemistry. Am J Surg Pathol 2001, 25(9): 1208-1210.
- 8-Harris N, Jaffe E, Diebold J, Flandrin G, Muller –Hermelink H, Vardiman J et al. World Health Organization classification of hematologic malignancies: report of the clinical advisory committee meeting- Airlie House, Virginia, november 1997. J Clin Oncol 1999, 17:3835-3849.
- 9- Harris N, Jaffe E, Stein H. A revised European – American classification of lymphoid neoplasms. A proposal from the international Lymphoma Study Group. Blood 1994;84:1361-1392.
- 10-Andrade R, Wick M, Fizzera G. Immunophenotyping of hematopoietic malignancies in paraffin sections. Hum Pathol 1988, 19:394-402.
- 11- Taylor C, Shi S, Cote R. Antigen retrieval for immunohistochemistry. Appl Immunohistochem 1996, 4(3): 144-166.
- 12-Stewart C, Bhem F, Carey J, Cornbleet J, Duque R, Hudnall D, et al.. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: Selection of antibody combinations. Cytometry 1997, 30:231-235.
- 13-Borowitz M, Bray R, Gascoyne R, Melnick S, Parker J, Picker L, et al. US-Canadian consensus recommendation on the immunophenotypic analysis of

hematologic neoplasia by flow cytometry: Data analysis and interpretation. *Cytometry* 1997, 30:236-244.

14- Benharroch D, Meguerian Z, Lamant L. ALK positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood* 1998; 91:2076-2084.

15- Falini B, Bigerna B, Fizzotti M. ALK expression define a distinct group of T/null lymphoma with a wide morphological spectrum. *Am J Pathol* 1998; 153: 875-886.

16- Chan J. Immunostaining for cyclin D1 and the diagnosis of mantle cell lymphoma: is there a reliable method? *Histopathology* 1999; 34: 266-270.

17- Alkan S, Schnitzer B, Thompson J. Cyclin D1 protein expression in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol* 1995; 6: 567-570.

17^a-Frizzera G, Wu D, Inghirami G. The usefulness of immunophenotypic and genotypic studies in the diagnosis and classification of hematopoietic and lymphoid neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1999, 111(Suppl1): S13-39.

18- Lai R, Arber D, Chang K, Wilson C, Weiss L. Frequency of bcl-2 expression in non Hodgkin's lymphomas. A study of 778 cases with comparison of marginal zone lymphoma and monocytoid B cell hyperplasia. *Mod Pathol* 1998;11:864-869.

19- Gelb A, Dorfman R. Detection of immunophenotypic abnormalities in paraffin-embedded B-lineage non Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol* 1994;102:825-834.

20- Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, Quatrone S, Migliaretti G, Fassone G, et al. Distribution and pattern of bcl-6 mutations throughout the spectrum of B cell neoplasia. *Blood* 2000; 95: 651-659.

21- Mason D, Cordell J, Brown M. Detection of T cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. *J Clin Pathol* 1989; 42: 194-200.

22- Dorfman D, Shahsafaei A. Usefulness of new CD5 antibody for the diagnosis of T- cell and B- cell lymphoproliferative disorders in paraffin sections. *Mod Pathol* 1997; 10(9): 859-863.

23-Arber D, Weiss L. CD10: A review. *Appl Immunohistochem* 1997; 5: 125-140.

24-Arber D, Weiss L. CD15: A review. *Appl Immunohistochem* 1993;1:17-30.

- 25-Bleesing J, Fleisher T. Immunophenotyping. *Semin Hematol* 2001; 38(2): 100-110.
- 26-Chang K, Arber D, Weiss L. CD20: A review. *Appl Immunohistochem* 1996; 4:1-15.
- 27- Said J. The immunohistochemistry of Hodgkin's disease. *Semin Diagn Pathol* 1992, 9:265-271.
- 28-Lampert I, Wotherspoon A, Van Norden S, Hasserjian R. High expression of CD23 in the proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia in lymph nodes and spleen. *Hum Pathol* 1999, 30: 648-654.
- 29-Campo E, Raffeld M, Jaffe E. Mantle cell lymphoma. *Semin Hematol* 1999, 36:115-127.
- 30-Chang K, Arber D, Weiss L. CD30: A review. *Appl Immunohistochem* 1993, 1:244-255.
- 31-Van de Rijn R, Rouse R. CD34: A review. *Appl Immunohistochem* 1994, 2:71-80.
- 32-Arber D, Weiss L. CD43: A review. *Appl Immunohistochem* 1993, 1:88-96.
- 33-Lai R, Weiss L, Chang K, Arber D. Frequency of CD43 expression in non Hodgkin's lymphomas. A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43+ follicular lymphomas. *Am J Clin Pathol* 1999, 111:488-494.
- 34-Weiss L, Arber D, Chang K. CD45: A review. *Appl Immunohistochem* 1993, 1:166-181.
- 35-Weiss L, Arber D, Chang K. CD68: A review. *Appl Immunohistochem* 1993: 1:2-8.
- 36-Mason D, Cordell J, Brown M. CD79a: a novel marker for B cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood* 1995; 85: 1453-1459.
- 37-Robertson P, Neiman S, Worapongpaiboon S. O13 (CD99) positivity in hematologic proliferation correlates with Tdt positivity. *Mod Pathol* 1997, 10:277-282.
- 38- Berman J, O'Leary T. Gastrointestinal stromal tumor workshop. *Hum Pathol* 2001, 32: 578-582

- 39-Chilosi M, Adami F, Lestani M, Montagno L, Cimarosto L, Semenzato G, et al. CD138/Syndecan 1: A useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Mod Pathol* 1999, 12(12): 1101-1106.
- 40-Chittal S, Saati T, Delsol G. Epithelial membrane antigen in hematolymphoid neoplasms. *Appl Immunohistochem* 1997, 5:203-215.
- 41- Kwong Y, Cahn A, Liang R. Natural killer cell lymphoma/leukemia: Pathology and treatment. *Hematol Oncol* 1997 ;15: 71-79.
- 42- Jones D, Dorfman D. Phenotypic characterization of subsets of T cell lymphoma: towards a functional classification of T cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001; 40(5-6): 449-459.
- 43- Chan J. Peripheral T-cell and NK-cell neoplasms: an integrated approach to diagnosis. *Mod Pathol* 1999 12(2): 177-199.
- 44-Grogan T, Lippman S, Spier C. Independent prognosis significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki67. *Blood* 1988, 71:1157-1160.
- 45-Chilosi M, Pizzolo G. Review of terminal deoxynucleotidyl transferase. *Appl Immunohistochem* 1995, 3:209-221.
- 46- Vercelli J. La biopsia de ganglio linfático. Generalidades de interés clínicoquirúrgico. *Rev Med Uruguay* 4: 195-200, 1988.
- 47- Dárena G, Keating M, Carotenuto M. Chronic lymphoproliferative disorders: an integrated point of view for the differential diagnosis. *Leuk Lymphoma* 2000; 30(3-4): 225-237.

