

Universidad de Salamanca
Departamento de Medicina
Hematología



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

Tesis doctoral

**Aportación de la citometría de flujo en el estudio
de los linfomas no Hodgkin: análisis de la
infiltración de médula ósea y caracterización
inmunofenotípica de síndromes linfoproliferativos
crónicos con expresión leucémica**

Lucía López-Anglada Fernández

2014



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

Dña. Belén Vidriales Vicente, Doctora en Medicina y Médico Adjunto del Hospital Universitario de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por Dña. Lucía López-Anglada Fernández, titulado *Aportación de la citometría de flujo en el estudio de los linfomas no Hodgkin: análisis de la infiltración de médula ósea y caracterización inmunofenotípica de síndromes linfoproliferativos crónicos con expresión leucémica*, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firma la presente certificación en Salamanca, a 23 de Junio de 2014

Directora

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Belén Vidriales', enclosed within a large, stylized blue oval.

Fdo. Dra. Belén Vidriales Vicente



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

D. Marcos González Díaz, Doctor en Medicina, Profesor Titular de la Facultad de Enfermería y Jefe de Sección del Departamento de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca,

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por Dña. Lucía López-Anglada Fernández, titulado *Aportación de la citometría de flujo en el estudio de los linfomas no Hodgkin: análisis de la infiltración de médula ósea y caracterización inmunofenotípica de síndromes linfoproliferativos crónicos con expresión leucémica*, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firma la presente certificación en Salamanca, a 23 de Junio de 2014

Director

A handwritten signature in blue ink, reading "Marcos González Díaz", with a horizontal line underneath.

Fdo. Dr. Marcos González Díaz

Agradecimientos

Glosario de abreviaturas

ABC. Célula B activada.

AcMo. Anticuerpo(s) monoclonal(es).

Ag. Antígeno.

ALAT. Alanina aminotransferasa.

ALK. *Anaplastic lymphoma kinase* (ALK), también conocida como «receptor ALK tirosina-kinasa» o «CD246».

APC. Aloficocianina.

ASAT. Aspartato aminotransferasa.

bcl2. Familia de proteínas que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular. Deriva del protooncogén Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*).

bcl6. Proteína 6 del linfoma de células B (BCL6). Es una proteína codificada en humanos por el gen bcl6.

BCR. Receptor de células B.

Blimp-1. Proteína de maduración inducida por linfocito B, del inglés *B-lymphocyte-induced maturation protein 1*.

BM. Biología molecular.

BO. Biopsia ósea.

BOB. Biopsia ósea bilateral.

BOU. Biopsia ósea unilateral.

c-Kit. *Proto-oncogen c-Kit* o «proteína tirosina-kinasa Kit» o «CD117»; proteína codificada en humanos por el gen KIT, responsable de distintas rutas de señalización celular implicadas en crecimiento celular, proliferación, supervivencia y migración celular.

CD. *Cluster of differentiation* (marcadores de superficie celular).

CDF. Células dendríticas foliculares.

CG. Centro germinal.

CMF. Citometría de flujo.

CMH. Complejo mayor de histocompatibilidad.

CMV. Citomegalovirus.

CP. Célula plasmática.

CXCL13. Proteína codificada por el gen CXCL13 también llamada *B lymphocyte chemoattractant* (BLC).

CXCR12. Factor derivado del estroma (SDF-1).

CXCR4. Receptor de citoquinas tipo 4, fusina o CD184.

CXCR5. Receptor de citocina tipo 5 o CD185 (*cluster of differentiation 185*) o receptor 1 de linfoma de Burkitt (BLR1).

cy. Citoplasmático.

DS. Desviación estándar.

E2A. Factor de transcripción con papel principal en la diferenciación específica tisular durante la embriogénesis, como en la diferenciación temprana de células B.

EBV. Virus Epstein-Barr.

EMR. Enfermedad mínima residual.

FDG. 18-F-fluorodesoxiglucosa.

FISH. Hibridación in situ fluorescente.

FITC. Isotiocianato de fluoresceína.

FSC. Dispersión frontal de luz o tamaño celular.

GL. Ganglio linfático.

GM. Gammapatía monoclonal.

GMSI. Gammapatía monoclonal de significado incierto.

HC2. Región constante 2 de las cadenas pesadas.

HLA. Antígenos leucocitarios humanos.

HMS. Hipermutación somática.

HPN. Hemoglobinuria paroxística nocturna.

HUMARA. Test molecular de inactivación del cromosoma X.

Ig. Inmunoglobulina/s.

IGH. Gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

IGL. Gen de la cadena ligera de las inmunoglobulinas.

IL. Interleucina.

IPI. Índice pronóstico internacional.

irf-4. Factor regulador de interferón 4.

Ki67. Antígeno KI-67 o MKI67, proteína codificada por el gen MKI67, asociada a proliferación celular.

LAM. Leucemia aguda mieloblástica.

LB. Linfoma de Burkitt.

LBDCG. Linfoma B difuso de célula grande.

LCM. Linfoma de células del Manto.

LCR. Líquido céfalo-raquídeo.
LDH. Lactato-deshidrogenasa.
LF. Linfoma folicular.
LLA. Leucemia linfoblástica aguda.
LLC. Leucemia linfática crónica.
LCP. Leucemia de células plasmáticas.
LLCP. Linfoma linfocítico de célula pequeña.
LLGG-T. Leucemia/linfocitosis de linfocitos T grandes granulares.
LLP. Linfoma linfoplasmocítico.
LNH. Linfoma no Hodgkin.
LPL-B. Leucemia prolinfocítica B.
LZM. Linfoma de zona marginal.
LZME. Linfoma de zona marginal esplénico.
LZMn. Linfoma de zona marginal nodal.
MALT. Tejido linfoide asociado a mucosas.
MBL. Linfocitosis B monoclonal.
MFI. Intensidad media de fluorescencia.
mitf. Factor de transcripción asociado a microftalmia.
MM. Mieloma múltiple.
MO. Médula ósea.
MS. Mastocitosis sistémica.
MTC. *Major translocation cluster.*
MW. Macroglobulinemia de Waldenström.
NK. *Natural killer.*
OMS. Organización Mundial de la Salud.
ORL. Otorrinolaringea.
PAAF. Punción aspiración con aguja fina.
PAX5. Proteína *paired box-5.*
PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.
PE. Ficoeritrina.
PerCP. Proteína peridín-clorofila.
PET. Tomografía por emisión de positrones.
PU-1. Factor de transcripción tejido específico expresado en células de linaje hematopoyético.
RAG. Gen activador de la recombinación.
REAL. Clasificación revisada europea-americana.
RMN. Resonancia magnética nuclear.
SCF. *Stem cell factor.*
SLP. Síndrome linfoproliferativo.
SLPC. Síndrome linfoproliferativo crónico.
SMD. Síndrome mielodisplásico.
SNC. Sistema nervioso central.
SP. Sangre periférica.
SSC. Dispersión lateral de luz o complejidad interna de la célula.
SvLP. Supervivencia libre de progresión.
TC. Tomografía computerizada.
TCR. Receptor de células T.
Tdt. Deoxinucleotidil-transferasa-terminal.
TL. Tricoleucemia.
TL-V. Forma variante de tricoleucemia.
VCAM-1. Del inglés *vascular cell adhesion molecule 1* o «CD106».
VHB. Virus hepatitis B.
VHC. Virus hepatitis C.
VIH. Virus de la inmunodeficiencia humana.
VLA-4. Integrina alpha4beta1 (*Very Late Antigen-4*), compuesto por CD49d (alpha 4) y CD29 (beta 1).
Xbp-1. Proteína 1 de unión de segmentos X.

Índice

INTRODUCCIÓN	25
1. Maduración Linfoide.....	28
1.1. Estadios iniciales en la maduración Linfoide B y T.....	28
1.2. Maduración B	28
1.2.1. Maduración B independiente de antígeno	29
1.2.2. Maduración linfoide B dependiente de antígeno	31
1.3. Maduración T y NK	35
2. Diagnóstico, clasificación y estadificación de los LNH.....	39
3. Determinación de clonalidad linfoide mediante CMF en síndromes linfoproliferativos	43
3.1. Clonalidad B.....	44
3.2. Clonalidad T	45
3.3. Clonalidad NK:	47
4. Biopsia ósea	48
5. Características inmunofenotípicas de SLPC	53
5.1. Características inmunofenotípicas de los SLPC-B	54
5.1.1. SLPC primariamente leucémicos.....	54
5.1.1.1. Leucemia linfática crónica B y linfoma linfocítico de células B pequeñas (LLC/LLCBP)	54
5.1.1.2. Leucemia prolinfocítica B (LPL-B).....	56
5.1.1.3. Tricoleucemia (TL).....	56
5.1.2. LNH-B con expresión leucémica (expresión periférica)	57
5.1.2.1. Linfoma de células del manto (LCM)	57
5.1.2.2. Linfoma Folicular (LF).....	58
5.1.2.3. Linfoma B difuso de células grandes (LBDCG)	59
5.1.2.4. Linfoma de Burkitt (LB)	60
5.1.2.5. Linfomas de zona marginal (LZM).....	60
5.1.2.6. Linfoma linfoplasmocítico (LLP) y macroglobulinemia de Waldenstrom (MW)	61
5.1.2.7. Gammapatías monoclonales (GM) y mieloma múltiple (MM)	62
5.1.3. Subgrupo de SLPC-B leucémico con Fenotipo CD19+CD5+ . Un reto diagnóstico en la rutina clínica.....	62
5.2. Características fenotípicas de los SLPC-T y SLPC-NK.....	63
5.2.1. Leucemia prolinfocítica T	63
5.2.2. Leucemia/linfoma T del adulto	64
5.2.3. Leucemia/linfoma de linfocitos T grandes granulares (LLGG-T)	64
5.2.4. Síndrome de Sézary y micosis fungoide.....	65
5.2.5. Linfoma T angioinmunoblástico.....	65
5.2.6. Linfoma T periférico NOS (<i>not otherwise specified</i>).....	66
5.2.7. Linfoma T hepato-esplénico	66
5.2.8. Linfoma T subcutáneo tipo paniculítico.....	66
5.2.9. Linfomas T/NK extranodal tipo nasal.....	66
5.2.10. Linfoma T asociado a enteropatía.....	67
5.2.11. Linfoma T anaplásico de células grandes ALK+	67
5.2.12. Linfoma T anaplásico de células grandes ALK-.....	67
5.2.13. Síndrome linfoproliferativo crónico de células NK (SLPC-NK).....	67
5.2.14. Leucemia agresiva de células NK	68
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
RESULTADOS.....	83
DISCUSIÓN.....	97
CONCLUSIONES.....	109
BIBLIOGRAFÍA	113

Introducción

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos son células de origen hematopoyético que forman parte del sistema inmune. El sistema inmune es un conjunto de estructuras y procesos biológicos dentro de un organismo que lo protegen contra enfermedades identificando y destruyendo células patógenas. Los linfocitos reconocen agentes extraños distintos y responden ante cada uno de ellos de forma específica y adaptada, o inducen tolerancia frente a las estructuras propias. Existen dos grandes grupos de células linfoides con origen y función diferentes: los linfocitos T y los linfocitos B, aunque también se describe un tercer grupo de células linfoides con ciertos mecanismos efectores de respuesta inmune comunes con los linfocitos T, y a las que se denomina «células *natural killer*» (NK).

Las células linfoides B y T contienen moléculas receptoras que reconocen objetivos o blancos específicos [receptor de células B (BCR) y receptor de células T (TCR), respectivamente]. Las células T reconocen un objetivo no-propio, como por ejemplo un patógeno, después de que los antígenos (fragmentos residuales del patógeno) han sido procesados y presentados en combinación con un receptor propio: una molécula del llamado «complejo mayor de histocompatibilidad» (CMH). Hay dos subtipos principales de células T: la célula T citotóxica (Linfocito T-CD8) y la célula T colaboradora (Linfocito T-CD4). Las células T citotóxicas solo reconocen antígenos acoplados a moléculas del CMH de clase I, mientras que las células T colaboradoras solo reconocen antígenos acoplados a moléculas del CMH de clase II. Estos dos mecanismos de presentación de antígenos reflejan los diferentes cometidos de uno y otro tipo de células T. Un tercer subtipo lo forman las células $T\gamma\delta$, que reconocen antígenos intactos que no están acoplados a receptores CMH. El BCR es una molécula de inmunoglobulina (Ig) no secretable, expresada en la superficie de la célula B y que reconoce patógenos completos sin la necesidad de que los antígenos sean procesados previamente. Cada linaje de células B expresa un anticuerpo diferente, de forma que el conjunto completo de receptores de antígenos de las células B de un organismo representa todos los anticuerpos que ese organismo es capaz de fabricar.

Las neoplasias malignas de células linfoides son enfermedades que engloban desde procesos de escasa malignidad, hasta neoplasias muy agresivas. Se originan a partir de una proliferación clonal linfoide de células que se encuentran en distintas etapas de diferenciación, lo que da lugar a una gran variedad de datos morfológicos e inmunitarios y de manifestaciones clínicas. Los avances en la investigación del sistema inmune normal han permitido conocer mejor estos procesos, a veces confusos.

Algunas neoplasias malignas de las células linfoides se manifiestan de forma predominante como leucemia [es decir, afectando sobre todo a la sangre periférica (SP) y la médula ósea (MO)], mientras que otras se presentan como linfomas (es decir, tumores sólidos del sistema inmunitario). Algunas neoplasias linfoides se pueden presentar como leucemias unas veces y como linfomas otras, y, además, la forma clínica puede cambiar durante la evolución de la enfermedad. Este cambio se observa con mayor frecuencia en pacientes que comienzan con un linfoma y que, más tarde, en el curso evolutivo de la enfermedad, muestran manifestaciones de leucemia (proceso de leucemización).¹

Dentro de las posibles enfermedades hematológicas malignas de células linfoides, bajo el término de «síndromes linfoproliferativos» (SLP) se incluye un grupo heterogéneo de enfermedades que tienen en común el origen linfoide de las células que proliferan. Dentro de los SLP, cabe distinguir los agudos (leucemias agudas linfoblásticas), y los crónicos (SLPC). Estos, a su vez, pueden cursar con expresión leucémica o no. Entre estos últimos, denominados genéricamente «linfomas», se incluye un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por una proliferación clonal de células linfoides de aspecto maduro con características correspondientes, en cada caso, a distintas subpoblaciones normales de linfocitos maduros. Dentro de los linfomas se distinguen dos grandes grupos, los denominados «Hodgkin» y el resto [Linfomas No Hodgkin (LNH)]

Teniendo en cuenta distintas características, los SLPC se pueden clasificar en diferentes grupos. Si nos centramos en su inmunofenotipo y origen celular, podemos hablar de SLPC-B, T y NK. Sin embargo, según la clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS),¹ los SLPC-T y NK se consideran de forma conjunta, ya que algunos subtipos presentan características clínicas, morfológicas y evolutivas similares, independientemente de la naturaleza de la célula clonal, y claramente son diferentes de las neoplasias de linfocitos B.

Por lo general, más del 90-95 % de todas las enfermedades neoplásicas linfoproliferativas crónicas están representadas por los SLPC-B:² engloban un amplio grupo de enfermedades, clínica y biológicamente bien definidas; sin embargo, el número de SLPC-T y NK es mucho menor.^{1,3}

A lo largo de esta introducción, revisaremos algunos aspectos de la maduración linfoide normal, repasaremos brevemente el diagnóstico y la clasificación de los LNH, así como las características inmunofenotípicas de los SLPC y los LNH, y las aportaciones de la citometría de flujo (CMF) en este campo. Analizaremos las estrategias de diagnóstico de clonalidad linfoide en los SLPC mediante CMF y revisaremos las características fenotípicas más relevantes de los distintos subtipos de SLPC-B y T identificados en la clasificación de la OMS.¹

Nos centraremos también en el estudio clínico de extensión de los LNH y en la importancia del análisis histológico de biopsia ósea (BO) junto al estudio de CMF para determinar el estadio clínico del linfoma pre-tratamiento con el uso combinado de técnicas diagnósticas, como el estudio de clonalidad y/o las translocaciones cromosómicas mediante técnicas de Biología Molecular (BM). Igualmente, se analizará el valor clínico de realizar la BO en una cresta iliaca o en ambas (estudio bilateral).

1. Maduración Linfoide

1.1. Estadios iniciales en la maduración Linfoide B y T

Los linfocitos proceden de un precursor hematopoyético CD34+.⁴⁻⁶ Entre los precursores CD34+CD45+^{débil} de la MO, se identifica un compartimento significativo de precursores B con co-expresión de la enzima nuclear deoxinucleotidil-transferasa-terminal (Tdt), proteína *paired box-5* (PAX5), CD81, CD10, CD19, CD22 y CD79a citoplasmático (cy).⁷

Aunque no existe un acuerdo unánime sobre la secuencia exacta de aparición de estos marcadores, sabemos que la expresión de PAX5 es un evento temprano que se asocia a la activación de expresión de otras proteínas propias de la diferenciación B;⁸⁻¹¹ se asume que la expresión de Tdt precede a CD10, CD22 y CD79a y que CD19 se positiviza en un estadio inmediatamente posterior a estos últimos marcadores inducido por CD81.^{7,12}

En el caso de las células T o NK, no está totalmente aclarado el precursor de la MO, ni los primeros estadios de diferenciación,^{12,13} aunque se ha sugerido que un grupo minoritario de células que expresan CD34+CD7+ en MO (<0,5 % de la celularidad global y <20 % de los precursores CD34+) podría incluir un precursor común T/NK/célula dendrítica^{14,15} con co-expresión de CD117, CD135, CD38, CD44, CD45RA y HLA-DR, y con expresión variable de los marcadores asociados a línea mielóide CD13 y CD33.¹⁴⁻¹⁶ La presencia de reactividad para CD5, que habitualmente ocurre fuera de la MO, permite identificar los precursores específicos de célula T más inmaduros que han emigrado al timo y, a su vez, distinguirlos de los precursores de células NK.^{14,15}

1.2. Maduración B

La maduración de las células B tiene lugar en dos etapas diferentes, y en dos localizaciones distintas:

- a) *Independiente de antígeno (Ag)*, que tiene lugar durante el periodo fetal en el saco vitelino y en el hígado, y, tras el nacimiento, se localiza en la MO. En esta primera etapa ocurre la diferenciación de precursores de células B desde célula *stem* hasta linfocito B maduro inmuno-competente (célula B *naïve* o virgen).¹⁷
- b) *Dependiente de Ag*, que tiene lugar en los órganos linfoides secundarios — ganglios linfáticos (GL), bazo, MO y tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)— y en la que ocurre la maduración a células de memoria/efectoras, hasta las células plasmáticas.^{18,19}

Las subpoblaciones de células B resultantes de estas dos etapas, circulan a través de la SP entre los distintos tejidos, y podrían reflejar el estado inmunológico de un individuo.

1.2.1. Maduración B independiente de antígeno

Según el estado de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las Ig y la expresión de gran variedad de proteínas de superficie e intracelulares, se han identificado cinco compartimentos madurativos de células B en la MO: precursores pro-B, pre-BI, pre-BII, linfocitos B inmaduros (o transicionales) y células B *naïve*.^{10,12,17,20,21}

Los precursores de MO adquieren compromiso madurativo a línea linfóide B tras su interacción con células del estroma a través, entre otras, de moléculas VLA-4/VCAM-1 y c-Kit/SCF (*stem cell factor*).^{17,21,22} Se induce así la diferenciación a célula pro-B, que expresará de forma débil CD22 y CD45, junto a marcadores de célula precursora como CD34 y niveles elevados de CD38, sin que expresen aún CD19.^{10,12,23} Estos precursores, aún sin compromiso B, a través del receptor de citocinas tipo 4 (CXCR4) se unen específicamente a células que expresan el factor derivado del estroma CXCL12, responsable de la migración de precursores hematopoyéticos a la MO. Cuando los precursores migran a nichos medulares donde se expresa IL-7, es cuando adquieren el compromiso a línea linfóide B.^{17,24,25} La interacción de IL-7 con su receptor (CD127), que se expresa en la membrana de la célula pro-B, promueve la activación de varios factores de transcripción (PAX-5, PU.1, ENF-1, E2A), que inducen la síntesis de la enzima nuclear Tdt y el gen activador de la recombinación (RAG), produciendo Tdt, rag1 y rag2, proteínas necesarias para la recombinación somática entre los genes de los segmentos D y J (diversidad y de unión «*joint*») del locus de la cadena pesada de las Ig (IGH),^{26,27} de modo que durante la fase de célula pro-B se reordenan los segmentos génicos DH/JH primero en un cromosoma y si el reordenamiento no es funcional, se reordenarían en el segundo cromosoma. Al expresar PAX-5, las células pro-B comprometen su linaje a línea B como células pre-BI, en las que se detecta por primera vez CD19, con fenotipo CD10++CD38++CD34+CD79a+ y expresión nuclear de Tdt. En este paso la unión de un segmento V (variable) a un segmento D-J preformado completaría el reordenamiento del locus IGH. Primero se reordenaría un cromosoma y si es funcional no se produciría el reordenamiento en el otro cromosoma. Por el contrario, si falla el reordenamiento se reordena el otro alelo para producir un reordenamiento VDJ funcional. Si ambos reordenamientos fallan y no son funcionales, la célula B entra en apoptosis.

La generación de la cadena pesada I μ se debe a la unión de su exón constante (IGH) a un exón VDJ funcional. Las células en las que se detecta I μ citoplasmática (cy I μ), se identifican como células pre B-II^{12,28} y presentan reactividad para CD20,

aumento de expresión de CD45 y descenso de reactividad de CD34 y de la expresión nuclear de Tdt.^{10,12} Ig μ se expresa a niveles bajos en la superficie de células pre-B junto a proteínas Vpre-B y λ 5, que sustituyen la cadena ligera de la Ig, cuyo *loci* no ha sido todavía reordenado en estas fases de la maduración.^{20,29}

Ig α e Ig β (CD79a y CD79b) son proteínas de señalización que también se expresan para formar el pre-BCR junto con la cadena Ig μ , Vpre-B y λ 5. En este punto tiene lugar una selección positiva de precursores B, confirmando que la cadena Ig μ generada es funcional, y eliminando aquellas células con reordenamiento de genes IGH no funcionales (aproximadamente el 50 % de las generadas).^{20,29} Al mismo tiempo, la señalización a través del pre-BCR induce la proliferación de estas células B y reordenamiento de los genes de la cadena ligera de las Ig (IGL).³⁰

Tras conseguir un reordenamiento productivo de los genes de las cadenas de Ig (*loci* IGH e IGL), se puede detectar expresión de IgM completa en la superficie celular (sIgM), en el compartimento de células B inmaduras/transicionales.¹² Estas células B inmaduras presentan fenotipo similar al linfocito B *naïve* maduro, con expresión fuerte de CD20 y CD45, pero se diferencian de ellos en que conservan expresión débil de CD10 y reactividad fuerte para CD38 (FIGURA 1).¹² Además expresa niveles más elevados de sIgD³¹⁻³⁴ y CD21,³³ con positividad homogénea para CD5.

El proceso de selección negativa se da en la fase de linfocito B inmaduro, donde se eliminan las células que presentan un BCR auto-reactivo.^{35,36} Antes de su eliminación, algunas células que reconocen antígenos propios en MO tienen una segunda oportunidad para reordenar su *loci* IGL y reeditar su BCR. Sólo en caso de no ser capaces de producir un BCR no auto-reactivo, entrarán en apoptosis o bien quedarán en un estado de incapacitación funcional o anergia, en función de la afinidad por dichos auto-antígenos.²⁰ Tras este proceso de selección, las células B inmaduras que sobreviven se convierten en linfocitos B *naïve* maduros que pierden expresión de CD10, CD38 y CD5,¹² abandonan la MO hacia la SP y circulan a través de los vasos sanguíneos. Las células B *naïve* maduras que co-expresan IgM+IgD+, y que son completamente funcionales, se producen en MO y no son dependientes del bazo para su maduración.

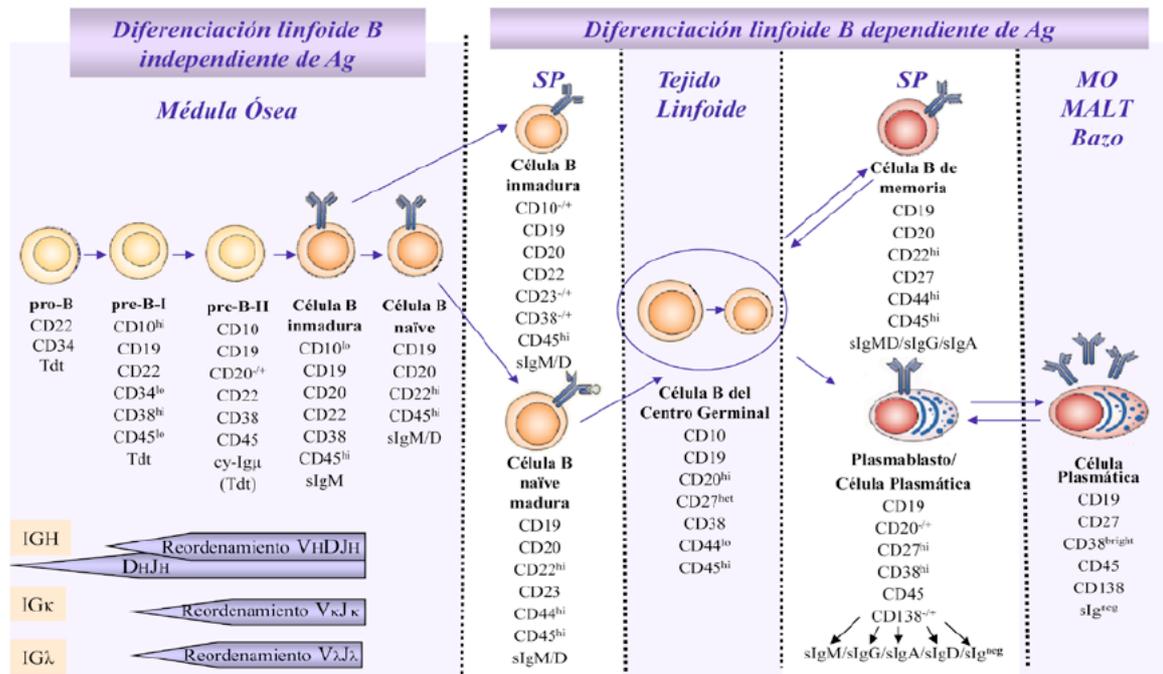


FIGURA 1. Maduración linfocítica B: características inmunofenotípicas de los diferentes estadios de maduración de la célula B de humanos en la MO, SP y órganos linfoides secundarios.

Las barras horizontales representan las fases de la diferenciación B en las que se produce reordenamiento de las cadenas pesadas (IGH) y ligeras (κ y λ) de las Ig durante el proceso de maduración.

(Adaptada de Pérez-Andrés et al.³⁷ y van Zelm et al.¹⁰)

1.2.2. Maduración linfocítica B dependiente de antígeno

Las células B *naíve* CD27-CD20+CD19+CD38- que salen de MO circulan a través de la SP, y entran en la zona T del GL a través de las venas endoteliales,^{18,19} donde si no se exponen a Ag, lo abandonan a través de las venas linfáticas y recirculan entre SP y GL, muriendo a los pocos días. Si estas células B *naíve* reconocen su Ag, presentado por las células dendríticas foliculares (CDF), entran en contacto con células T específicas de Ag, se activan y migran al centro germinal (CG),^{12,19} donde las células B están en continuo flujo entre la zona oscura (rica en centroblastos) y la zona clara (rica en centrocitos). En la zona oscura, las células proliferan de forma intensa y rápida y en ella se dan los procesos de hipermutación somática (HMS) de IgV y el cambio de isotipo de IgH. En la zona clara la célula B se reencuentra con el Ag, aumentando la supervivencia y la proliferación de clones de células B con elevada afinidad del BCR por el Ag inductor de respuesta B.^{12,19}

Podemos diferenciar los linfocitos B del CG de otras células B del GL (linfocitos B *naíve* y de memoria, plasmablastos...) por la expresión de un patrón diferente de proteínas.^{19,38-40} Los linfocitos B del CG expresan niveles más altos de CD10, CD38, CD95 y HLA-DR y menor reactividad para CD44 y cybc12, junto a una positividad heterogénea para marcadores relacionados con la maduración del compartimento de células B efectoras/memoria, como CD27.^{19,38-40} Se ha sugerido que los

centroblastos expresan CXCR4 y CD77⁴⁰ de forma más intensa que los centrocitocitos, aunque no se ha llegado a un consenso sobre cuales son las diferencias fenotípicas exactas entre estas dos subpoblaciones de linfocitos B del CG.¹⁹ En la actualidad se cree que los centroblastos CXCR4+ que contactan con CDF de la zona oscura expresan niveles elevados de CXCL12 en ausencia de CXCL13; la internalización de CXCR4+ por los centroblastos induce la expresión de CXCR5, que atraería a estas células a la zona clara, donde las CDF producen niveles elevados del ligando de este receptor (CXCL13) y muestran de nuevo el Ag a la célula B.^{19,41} La nueva interacción entre célula B y CDF en la zona clara es muy breve, pero permite captación y presentación del Ag por la célula B a la célula T folicular, perpetuando las señales de supervivencia que requiere el linfocito B activado.⁴¹⁻⁴³

Durante la diferenciación del linfocito B *naïve* a célula B de memoria, los linfocitos adquieren gran afinidad de unión al Ag¹⁸ a la vez que cambian los patrones de expresión de múltiples receptores de superficie e intracelulares, que aumentan su sensibilidad a la estimulación antigénica.⁴⁴ La sobreexpresión de factores como el factor regulador de interferón 4 (*irf-4*), la proteína de maduración inducida por linfocito B (*Blimp-1*)^{45,46} y la proteína 1 de unión de segmentos X (*Xbp-1*), que reprimen a los factores de transcripción *Pax-5*, *bcl6*, y factor de transcripción asociado a microftalmina (*mitf*), promueven esta diferenciación. Se inhiben así los procesos futuros de HMS y de cambio del isotipo de la cadena pesada de la Ig, estimulando la secreción de anticuerpos junto a cambios en el patrón de expresión de proteínas de la superficie celular y en las propiedades de «*homing*» de la célula B.^{3,31}

Las células B *naïve* constituyen el 60-70 % de las células B circulantes en SP, carecen de mutaciones somáticas en la región IgV y co-expresan simultáneamente IgM e IgD.⁴⁷ Las células B de memoria, que constituyen un 20-30 % de las células B en SP, han sufrido HMS y muestran una región IgV mutada; además la mitad de estas células han sufrido el cambio de isotipo de IgH,⁴⁷ reflejado por la expresión de sIgA y sIgG en el 23 % +/-10 % y 21 % +/-9 % de las células B de memoria circulantes del adulto, respectivamente.³⁷ La otra mitad de las células de memoria co-expresan sIgM y sIgD (52 % +/-15 % de las células de memoria). Se ha descrito que estas subpoblaciones de linfocitos B son CD18+, CD19+, FMC7+, CD21+, CD37+, CD40+, CD44+, CD53+, cyCD79a+, CD79b+ y CD81+, con expresión fuerte de CD20, CD22 y CD45 (en membrana), y de cybcl2 (en citoplasma),⁴⁸⁻⁵² y con negatividad para CD103 y CD10.^{49,50,53,54} Otros antígenos como CD5, CD11c, CD23, CD24, CD25, CD27, CD38, CD43, CD62L, CD80 y CD148 se expresan de forma variable en las distintas subpoblaciones de linfocitos B.^{7,55-57}

Se ha sugerido la existencia de células B de memoria sIgG+ (20 % de las células B sIgG+) y sIgA+ (10 % de las células B sIgA+) que no expresan CD27 en SP de

individuos sanos,^{37,58} y se desconoce su origen y relación con las subpoblaciones de células B de memoria CD27+.⁵⁸ No se ha demostrado hasta ahora la existencia de células B de memoria sIgE+, y se ha sugerido que las células plasmáticas secretoras de IgE se generan directamente a partir de células B de memoria IgG1,⁵⁹ aunque sigue siendo motivo de controversia.⁶⁰

Aunque la mayoría de linfocitos B circulantes en SP expresan niveles elevados de CD21, existe una pequeña proporción de células B *naïve* y de memoria con niveles bajos de CD21 y que muestra características fenotípicas diferentes a su contrapartida CD21+,⁶¹ como son la expresión de CD11c+ y CD95+ en ausencia de CD23(-) o que bien pueden ser CD11c- y CD95- con expresión variable de CD23(-/+). En la actualidad seguimos sin conocer en profundidad las funciones biológicas de esta subpoblación B, que se ha observado que aumenta en inmunodeficiencias primarias y secundarias.

La maduración a célula plasmática (CP) se produce fuera de la MO en órganos linfoides secundarios, y una vez madura, recircula entre los distintos tejidos. En nichos específicos de la MO, además de los precursores de células B (células pro-B y pre-B), los linfocitos B inmaduros y las células B *naïve*, también residen las CP, que mantienen su supervivencia y la producción de anticuerpos.^{26-30,35,36,62} El compartimento medular de CP, que está relacionado con la recirculación linfoide desde los GL y otros órganos linfoides secundarios, a la MO a través de la SP, presenta unas características fenotípicas bien definidas.

Las CP de MO presentan elevada expresión de CD38 y positividad para CD138 y Cylg (de tipo IgG o IgA y en menor proporción IgM), y normalmente ausencia de expresión de la mayoría de los antígenos asociados a línea B (CD5-, CD20-/FMC7-, CD22-, CD23-, CD24-, CD25-, CD79b-) excepto CD19, CD21, CD27 y cyCD79a.⁶³⁻⁶⁵ Expresan la proteína clave para la diferenciación de los linfocitos B a CP productora de anticuerpos Blimp-1.^{45,46} En citoplasma, la mayoría de las células plasmáticas expresan de forma fuerte cybc12,⁶⁶ y una proporción variable puede expresar débilmente en la membrana marcadores asociados a otras líneas hematopoyéticas, como CD13, CD28, CD33 y CD56.^{63,64,67,68}

En SP también existe una pequeña población de CP que representa un 1-3 % (1-5 céls/mcL) de todas las células B de SP en adultos sanos.^{34,69,70} Se piensa que la mayoría de estas células son plasmablastos recién generados que salen a la sangre desde tejidos linfoides secundarios, dirigiéndose a un nicho de MO, MALT o a tejidos inflamados.

En condiciones de activación inmune también es posible detectar en SP células plasmáticas maduras que han abandonado la MO y/o mucosas.^{69,70} Se han identificado algunas diferencias inmunofenotípicas entre CP de los nichos de MO y

las circulantes en SP; estas últimas tienen CD38 en niveles ligeramente más bajos que las CP de MO, y expresan de forma heterogénea CD20 y CD138, de forma débil pero homogénea CD19 y CD45, y carecen de CD56.^{34,69-71} Además, las CP de MO son slg negativas, mientras que más del 75 % de las plasmáticas circulantes expresan slg débil.³⁴

La información que tenemos actualmente sobre las características inmunofenotípicas de los linfocitos B de tejido linfoide normal o reactivo es limitada, aunque se conoce que en el CG los linfocitos B son habitualmente CD5- y CD23-, muestran expresión débil de slg y cybcl2, junto a una fuerte reactividad para CD10, CD20 y CD38. Estas células B tienen también un fenotipo de memoria CD27+ y una elevada tasa proliferativa, demostrada por la expresión intensa de bcl6 y Ki67.^{72,73} Las células de la zona del manto del tejido ganglionar normal o reactivo son slgM+/slgD+, expresan cybcl2 de forma intensa y tiene positividad variable para los antígenos CD5, CD10, CD23 y CD27, junto a una menor expresión de CD20 y CD38 y negatividad para Ki67 (fenotipo característico de linfocitos B vírgenes/ *naïve* en reposo).⁷⁴

La heterogeneidad de fenotipo de estas células se debe a la coexistencia de diferentes subpoblaciones de células B. Una pequeña proporción de linfocitos B, células B *naïve* foliculares, expresa niveles elevados de slgD y CD23, baja expresión de IgM y niveles intermedios de CD21. La subpoblación mayoritaria corresponde a células de zona marginal y presenta niveles elevados de CD21 y CD1d, con slgD elevado, baja expresión de slgM y negatividad para CD23.⁷⁵ La maduración de estas células tras reconocimiento antigénico T-dependiente, supone la formación del CG y el paso de célula B *naïve* folicular a célula efectora.⁷⁶

El microambiente medular del CG es complejo, formado por centroblastos, centrocitocitos, CDF y linfocitos T⁷⁶ y su finalidad es generar respuestas humorales de alta afinidad por el antígeno (FIGURA 1). Los cambios fenotípicos que tienen lugar en el CG se asocian con aumento de afinidad del BCR por el antígeno, debido al proceso de HMS que afecta a los genes de las Ig y por otro lado, con el cambio de isotipo de Ig por recombinación somática de la región constante del gen IGH.⁷⁶ Posteriormente, algunas de las células de memoria y plasmocitos de vida larga, permanecen en las zonas B de los órganos linfoides secundarios, mientras que otras células recirculan o migran a la MO, como se ha descrito anteriormente.^{76,77}

Las células plasmáticas del GL se diferencian ligeramente de las medulares, con expresión variable de cybcl2 (que va de intensidad débil a fuerte),⁶⁶ junto a una mayor proporción de células cyIgM+⁶⁶ y menor reactividad para CD138.

1.3. Maduración T y NK

Los linfocitos T se originan a partir de precursores hematopoyéticos de la MO, que se liberan en oleadas al torrente sanguíneo y entran de forma periódica al timo, que es el órgano encargado de su desarrollo y diferenciación.⁷⁸ Dentro de las moléculas responsables de la diferenciación T encontramos factores de transcripción, citoquinas, quimiocinas, selectinas, entre las que Notch-1 se describe como un factor esencial.⁷⁹ La unidad funcional del timo es el lobulillo tímico, constituido por tres compartimentos (zona sub-capsular, cortical y medular). A partir de los pro-timocitos se generan linfocitos T portadores del complejo CD-TCR de membrana.⁸⁰

Al timo llegan precursores inmaduros CD34+ CD7++ Tdt+ CD44+ CD117+.^{13,81} Se cree que tanto CD44 como CD7 podrían ser moléculas asociadas al tropismo por el timo de los precursores CD34+.⁸⁰ CD44 intervendría en la salida de la célula del interior del capilar sanguíneo y CD7 estaría implicada en el tropismo por la zona subcapsular.⁸⁰ Al entrar en el timo, el precursor T queda retenido en la zona subcapsular y entra en contacto con las células epiteliales tímicas, con las que interactúa, entre otros, a través de la unión de la molécula CD2 (timocito) y la CD58 (célula epitelial). Se induce así la secreción de citocinas y hormonas tímicas y la activación, proliferación y diferenciación de timocitos. En este estadio, el timocito subcapsular deja de expresar CD44 y HLA-DR y adquiere reactividad para otros antígenos pan-T como CD5 y CD2 de membrana, y positividad citoplasmática para CD3. La activación de este timocito inmaduro se asocia a la expresión de receptores de citocinas como CD25 y de moléculas de activación como CD71^{82,83} (FIGURA 2). Se da en este momento el reordenamiento de los genes del TCR, de forma similar a lo que ocurre en las células B, siendo éste el hecho central de la diferenciación tímica.

Tras expresar una forma primitiva del receptor, los timocitos adquieren reactividad para CD4 y a continuación co-expresan CD4 y CD8, junto a CD1a y pierden reactividad para Tdt, CD34 y CD117; esta población celular representa alrededor del 80 % de la celularidad del timo⁸⁴ (FIGURA 2). La diferenciación posterior a timocito maduro se asocia a la pérdida de expresión de CD1a, junto a CD4 (timocitos CD8+CD4-) o CD8 (timocitos CD4+CD8-).⁸⁴ En este momento se observa claramente expresión de CD3 y TCR $\alpha\beta$ en la membrana citoplasmática. Los linfocitos T CD3+ TCR $\gamma\delta$ + abandonan de forma precoz el timo, son siempre negativos para CD4, y carecen o expresan débilmente CD8. (FIGURA 2)

Los linfocitos T *naïve* inicialmente son CD45RA+, CCR7+, CD28+, CD62L+, CD27- y CD45RO-,^{85,86} fenotipo que permite distinguirlos de las células T de memoria central (CD45RA-, CCR7+, CD45RO+, CD27+)^{85,86} como de los linfocitos T de memoria periférica (CD45RA-, CCR7-, CD45RO+, CD27-/+) ^{85,86} (FIGURA 2). Los

linfocitos T efectores, generalmente tienen un fenotipo CD45RA+, CD45RO- o +débil, CCR7-, CD28-, CD27- y CD62L-.^{85,86} (FIGURA 2)

La activación de linfocitos T *naïve* o de memoria se asocia con cambios fenotípicos similares a los de las células NK activadas, como incremento de expresión de CD2, CD11a y en células T CD8+, también de CD11c;^{87,88} aumento transitorio de la positividad para CD69, CD25, HLA-DR, CD38, CD57 y CD45RO^{87,88} y disminución de la reactividad de CD7.^{87,88}

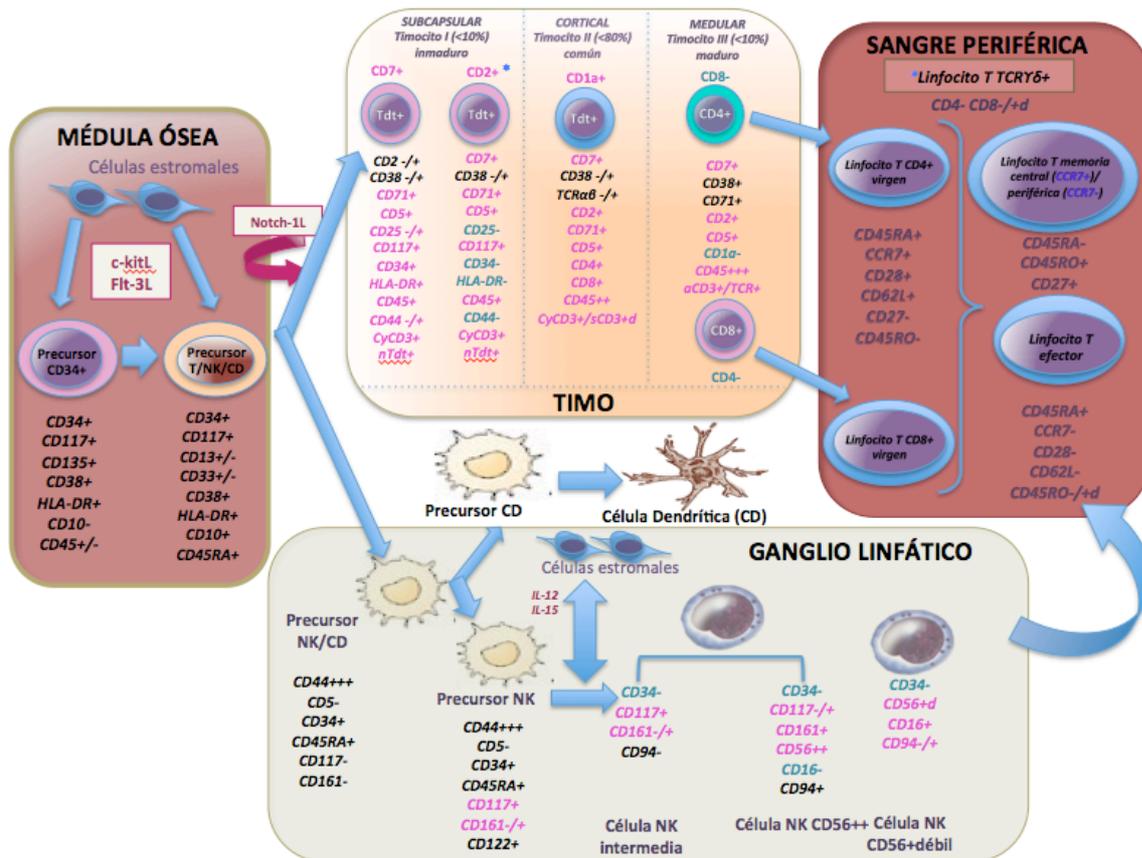


FIGURA 2. Esquema de maduración de precusores T y NK: secuencia de cambios de la expresión de diferentes antígenos (cy: citoplasmático; +d: positivo de intensidad débil; CD: célula dendrítica; NK: «natural killer». (Adaptada de Tesis Doctoral de S. Barrena Delfa Figura 2 pag17).

En SP, además de las poblaciones T mayoritarias ($\text{TCR}\alpha\beta+\text{CD4}+\text{CD8}-$, $\text{TCR}\alpha\beta+\text{CD4}-\text{CD8}+$ y $\text{TCR}\gamma\delta+$), existen otras subpoblaciones minoritarias como los linfocitos T maduros $\text{TCR}\alpha\beta+$ y $\text{CD5}-$,¹³ $\text{CD4}-/\text{CD8}-$ ⁸⁹ o $\text{CD2}-$.^{13,90} Además, también se detecta una subpoblación de células T $\text{TCR}\alpha\beta+\text{CD4}+\text{CD8}-/+^{\text{débil}}$ con fenotipo citotóxico efector con expresión de granzima y perforina en citoplasma.^{91,92} Desde el punto de vista funcional, estas células T $\text{TCR}\alpha\beta+\text{CD4}+\text{CD8}-/+^{\text{débil}}$ aumentan en número en respuesta a virus capaces de inhibir la presentación antigénica a través de moléculas HLA clase-I, como citomegalovirus (CMV).⁹³

El proceso de maduración de las células NK a partir de precursores hematopoyéticos $\text{CD34}+$ no se conoce en profundidad. Se plantea como posibilidad, que su maduración no tiene lugar de forma completa en MO, dado que existe una población de células NK con intensa expresión de CD56 ($\text{NK}-\text{CD56}++$) que se ha aislado en GL, amígdala y otros tejidos; y que son más abundantes en los tejidos linfoides secundarios que las células $\text{NK56}+^{\text{débil}}$, que están en mayor proporción en MO, SP y bazo.^{94,95} Se ha observado que las células NK $\text{CD56}++$ son más inmaduras que las células $\text{NK CD56}+^{\text{débil}}$ ⁹⁶ y que su activación aumenta la expresión de los receptores característicos de la población $\text{CD56}+^{\text{débil}}$.⁹⁷ Se ha identificado en tejidos linfoides secundarios la presencia de una población de células precursoras NK $\text{CD34}+$ y $\text{CD45RA}+$, presentes también en baja frecuencia en el compartimento de precursores CD34 en MO (<1 %) y SP (<10 %).⁹⁸ Se ha sugerido que la maduración de las células NK «*in vivo*» se produciría en los órganos linfoides secundarios, dada la existencia de abundantes células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno con expresión de IL-15 ,⁹⁹ citocina necesaria para la maduración de células NK,¹⁰⁰ en estos órganos.

Un modelo hipotético de maduración de células NK a partir de células $\text{CD34}+$ ^{14,15,101,102} plantea que las células NK más inmaduras expresarían CD7 y CD161 . Al madurar irían adquiriendo de forma secuencial expresión de CD56 , CD94 y por último CD16 , presentando así las células NK circulantes fenotipo $\text{CD56}+^{\text{débil}}$ y/o $\text{CD16}+$, $\text{CD3}-$, $\text{CD7}+$, $\text{CD94}-/+$, $\text{CD161}+$, $\text{cy-granzima}+$, $\text{cy-perforina}+$,¹⁰³ $\text{CD11b}+$ y $\text{CD22}+$.¹⁰²

Hay que tener en cuenta que las células NK maduras de SP no son homogéneas en cuanto a su fenotipo y presentan reactividad variable para los antígenos CD16 , CD56 , CD2 , CD94 , CD11c y CD57 , entre otros.¹⁰³ Esta diversidad se puede explicar en parte por la existencia de diferentes subpoblaciones de células NK, como las $\text{CD56}++\text{CD16}-$ o $+^{\text{débil}}$ y las $\text{CD56}+^{\text{débil}}\text{CD16}+$.¹⁰³ Algunos autores⁹⁶ han descrito una tercera población de NK agranulares con fenotipo $\text{CD56}-\text{CD16}+$, con escasa representación en adultos y que podría corresponder a células NK más inmaduras.⁹⁶

Cuando las células NK se activan, al reconocer la célula diana, experimentan cambios de fenotipo, como incremento de expresión de CD2, CD94 y CD11c, con un aumento transitorio de la positividad de HLA-DR, CD57 y CD45RO, junto a disminución de la reactividad para CD7, CD38 y CD11b entre otros marcadores.^{87,103-105}

2. Diagnóstico, clasificación y estadificación de los LNH

Para establecer el diagnóstico de certeza en LNH se precisa la obtención de una biopsia tisular, por lo general de GL. Sin embargo, los avances actuales de las técnicas consideradas complementarias al diagnóstico histopatológico, como el caso de la CMF multiparamétrica, permiten poder establecer un diagnóstico de certeza a partir del análisis de muestras de SP en LNH leucemizado o de punción aspiración con aguja fina (PAAF)¹⁰⁶ en casos de comportamiento más ganglionar, aunque por el momento este tipo de información no se incluye en las revisiones de consenso, siendo imprescindible para la tipificación histológica del linfoma la realización de un estudio histológico.

Una vez que se establece el diagnóstico de LNH, es necesario realizar un estudio de extensión de la enfermedad para poder hacer una estimación pronóstica y adecuar al máximo el tratamiento del paciente.

En el caso de que el SLPC se presente como leucémico (más expresión periférica que ganglionar) y poco sintomático, si se dispone de un análisis inmunofenotípico adecuado en SP, se puede valorar no realizar estudios de extensión en aquellos pacientes en los que no sea necesario iniciar tratamiento.

El estudio diagnóstico en un paciente con LNH, incluye:

- Anamnesis detallada y exploración física.
- Hemograma completo y estudio bioquímico completo (glucemia, albúmina, creatinina, ionograma, calcio, ácido úrico, aspartato aminotransferasa (ASAT), alanina aminotransferasa (ALAT), bilirrubina, proteinograma e inmunoglobulinas, LDH y β 2-microglobulina) y perfil básico de coagulación.
- Examen básico de orina.
- Serologías virales (VIH, VHB y VHC).
- Electrocardiograma.
- Radiografía simple de tórax.
- Tomografía computerizada (TC) tóraco-abdomino-pélvica.
- Tomografía por emisión de positrones (PET) corporal si procede o gammagrafía con Galio-67 (Ga-67).
- Biopsia de médula ósea (BO).
- Punción lumbar con análisis de líquido céfalo-raquídeo (LCR) en casos especiales [Linfoma de Burkitt (LB), Linfoma de células del manto (LCM) de alto riesgo, y cualquier otro si hay afectación de senos o testes]. En caso de afectación de área ORL requerirá también TC cervical y punción lumbar.

- Biopsia de otros tejidos si existe sospecha de infiltración linfomatosa (como el estudio endoscópico con toma de biopsia gástrica en el caso de linfoma MALT o LCM).

En función de los resultados de estas pruebas estableceremos el estadio de extensión del linfoma según la valoración clásica de Ann Arbor:

- Estadio I: Afección de un solo territorio ganglionar o de una sola localización extra-linfoide (IE).
- Estadio II: Afección de dos o más territorios ganglionares o estructuras linfoides en el mismo lado del diafragma.
- Estadio III: Afección de territorios ganglionares o estructuras linfoides a ambos lados del diafragma.
- Estadio IV: Afección diseminada de una o más localizaciones extra-linfáticas, con o sin afectación ganglionar.

Además: si existe afectación extra-ganglionar se añade sufijo «E» si la extensión es por contigüidad; si se trata de afectación a distancia debe considerarse estadio IV.

Si no existe sintomatología general (pérdida de peso ≥ 10 % durante los seis meses previos no explicada por otros motivos, fiebre $>38^{\circ}\text{C}$ persistente o remitente durante un mes antes del diagnóstico, sudación nocturna profusa durante el mes anterior) se añade el sufijo «A», en el caso contrario, si hay síntomas generales (uno o varios) se añade el sufijo «B». En caso de presentar enfermedad voluminosa, es decir masa de $\geq 1/3$ de la anchura mediastínica o masa adenopática de ≥ 10 cm de diámetro, hablamos de presencia de masa bulky.

Como hemos visto en la clasificación de Ann Arbor, la infiltración de la MO, clásicamente establecida por BO, determina un estadio IV independientemente de las áreas ganglionares afectas.

Para la clasificación pronóstica del LNH disponemos del «Índice pronóstico internacional» (IPI) elaborado inicialmente para los linfomas agresivos, pero que se ha utilizado para otros tipos de linfoma.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ Como variables a considerar están: edad (favorable <60 años, desfavorable ≥ 60 años), estado general (ambulatorio vs no ambulatorio), estadio (favorable I-II vs desfavorable III-IV), afectación extra-ganglionar (favorable <2 vs desfavorable ≥ 2), LDH sérica (favorable normal vs desfavorable elevada). En función de estos factores se establecen varios grupos de riesgo: riesgo bajo (0 o 1 factor desfavorable); riesgo intermedio bajo (2 factores desfavorables), riesgo intermedio alto (3 factores desfavorables), riesgo alto (4 o 5 factores desfavorables). Dada la heterogeneidad

de los LNH una herramienta pronóstica de este tipo es fundamental para optimizar el tratamiento de los pacientes. El IPI ha sido el primer modelo pronóstico usado en el manejo de pacientes con LNH desde 1993, sin embargo, la introducción de la inmunoterapia [uso de Rituximab (R)] requería validar este índice pronóstico, surgiendo así el R-IPI:¹¹¹ los pacientes sin factores de riesgo se consideran como de muy buen pronóstico con un 90 % de supervivencia libre de progresión (SvLP); los pacientes con 1 o 2 factores de riesgo entran en el grupo de buen pronóstico con un 80 % de SvLP y pacientes con 3, 4 o 5 factores de riesgo entran dentro del grupo de mal pronóstico con una SvLP del 50 %.

En el linfoma folicular (LF) se aplica el índice pronóstico FLIPI,¹⁰⁸ y en el LCM el MIPI.¹¹⁰ En el caso de los LNH-T existen varios índices pronóstico: IPI, PIT, IPTCLT y mPIT.^{112,113}

El tratamiento a aplicar es extremadamente variable, dependiendo del subtipo histológico y de los factores de riesgo establecidos al diagnóstico, pero dado que no es objeto de nuestro estudio, no se tratará en esta introducción.

A continuación se muestra en la TABLA 1 la clasificación vigente de LNH según la OMS-2008,¹ en la que profundizaremos más adelante.

Tabla 1. Clasificación OMS 2008 de las Neoplasias Linfoides

Clasificación de neoplasias de células B maduras
<ul style="list-style-type: none"> • Leucemia linfática crónica/ Linfomalinfocítico de célula pequeña • Leucemia de prolinfocítica de células B • Linfoma esplénico de zona marginal • Leucemia de células peludas (Tricoleucemia) • Leucemia/Linfoma esplénico no clasificable* <ul style="list-style-type: none"> ○ Linfoma B esplénico de célula pequeña de la pulpa roja* ○ Leucemia de células peludas variante • Linfoma linfoplasmocítico <ul style="list-style-type: none"> ○ Macroglobulinemia de Waldenström • Enfermedad de cadenas pesadas <ul style="list-style-type: none"> ○ Enfermedad de cadenas pesadas α ○ Enfermedad de cadenas pesadas γ ○ Enfermedad de cadenas pesadas μ • Mieloma de células plasmáticas • Plasmocitoma solitario del hueso • Plasmocitoma extraóseo • Linfoma de células B de zona marginal extranodal de tejido linfoide asociado a mucosas (linfoma MALT) • Linfoma de célula B de zona marginal nodal <ul style="list-style-type: none"> ○ Linfoma de zona margina pediátrico* • Linfoma de centro folicular cutáneo primario • Linfoma folicular <ul style="list-style-type: none"> ○ Linfoma folicular pediátrico* • Linfoma de células del manto • Linfoma B difuso de célula grande, NOS <ul style="list-style-type: none"> ○ Linfoma difuso B de célula grande rico en células T /histiocitos ○ DLBCL del anciano EBV+* ○ DLBCL primario cutáneo de la pierna ○ DLBCL primario del sistema nervioso central • DLBCL asociado a inflamación crónica • Granulomatosis linfomatoide • Linfoma de célula grande B primario mediastínico (tímico) • Linfoma B de célula grande intravascular • DLBCL ALK positivo • Linfoma plasmablástico • Linfoma de célula grande asociado a enfermedad de Castleman multicéntrica HHV8 • Linfoma primario de derrame • Linfoma de Burkitt • Linfoma de célula B no clasificable con características intermedias entre difuso de célula grande y linfoma de Burkitt • Linfoma de célula B no clasificable con características intermedias entre difuso de célula grande y linfoma de Hodgkin clásico.
Neoplasia madura de células T/NK
<ul style="list-style-type: none"> • Leucemia prolinfocítica de células T • Leucemia linfocítica de células T grandes granulares • Síndrome linfoproliferativo crónico de células NK* • Leucemia agresiva de células NK • Síndrome linfoproliferativo de células T EBV+ de la infancia (asociado a infección crónica por EBV) • Linfoma hydroa vacciniforme-like • Leucemia /linfoma de células T del adulto • Linfoma de células T/NK extranodal nasal • Enteropatía asociada a linfoma de células T • Linfoma de células T hepatoesplénico • Linfoma de células T subcutáneo paniculitis –like • Micosis fungoide • Síndrome de Sèzary • Síndromes linfoproliferativos cutáneos primarios de célula T CD30+ <ul style="list-style-type: none"> ○ Papulosis linfomatoide ○ Linfoma de célula grande anaplásico cutáneo primario • Linfoma primario cutáneo de células T $\gamma\delta$ • Linfoma de células T citotóxicas CD8 positivas agresivo epidermotrópico primario cutáneo* • Linfoma de células T pequeñas/medianas CD4 positivas primario cutáneo* • Linfoma de células T periféricas NOS • Linfoma de células T angioinmunoblástico • Linfoma de célula grande anaplásico (ALCL) ALK positivo • Linfoma de célula grande anaplásico (ALCL) ALK negativo*

NOS: *not otherwise specified*; ALK: *anaplastic lymphoma kinase*; HHV8: *human herpesvirus 8*; NK: *natural killer*.

*Estos tipos histológicos son entidades provisionales para las que la OMS consideró que no tenían evidencia suficiente para ser reconocidas como enfermedades distintas en ese momento.

3. Determinación de clonalidad linfoide mediante CMF en síndromes linfoproliferativos

A lo largo de las últimas décadas se han ido introduciendo nuevas herramientas de apoyo de gran utilidad para el diagnóstico hematológico, como los recuentos de poblaciones celulares con contadores automáticos y técnicas diagnósticas mínimamente invasivas, como la PAAF del tejido con sospecha de infiltración tumoral.¹¹⁴⁻¹¹⁹

También se ha avanzado de forma significativa en la caracterización fenotípica, citogenética y molecular de las neoplasias hematológicas,^{1,41} aportando una herramienta clave en el diagnóstico hematológico, que permite detectar anomalías cuantitativas y cualitativas de las diferentes poblaciones de SP y tejidos linfoides asociadas a hemopatías clonales.¹²⁰

A partir de finales de los años 80, la información fenotípica y genética se ha ido introduciendo progresivamente y de forma masiva al diagnóstico de estas neoplasias, incorporándose a las nuevas clasificaciones de consenso de hemopatías malignas.^{1,121} En la clasificación más aceptada en la actualidad de hemopatías, la clasificación OMS,¹ la definición de la mayoría de las entidades incluidas dentro de cada subgrupo de neoplasias hematológicas, va dirigida a la definición de entidades clínico-biológicas, y tiene en cuenta de forma simultánea criterios cito-morfológicos, histopatológicos, inmunofenotípicos y genético-moleculares junto al comportamiento clínico de la enfermedad. Así, estas técnicas han pasado a ser empleadas en muchos casos en la rutina diagnóstica, incorporándose a las pruebas establecidas para el diagnóstico inicial y la monitorización de enfermedad residual en diversas hemopatías.¹²²⁻¹²⁶

Las técnicas de inmunofenotipado han evolucionado de una forma notable en las últimas décadas, para lo que ha sido clave el empleo de marcajes múltiples mediante CMF. Se ha podido demostrar que las técnicas de inmunofenotipo mediante CMF proporcionan un recuento fiable, altamente específico, sensible y reproducible de las distintas subpoblaciones celulares presentes en una muestra biológica, siempre que esté constituida por suspensiones unicelulares.¹²³ Así, suponen un complemento muy útil a la información que proporcionan los contadores hematológicos y la citología convencional, ya que permiten identificar en muchos casos, dentro de un compartimento celular concreto, células neoplásicas y distinguirlas de las células normales, cuando ambas coexisten en una determinada muestra.¹²⁷⁻¹²⁹

En los últimos años la CMF multiparamétrica ha demostrado ser de gran utilidad en la identificación y caracterización de SLPC, y se ha utilizado en el estudio de SP, MO y GL,^{106,130} además de en otros líquidos biológicos, como el

LCR.¹³¹ También ha demostrado ser de gran utilidad en otras enfermedades como la leucemia linfoblástica aguda (LLA)¹³² y la leucemia aguda mieloblástica (LAM),^{124,133,134} la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)¹³⁵ y más recientemente, los síndromes mielodisplásicos (SMD)¹³⁶ y algunos subtipos concretos de enfermedades mieloproliferativas, como las mastocitosis sistémicas (MS).^{137,138}

3.1. Clonalidad B

La CMF multiparamétrica se ha convertido en uno más de los métodos de diagnóstico de SLPC-B, pero inicialmente sólo se realizaba una vez que el diagnóstico de la hemopatía ya se había establecido mediante estudio morfológico y/o histopatológico.^{1,122} Por lo general es en SP, MO y/u órganos linfoides secundarios donde se detectan poblaciones de células B patológicas. La infiltración de otros tejidos, como sistema nervioso central (SNC), piel o mucosas es menos frecuente.¹ Dentro de los principales objetivos del estudio inmunofenotípico por CMF multiparamétrica está la de descartar si esa población de células B detectada es clonal o no.^{139,140}

Durante muchos años el estudio de clonalidad B por CMF se fundamentaba casi exclusivamente en detectar un exceso de células B con expresión restringida, en membrana o citoplasma, de una de las cadenas ligeras de Ig kappa (Igκ+) o lambda (Igλ+).^{130,141} En este sentido las técnicas de BM que permiten detectar los reordenamientos clonales de los diferentes genes que codifican las moléculas de Ig, siguen siendo hoy el método de elección para detectar que la población linfoides de estudio es clonal o reactiva.¹⁴²⁻¹⁴⁵ Sin embargo, en la actualidad, gracias a los avances recientes en el conocimiento de las diferencias fenotípicas entre células B normales y neoplásicas, junto a la disponibilidad de un número creciente de fluorocromos y equipos capaces de medir de forma simultánea más de dos fluorescencias diferentes, se ha modificado la estrategia de identificación de clonalidad B, pasando a ser la CMF una técnica de gran importancia para el rastreo diagnóstico de clonalidad.^{125,146,147}

Entre estos avances, se encuentra la posibilidad de realizar un análisis rápido, simple y relativamente barato de muestras con sospecha diagnóstica de infiltración por SLPC-B, que permita la identificación de la línea celular y el estadio madurativo de la población de linfocitos neoplásicos, empleando marcajes múltiples de tres o cuatro fluorescencias en una sola medición.¹⁴⁷ La reciente ampliación a ocho fluorescencias permite identificar mejor estas subpoblaciones celulares, caracterizar con más exactitud su fenotipo y definir de forma más precisa fenotipos aberrantes adicionales, asociados a los SLPC-B más frecuentes. Ante la presencia de células clonales B en una determinada muestra, la identificación de fenotipos aberrantes presentes en casi la totalidad de los SLPC-B

es un signo inequívoco de clonalidad, sin requerir en este caso confirmación molecular. Además el empleo de estas técnicas permite alcanzar una mayor sensibilidad, que en la rutina diagnóstica se sitúa en 10^{-4} - 10^{-5} ,^{146,148} así como gran especificidad cuando se comparan con los procedimientos convencionales, y hay que tener en cuenta que los resultados se obtienen en un corto espacio de tiempo.¹⁴⁷

Actualmente, el uso de los análisis multiparamétricos por CMF se extiende también al estudio de enfermedad mínima residual (EMR), tanto en el contexto de evaluación del grado de infiltración de un tejido y del grado de extensión de un tumor en el momento del diagnóstico (p.ej.: infiltración de LCR en LNH agresivos o con sospecha de infiltración leptomeníngea),¹³¹ como para monitorizar los efectos del tratamiento en situaciones en las que la sensibilidad de las técnicas convencionales es insuficiente.^{146,148,149} En este sentido, se ha demostrado que en la leucemia linfática crónica (LLC), tricoleucemia (TL) y LCM,^{146,150,151} el análisis inmunofenotípico por CMF es una técnica muy sensible y específica para el diagnóstico de EMR, y con alto impacto clínico como en el caso de la LLC.¹⁴⁸

El estudio por CMF suele proporcionar también información adicional, útil para la caracterización diagnóstica de las células clonales, como datos de elevado tamaño y complejidad interna en el caso de los linfomas de célula grande (LBDCG) y la TL; la expresión débil de CD20 y sIg, y positividad para CD5 en la LLC; la ausencia/disminución de expresión de CD19 en células de pequeño tamaño en el LF y la expresión elevada de CD38 en el LB y el mieloma múltiple (MM).^{131,146} El hecho de que los SLPC-B más habituales muestren un fenotipo característico, que permite su identificación, hace que el análisis inmunofenotípico constituya en la actualidad un pilar básico en la caracterización diagnóstica de estas entidades,¹ junto a otras características clínicas, morfológicas, histopatológicas y genético/moleculares. En algunos casos permite incluso detectar la presencia de dos o más clones diferentes de células B (no relacionados) en un mismo paciente, hasta en un 5 % de todos los SLPC-B leucemizados,¹⁵² aunque la repercusión clínica de estos hallazgos aún no se ha establecido.

3.2. Clonalidad T

Al contrario que en el caso de los SLP-B, en los que la CMF puede identificar claramente la naturaleza clonal de una población B gracias a la confirmación de restricción de cadenas ligeras, en los SLP-T no se disponía hasta fechas recientes de marcadores que demostraran la presencia de una población clonal.

Se puede sospechar la presencia de una población clonal T al observar un desequilibrio porcentual entre las distintas subpoblaciones de células T y ante la presencia de fenotipos T poco habituales o aberrantes.^{129,153} Entre las aberraciones fenotípicas más frecuentemente encontradas están la ausencia o

pérdida de expresión de una o más moléculas pan-T, la sobre-expresión de un antígeno asociado a células T, los asincronismos madurativos (perfil fenotípico de co-expresión de dos o más marcadores ausentes en linfocitos T normales, como la expresión asincrónica de CD3 y TCR en la superficie celular), la co-expresión de CD4 y CD8 o la ausencia de expresión de ambos marcadores en una proporción elevada de linfocitos.

Sin embargo, estas alteraciones solo están presentes en el 60-70 % de los SLPC-T¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ y además, se han descrito en situaciones de reactividad de linfocitos T.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Las células T maduras, tanto normales como las neoplásicas, expresan en su mayoría las cadenas alfa (α) y beta (β) o gamma (γ) y delta (δ) del TCR (TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$, respectivamente). Así, para la confirmación de clonalidad T, en la actualidad existen dos aproximaciones metodológicas distintas para la caracterización del repertorio de estas cadenas del TCR, centradas en técnicas de BM, que tradicionalmente se ha empleado en el estudio de reordenamiento clonal en los genes que codifican las diferentes cadenas del TCR,¹⁶⁰ y CMF respectivamente.¹⁶¹⁻¹⁶⁵

En los últimos años están disponibles anticuerpos específicos dirigidos frente a gran parte de las distintas familias de las cadenas del TCR, especialmente de la cadena β , que pueden ser empleados en el estudio de clonalidad T mediante CMF multiparamétrica.

Al demostrar la existencia de una expansión preferencial de una familia de regiones variables de las cadenas α y/o β o γ y/o δ del TCR.¹⁶¹⁻¹⁶⁴ Esta aproximación resulta especialmente útil cuando no están disponibles de forma inmediata los resultados de técnicas moleculares, o en los casos en los que se detectan poblaciones minoritarias fenotípicamente anómalas, que pueden quedar por debajo del límite de sensibilidad de las técnicas moleculares convencionales. No obstante, la interpretación de los resultados de los estudios del repertorio T en sujetos con sospecha de SLPC-T exige un conocimiento detallado del repertorio T normal,¹⁶⁶ ya que hoy se conoce que este repertorio depende de una gran variedad de factores, entre los que se incluyen origen étnico, edad, tejido y subpoblación T objeto de estudio (p.ej.: linfocitos T CD4+ vs CD8+).^{167,168} En sujetos sanos podemos encontrar expansiones de una o más familias, especialmente en los linfocitos T efectoras de individuos de edad avanzada,^{157-159,169} o en sujetos que padecen algunas enfermedades de naturaleza infecciosa, tumoral o autoinmune en las que se pueden observar expansiones oligoclonales de células T.¹⁷⁰⁻¹⁷³ En estos casos, las expansiones no suelen superar el 40 % de las células T CD4+ y/o CD8+ de SP.

Con todo, el análisis del repertorio de las familias TCR en pacientes con sospecha de infiltración por SLPC-T resulta muy útil en el rastreo diagnóstico de

clonalidad T. Su utilidad aumenta cuando se combina con la identificación de fenotipos aberrantes para una mejor delimitación de la población tumoral sobre la que analizar el repertorio del TCR, y así se observa un uso restringido de una familia de la cadena β del TCR en más del 60 % de las células T.¹⁶³

3.3. Clonalidad NK

La demostración de clonalidad sigue resultando difícil en los casos en los que se observa un aumento de células NK en SP, excepto en determinados casos en los que se detectan alteraciones citogenéticas, se demuestra la integración clonal de secuencias genómicas de origen vírico o bien en mujeres, en las que se comprueba la existencia de un patrón clonal de inactivación del cromosoma X (HUMARA) sobre células NK previamente purificadas.^{174,175}

Desde el punto de vista fenotípico, se ha sugerido que algunos patrones de expresión de receptores de tipo Ig de las células NK (KIR) (en especial CD158a y CD158b) podrían ser marcadores útiles para la detección de clonalidad NK, y también el hecho de encontrar una expresión fuerte y homogénea de CD94 y HDR indica una alta probabilidad de que la población NK sea clonal.¹⁷⁶⁻¹⁸⁰

Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de estos estudios es limitada, en especial cuando la población clonal de células NK está presente sobre un fondo de células NK policlonales residuales.

4. Biopsia ósea

La MO es un tejido líquido que se encuentra en la cavidad central del hueso (medular). La fuente principal de sangre se la proporciona la arteria nutricia, que cruza el córtex óseo a través del canal nutricio hacia la cavidad medular, donde se divide en arterias ascendente y descendente. De aquí parten las arterias radiales, que entran al córtex a través del endostio, revistiendo la cavidad medular, donde se convierten en capilares corticales (FIGURA 3).¹⁷ La sangre de estos capilares puede mezclarse con la sangre de los capilares del periostio y del endostio. Los capilares corticales entran hacia los senos vasculares medulares, donde forman una densa red a través de la cavidad medular. Los senos confluyen en el seno central, por el que la sangre abandona la MO. Los senos vasculares medulares están recubiertos por células endoteliales y por células reticulares de adventicia. La hematopoyesis ocurre en los espacios extravasculares inter-sinusoidales, donde las células sanguíneas y sus precursores se encuentran empaquetados, en el seno de un complejo microambiente medular (FIGURA 3).¹⁷ Su organización espacial y la interacción con el microambiente medular de la MO, son importantes para entender los mecanismos reguladores de la hematopoyesis. Se asume la presencia de células adherentes, llamadas células estromales, que crean nichos medulares que mantienen la viabilidad y dan soporte a las células sanguíneas, siendo a su vez fuente de los factores necesarios para su desarrollo. Es difícil establecer las características específicas de las células estromales que identifiquen los nichos para las diferentes líneas celulares hematopoyéticas.

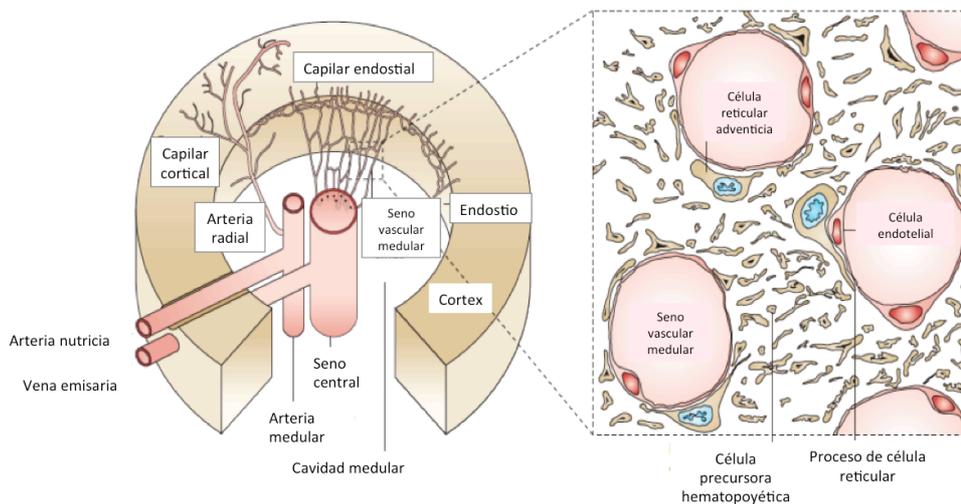


FIGURA 3. Esquema de la estructura de la MO¹⁷.

El aspirado de MO y la BO son los procedimientos más antiguos para el diagnóstico de hemopatías.

El primer intento de obtención de una muestra de MO con fines diagnósticos lo llevó a cabo Pianese en 1903.¹⁸¹ Realizó una punción en la parte más alta de la epífisis femoral y describió un caso de anemia infiltrativa por Leishmania.¹⁸²

Ghedini (1908)¹⁸³ sugirió la toma de muestra de la parte medial de la epífisis femoral, pero analizaba la sección tisular más que la muestra de aspirado medular, técnica que no consiguió aceptación. Morris y Falconer (1922)¹⁸⁴ introdujeron el método de la biopsia tibial usando una especie de trocar que les permitía obtener una muestra similar a las que extraemos en la actualidad.

Seyfarth (1922)¹⁸⁵ desarrolló una aguja de punción para obtener biopsias esternales a la altura de la 3ª y 4ª costilla. Con ella conseguía aspirados satisfactorios, preparaciones adecuadas y bloques de tejido para seccionar. Este procedimiento se realizaba sin anestesia adecuada pero con bata y guantes. En 1927, Anirkin extrajo una muestra de MO esternal usando una aguja de punción lumbar; publicó los resultados de 103 procedimientos en 1929.¹⁸⁶ No se describieron complicaciones y Anirkin sugería que el aspirado medular estimulaba la actividad de la médula. La técnica de Anirkin se usaba para enfermedades hematológicas y para estudios de tifus y tuberculosis.

Peabody (1927)¹⁸⁷ preparaba cuidadosamente secciones de curetaje tibial cuando describió la anemia perniciosa. Arjeff (1931)¹⁸⁸ introdujo agujas con guía y Grunke (1938)¹⁸⁹ seguía recomendando el aspirado con aguja corta de punción lumbar a nivel esternal con ayuda de una maza de madera. Custer y Ahlfeldt (1932)¹⁹⁰ publican su experiencia con biopsia esternal, demostrando el valor de secciones histológicas de tejido, improntas de biopsia y de extensiones de frotis medular.

La aguja diseñada por Klima y Rosegger (1935)¹⁹¹ tenía una guía, y Leitner¹⁹² posteriormente modificó la aguja para encajar dentro de un trocar, siendo ésta la más utilizada desde entonces.

Henning y Koth (1934)¹⁹³ sugerían el uso de una cánula con un extremo abierto para facilitar la irrigación medular que iba graduada en centímetros. Defendían que podían obtener MO inyectando 1mL de heparina o solución de citrato de sodio, cuando una punción simple no era exitosa; aunque raramente hacían irrigación medular.

Entre 1929 y 1938 se extrajeron muestras de MO de voluntarios sanos con el fin de describir sus características; Faber (discípulo de Anirkin) fue quien publicó los resultados de MO normal.

Hasta 1939 muchos autores consideraban que la anestesia local no era necesaria, aunque el procedimiento de extracción de muestra de MO resultara

doloroso y molesto para el paciente.¹⁹² Parece probable que las primeras muertes por toma de muestra medular se describieran en 1943 y 1944 tras punciones esternales, asociadas a un esternón puncionado en varias ocasiones y penetración de las cavidades cardíacas derechas. Por este motivo se recomienda desde entonces la punción esternal dirigida hacia la placa externa del hueso y con ligeros golpes por un pequeño martillo.¹⁹⁴ Turkel y Bethell (1943)¹⁹⁵ describen un microtrocar de unos 2 mm de diámetro que pasaba a través de un agujero ligeramente mayor que el de una aguja de aspirado medular, con esta aguja no era necesaria una incisión mayor en la piel y era adecuada para punción esternal. Las muestras que se obtenían eran pequeñas y frágiles.

A pesar de que el 50 % de la MO del cuerpo humano adulto está en los huesos pélvicos no se sugirió la punción en crestas ilíacas hasta 1950.¹⁹⁶ Bierman (1952)¹⁹⁷ planteó inicialmente la punción en cresta iliaca posterior, siendo el sitio preferido para extracción de biopsia y aspirado, que proporcionaba una muestra adecuada para el diagnóstico con las nuevas agujas.¹⁹⁸

Se registraba en un 5 % de los casos fallo en la toma de muestra, por lo que McFarland y Dameshek (1958)¹⁹⁹ describieron una técnica de toma de biopsia usando la aguja de Vim-Silverman²⁰⁰ en posición de decúbito lateral y punción en la cresta iliaca derecha con anestesia local y sin incisión en piel.

Ellis y Westerman (1964)²⁰¹ describieron una serie de casos entre 1959 y 1964 usando una aguja modificada de Vim-Silverman; ésta tenía una empuñadura, un estilete y un obturador que se bloqueaban en una determinada posición, más larga y resistente. Estas biopsias se llevaban a cabo sobre todo en pacientes ambulatorios y seguían registrando un 5 % de muestras no válidas para un análisis correcto. La aguja trans-ilial, más ancha y de mayor calibre, se diseñó para obtener biopsias trans-iliales de córtex a córtex.²⁰² La aguja frecuentemente usada en los años 60 era la aguja Gardner,²⁰³ que tenía un extremo de sierra.

En 1971 Khosrow Jamshidi patentó su aguja, en la que el diámetro distal de la misma estaba biselado, permitiendo sobresalir al extremo cortante de la aguja interna, lo que permitía entrar libremente en la luz medular y extraer la muestra con mayor facilidad.²⁰⁴ Es la aguja de uso más extendido en la actualidad.

Posteriormente se han desarrollado trócares eléctricos, que han tenido poca aceptación, dada la buena calidad de las muestras extraídas con trócares manuales,²⁰⁵⁻²⁰⁷ con un coste mucho menor.

Importancia de la biopsia ósea en el LNH y técnicas de estudio de infiltración medular

Como ya hemos señalado en párrafos anteriores, el estudio histológico de BO es una prueba obligatoria para la estadificación de pacientes con LNH, tanto de nuevo diagnóstico, como en la recaída o para la evaluación de la respuesta al tratamiento en el caso de que estuviese infiltrada al diagnóstico, y su importancia se refleja en el hecho de que se incluye en los índices pronósticos vigentes en la actualidad.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

En diversas patologías, hematológicas y no hematológicas, que pueden afectar a la hematopoyesis, algunos autores han recomendado la realización de biopsia ósea bicrestal (BOB) para incrementar el rendimiento de la prueba.²⁰⁸⁻²¹¹ En LNH la incidencia de infiltración de MO depende del subtipo histológico,²⁰⁹ siendo más frecuente en el linfoma linfocítico de célula pequeña (LLCP) y más rara en el LBDCG.

En el contexto de los LNH, algunos estudios muestran mayor rentabilidad de la BOB,²¹² que detecta entre un 10 % y un 20 % más de casos infiltrados que no serían reconocidos realizando solo una biopsia ósea unilateral (BOU).^{208,209,212} Sin embargo, otros estudios han observado que el estudio de BOB no incrementa significativamente el número de casos infiltrados que condicione un cambio a estadio IV,^{210,213} ni en LNH indolentes ni en linfomas agresivos, donde el cambio a estadio IV se observó en una minoría de casos (6 % y 2,5 %, respectivamente).^{210,213}

Para el estudio histológico de BO es importante tener en cuenta la longitud del cilindro óseo, siendo imprescindible que al menos sea de 10mm.²¹¹ En este sentido, algunos autores han sugerido que bastaría una BOU si la muestra extraída es de 20mm.²¹⁴

En ocasiones la histología con tinciones convencionales no permite obtener un resultado concluyente, como en los casos en los que se debe diferenciar una posible infiltración linfomatosa de posibles agregados linfoides reactivos,²¹⁵ por lo que necesita el apoyo de técnicas complementarias como la inmunohistoquímica u otro tipo de estudios más sensibles, como la CMF multiparamétrica o la BM.²¹⁶

La inmunohistoquímica es útil para distinguir entre linfocitos reactivos e infiltración neoplásica, pero en el caso de los LNH, la determinación certera de monoclonalidad basada en la restricción de cadenas ligeras de las Ig puede ser complicada por el deterioro de los epítomos antigénicos en los procesos de fijación y decalcificación de las muestras de BO. Por este motivo tiene un especial interés el desarrollo de técnicas que aporten una mayor sensibilidad y especificidad.

El análisis inmunofenotípico mediante CMF multiparamétrica se ha desarrollado de forma importante en los últimos años, gracias a su alta aplicabilidad y sensibilidad, lo que ha favorecido su incorporación a los laboratorios clínicos de rutina para el estudio de enfermedades hematológicas. En el caso de los LNH, no está totalmente establecido el valor de la CMF para la evaluación de la infiltración de la MO en los estudios de extensión, y por tanto, no se emplea en general de forma protocolizada. Además, existe poca información sobre estudios comparativos entre el análisis histopatológico de la BO y de CMF para la evaluación de la infiltración de la MO en LNH, que permita concluir qué técnica es más acertada o bien si se pueden utilizar indistintamente, y son muy escasos los datos sobre el potencial valor pronóstico en el caso de existir bajos niveles de infiltración medular detectables solo por CMF respecto a lo que se describe en otras patologías.^{141,217-220}

Otros métodos como la PET, que muestra áreas con alta captación de 18-F-fluorodesoxiglucosa (FDG) bien focal o de patrón difuso, según el tipo de infiltración, o la resonancia magnética (RM), que permite una visualización directa de la MO con alta resolución y un excelente contraste de tejidos blandos, pueden ser más sensibles que la histología convencional.^{221,222} Sin embargo ninguna de estas técnicas se ha incorporado a la rutina clínica hasta el momento actual, por un lado, por la variabilidad inter-observador de técnicas no aceptadas para esta determinación, dependiente tanto del equipo técnico como de la experiencia del personal que interpreta la prueba y por otro lado, por limitaciones técnicas como una baja actividad metabólica en caso de linfomas de bajo grado en el caso del PET así como la falta de disponibilidad de estos estudios en algunos centros.

La BO es un procedimiento invasivo y molesto para el paciente; como todo procedimiento invasivo, aunque la incidencia sea baja, puede tener complicaciones, por lo que la toma de muestra debe realizarse sólo bajo estricta indicación clínica. Dentro de las complicaciones descritas en el procedimiento de toma de muestra se encuentran dolor, hemorragias de distinta gravedad,^{223,224} fractura iatrogénica,²²⁵ en casos de toma de muestra a nivel externo (habitualmente aspirado medular) se han descrito casos de perforación mediastínica o taponamiento cardíaco, que aunque son complicaciones muy graves, se dan muy esporádicamente;^{226,227} los casos de infección o ruptura de la aguja de punción son también raros, y de forma general la BO se considera un procedimiento seguro con baja morbilidad.²²⁸

5. Características inmunofenotípicas de SLPC

Las células neoplásicas de los SLPC, muestran características similares a las células normales,^{229,230} por lo que los estudios inmunofenotípicos se dirigen a identificar características que permitan establecer la línea a la que pertenecen (B, T o NK) y establecer su estadio de maduración.^{229,230}

A pesar de estas similitudes con los linfocitos normales, las células neoplásicas presentan alteraciones en los patrones de expresión de proteínas normales, lo que llamamos fenotipos aberrantes.^{52,126,146,231,232} Los fenotipos aberrantes se describieron en leucemias agudas, y se pueden clasificar en:

- a) Asincronismos madurativos (co-expresión de dos o más antígenos que no se dan simultáneamente en la maduración normal).
- b) Sobre-expresión o infra-expresión antigénica (expresión mayor o menor de lo que correspondería por su estadio madurativo). O bien la expresión de antígenos asociada a otra línea (p.e. expresión de antígenos mieloides en línea linfoide).
- c) Fenotipos ectópicos^{52,146,231,232} (expresión de antígenos en un tejido que no le corresponde).

A diferencia de lo que ocurre en las leucemias agudas, en las que es frecuente encontrar todos los fenotipos aberrantes, en los SLPC lo más frecuente es encontrar infra-expresión o sobre-expresión antigénica, siendo el resto de los tipos de fenotipos aberrantes muy infrecuentes.^{52,126,146,231,232}

Se sugiere 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 microambiente.^{233,234}

Los estudios inmunofenotípicos en SLPC pueden realizarse mediante técnicas de inmunohistoquímica o de inmunofenotipo.^{146,235,236} Otras técnicas como el Western-blot y los recientes arrays de anticuerpos tienen en la actualidad muy poca relevancia clínica. La inmunohistoquímica se emplea fundamentalmente en muestras de tejidos, en los que la arquitectura tisular queda preservada, mientras que la CMF analiza el inmunofenotipo sobre células individuales que deben estar suspendidas en un fluido, por lo que se ha empleado fundamentalmente en tejidos líquidos como la MO o la SP, aunque también se emplea en tejidos sólidos que precisan ser disgregados antes del análisis.^{106,237}

Los antígenos pan-B como CD19 o CD20, se emplean para la identificación de las células B, mientras que otros como CD5, sIg, CD23, CD10, CD11c, CD22, CD25, CD30, CD38, CD79, CD103, FMC7 y cybc12 resultan de gran ayuda en la caracterización específica de algunas entidades.^{237,238} Otros marcadores también pueden ser importantes porque permiten diferenciar los SLPC-B de las neoplasias inmaduras de precursores B, como Tdt, CD34 y CD45.²³⁸

Realizaremos a partir de aquí una revisión de las características fenotípicas de los SLPC primariamente leucémicos y de LNH con expresión periférica, de origen B y T.

5.1. Características inmunofenotípicas de los SLPC-B

5.1.1. SLPC primariamente leucémicos

De acuerdo con la clasificación más reciente de la OMS,¹ en este grupo se incluyen la LLC, la leucemia prolinfocítica (LPL)-B y la TL.

Teniendo en cuenta el proceso de HMS de los genes de las Ig, se considera que los SLPC-B se originan a partir de células B que no han pasado por el CG (no mutación en genes de las Ig) o de células B del CG o post-CG (cuando han pasado a través del CG y han sufrido mutación en los genes de las Ig).^{76,239}

5.1.1.1. Leucemia linfática crónica B y linfoma linfocítico de células B pequeñas (LLC/LLCBP)

La LLC es la leucemia más común en adultos de países occidentales (2-6 casos por 100 000 habitantes y año), con una frecuencia que aumenta con la edad.²⁴⁰ Las células neoplásicas de la LLC muestran un fenotipo muy característico, por lo que en la mayoría de los casos se diagnostica fácilmente mediante CMF.⁴⁸⁻⁵⁰ La LLC expresa el antígeno pan-B CD19, y característicamente es CD5, CD23 y CD200 positiva, además de presentar reactividad débil para CD20, CD22, CD79b, CD81 y sIg, y ausencia de FCM7. Tanto CD23 como CD200 y CD79²⁴¹ son importantes para el diagnóstico diferencial del linfoma de células del manto (LCM),^{242,243} que también co-expresa CD5. Además las células de LLC son positivas para CD21, CD24, CD25, CD27, CD39, CD40, CD43, CD45RA, CD62L, CXCR5 y sIgM, y expresan de forma moderada bcl-2 en citoplasma.^{66,244} (FIGURA 4) En las formas de LLC atípica el patrón fenotípico no es tan característico, y suelen mostrar mayor expresión de antígenos como CD20, CD79b, FMC2, CD22, además de expresión más intensa de sIg.

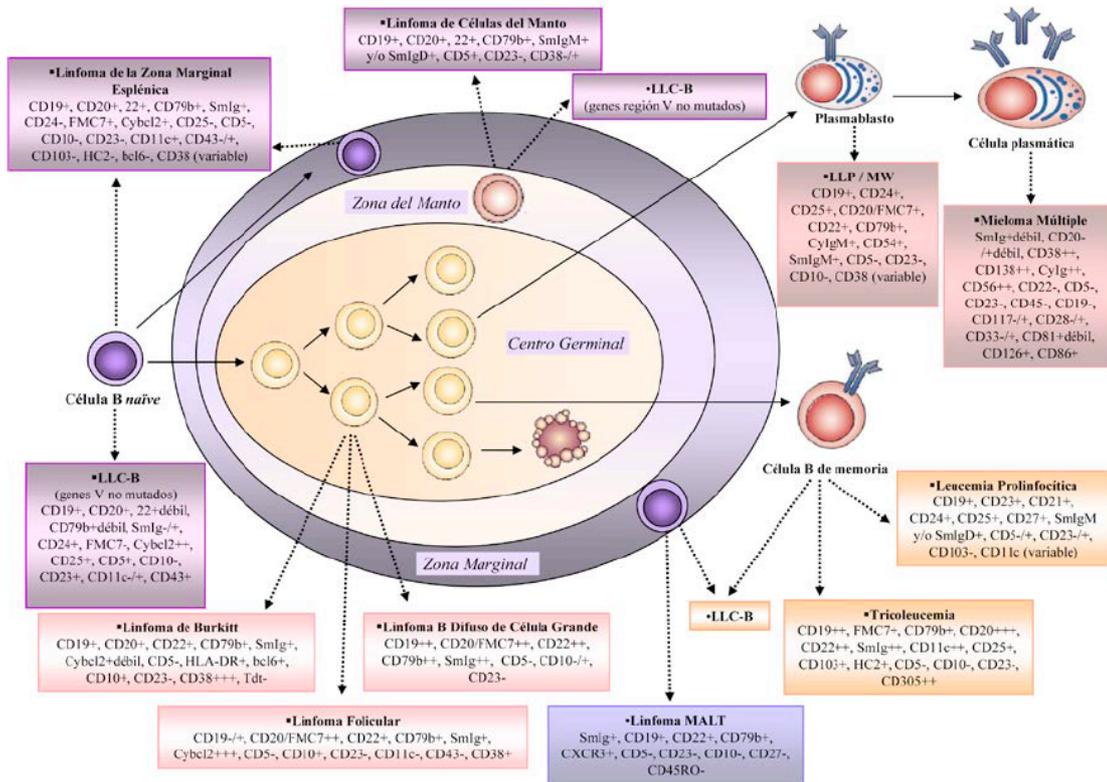


FIGURA 4. Origen celular de los SLPC-B. En función de las etapas de la maduración de las células B normales y de la ausencia o presencia de hipermutación somática, los SLPC-B pueden dividirse en: i) SLPC-B derivados de células B pre-CG y carentes de mutaciones en los genes de las Ig, (LLC, LCM, y LCME), ii) SLPC-B derivados de células B que han pasado por el CG y que muestran mutaciones de Ig (LF, LBDCG, LB), iii) SLPC-B derivados de células B post-CG (LLP, MM), y iv) SLPC-B derivados de células B de memoria (LLC, TL, LP). Las líneas continuas indican etapas o estadios madurativos de la célula B normal y las líneas de puntos muestran los linfomas que presumiblemente se originarían a partir de cada estadio de la diferenciación normal. (Adaptado de Küppers.)²⁴⁵

La expresión de otros marcadores como CD11c, CD38, CD45RO, CD80, CD95, CD124, CD126, CD130 y CyZAP-70 es variable.^{244,246} Cabe señalar que la expresión de CD38 y CyZAP-70 se ha asociado con el estado no mutado de los genes de las cadenas pesadas de las Ig (genes IGH), lo que implica un pronóstico adverso;²⁴⁷⁻²⁵⁰ al igual que en el caso de CD49d (presente en LLC no mutada).²⁴⁶

El fenotipo de los linfocitos del LLCBP es superponible al de la LLC,^{1,3,251} lo que es concordante con la patogenia de la enfermedad, ya que en ambas entidades la célula que prolifera es la misma, aunque en el primer caso la enfermedad tiene un comportamiento predominantemente ganglionar y en el segundo leucémico. Además, recientemente se ha definido una nueva entidad como «linfocitosis B monoclonal» (MBL), que serían los casos con presencia de células B monoclonales en SP, la mayoría con fenotipo de LLC, pero en los que no se cumple el criterio absoluto de linfocitos B clonales $>5 \times 10^9/L$, y siempre en ausencia de signos o

síntomas de la enfermedad.²⁵²⁻²⁵⁴ Es interesante señalar que se ha demostrado recientemente que se pueden detectar pequeños clones de células B fenotípicamente idénticas a las LLC en prácticamente todos los adultos sanos de >40 años.^{253,255,256}

En cuanto al origen de la LLC, en la actualidad se considera que las LLC que presentan mutación de los genes IGH ($\approx 50\%$ de los casos) derivarían de linfocitos B de memoria presentes tanto en MO y SP, como en los órganos linfoides secundarios, en los que ya ha tenido lugar el proceso de HMS,²⁵⁷⁻²⁵⁹ y tendrían un mejor pronóstico. Sin embargo, los casos no mutados se originarían a partir de células B *naïve* que no hayan pasado por el CG, y presentan un curso clínico más agresivo, con menor supervivencia.^{245,258,260-264}

5.1.1.2. Leucemia prolinfocítica B (LPL-B)

El diagnóstico de la LPL-B se basa en la presencia de prolinfocitos en SP en un porcentaje igual o superior al 50 % del total de linfocitos, que se acompaña de las manifestaciones clínico-hematológicas de la enfermedad, como la hiperlinfocitosis (habitualmente $>100 \times 10^9/L$) y la presencia de esplenomegalia, con o sin adenopatías evidentes. En cuanto a su fenotipo, los prolinfocitos expresan intensamente antígenos como CD19+, CD20+/FMC7+, CD22+, CD79b+ o slg, con niveles elevados de slgM y/o slgD, y menor reactividad para CD5, CD23 y CD25.^{49,123,265-268} (FIGURA 4) En general, el prolinfocito muestra un fenotipo superponible al de un linfocito B activado de SP,^{51,266} y en algunos casos puede plantearse el diagnóstico diferencial con formas variantes de tricoleucemia (TL-V),²⁶⁹⁻²⁷¹ con la que se diferencian en que los tricoleucocitos expresan CD103 y los prolinfocitos muestran menor expresión, aunque variable, de CD11c y CD305 (LAIR-1).²⁷² También puede ser necesario el diagnóstico diferencial con el LCM, que puede presentar un cuadro clínico y morfológico similar al de la LPL-B, aunque las células B neoplásicas del LCM son característicamente CD200-, CD23-, CD5+/CD43+ y presentan t(11;14)(q13;q32).²⁶⁷ Desde hace tiempo se conoce la existencia de formas variantes de LPL-B con características intermedias entre LLC y LPL-B.^{48,266} Algunos de estos casos son formas evolucionadas de LLC y otros presentan ya en el diagnóstico un porcentaje variable de prolinfocitos (entre 11 % y 55 %), que en ocasiones presentan características fenotípicas intermedias entre ambas entidades.^{1,3,266} En pacientes con LPL-B la incidencia de CyZAP-70 y CD38 se da en un 50-60 %, y, al contrario de lo que ocurre en la LLC, su expresión no se relaciona con el estado de mutación de los genes de las Ig.²⁷³

5.1.1.3. Tricoleucemia (TL)

El tricoleucocito presenta una morfología y fenotipo característicos, que no plantean habitualmente problemas de diagnóstico diferencial con otros SLPC-B. Su contrapartida normal podría corresponder a una célula B de memoria activada y/o

a una célula presentadora de antígeno, que ya ha sufrido procesos de recombinación IGH V(D)J e HMS.²⁷⁴

Debido a sus características morfológicas, con prolongaciones citoplasmáticas, el tricoleucocito presenta características de dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) anormalmente elevadas. Fenotípicamente expresa con elevada intensidad antígenos pan-B como CD19, CD20, CD22 y slg, además de CD25, CD103, LAIR-1 (CD305), CD11c, FMC7, CD79b, CD123, T-beta, anexina A1, HC2 y CD72.^{48,51,53,265,269-271,275,276} Curiosamente, puede expresar IgM y/o IgD junto a slgG y/o slgA.^{1,49,123,275} (FIGURA 4)

Existe una forma variante de TL (TL-V), que fenotípicamente se caracteriza por ausencia de expresión de CD25 y HC2,⁵⁰ manteniendo una expresión similar a la TL de CD103 lo que, junto a un patrón de CD24 y CD305 facilita el diagnóstico diferencial con el linfoma esplénico de zona marginal (LZME).⁵⁰

5.1.2. LNH-B con expresión leucémica (expresión periférica)

Todos los LNH-B pueden leucemizar, aunque la expresión periférica es más frecuente en algunos subtipos.

Aunque mediante CMF se pueden detectar en SP linfocitos B clonales correspondientes a una fase de leucemización de un LNH-B, en la actualidad es imprescindible hacer un estudio histológico de biopsia ganglionar para determinar el diagnóstico y definir el subtipo.²⁷⁷

En cuanto a los resultados de los estudios moleculares, de acuerdo con los patrones de expresión génica, algunos SLPC-B como el LF, el LB y el LBDCG, muestran perfiles asociados con células B del CG,²⁷⁸ aunque existen casos de LBDCG cuyos perfiles de expresión se parecen más a los de células B activadas (ABC),²⁷⁸ como veremos más adelante.

5.1.2.1. Linfoma de células del manto (LCM)

Los LCM representan un 5-10 % de todos los LNH del paciente adulto.²⁷⁹ En la mayoría de los casos las células B neoplásicas tienen un tamaño de pequeño a mediano y un aspecto maduro, similar a la LLC; el núcleo puede ser hendido con contorno irregular, asociado o no a la presencia de nucléolos evidentes con cromatina dispersa y escaso citoplasma, en ausencia de sombras de Gümprrecht.²⁸⁰ Aunque los rasgos citológicos pueden ayudar al diagnóstico diferencial entre ambas entidades, es clave el estudio histológico ganglionar, la demostración de expresión de ciclina D-1 por inmunohistoquímica, el análisis fenotípico de las células neoplásicas y la demostración de la t(11;14)(q13;q32).²⁸¹ En cuanto al fenotipo, el LCM comparte características con la LLC, y su origen podría estar en un linfocito B en un estadio madurativo inmediatamente posterior al de la LLC, e

histológicamente localizado en la región del manto de los órganos linfoides secundarios. Un 25 % de los pacientes con LCM presenta mutación de los genes IGVH,²⁸² siendo más frecuentes los casos no mutados en los pacientes con enfermedad ganglionar (90 % vs 40 %).²⁸² A diferencia de la LLC, el estado mutacional de IGVH no se correlaciona tan claramente con la supervivencia, aunque podría ser de utilidad para reconocer posibles formas indolentes de la enfermedad (mutadas).^{282,283}

Habitualmente las células B neoplásicas de LCM son CD19+ y co-expresan CD5 y CD43, al tiempo que otros marcadores pan-B como CD20, CD22 y CD24.^{1,3,48,49,51,52} Se diferencian de la LLC en la ausencia de expresión de CD23 y CD200²⁴² y la positividad más intensa para sIgM y/o sIgD, CD18, CD20, FMC7, CD54 y sobre todo CD79b; la reactividad para CD38 es variable, aunque en general es superior a la de la LLC típica.^{1,3,52,238,284} (FIGURA 4) Cabe destacar que existen casos de LCM que presentan variaciones del inmunofenotipo clásico.²⁸⁵

El LCM variante blástica,²⁸⁶ que puede asociarse o no a la presencia de prolinfocitos en SP, presenta un fenotipo superponible al de la forma clásica, aunque, por lo general, la célula B tumoral clonal presenta mayor tamaño y complejidad interna (FSC y SSC), expresa CD10 en algunos casos, lo que puede llegar a plantear diagnóstico diferencial con LBDCG,²⁸⁷ siendo útil para esto la determinación de bcl-6 por inmunohistoquímica, que es negativa en LCM.

Se ha descrito además una variante indolente de LCM,^{288,289} motivo actual de controversia,²⁹⁰ que se caracteriza por un bajo índice proliferativo, predominio de formas mutadas para IGVH, ausencia de alteraciones citogenéticas secundarias y predominio de expresión clínica periférica con esplenomegalia y escasa afectación ganglionar. Estos pacientes se beneficiarían más de una actitud expectante, de forma similar a lo que ocurre con estadios precoces de la LLC o de linfomas indolentes. En este sentido, sería de gran relevancia distinguir en el momento del diagnóstico los pacientes que van a tener un comportamiento indolente o agresivo, lo que es determinante para tomar una decisión terapéutica.

5.1.2.2. Linfoma Folicular (LF)

El LF es el más frecuente de los LNH primarios con infiltración de SP, con una incidencia estimada de leucemización del 10 al 40 % de los casos.²⁵¹ Actualmente se pueden emplear técnicas más sensibles, como la CMF multiparamétrica y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que detectan células B neoplásicas en SP al diagnóstico, o en una mayor proporción de casos durante la evolución de la enfermedad.^{251,291} En SP, el LF puede confundirse morfológicamente con la LLC, siendo útil para su diagnóstico diferencial demostrar la existencia de linfocitos con núcleo hendido (centrocitos) y la presencia de cierto grado de polimorfismo celular (centrocitos y centroblastos) en ausencia de sombras de Gümprrecht.²⁵¹ Sin

embargo, el estudio histológico ganglionar sigue siendo esencial para establecer el diagnóstico definitivo de LF.¹

Las células B neoplásicas del LF muestran un fenotipo similar al del linfocito B del folículo linfoide: reactividad fuerte para sIgM, CD20/FMC7, CD22 y CD79b, co-expresión prácticamente constante de CD10, bcl6 y C38 con intensidad intermedia.^{51,73,238,265} Por lo general son negativas para CD5, CD11c, CD23, CD43, CD103, CD200 y HC2, y con frecuencia presentan expresión débil de CD19,^{51,73,265} y de forma característica presentan sobre-expresión de bcl2 en citoplasma.⁶⁶ (FIGURA 4)

Aunque en la mayoría de los casos las células B neoplásicas del LF tienen un pequeño tamaño, pueden coexistir células de gran tamaño y complejidad, que obliga a establecer diagnóstico diferencial con LBDCG CD10+CD200-.

En la clasificación actual de la OMS¹ se incluye el LNH folicular cutáneo primario como un subtipo particular de linfoma centro-folicular que, a diferencia del subtipo clásico de LF, suele carecer de sIg y, con frecuencia es CD10- y muestra expresión menos intensa de bcl2.

5.1.2.3. Linfoma B difuso de células grandes (LBDCG)

Los LBDCG son un grupo heterogéneo de linfomas¹ que se definen según criterios morfológicos e histológicos, y de los que sólo una pequeña parte (<5 %) leucemiza al diagnóstico,²⁵¹ mostrando generalmente inmunoblastos grandes y/o centroblastos. La heterogeneidad clínica del LBDCG probablemente refleja su variabilidad genética. En la mayoría de los casos, las células B neoplásicas presentan reordenamiento de los genes IGH asociados a mutación somática.²⁷⁹

Se conocen hasta el momento al menos dos subtipos principales en cuanto a expresión genómica:²⁹² los LBDCG con patrón de expresión de célula B tipo CG (similares a las células B sanas del CG), que se asocian con mayor supervivencia, y los LBDCG de tipo célula B activada (ABC), de peor pronóstico,²⁹² cuyo nombre deriva de los estudios que muestran la activación continua de ciertas vías o rutas celulares normalmente activadas cuando las células B sanas interactúan con un antígeno. Además, la expresión de distintos genes como HGAL, BCL6, LMO2 y FN1 se asocia a una supervivencia favorable,²⁹³ mientras que BCL2, SCYA3 y CCND2 se asocian a un pronóstico adverso.²⁹³ Debido a la dificultad de realizar en la práctica clínica los estudios de expresión génica, se han validado patrones de inmunohistoquímica que se correlacionan con los diferentes subtipos biológicos de LBDCG. El algoritmo de *Hans y cols.*²⁹⁴ utiliza CD20, CD10, Bcl-6 y MUM-1. Otro algoritmo reciente es el de *Choi y cols.*²⁹⁵ que utiliza GCET1, CD10, BCL-6, MUM1 y FOXP1, con una concordancia con la expresión génica del 93 %.²⁹⁵

Los estudios fenotípicos en el LBDCG muestran linfocitos neoplásicos de tamaño grande, con reactividad intensa para marcadores pan-B como CD19, CD20/FMC7, CD22, CD79b y slg, y se pueden identificar dos grupos en función de la expresión de CD10+.^{1,3,51,238,265} (FIGURA 4) Se puede identificar un subgrupo numeroso con sobreexpresión clara de cybc12, que podría corresponder a casos con características de célula B de CG y t(14;18)(q32;q21).^{66,296} 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 han asociado con peor pronóstico.^{1,3,284,297} Los LBDCG CD5 positivos se diferencian de la variante blástica de LCM en que no expresan ciclina D1 y carecen de la t(11;14)(q13;q32).²⁹⁷ En la variante anaplásica de LBDCG también se observa como rasgo diferencial la expresión de CD30.²⁹⁸

5.1.2.4. Linfoma de Burkitt (LB)

El LB es un linfoma de células grandes agresivo, cuyo fenotipo es muy característico y con frecuencia reproduce los rasgos de los linfocitos grandes centrofoliculares. 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;²⁹⁹ generalmente carece de expresión de CD5 y CD23 y expresa de forma débil bcl2 citoplásmico.^{66,299} (FIGURA 4) Es característico el hallazgo de una elevada tasa proliferativa asociada a una rápida apoptosis espontánea.^{300,301} Existe una forma variante descrita como Burkitt-like, con características histopatológicas intermedias entre LB y LBDCG.^{1,3,284} Aunque las células B de estos pacientes expresan antígenos pan-B en ausencia de CD5, a diferencia del LB suelen ser CD10- y con una mayor expresión de cybc12, junto a positividad intensa para ki67.^{1,3,284}

5.1.2.5. Linfomas de zona marginal (LZM)

El LZME presenta en general un curso clínico benigno que no requiere un tratamiento inmediato.^{265,302,303} En sangre periférica, los linfocitos B neoplásicos son morfológicamente más grandes que las células B normales, con 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 dispuestos en un polo de la célula (menos numerosas aunque más gruesas, largas y separadas que las células B de la TL).²⁶⁵ Fenotípicamente muestran características de maduración similares a las de las células de la TL, son relativamente homogéneas, con expresión intensa de slg y CD79b, y positividad para CD19, CD20/FMC7 y CD22.^{47,50} Al igual que en la TL, las células B clonales expresan CD11c, aunque con expresión menos intensa, y similar a la subpoblación de células B normales (<5 %) circulante.¹⁴⁶ Con frecuencia carecen de reactividad para CD103, HC2 y CD25 y la expresión de CD24 es más débil que en los tricoleucocitos.^{1,3,47,50} (FIGURA 4) Otros antígenos como CD5,

CD10 y CD23 son generalmente negativos, 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.^{1,3,50,51,265} (FIGURA 4) El LZM nodal (LZMn) tiene un fenotipo muy similar al LZME.

El linfoma tipo MALT constituye el 7-8 % de todos los linfomas de células B³⁰⁴ y más del 50 % de los linfomas gástricos primarios.³⁰⁵ En estos pacientes, las células B expresan slg (slgM, slgA o slgG) y en muchos casos co-expresan 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.³⁰⁶⁻³⁰⁸ (FIGURA 4) Algunos autores han asociado la expresión de CD5 con un comportamiento más agresivo y peor pronóstico para la enfermedad.³⁰⁹

5.1.2.6. Linfoma linfoplasmocítico (LLP) y macroglobulinemia de Waldenstrom (MW)

El LLP presenta frecuentemente infiltración de la MO, pero la presencia de células B clonales en SP es menos frecuente.^{48,51,265} En las muestras infiltradas (tanto en SP como en MO) a menudo coexisten linfocitos pequeños clonales con linfoplasmocitos típicos y células plasmáticas que expresan el mismo isotipo de cadena ligera de Igs.^{49,51,265} En la mayoría de los casos se detecta un componente monoclonal, aunque a veces se necesitan métodos sensibles como la inmunofijación para su identificación.^{3,284,310} La MW es una variante del LLP caracterizada por la presencia de paraproteína IgM (que excede la concentración de 1,5g/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.³¹¹ Además las células plasmáticas de la MW, a diferencia de las gammapatías monoclonales (GM), presentan una expresión de antígenos normal.³¹² 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.²⁸⁴

El perfil fenotípico de los linfocitos B neoplásicos de los pacientes con LLP generalmente es superponible al de los linfocitos B CD5-/CD23- maduros predominantes en SP: ausencia de reactividad para CD5, CD10 y CD23, expresión de marcadores pan-B (CD19+, CD20+/FCM/+, CD22+,CD24+), positividad constante para CD25 y CD54 y reactividad variable para CD38.^{1,3,51,52,311} Recientemente se ha descrito el potencial valor de la CMF en la caracterización de clones de MW como su importancia para establecer diagnóstico diferencial, predecir riesgo de progresión o supervivencia.^{312,313}

5.1.2.7. Gammopatías monoclonales (GM) y mieloma múltiple (MM)

Las GM son las neoplasias de CP, las células en último estadio madurativo de la diferenciación linfoide B. Desde el punto de vista del fenotipo existe gran similitud entre las CP clonales de las distintas formas de GM [(GM de significado incierto (GMSI), MM y leucemia de CP (LCP)]. Como rasgo diferencial no expresan marcadores asociados a otras neoplasias B como CD22, CD5 y CD23;^{1,3,284,314,315} CD38 es una glicoproteína de membrana, presente en todas las líneas hematopoyéticas,³¹⁶ que se expresa en las CP con una intensidad muy superior a la de otras células permitiendo fácilmente su identificación.^{63,64,317,318} En la mayoría de los casos la CP mielomatosa expresa CD38 de forma más débil que la CP normal.³¹⁹ Otro marcador característico es CD138, proteoglicano de superficie que promueve la adhesión al colágeno tipo I y a la fibronectina, y que en MO se expresa únicamente en las CP (normales y patológicas),³²⁰ por lo que se utiliza para la identificación y purificación de las CP. Con frecuencia las CP patológicas son CD45- y CD19-^{64,68,321} (FIGURA 4) aunque algunos autores han correlacionado la expresión fuerte de CD45 con una alta capacidad proliferativa y alto grado de inmadurez de las CP.^{319,322} En las CP normales CD56 se expresa débilmente, sin embargo en la mayoría de los casos es fuertemente positivo en las CP mielomatosas (>60 % de los MM)^{323,324} y en las GMSI se encuentra con frecuencia fuerte reactividad para CD56 en presencia o ausencia de un patrón de expresión aberrante para CD117,³²⁵ CD27, CD28, CD33, CD81, CD126, CD229 y CD86.^{63,65,68,326-331} (FIGURA 4). La expresión de CD86 se ha asociado a pronóstico adverso,³¹⁹ mientras que CD117 se ha asociado a características favorables de la enfermedad.³³² En la leucemia de células plasmáticas (LCP) puede observarse expresión de CD56, aunque se considera típicamente negativo e incluso se ha postulado que CD56 pueda ser un factor asociado a la progresión de la enfermedad.^{333,334} Además en la LCP se detecta más frecuentemente reactividad para CD20 y positividad más intensa para CD27.^{65,333,334} 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.³³⁵

5.1.3. Subgrupo de SLPC-B leucémico con Fenotipo CD19+CD5+ . Un reto diagnóstico en la rutina clínica

En el laboratorio clínico asistencial, se pueden plantear problemas de diagnóstico diferencial en SLPC-B CD5+. De hecho algunos autores han propuesto una clasificación de SLPC-B en función de la expresión de CD5 y CD10,¹²⁶ que ayudaría a orientar el diagnóstico y decidir si hay que realizar técnicas complementarias.

Dentro de los SLPC-B con expresión de CD5 nos encontramos un grupo heterogéneo de enfermedades.^{336,337} La más común es la LLC/LLCBP, seguida por

el LCM.³³⁸ El diagnóstico diferencial de estas dos entidades, por lo general ambas CD5+CD10-, es habitualmente fácil de establecer con técnicas de inmunofenotipo.^{49,339} El fenotipo típico del LCM, es generalmente CD5+, CD23-, CD200-, FMC7+, CD79+, CD20+ y sIg+ fuerte,³⁴⁰ lo que permite diferenciarlo de la LLC clásica.³⁴¹ Sin embargo, existen variantes de los distintos SLP-B que obligan a un diagnóstico diferencial más exhaustivo, como en el caso del área gris de las LLC atípicas.³⁴² Se ha sugerido que la ausencia o expresión débil del receptor de Ig-E CD23 descartaría el diagnóstico de LLC, que iría más a favor de LCM,²⁷⁶ aunque también se han descrito casos de LLC claramente CD23-^{342,343} e incluso variantes de LCM CD23+.³⁴⁴ Hay que tener en cuenta que para el diagnóstico de una entidad no debe valorarse el patrón de expresión de un solo antígeno, sino que debe estar basado en un panel suficiente de antígenos que defina su perfil inmunofenotípico.

A pesar de todo, en la labor diaria del laboratorio clínico asistencial de CMF, con frecuencia se identifican casos de SLPC-B CD5+ cuyo fenotipo es «compatible con LCM», y que no presentan la t(11;14). Este grupo de casos plantean problemas diagnósticos que pueden tener implicaciones clínicas, por lo que consideramos interesante analizar las características inmunofenotípicas de este grupo de pacientes y describir la incidencia y el comportamiento clínico de estas entidades en relación con la presencia o ausencia de t(11;14), con el fin de establecer un diagnóstico más preciso que permita una mejor valoración clínica.

5.2. Características fenotípicas de los SLPC-T y SLPC-NK

Aunque se pueden definir algunas entidades dentro de los SLPC-T en base a sus características inmunofenotípicas, el conocimiento de este subgrupo es menor que en el caso de los SLPC-B, debido en parte a su menor frecuencia. En el caso de las neoplasias de células NK maduras la identificación de la línea no suele presentar grandes dificultades, aunque por el momento no existen claros marcadores de clonalidad, ya que las células neoplásicas no presentan reordenamiento IGH ni de TCR. En el caso de que el paciente sea una mujer se puede demostrar clonalidad realizando el test molecular de inactivación del cromosoma X (HUMARA), que no es aplicable en pacientes varones.

5.2.1. 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) con sobreexpresión de CD7³⁴⁵ y un fenotipo CD4+CD8-; aunque también puede presentar fenotipos CD4+CD8+ y CD4-CD8+ en aproximadamente el 25 % y el 15 % de los casos, respectivamente.³⁴⁵ Estas células muestran también fuerte reactividad para CD52 y positividad débil y variable para CD25 y HLA-DR, junto con características de linfocito T escasamente diferenciado, de fenotipo *naïve* en la mayor parte de los casos (CD45RA+, CCR7+, CD45RO-,

CD28+).³⁴⁵ De forma característica, en la mayoría de casos (~80 %) se observa expresión citoplasmática de TCL1, asociada a translocaciones que involucran este gen en el cromosoma 14q32.1.³⁴⁶

5.2.2. Leucemia/linfoma T del adulto

La leucemia/linfoma T del adulto relacionado con la infección del virus HTLV-1, presenta un fenotipo T maduro correspondiente al de un linfocito T regulador CD4+CD25++ con expresión de CCR4 y FoxP3;^{48,284,347,348} 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 TCR $\alpha\beta$ +.^{48,284,347,348} 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.^{48,284,347,348} A veces se observa expresión parcial de CD30 en ausencia de proteína ALK y enzimas citotóxicas.¹

5.2.3. Leucemia/linfoma de linfocitos T grandes granulares (LLGG-T)

Las LLGG-T conforman un grupo heterogéneo desde el punto de vista fenotípico. En la mayoría de los pacientes las células T clonales muestran un fenotipo CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD8+, aunque también se han descrito casos CD3+TCR $\gamma\delta$ +CD4- o CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4+ asociados 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-.³⁴⁹

Las células T de los pacientes con LLGG-T por lo general, tienen un fenotipo citotóxico efector, independientemente de su origen. Se detecta expresión intracitoplasmática de proteínas citotóxicas como granzima B y M y perforina, con reactividad variable para las moléculas CD16, CD56, CD57, CD11c y CD94,³⁵⁰ expresión intensa de CD45RA con ausencia de reactividad para CCR7 y CD28, y positividad variable para CD45RO.³⁵⁰⁻³⁵³ Otras moléculas pan-T como CD5, CD7 y CD2, que son positivas en linfocitos T normales, suelen mostrar una expresión variable, y se pueden detectar en algunos pacientes dos o más subpoblaciones T patológicas con diferentes niveles de expresión para estos marcadores.³⁵⁰⁻³⁵³

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. Así, las LLGG-T CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4+ suelen expresar 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 muchos de estos casos expresan la familia TCRV β 13.1, asociada a la presencia del alelo HLA-DRB1*0701 e infección por citomegalovirus (CMV), que probablemente constituye el estímulo antigénico concreto involucrado en estas expansiones clonales T.^{180,354,355}

Por su parte, las LLGG-T CD3+TCR $\gamma\delta$ +CD4- se caracterizan por la expresión variable de CD8, CD56 y CD57 y ausencia de reactividad para CD16, CD11b y CD11c, con un predominio de expansiones TCRV γ 9+TCRV δ 2+,¹⁶⁴ de forma similar a lo que ocurre con las células T TCR $\gamma\delta$ + de SP de adulto sano.

Respecto a los casos CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD8+, que es el fenotipo más frecuente, merece destacar que suelen expresar un repertorio de regiones TCRV β similar al de las células T CD8+ de sujetos adultos sanos.^{162,163} Fenotípicamente, las células clonales de estos pacientes muestran reactividad variable para CD57, CD11c y CD56,³⁵⁶ con expresión intensa de CD8 y ausencia de CD4.^{350,356}

5.2.4. 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.¹⁵⁶ La gran mayoría de los casos son CD4+ aunque se han descrito casos CD8+,³⁵⁷ que tienen un comportamiento clínico similar a los CD4+, y son más frecuentes en pacientes pediátricos. En la mayor parte de los casos, 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 %).^{48,51,156,284,358} Además, las células de Sézary son característicamente CD26 negativas, y muestran reactividad para los antígenos 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).¹⁵⁶

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 fenotipo, siendo frecuente la coexistencia de subpoblaciones celulares CD7- y CD7+.^{156,359-361}

5.2.5. Linfoma T angioinmunoblástico

El linfoma T angioinmunoblástico muestra habitualmente un fenotipo típico que se caracteriza por la presencia de una o varias subpoblaciones de células T CD4+CD8- con expresión anormalmente disminuida y variable de CD3TCR $\alpha\beta$ +, asociado o no a una expansión policlonal de las células B.^{362,363} De forma característica, las células neoplásicas de los pacientes con linfoma T angioinmunoblástico expresan los antígenos CD10,³⁶⁴ CXCL13,³⁶⁵ y PD-1 (CD279, miembro de la familia extendida CD28CTLA-4),³⁶⁶ fenotipo similar al de la célula T colaboradora folicular CD4+ normal, que puede ser el origen de esta neoplasia.^{364,367}

5.2.6. Linfoma T periférico NOS (*not otherwise specified*)

Estos linfomas T comprenden aproximadamente un 30 % de los linfomas T periféricos,³⁶⁸ representando por tanto el grupo más frecuente de las neoplasias T pos-tímicas. Es un grupo muy heterogéneo que incluye todos aquellos linfomas T periféricos que no pueden adscribirse a ninguna otra categoría de la OMS. Fenotípicamente se caracterizan por una gran heterogeneidad en cuanto a la expresión de marcadores pan-T, como CD3, CD2, CD5 y CD7 que pueden ser positivos o negativos;^{154,369,370} y 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). Suelen expresar la isoforma CD45RA del antígeno CD45, en ausencia de CD45RO.^{1,3} 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 más raramente CD4-CD8- (10 %) o CD4+CD8+ (10 % de los casos).^{154,370}

5.2.7. Linfoma T hepato-esplénico

En la clasificación actual de la OMS¹ se incluye el linfoma T hepatoesplénico como un nuevo subtipo de linfoma T. 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 del fenotipo el linfoma T hepatoesplénico se caracteriza por presentar un perfil 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 ausente) para enzimas citotóxicas (granzima B y perforina) y CD56, en ausencia de CD94 y otros receptores KIR.^{371,372}

5.2.8. Linfoma T subcutáneo tipo paniculítico

El linfoma T subcutáneo tipo paniculítico se asocia de forma característica a una expansión clonal de células T TCR $\alpha\beta$ +, CD8+, con fenotipo citotóxico y expresión de β F1, en ausencia de CD56. Clínicamente se caracteriza por infiltrar el tejido subcutáneo habitualmente en ausencia de diseminación periférica. En la nueva clasificación de la OMS¹ esta entidad queda excluida de los linfomas T $\gamma\delta$ cutáneos primarios.

5.2.9. Linfomas T/NK extranodal tipo nasal

El linfoma T/NK extranodal tipo nasal es una entidad rara en nuestro medio, asociada en la mayoría de los casos a infección por virus de Epstein Barr (EBV).³⁷³⁻³⁷⁵ Histológicamente se observa un infiltrado pleomórfico en la lesión tumoral, con destrucción vascular y necrosis asociada.³⁷³⁻³⁷⁵ En cuanto al fenotipo, 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, CD95;^{376,377} en una minoría de los casos se observa un fenotipo de célula T citotóxica CD3+CD56+.

Los casos en los que se observa expresión de CD3 intracitoplasmático en ausencia de CD56 y que son EVB+, cy-granzima+ y cy-perforina+, se clasifican como linfoma T/NK extranodal, y tienen un comportamiento clínico similar al de los casos CD56+.³⁷⁸

5.2.10. Linfoma T asociado a enteropatía

En el linfoma T asociado a enteropatía típicamente se detecta una expansión de linfocitos T CD7+, CD3+/TCRαβ+, que son negativos para CD4 y CD8, o presentan expresión débil de CD8.^{1,3,379-381} Es típico que las células T neoplásicas de esos pacientes co-expresen CD103 y presenten reactividad variable para C30+ en ausencia de CD5.^{1,3,379,380,382}

5.2.11. 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.^{1,3,383} Otros antígenos como EMA, CD15, CD43, CD45 y CD45RO pueden ser negativos o positivos, y suelen carecer de CD68.^{1,3,383} Característicamente muestran expresión de la proteína ALK, asociada a las translocaciones que involucran este gen en el cromosoma 2p23, siendo la más frecuente (84 % de los casos) la t(2;5)(p23;q53), que resulta en la generación de la proteína quimérica NPM-ALK.³⁸⁴

5.2.12. Linfoma T anaplásico de células grandes ALK-

A diferencia de lo que ocurre en el linfoma T anaplásico de células grandes ALK+, estos linfomas T carecen, por definición, de la expresión de ALK. Otras características como la positividad para CD30 y la pérdida de uno o varios antígenos pan-T, son similares a los linfomas T anaplásicos de células grandes ALK+. Son más frecuentemente CD4 que CD8. Por el momento se trata de una entidad provisional en la clasificación de la OMS, con un pronóstico claramente peor que los casos ALK+.¹

5.2.13. Síndrome linfoproliferativo crónico de células NK (SLPC-NK)

El SLPC-NK es el subgrupo de neoplasias de células NK maduras más frecuente en los países occidentales. Esa categoría ha sido propuesta por la OMS en la última clasificación,¹ en lugar de las entidades previamente llamadas «linfocitosis crónica de células NK», «leucemia de linfocitos grandes granulares (LGG) NK» y «leucemia/linfocitosis de LGG de células NK», entre otros, que incluían leucemias y linfocitosis bajo un término común.

Las células NK de los SLPC-NK presentan un fenotipo de célula madura, similar al de su contrapartida normal: CD16+, CD3-, CD7-, cy-granzima+ y cy-perforina+. En función de 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}.³⁸⁵ El primer subgrupo es el más frecuente y representa alrededor del 50 % de los casos; le sigue en frecuencia (40 %) el grupo con expresión débil o negativa de CD56, mientras que los pacientes CD2-CD56+ representarían el subgrupo menos frecuente (<10 % de los casos).³⁸⁵ Estudios previos han demostrado el carácter clonal de las expansiones NK con expresión anormalmente baja o ausente de CD56 y CD2,³⁸⁵ aunque también se han descrito casos con células NK CD56-/+^{débil} que son policlonales. En estas neoplasias, la expresión de CD94 y HLA-DR está significativamente aumentada, y en general la expresión de CD94 es homogénea.^{386,387} Aunque algunos autores han sugerido que el patrón de expresión de algunos receptores NK, como CD158, podría ser diferente en las células NK neoplásicas y en las reactivas,³⁵³ estos hallazgos no se han confirmado.^{385,388,389}

5.2.14. Leucemia agresiva de células NK

La leucemia agresiva de células NK es una entidad rara en nuestro medio. Afecta principalmente a adultos jóvenes, se asocia a infección por virus EBV y es de mal pronóstico.¹ Habitualmente cursa con hepato-esplenomegalia, adenopatías y linfocitosis.³⁹⁰⁻³⁹² Se han descrito algunas anomalías cromosómicas como del(6)(q21q25) y deleción de 11q,³⁹³ pero no existe una alteración genética característica. El fenotipo de las células tumorales muestra características superponibles a las células NK normales, con expresión de proteínas citotóxicas en citoplasma (TIA1+, cy-Granzima+, cy-Perforina+) y moléculas de membrana características de células NK maduras (CD56+, CD16+, CD7+, CD3-, CD8-ó+),³⁹⁰ siendo habitual la expresión de CD95 en ausencia de CD57.³⁸⁷

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El término de SLPC engloba un conjunto heterogéneo de hemopatías linfoides malignas, originadas a partir de la expansión clonal de células linfoides de aspecto maduro, que presentan un bloqueo en su diferenciación/maduración.

Los SLPC-B forman el grupo de neoplasias hematológicas con mayor prevalencia en los países occidentales. Es fundamental por tanto, poder disponer de técnicas eficaces para su identificación, tanto para establecer un diagnóstico precoz como para una buena estadificación diagnóstica y un seguimiento posterior de la enfermedad.

El diagnóstico de los SLPC-B se basa tradicionalmente, casi de forma exclusiva, en técnicas citomorfológicas e histopatológicas convencionales, integradas con información clínica extraída de la anamnesis y exploración física del paciente. De forma aislada estas técnicas tienen una especificidad y sensibilidad limitada, tanto para detectar la presencia de enfermedad como para definir el subtipo diagnóstico concreto de la enfermedad.

Durante los últimos años se han ido incorporando de forma progresiva técnicas inmunofenotípicas, genéticas y moleculares al diagnóstico y clasificación de los SLPC, así como para otras patologías hematológicas. La OMS en este sentido apuesta por una aproximación multiparamétrica, combinando técnicas morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y moleculares, para el diagnóstico y clasificación de estos procesos.

La CMF multiparamétrica es una herramienta útil en el estudio diagnóstico y para el seguimiento de distintas patologías hematológicas, como se ha demostrado en los últimos años. El análisis inmunofenotípico por CMF podría contribuir a mejorar la eficiencia de los métodos de rastreo diagnóstico tradicionales. Se ha objetivado una clara superioridad de la CMF respecto a la citología convencional (en términos sobre todo de sensibilidad) a la hora de detectar células B patológicas/clonales en muestras de SP de sujetos con linfocitosis absoluta y/o relativa, en muestras de MO en estudios de extensión y en muestras de LCR de pacientes con SLPC-B con sospecha de infiltración leptomeníngea. Del mismo modo, trabajos recientes han mostrado la utilidad de la CMF (respecto a la citología convencional) en el estudio de muestras de tejido linfóide obtenidas mediante PAAF,¹⁰⁶ su potencial papel en el diagnóstico inicial de los SLPC-B y T, y en la clasificación de los linfomas en los distintos subgrupos diagnósticos establecidos por la OMS.¹ Hasta el momento actual, sin embargo, el análisis histológico/inmunohistoquímico realizado sobre tejido de biopsia es la

técnica considerada de referencia, así como la muestra de BO para determinar una posible infiltración medular a la hora de determinar estadio diagnóstico.

El análisis inmunofenotípico por CMF como herramienta de utilidad en la clasificación de los SLPC-B y T (incluyendo linfomas) tiene a su favor la existencia de perfiles fenotípicos característicos de cada una de las distintas entidades. Pero debemos tener en cuenta que existe un grado relevante de solapamiento entre las diferentes categorías diagnósticas, lo que hace que el estudio de inmunofenotipo mediante CMF pierda peso respecto a otros criterios y herramientas diagnósticas. Es posible que sea necesario disponer de marcadores adicionales capaces de diferenciar de forma más eficaz las células normales de las neoplásicas, y de nuevas estrategias de análisis que faciliten una evaluación más objetiva.

Nuestra hipótesis se plantea para demostrar la utilidad de la CMF en la evaluación de la infiltración de la MO en los LNH, y apoyar su incorporación como método de rutina en los laboratorios clínicos en los estudios de estadificación de los LNH. Por otro lado, nos planteamos valorar en la era de la CMF, si es necesaria o no la realización de BOB, ya que otros métodos diagnósticos en la actualidad aportan mayor sensibilidad para detección de infiltración medular. Además, creemos que la CMF puede tener un papel relevante en el estudio de los SLPC CD5+ no LLC, tanto como ayuda para predecir la existencia de la alteración molecular característica de los LCM, como discriminando entre formas agresivas e indolentes.

A raíz de todo lo expuesto, en el presente trabajo nos planteamos tres objetivos principales:

1. Evaluar el valor del estudio simultáneo de MO mediante CMF y BO en pacientes con LNH: correlación del diagnóstico histológico y el tipo de infiltración.
2. Analizar el valor de la BOB en la era de la CMF, como técnica de análisis de rutina en la estadificación de los LNH, y su aportación comparada con el empleo simultáneo de la BOU y la CMF.
3. Identificar y describir las características fenotípicas de SLPC CD19+CD5+ (no-LLC) en relación con alteraciones moleculares subyacentes (bcl-1; t(11;14)), así como identificar pacientes con diferente comportamiento clínico (indolente vs agresivo).

Pacientes, materiales y métodos

Resultados

Discusión

DISCUSIÓN

El estudio histológico de BO se considera, hasta el momento actual, como obligatorio para establecer el estadio de los linfomas al diagnóstico, para el seguimiento de la respuesta a tratamiento y para una nueva estadificación en caso de recaída. Nos proporciona información crítica para la evaluación pronóstica y para el planteamiento terapéutico.^{108,109,405}

Tradicionalmente, la infiltración de MO se evalúa mediante estudio histológico de muestra de BO, extraída generalmente mediante punción de cresta ilíaca posterior. Esta estrategia analítica ha sido la que se ha tenido en cuenta hasta el momento para establecer el estadio clínico en la mayoría de los índices pronósticos de los linfomas (por ejemplo IPI, FLIPI, etc.).^{108,109} Sin embargo, en la actualidad existen técnicas de análisis con mayor sensibilidad, como el estudio de inmunofenotipo por CMF y los estudios de BM, que tienen un papel muy importante en la evaluación de muestras de MO, y que pueden permitir una mejor caracterización y estadificación de los pacientes con LNH, con posible implicación pronóstica añadida. Por este motivo, el objetivo principal de este trabajo de tesis doctoral es el análisis crítico del valor de la CMF para el estudio de la infiltración linfomatosa de la MO.

En primer lugar, presentamos una revisión de larga serie de casos (n=494) estudiados simultáneamente por estas técnicas, en el contexto del estudio de extensión de los LNH, con el fin de evaluar el impacto del empleo de la CMF en el estudio de la MO para valorar infiltración linfomatosa, y compararlo con los resultados del estudio histológico de la BO.

Actualmente, el diagnóstico y la clasificación de las neoplasias linfoides, se basa en la utilización de un amplio conjunto de información aportada por diferentes técnicas, para encuadrar un caso concreto en una categoría diagnóstica de la OMS.¹ De este modo, no solo se tienen en cuenta el cuadro clínico del paciente, las características morfológicas de las células y su patrón de distribución tisular, sino también el perfil inmunofenotípico y las alteraciones genéticas/moleculares de las células tumorales.

En lo que respecta a los estudios inmunofenotípicos, su incorporación y empleo rutinario en el estudio de los síndromes linfoproliferativos ha sido posible gracias a los avances alcanzados en instrumentos de medición y a la posibilidad de realizar marcajes simultáneos con múltiples anticuerpos. Con ello, se ha comprobado que la aplicación sistemática de los estudios inmunofenotípicos resulta de gran utilidad, tanto en el diagnóstico de clonalidad, como en la caracterización fenotípica de los síndromes linfoproliferativos dirigida a su

clasificación. En general, hay acuerdo unánime al considerar que la CMF es una técnica sensible, específica, fiable y reproducible para la identificación de células linfoides aberrantes/clonales, al menos cuando se aplica a muestras convencionales de SP y MO, siendo su eficiencia claramente superior a la de las técnicas morfológicas a la hora de establecer el diagnóstico de clonalidad,^{123,125} y para detectar EMR.^{132,146,395-397,406-409} Sin embargo, su uso en rutina para la estadificación de linfomas no está establecido, aunque se realiza de forma paralela al estudio histológico de infiltración medular en muchos centros. El número de publicaciones existentes evaluando su papel en comparación con la histología de BO es limitado y hay muy poca información en cuanto a su impacto pronóstico.^{141,217-220}

La mayor parte de los datos publicados hasta la actualidad, muestran una alta tasa de concordancia entre los estudios de histología de BO y de inmunofenotipo por CMF en la estadificación de LNH,^{141,217-220} aunque se describe la existencia de valores discrepantes en un rango del 5 al 32%.^{141,151,216-220,410-417} Estas diferencias pueden explicarse, al menos en parte, por el uso de distintas técnicas de análisis (con uso de 3 a 6 fluorescencias simultáneas en el estudio de inmunofenotipo, diferentes estrategias de análisis, o bien por diferente longitud en el tamaño de las muestras de BO). Esto hace evidente la necesidad de nuevos estudios que clarifiquen la naturaleza de estas discrepancias. En el estudio comparativo que planteamos en nuestro primer objetivo, con uso de 4 fluorescencias, detectamos un 20 % de discrepancias entre el estudio histológico de la BO y el estudio inmunofenotípico por CMF, y un 80 % de casos concordantes, de acuerdo con lo previamente descrito por otros autores.^{141,216,415,416} En nuestra serie, la distribución de estos casos discrepantes fue similar entre casos BO+CMF- (42 %) y BO-CMF+ (58 %), con una ligera ventaja hacia el estudio de inmunofenotipo por CMF.

El uso de la CMF en nuestra serie, permitió detectar infiltración medular en un 12 % de los casos aparentemente no infiltrados por el estudio histológico, lo que puede ser importante para la evaluación pronóstica de pacientes con linfoma.

Se debe tener en cuenta la gran sensibilidad de la CMF, especialmente cuando se consiguen combinar 4 o más fluorescencias; en este sentido, cuando el estudio de inmunofenotipo por CMF se realiza con menos de 4 colores de fluorescencia, la capacidad de detección de infiltración medular es menor,^{218,219,414,417,418} y la distribución de BO+CMF- y BO-CMF+ entre los casos discordantes va a favor de la histología de BO.^{218,219,410,414,417-419} Sin embargo, cuando en el estudio inmunofenotípico se utilizan cuatro o más colores de fluorescencia, la distribución de casos discordantes BO+CMF- y BO-CMF+ es casi equitativa,²¹⁶ o incluso favorable para la CMF,^{151,220,411,412} lo que evidencia la gran importancia de realizar

una técnica de calidad. Por este hecho es por lo que se han ido incorporando a los laboratorios asistenciales citómetros de seis y ocho colores,⁴²⁰ con una sensibilidad mucho mayor, que permitirán en un futuro próximo, una mejor identificación de la infiltración medular en pacientes con linfoma de Hodgkin. En ese sentido, el grupo Euroflow (EuroFlow Consortium EU-FP6 LSHB-CT) está trabajando en el desarrollo de estrategias diagnósticas para estandarizar los estudios de CMF, así como para establecer pronóstico o establecer la respuesta a tratamiento en distintas patologías hematológicas.^{409,420,421} Esto implicará una identificación y caracterización inmunofenotípica de células neoplásicas más robusta, sensible y estandarizada.

Sabemos que la frecuencia de infiltración medular depende, entre otros factores, del tipo histológico del linfoma¹ y del mismo modo, encontramos que la distribución entre casos BO+CMF- y BO-CMF+ también difiere en función del tipo histológico de linfoma y su patrón de infiltración.

En nuestra serie de casos, las discrepancias fueron más frecuentes en los linfomas T/NK (33 %), seguidas de los LZME (23 %), LCM (20 %), LF (17 %) y los LBDCG (15 %). A pesar de que no se dispone de información en la literatura sobre los linfomas T/NK, sí han sido descritas discrepancias entre BO y CMF en todos los tipos de LNH-B con resultados heterogéneos.^{141,216,217,219,220,410} Algunas series muestran menor porcentaje de discrepancia en LCM^{151,411} y LF^{217,410} mientras otros describen mayor frecuencia de discrepancia en LF.^{141,412,417} En cuanto a los casos discrepantes, si nos centramos en la distribución entre BO+CMF- y BO-CMF+, en nuestra serie la CMF fue más sensible en los linfomas T/NK, LCM y LBDCG, y por el contrario, la BO fue más sensible en LF, existía tendencia a mayor sensibilidad en el caso de los LLP, sin encontrar diferencias en el caso de los LZME. Aunque hay poca información al respecto, de acuerdo con nuestros resultados el LCM fue el tipo de linfoma con resultados más homogéneos mostrando la CMF como técnica más sensible para la detección de infiltración medular.^{151,220,411} En el caso del LF también hay poca información disponible, pero en nuestra serie, al igual que en otras publicadas, se muestra que si hay discrepancias habitualmente evidencian mayor sensibilidad para el estudio de BO en comparación con la CMF,^{219,410,412,414,417} sin embargo, no toda la información publicada hasta el momento lo confirma.^{217,220} En el caso particular del LF, la elevada sensibilidad descrita a favor de la BO puede estar condicionada por el patrón de infiltración medular en este tipo de linfoma, habitualmente paratrabecular/intertrabecular, y la fibrosis típica de los LF lo que puede hacer más difícil la obtención de un aspirado medular de buena calidad para el estudio de CMF. En los casos de LBDCG se ha descrito un mayor número de casos discrepantes con resultado favorable para la CMF como en nuestra serie,²¹⁷ aunque otros autores no describen diferencias^{216,220} y alguno refiere mejores resultados del estudio de BO.^{219,410,412} En

los casos discrepantes de LZME, no encontramos diferencias entre casos BO+CMF- y BO-CMF+ al igual que describen algunos autores,⁴¹² sin embargo hay trabajos que muestran resultados favorables para la CMF²²⁰ y otros para la BO.^{219,418,419} A partir de todo esto, vemos que tanto la CMF como el estudio histológico de BO son técnicas muy importantes para detectar infiltración medular en todos los tipos de linfoma y que la información que aportan puede considerarse complementaria.

Como habíamos señalado anteriormente en el caso concreto de los LF, parece razonable pensar que el patrón de infiltración medular puede afectar a la detección de infiltración linfomatosa por cada una de las técnicas. De este modo vemos como el patrón de infiltración parcheada de los casos descritos como infiltrado intertrabecular de algunos linfomas puede dar lugar a aspirados de sangre medular libres de células patológicas, responsable de la gran mayoría de casos BO+CMF-. Tal y como cabía esperar, nuestros resultados mostraron una concordancia total entre CMF y BO en los casos con infiltración difusa, pero una menor sensibilidad de la CMF cuando la infiltración seguía patrón nodular o intersticial, en la línea de lo que se describe hasta el momento en la literatura.^{218-220,412,417}

Por otro lado, sabemos que la evaluación histológica de la BO en ocasiones puede ser difícil, dada la presencia de agregados linfoides que pueden presentarse en MO normal.^{422,423} Dos pequeños estudios^{217,218} han mostrado que la CMF puede identificar infiltración linfomatosa en estos casos, donde, de acuerdo con nuestros resultados, se muestra un 20 % más de casos con MO infiltrada en los que la histología de BO mostraba agregados linfoides inespecíficos, reforzando en este sentido la importancia de realizar estudio de CMF para la estadificación de LNH.

Una cuestión crucial en los casos discrepantes BO-CMF+, donde hay un nivel de infiltración muy bajo, es saber si esto tiene la misma relevancia clínica y pronóstica que en los casos que se muestra clara infiltración por BO. A pesar de que se ha sugerido que los casos BO-CMF+ y los casos BO-CMF- no difieren en cuanto a su comportamiento clínico,^{141,220} datos más recientes de series largas de pacientes muestran que la positividad de la CMF, aunque sea de forma aislada en las muestras de aspirado de MO, se asocia frecuentemente con enfermedad recurrente o bien con recaída.⁴¹¹ Recientemente *Talaulikar et al.*²¹⁶ han revisado el modelo de IPI en LBDCG de acuerdo con la detección de infiltración medular por estudio de inmunofenotipo, mostrando que esta aproximación da lugar a una mejor diferenciación de categorías IPI y concluyen, que la mejoría en la estadificación de infiltración de MO con el uso de CMF e inmunohistoquímica, mejora el valor predictivo del IPI, y que debe realizarse el estudio por CMF de forma rutinaria en todos los casos de LBDCG. Además, la evidencia del impacto

pronóstico negativo de una enfermedad mínima residual detectable en MO tras tratamiento en SLP,^{151,408,411,424} respalda estos resultados.

En este primer apartado, por tanto, hemos objetivado que la combinación de CMF junto al estudio histológico de BO muestra una interpretación más real del estado de la infiltración de la MO en LNH, ya que ambos procedimientos proporcionan información complementaria, lo que hace interesante que se apliquen conjuntamente de forma rutinaria en los estudios de extensión de LNH. Sin embargo con nuestra serie, debido al bajo número de casos y a la heterogeneidad histológica del grupo de linfomas estudiados, no podemos dar conclusiones definitivas. Estos resultados preliminares aconsejan realizar más estudios para poder conocer con precisión el valor de la CMF, y ver si ambas técnicas son o no complementarias, o bien si la BO puede ser sustituida por la CMF, así como confirmar su implicación pronóstica.

En relación con esta primera observación, desarrollamos nuestro segundo objetivo, en el que nos planteamos si el hecho de realizar múltiple toma de biopsia al diagnóstico (BOB), procedimiento que se llevaba a cabo en nuestro centro de forma habitual en casos indicados, resulta más rentable que una única biopsia y qué papel podría tener este procedimiento de doble toma en la era de la CMF.

En nuestra serie de casos (n=105) observamos una concordancia entre ambas muestras de biopsia estudiadas por histología del 91 %, con concordancia negativa (BO-BO-) en el 73 % de casos y concordancia positiva (BO+BO+) en el 18 % de los casos, encontrando discrepancia de resultados entre ambas biopsias (BO-BO+) en un 9 % de los casos. Por tanto, el uso de doble toma de muestra, sin técnicas complementarias, conseguía detectar infiltración en un 9 % más de casos que una toma única.^{209,212} En este contexto, el uso del estudio inmunofenotípico por CMF de la muestra de aspirado de sangre medular, obtenida del primer punto de punción, consiguió detectar infiltración en el 66 % (6/9) de los casos dados como no infiltrados por ambas biopsias. De este modo, el uso de la CMF reduce el impacto de realizar una segunda biopsia a solo un 3 % de casos que se habrían considerado negativos realizando una única toma de biopsia. El estudio de CMF además permitió detectar infiltración en un 13 % (10/77) de casos considerados como negativos por ambas biopsias, permitiendo por tanto detectar un grupo de pacientes con infiltración medular que no habrían sido detectados con la doble toma de muestra de biopsia. Sin embargo, dentro de los casos con doble muestra positiva para infiltración medular, la CMF no detectó infiltración en un 2 % (3/105) de casos de la serie total. Este hecho podría explicarse, al menos en parte, porque la BO obtiene información sobre un área más amplia de la MO, mientras que los resultados de CMF pueden estar condicionados por el lugar concreto de punción del aspirado medular, que en algunos tipos de patrón de infiltración puede

favorecer un resultado falsamente negativo.^{219,412} El patrón de infiltración medular en cada uno de estos tres casos BO+BO+CMF- fue nodular, intersticial y mixto, acorde con lo que habíamos observado en el desarrollo de nuestro primer objetivo.

Por otro lado, cuando nos centramos en el porcentaje de infiltración detectado por CMF, confirmamos que era menor en los casos BO- BO- CMF+ (10/77), con una mediana de 0,86 (media \pm DS de 2,15 % \pm 2,8), mientras que en los casos BO- BO+ CMF+ (n=6) y BO+ BO+ CMF+ (n=15) la mediana aumentaba a un 2,7 % (media \pm DS de 5,9 % \pm 6,4) y 2,9 % (media \pm DS de 14,86 \pm 22.29), respectivamente. Por tanto, como cabía esperar, los casos que mostraron infiltración histológica de BO, aunque fuese detectado solo en una de las dos muestras histológicas, presentaban mayor grado de infiltración por CMF que aquellos que sólo se detectaron por CMF, lo que demuestra una mayor sensibilidad de esta técnica cuando el grado de infiltración es bajo. Además podríamos plantear, basándonos en estos resultados, que cuando la detección de infiltración por CMF es ≥ 2 % podría sugerirse como infiltrada por BO (ya que la probabilidad de que la 2ª BO tenga un resultado positivo es muy alta).

De acuerdo con nuestros resultados, con el desarrollo de este segundo objetivo vemos como el uso simultáneo del estudio histológico de BO y de CMF mejora la detección de infiltración medular en la estadificación de LNH, haciendo innecesaria la toma de doble muestra de biopsia, con las complicaciones, costes y molestias para el paciente que esto implica. Cabe señalar además, que la reciente incorporación a los laboratorios clínicos de nuevos citómetros de flujo de hasta 8 colores, permitirá incrementar la sensibilidad de la técnica, mejorando también la caracterización del linfocito clonal.

Finalmente, nos planteamos el tercer objetivo dada la alta frecuencia de detección de SLP diagnosticados por estudio rutinario de linfocitosis persistente CD19+CD5+, que no correspondían a LLC, y que frecuentemente, presentan fenotipo compatible con LCM. El interés fundamental era evaluar sus características y comportamiento clínico, en función de los hallazgos del laboratorio clínico-asistencial, ya que los SLP-B con expresión de CD5+ engloban un grupo heterogéneos de enfermedades.^{336,337} Excluyendo la LLC, la siguiente patología más frecuente es el LCM.³³⁸ Sin embargo, sabemos que el diagnóstico no puede estar basado exclusivamente en datos de fenotipo, dado que existen variaciones de fenotipo descritas en más de un 40 % de los LCM.^{285,425} En cuanto a lo que se refiere a la expresión de CD23, algunos datos sugieren que los LCM con CD23+ presentan un comportamiento más leucémico³⁴⁴ y menos agresivo que los CD23-.⁴²⁶ En nuestra serie de casos, seleccionados por positividad para CD19 CD5, independientemente del comportamiento clínico, un 72 % (86/120) presentaban

CD23- y un 28 % (34/120) eran CD23+. El 43 % (52/121) de nuestros pacientes presentaba un comportamiento clínico leucémico y un 57 % (69/121) un comportamiento más linfomatoso; en relación con su comportamiento clínico, un 40 % (20/51) de los casos con comportamiento leucémico era CD23+ y un 60 % (31/51) CD23-, y en los de comportamiento más linfomatoso, la distribución era 20 % (14/69) CD23+ y 80 % (55/69) CD23-; por ello, sí podríamos considerar que entra dentro de lo descrito, siendo relativamente más frecuente cuando se da, la expresión de CD23+ en los casos de LCM con comportamiento más leucémico.

Aunque se indica estudio de biopsia ganglionar para el diagnóstico de LCM (definido histológicamente por sobreexpresión de ciclina D1),¹ en ocasiones puede no ser posible disponer de este tejido, dada la forma clínica de presentación del linfoma (con esplenomegalia o bien leucémica),^{282,427} o bien cuando nos encontramos con un paciente de avanzada edad, siendo fundamental en estos casos, basar el diagnóstico en un estudio combinado de morfología, inmunofenotipo y en la detección de t(11;14), bien en células de SP o en aspirado medular.

Obviamente, determinar la presencia de ciclina D1 es más complicado en las células circulantes de SP, dado que no disponemos de un marcador adecuado para detectar su expresión por CMF, y dadas las limitaciones evidentes para su estudio por inmunohistoquímica al tratarse de un tejido líquido. Por ello, nos planteamos revisar en nuestro laboratorio dentro de esta serie de casos, qué técnica es la más adecuada para detectar la presencia de t(11;14) en función de los estudios disponibles en rutina, y tal y como ya se ha descrito previamente, resultó ser la técnica de FISH.⁴²⁸ En relación con nuestros resultados, podríamos considerar el realizar estudio de t(11;14)/bcl-1 por BM (PCR), para completar un estudio con alta sospecha de LCM en el que tengamos un resultado negativo por FISH, aunque sabemos que no es un procedimiento tan útil dadas las limitaciones técnicas.²⁷⁹ Aún así, debemos tener en cuenta que un resultado negativo de t(11;14) no significa que no nos encontremos ante un posible LCM, ya que se han descrito casos de LCM negativos para el estudio convencional de t(11;14).⁴²⁹

En nuestra serie, la t(11;14) resultó positiva en el 50 % de los casos (61/121) al menos por una de las tres técnicas (cariotipo, FISH y/o BM). Según lo descrito hasta el momento actual, los casos de LCM ciclina D1 negativo son clínicamente similares a los ciclina D1 positivos.^{429,430} El reconocimiento de los LCM ciclina D1 negativos resulta realmente complicada dado que morfológicamente se asemejan a otros linfomas B de célula pequeña, y su fenotipo se puede solapar. De acuerdo con nuestros hallazgos, la mayoría de los casos con t(11;14) positiva (n=61) presentaba un comportamiento más linfomatoso (47/61) en relación a los casos

t(11;14) negativos (n=60) y no encontramos diferencias significativas en cuanto a la agresividad en función de la presencia o ausencia de t(11;14).²⁸²

Hasta el momento actual, no se conocen con claridad los mecanismos responsables del comportamiento más agresivo o más indolente de los LCM, aunque existen estudios que comparan casos de enfermedad indolente no nodal y casos clásicos de LCM, que muestran ciertas diferencias genómicas, como la pérdida de 8p, que es mucho más común en los LCM leucémicos,⁴³¹ así como una menor frecuencia de cariotipos complejos asociados a la t(11;14). También se describe la presencia de hipermutación IGHV en los casos leucémicos, que sugiere un origen celular con fuerte influencia del microambiente centro-germinal, a diferencia del LCM convencional, en el que es menos frecuente que se dé mutación de IGHV.⁴³² Sin embargo, en este sentido, el estudio del estado de hipermutación de IGHV estaba disponible solo en un 15% de los casos estudiados, por lo que no disponemos de datos suficientes para establecer resultados concluyentes en este sentido, pero observamos tendencia a una mayor presencia de hipermutación IGHV en los casos con presentación leucémica (54% de casos mutados), a diferencia de los casos con comportamiento de LNH (40% de casos mutados).

Por otro lado la variante blástica del LCM se considera que representa una posible transformación de una forma clásica de LCM,⁴³³ y como rasgo diferencial, muestra alto índice mitótico con frecuente cariotipo complejo y una importante inestabilidad genómica, aunque a pesar de esto, no existen en el momento actual test moleculares específicos que nos permitan identificarlos.

Reconocer qué LCM presentará un comportamiento indolente y diferenciarlo de otros SLP CD5+ cuando la t(11;14) no está presente, es difícil, pero la combinación de aspectos clínicos y biológicos puede ser de gran utilidad para su identificación. Consecuentemente, las decisiones terapéuticas deben estar basadas en el comportamiento clínico, la situación del paciente, el diagnóstico histológico y su estudio genético/molecular.

Debemos tener en cuenta la alta variabilidad genética responsable de la patogénesis de los LCM t(11;14) negativos, que implican una dificultad añadida para reconocerlos adecuadamente. Aunque en ocasiones es posible establecer un diagnóstico certero con muestras tisulares extranodales, recomendamos que todos los pacientes, siempre que sea posible, se diagnostiquen por biopsia tisular adecuada para establecer un diagnóstico definitivo previo a inicio de tratamiento. Como técnica complementaria, la FISH es la más adecuada en el estudio de t(11;14) como ya se ha descrito, aunque estudios complementarios por BM pueden ser necesarios cuando la sospecha es alta y el resultado de FISH es negativo. A pesar de que casos con fenotipo CD5+ compatibles con LCM se

detectan con frecuencia en el laboratorio clínico-asistencial, la t(11,14) (q13;q32) se detecta en un 50 % de pacientes según nuestra serie, y tanto los casos t(11,14) positivos como los negativos, pueden presentar un comportamiento indolente o agresivo, requiriendo en el segundo caso, un inicio precoz de tratamiento.

Conclusiones

CONCLUSIONES

En relación con el valor del estudio simultáneo de MO mediante CMF y BO en pacientes con LNH:

- La CMF muestra alta concordancia con la citología y la histología en el diagnóstico de infiltración linfomatosa de MO. Además, la información que proporciona es complementaria y mejora la capacidad diagnóstica de ambos métodos convencionales. Nuestros datos apoyan el uso sistemático de la CMF en el diagnóstico inicial y en la evaluación pos-tratamiento para la estadificación de linfomas a la hora de establecer infiltración medular.
- La CMF detecta, especialmente en algunos subtipos histológicos de linfoma, un subgrupo de pacientes con infiltración medular en los que la BO es negativa. Sin embargo, para poder establecer el valor pronóstico de la infiltración medular en los casos BO- CMF+, se requiere confirmación con estudios que incluyan un mayor número de casos que hayan sido tratados de forma homogénea.

En relación con el valor de la BOB en la era de la CMF, como técnica de análisis de rutina en la estadificación de los LNH, y su aportación comparada con el empleo simultáneo de la BOU y la CMF:

- El empleo simultáneo de la CMF y BOU permite mejorar de forma significativa el rendimiento del estudio de estadificación de los LNH, haciendo no rentable realizar BOB, dadas las complicaciones, costes y molestias para el paciente que esto implica.
- La detección de más de un 2% de células clonales mediante CMF de cuatro colores se correlaciona, casi siempre (81% de los casos), con infiltración linfomatosa por histología. Sin embargo, niveles inferiores de enfermedad (<2%) presentan un grado de positividad histológica menor (56%).

En relación los síndromes linfoproliferativos crónicos CD5+ no LLC, con fenotipo compatible con linfoma del manto:

- En nuestra serie de casos solo el 50% de los pacientes con fenotipo de Linfoma del Manto presentan la t(11;14) (q13;q32) y su presencia no se correlaciona con el curso indolente o agresivo de la enfermedad.
- Confirmamos que la FISH es la técnica más adecuada para el estudio de t(11;14)(q13;q32), aunque estudios complementarios por BM pueden ser de utilidad cuando la sospecha de LCM es alta y el resultado de FISH es negativo ($\approx 10\%$; 5/61).

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Swerdlow SH CE, Seto M, Muller-Hermelink HK. Mantle cell lymphoma. In: Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, in Tissues eWCoToHaL (ed): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France, IARC, 2008, pp 229-232
2. Ravandi F, O'Brien S: Chronic lymphoid leukemias other than chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 80:1660-74, 2005
3. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al: World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17:3835-49, 1999
4. Campana D, Janossy G, Bofill M, et al: Human B cell development. I. Phenotypic differences of B lymphocytes in the bone marrow and peripheral lymphoid tissue. *J Immunol* 134:1524-30, 1985
5. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, et al: Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 70:1316-24, 1987
6. Loken MR, Shah VO, Hollander Z, et al: Flow cytometric analysis of normal B lymphoid development. *Pathol Immunopathol Res* 7:357-70, 1988
7. Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, et al: BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. *Leukemia* 15:1185-92, 2001
8. Schebesta M, Heavey B, Busslinger M: Transcriptional control of B-cell development. *Curr Opin Immunol* 14:216-23, 2002
9. Souabni A, Cobaleda C, Schebesta M, et al: Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* 17:781-93, 2002
10. van Zelm MC, van der Burg M, de Ridder D, et al: Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. *J Immunol* 175:5912-22, 2005
11. Hagman J, Lukin K: Transcription factors drive B cell development. *Curr Opin Immunol* 18:127-34, 2006
12. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, 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* 60:1-13, 2004
13. Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Lucio P, 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* 14:816-25, 2000
14. Spits H, Lanier LL, Phillips JH: Development of human T and natural killer cells. *Blood* 85:2654-70, 1995

15. Spits H, Blom B, Jaleco AC, et al: Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol Rev* 165:75-86, 1998
16. Lima M, Almeida J, Teixeira MA, et al: Reactive phenotypes after acute and chronic NK-cell activation. *J Biol Regul Homeost Agents* 18:331-4, 2004
17. Nagasawa T: Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 6:107-16, 2006
18. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG: Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 23:487-513, 2005
19. Allen CD, Okada T, Cyster JG: Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27:190-202, 2007
20. Espeli M, Rossi B, Mancini SJ, et al: Initiation of pre-B cell receptor signaling: common and distinctive features in human and mouse. *Semin Immunol* 18:56-66, 2006
21. Acosta-Rodriguez EV, Merino MC, Montes CL, et al: Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytokine Growth Factor Rev* 18:73-83, 2007
22. Egawa T, Kawabata K, Kawamoto H, et al: The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity* 15:323-34, 2001
23. Stoddart A, Ray RJ, Paige CJ: Analysis of murine CD22 during B cell development: CD22 is expressed on B cell progenitors prior to IgM. *Int Immunol* 9:1571-9, 1997
24. Zhu J, Garrett R, Jung Y, et al: Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* 109:3706-12, 2007
25. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, et al: Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20:707-18, 2004
26. Pelayo R, Welner RS, Nagai Y, et al: Life before the pre-B cell receptor checkpoint: specification and commitment of primitive lymphoid progenitors in adult bone marrow. *Semin Immunol* 18:2-11, 2006
27. Hillion S, Rochas C, Youinou P, et al: Signaling pathways regulating RAG expression in B lymphocytes. *Autoimmun Rev* 8:599-604, 2009
28. Cambier JC: Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* 155:3281-5, 1995
29. Loffert D, Ehlich A, Muller W, et al: Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development. *Immunity* 4:133-44, 1996
30. Hess J, Werner A, Wirth T, et al: Induction of pre-B cell proliferation after de novo synthesis of the pre-B cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1745-50, 2001
31. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, et al: Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 105:4390-8, 2005
32. Lee J, Kuchen S, Fischer R, et al: Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population. *J Immunol* 182:4116-26, 2009

33. Suryani S, Fulcher DA, Santner-Nanan B, et al: Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood* 115:519-29, 2010
34. Caraux A, Klein B, Paiva B, et al: Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica* 95:1016-20, 2010
35. Radic MZ, Zouali M: Receptor editing, immune diversification, and self-tolerance. *Immunity* 5:505-11, 1996
36. Chen C, Prak EL, Weigert M: Editing disease-associated autoantibodies. *Immunity* 6:97-105, 1997
37. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, et al: Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom* 78 Suppl 1:S47-60, 2010
38. Allen CD, Ansel KM, Low C, et al: Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5:943-52, 2004
39. Hennino A, Berard M, Krammer PH, et al: FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med* 193:447-58, 2001
40. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al: Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2639-44, 2003
41. Allen CD, Cyster JG: Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol* 20:14-25, 2008
42. Park CS, Yoon SO, Armitage RJ, et al: Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *J Immunol* 173:6676-83, 2004
43. Yoon SO, Zhang X, Berner P, et al: Notch ligands expressed by follicular dendritic cells protect germinal center B cells from apoptosis. *J Immunol* 183:352-8, 2009
44. Good KL, Avery DT, Tangye SG: Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol* 182:890-901, 2009
45. Lampert IA, Van Noorden S, Wotherspoon AC: Centrocytoid plasma cells of the germinal center. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13:124-31, 2005
46. Gonzalez-Garcia I, Ocana E, Jimenez-Gomez G, et al: Immunization-induced perturbation of human blood plasma cell pool: progressive maturation, IL-6 responsiveness, and high PRDI-BF1/BLIMP1 expression are critical distinctions between antigen-specific and nonspecific plasma cells. *J Immunol* 176:4042-50, 2006
47. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R: Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188:1679-89, 1998
48. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Pathol* 42:567-84, 1989
49. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al: The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 8:1640-5, 1994

50. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, et al: The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood* 83:1558-62, 1994
51. Montserrat E: Chronic lymphoproliferative disorders. *Curr Opin Oncol* 9:34-41, 1997
52. Deneys V, Mazzon AM, Marques JL, et al: Reference values for peripheral blood B-lymphocyte subpopulations: a basis for multiparametric immunophenotyping of abnormal lymphocytes. *J Immunol Methods* 253:23-36, 2001
53. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, et al: The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma* 14 Suppl 1:57-61, 1994
54. Matutes E: Contribution of immunophenotype in the diagnosis and classification of haemopoietic malignancies. *J Clin Pathol* 48:194-7, 1995
55. Ciudad J, Orfao A, Vidriales B, et al: Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. *Haematologica* 83:1069-75, 1998
56. Dworzak MN, Fritsch G, Froschl G, et al: Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. *Blood* 92:3203-9, 1998
57. Weir EG, Cowan K, LeBeau P, et al: A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for residual disease detection. *Leukemia* 13:558-67, 1999
58. Fecteau JF, Cote G, Neron S: A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol* 177:3728-36, 2006
59. Erazo A, Kutchukhidze N, Leung M, et al: Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity* 26:191-203, 2007
60. Achatz-Straussberger G, Zaborsky N, Konigsberger S, et al: Limited humoral immunoglobulin E memory influences serum immunoglobulin E levels in blood. *Clin Exp Allergy* 39:1307-13, 2009
61. Rakhmanov M, Keller B, Gutenberger S, et al: Circulating CD21low B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13451-6, 2009
62. Tokoyoda K, Zehentmeier S, Chang HD, et al: Organization and maintenance of immunological memory by stroma niches. *Eur J Immunol* 39:2095-9, 2009
63. Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IM, et al: Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 76:1739-47, 1990
64. Harada H, Kawano MM, Huang N, et al: Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 81:2658-63, 1993
65. Guikema JE, Hovenga S, Vellenga E, et al: CD27 is heterogeneously expressed in multiple myeloma: low CD27 expression in patients with high-risk disease. *Br J Haematol* 121:36-43, 2003

66. Menendez P, Vargas A, Bueno C, et al: Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. *Leukemia* 18:491-8, 2004
67. Vescio RA, Hong CH, Cao J, et al: The hematopoietic stem cell antigen, CD34, is not expressed on the malignant cells in multiple myeloma. *Blood* 84:3283-90, 1994
68. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, et al: Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 152:1655-65, 1998
69. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, et al: Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* 105:1614-21, 2005
70. Mei HE, Yoshida T, Sime W, et al: Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood* 113:2461-9, 2009
71. Gonzalez-Garcia I, Rodriguez-Bayona B, Mora-Lopez F, et al: Increased survival is a selective feature of human circulating antigen-induced plasma cells synthesizing high-affinity antibodies. *Blood* 111:741-9, 2008
72. Agematsu K: Memory B cells and CD27. *Histol Histopathol* 15:573-6, 2000
73. Stetler-Stevenson M, Braylan RC: Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol* 38:111-23, 2001
74. Trentin L, Zambello R, Sancetta R, et al: B lymphocytes from patients with chronic lymphoproliferative disorders are equipped with different costimulatory molecules. *Cancer Res* 57:4940-7, 1997
75. Cariappa A, Pillai S: Antigen-dependent B-cell development. *Curr Opin Immunol* 14:241-9, 2002
76. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, et al: Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341:1520-9, 1999
77. Bleul CC, Schultze JL, Springer TA: B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. *J Exp Med* 187:753-62, 1998
78. Heinonen KM, Perreault C: Development and functional properties of thymic and extrathymic T lymphocytes. *Crit Rev Immunol* 28:441-66, 2008
79. Wu L: T lineage progenitors: the earliest steps en route to T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 18:121-6, 2006
80. de la Hera A, Acevedo A, Marston W, et al: Function of CD44(Pgp-1) homing receptor in human T cell precursors. *Int Immunol* 1:598-604, 1989
81. Marquez C, Trigueros C, Fernandez E, et al: The development of T and non-T cell lineages from CD34+ human thymic precursors can be traced by the differential expression of CD44. *J Exp Med* 181:475-83, 1995
82. Schuurman HJ, van Wichen D, de Weger RA: Expression of activation antigens on thymocytes in the 'common thymocyte' stage of differentiation. *Thymus* 14:43-53, 1989

83. Kasinrerker W, Majdic O, Praputpittaya K, et al: Enhancement of human lymphocyte proliferative response to purified protein derivative by an anti-interleukin-2 receptor alpha chain antibody (CD25). *Immunology* 83:33-7, 1994
84. Sotzik F, Boyd A, Shortman K: Surface antigens of human thymocyte populations defined by CD3, CD4 and CD8 expression: CD1a is expressed by mature thymocytes but not peripheral T cells. *Immunol Lett* 36:101-6, 1993
85. Michie CA, McLean A, Alcock C, et al: Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 360:264-5, 1992
86. Sallusto F, Lenig D, Forster R, et al: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-12, 1999
87. Lima M, Almeida J, dos Anjos Teixeira M, et al: The "ex vivo" patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states. *Blood Cells Mol Dis* 28:181-90, 2002
88. Lima M, Teixeira Mdos A, Queiros ML, et al: Immunophenotype and TCR-Vbeta repertoire of peripheral blood T-cells in acute infectious mononucleosis. *Blood Cells Mol Dis* 30:1-12, 2003
89. Laky K, Fleischacker C, Fowlkes BJ: TCR and Notch signaling in CD4 and CD8 T-cell development. *Immunol Rev* 209:274-83, 2006
90. Loza MJ, Luppi P, Kiefer K, et al: Human peripheral CD2-/lo T cells: an extrathymic population of early differentiated, developing T cells. *Int Immunol* 17:1213-25, 2005
91. Appay V: The physiological role of cytotoxic CD4(+) T-cells: the holy grail? *Clin Exp Immunol* 138:10-3, 2004
92. van Bergen J, Thompson A, van der Slik A, et al: Phenotypic and functional characterization of CD4 T cells expressing killer Ig-like receptors. *J Immunol* 173:6719-26, 2004
93. Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, et al: Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood* 101:2686-92, 2003
94. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, et al: CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101:3052-7, 2003
95. Caligiuri MA: Human natural killer cells. *Blood* 112:461-9, 2008
96. Lanier LL, Le AM, Civin CI, et al: The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136:4480-6, 1986
97. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, et al: The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 172:1455-62, 2004
98. Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S, et al: A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* 22:295-304, 2005
99. Mattei F, Schiavoni G, Belardelli F, et al: IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J Immunol* 167:1179-87, 2001

100. Mrozek E, Anderson P, Caligiuri MA: Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87:2632-40, 1996
101. Bennett IM, Zatsepina O, Zamai L, et al: Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12. *J Exp Med* 184:1845-56, 1996
102. Freud AG, Yokohama A, Becknell B, et al: Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med* 203:1033-43, 2006
103. Lima M, Teixeira MA, Queiros ML, et al: Immunophenotypic characterization of normal blood CD56+lo versus CD56+hi NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties. *Blood Cells Mol Dis* 27:731-43, 2001
104. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, et al: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97:3146-51, 2001
105. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, et al: CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 31:3121-7, 2001
106. Barrena S, Almeida J, Del Carmen Garcia-Macias M, et al: Flow cytometry immunophenotyping of fine-needle aspiration specimens: utility in the diagnosis and classification of non-Hodgkin lymphomas. *Histopathology* 58:906-18, 2011
107. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, et al: A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 111:558-65, 2008
108. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, et al: Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 104:1258-65, 2004
109. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 329:987-94, 1993
110. Klapper W, Hoster E, Determann O, et al: Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop* 2:103-11, 2009
111. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al: The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 109:1857-61, 2007
112. Gallamini A, Stelitano C, Calvi R, et al: Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood* 103:2474-9, 2004
113. Gutierrez-Garcia G, Garcia-Herrera A, Cardesa T, et al: Comparison of four prognostic scores in peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol* 22:397-404, 2011
114. Tatsumi J, Tatsumi Y, Tatsumi N: Counting and differential of bone marrow cells by an electronic method. *Am J Clin Pathol* 86:50-4, 1986
115. d'Onofrio G, Kim YR, Schulze S, et al: Evaluation of the Abbott Cell Dyn 4000 automated fluorescent reticulocyte measurements: comparison with manual, FACSscan and Sysmex R1000 methods. *Clin Lab Haematol* 19:253-60, 1997
116. Das DK: Value and limitations of fine-needle aspiration cytology in diagnosis and classification of lymphomas: A review. *Diagn Cytopathol* 21:240-9, 1999

117. Sandhaus LM: Fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of lymphoma. The next step. *Am J Clin Pathol* 113:623-7, 2000
118. Mourad WA, Tulbah A, Shoukri M, et al: Primary diagnosis and REAL/WHO classification of non-Hodgkin's lymphoma by fine-needle aspiration: cytomorphologic and immunophenotypic approach. *Diagn Cytopathol* 28:191-5, 2003
119. Mori Y, Mizukami T, Hamaguchi Y, et al: Automation of bone marrow aspirate examination using the XE-2100 automated hematology analyzer. *Cytometry B Clin Cytom* 58:25-31, 2004
120. Kickler TS: Clinical analyzers. *Advances in automated cell counting. Anal Chem* 71:363R-365R, 1999
121. Meusers P, Brittinger G: [R.E.A.L. classification of non-Hodgkin lymphoma from the clinico-oncologic viewpoint]. *Praxis (Bern)* 87:793-800, 1998
122. Little JV, Foucar K, Horvath A, et al: Flow cytometric analysis of lymphoma and lymphoma-like disorders. *Semin Diagn Pathol* 6:37-54, 1989
123. Orfao A, Schmitz G, Brando B, et al: Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clin Chem* 45:1708-17, 1999
124. Basso G, Buldini B, De Zen L, et al: New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica* 86:675-92, 2001
125. Davis BH, Holden JT, Bene MC, et al: 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. *Cytometry B Clin Cytom* 72 Suppl 1:S5-13, 2007
126. Craig FE, Foon KA: Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 111:3941-67, 2008
127. D'Ostilio A, Ginaldi L, Marini L, et al: [Clinical uses of flow cytometry in hematological oncology]. *Recenti Prog Med* 88:157-65, 1997
128. Kaleem Z: Flow cytometric analysis of lymphomas: current status and usefulness. *Arch Pathol Lab Med* 130:1850-8, 2006
129. Cady FM, Morice WG: Flow cytometric assessment of T-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Med* 27:513-32, vi, 2007
130. Demurtas A, Accinelli G, Pacchioni D, et al: Utility of flow cytometry immunophenotyping in fine-needle aspirate cytologic diagnosis of non-Hodgkin lymphoma: A series of 252 cases and review of the literature. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 18:311-22, 2010
131. Quijano S, Lopez A, Manuel Sancho J, et al: Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol* 27:1462-9, 2009
132. Vidriales MB, Perez JJ, Lopez-Berges MC, et al: Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value. *Blood* 101:4695-700, 2003
133. Orfao A, Ciudad J, Lopez-Berges MC, et al: Acute lymphoblastic leukemia (ALL): detection of minimal residual disease (MRD) at flow cytometry. *Leuk Lymphoma* 13 Suppl 1:87-90, 1994

134. Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, et al: Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 25:567-74, 2011
135. Hernandez-Campo PM, Almeida J, Acevedo MJ, et al: Detailed immunophenotypic characterization of different major and minor subsets of peripheral blood cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transfusion* 48:1403-14, 2008
136. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, et al: Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 94:1124-34, 2009
137. Escribano L, Diaz-Agustin B, Lopez A, et al: Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: When and how to do it. Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom* 58:1-8, 2004
138. Escribano L, Garcia Montero AC, Nunez R, et al: Flow cytometric analysis of normal and neoplastic mast cells: role in diagnosis and follow-up of mast cell disease. *Immunol Allergy Clin North Am* 26:535-47, 2006
139. Alexander HD, Markey GM, Morris TC: Diagnostic value of clonality of surface immunoglobulin light and heavy chains in malignant lymphoproliferative disorders. *Am J Hematol* 46:256, 1994
140. Bellido M, Rubiol E, Ubeda J, et al: Rapid and simple immunophenotypic characterization of lymphocytes using a new test. *Haematologica* 83:681-5, 1998
141. Perea G, Altes A, Bellido M, et al: Clinical utility of bone marrow flow cytometry in B-cell non-Hodgkin lymphomas (B-NHL). *Histopathology* 45:268-74, 2004
142. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al: Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17:2257-317, 2003
143. Langerak AW, Groenen PJ, Bruggemann M, et al: EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 26:2159-71, 2012
144. van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA, et al: Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 21:201-6, 2007
145. Evans PA, Pott C, Groenen PJ, et al: Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 21:207-14, 2007
146. Sanchez ML, Almeida J, Vidriales B, 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* 16:1460-9, 2002
147. Costa ES, Arroyo ME, Pedreira CE, et al: A new automated flow cytometry data analysis approach for the diagnostic screening of neoplastic B-cell disorders in peripheral blood samples with absolute lymphocytosis. *Leukemia* 20:1221-30, 2006
148. Montillo M, Schinkoethe T, Elter T: 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* 23:488-96, 2005

149. Vuillier F, Claisse JF, Vandenvelde C, et al: Evaluation of residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients in clinical and bone-marrow remission using CD5-CD19 markers and PCR study of gene rearrangements. *Leuk Lymphoma* 7:195-204, 1992

150. Sausville JE, Salloum RG, Sorbara L, et al: Minimal residual disease detection in hairy cell leukemia. Comparison of flow cytometric immunophenotyping with clonal analysis using consensus primer polymerase chain reaction for the heavy chain gene. *Am J Clin Pathol* 119:213-7, 2003

151. Bottcher S, Ritgen M, Buske S, et al: Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: methods and significance of four-color flow cytometry compared to consensus IGH-polymerase chain reaction at initial staging and for follow-up examinations. *Haematologica* 93:551-9, 2008

152. Sanchez ML, Almeida J, Gonzalez D, et al: Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* 102:2994-3002, 2003

153. Ortonne N, Buyukbabani N, Delfau-Larue MH, et al: Value of the CD8-CD3 ratio for the diagnosis of mycosis fungoides. *Mod Pathol* 16:857-62, 2003

154. Jamal S, Picker LJ, Aquino DB, et al: Immunophenotypic analysis of peripheral T-cell neoplasms. A multiparameter flow cytometric approach. *Am J Clin Pathol* 116:512-26, 2001

155. Matutes E, Catovsky D: Classification of mature T-cell leukemias. *Leukemia* 17:1682-3; author reply 1683, 2003

156. Lima M, Almeida J, dos Anjos Teixeira M, et al: Utility of flow cytometry immunophenotyping and DNA ploidy studies for diagnosis and characterization of blood involvement in CD4+ Sezary's syndrome. *Haematologica* 88:874-87, 2003

157. Vallejo AN: Age-dependent alterations of the T cell repertoire and functional diversity of T cells of the aged. *Immunol Res* 36:221-8, 2006

158. Khan N, Shariff N, Cobbold M, et al: Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol* 169:1984-92, 2002

159. Kovaiou RD, Weiskirchner I, Keller M, et al: Age-related differences in phenotype and function of CD4+ T cells are due to a phenotypic shift from naive to memory effector CD4+ T cells. *Int Immunol* 17:1359-66, 2005

160. Rockman SP: Determination of clonality in patients who present with diagnostic dilemmas: a laboratory experience and review of the literature. *Leukemia* 11:852-62, 1997

161. Hu H, Queiro MR, Tilanus MG, et al: Expression of T-cell receptor alpha and beta variable genes in normal and malignant human T cells. *Br J Haematol* 84:39-48, 1993

162. Langerak AW, van Den Beemd R, Wolvers-Tettero IL, et al: Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalphabeta T-cell proliferations. *Blood* 98:165-73, 2001

163. Lima M, Almeida J, Santos AH, et al: Immunophenotypic analysis of the TCR-Vbeta repertoire in 98 persistent expansions of CD3(+)/TCR-alphabeta(+) large

granular lymphocytes: utility in assessing clonality and insights into the pathogenesis of the disease. *Am J Pathol* 159:1861-8, 2001

164. Sandberg Y, Almeida J, Gonzalez M, et al: TCRgammadelta+ large granular lymphocyte leukemias reflect the spectrum of normal antigen-selected TCRgammadelta+ T-cells. *Leukemia* 20:505-13, 2006

165. Salameire D, Solly F, Fabre B, et al: Accurate detection of the tumor clone in peripheral T-cell lymphoma biopsies by flow cytometric analysis of TCR-Vbeta repertoire. *Mod Pathol* 25:1246-57, 2012

166. van den Beemd R, Boor PP, van Lochem EG, et al: Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls. *Cytometry* 40:336-45, 2000

167. Geursen A, Skinner MA, Townsend LA, et al: Population study of T cell receptor V beta gene usage in peripheral blood lymphocytes: differences in ethnic groups. *Clin Exp Immunol* 94:201-7, 1993

168. McLean-Tooke A, Barge D, Spickett GP, et al: T cell receptor Vbeta repertoire of T lymphocytes and T regulatory cells by flow cytometric analysis in healthy children. *Clin Exp Immunol* 151:190-8, 2008

169. Posnett DN, Sinha R, Kabak S, et al: Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J Exp Med* 179:609-18, 1994

170. Shimomura T, Fujimura K, Takafuta T, et al: Oligoclonal accumulation of T cells in peripheral blood from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 95:732-7, 1996

171. Direskeneli H, Eksioglu-Demiralp E, Kibaroglu A, et al: Oligoclonal T cell expansions in patients with Behcet's disease. *Clin Exp Immunol* 117:166-70, 1999

172. Bristeau-Leprince A, Mateo V, Lim A, et al: Human TCR alpha/beta+ CD4-CD8- double-negative T cells in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome express restricted Vbeta TCR diversity and are clonally related to CD8+ T cells. *J Immunol* 181:440-8, 2008

173. Okajima M, Wada T, Nishida M, et al: Analysis of T cell receptor Vbeta diversity in peripheral CD4 and CD8 T lymphocytes in patients with autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 155:166-72, 2009

174. Boudewijns M, van Dongen JJ, Langerak AW: The human androgen receptor X-chromosome inactivation assay for clonality diagnostics of natural killer cell proliferations. *J Mol Diagn* 9:337-44, 2007

175. Kim HS, Kim KH, Chang MH, et al: Whole blood Epstein-Barr virus DNA load as a diagnostic and prognostic surrogate: extranodal natural killer/T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 50:757-63, 2009

176. Zambello R, Falco M, Della Chiesa M, et al: Expression and function of KIR and natural cytotoxicity receptors in NK-type lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes. *Blood* 102:1797-805, 2003

177. Epling-Burnette PK, Painter JS, Chaurasia P, et al: Dysregulated NK receptor expression in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood* 103:3431-9, 2004

178. Fischer L, Hummel M, Burmeister T, et al: Skewed expression of natural-killer (NK)-associated antigens on lymphoproliferations of large granular lymphocytes (LGL). *Hematol Oncol* 24:78-85, 2006

179. Yonescu R, Hristov AC, Ahmad A, et al: Cytogenetic characterization of natural killer cell leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 183:125-30, 2008
180. Gattazzo C, Teramo A, Miorin M, et al: Lack of expression of inhibitory KIR3DL1 receptor in patients with natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Haematologica* 95:1722-9, 2010
181. Wintrobe MM: *Hematology, the blossoming of a science : a story of inspiration and effort*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1985
182. Sebastian A: *A dictionary of the history of medicine*. New York, Parthenon Pub. Group, 1999
183. Ghedini G: Per la patogenesi e per la diagnosi delle malattie del sangue e degli organi emopoietici, punture esplorativa del midollo osseo. *Clinic Medica Italiana* 47:724-736, 1908
184. Morris LF, EH: Intravital bone marrow studies II. Survey of the clinical field. *Archives of Internal Medicine* 30:490-506, 1922
185. Seyfarth C: Eine einfache methode zur diagnostischen Entnahme von knochenmark beim lebenden. *Arch fur Schiffs-und Tropen-Hygiene, Pathologie und therapie exotischer Krankheiten* 26:337-341, 1922
186. Anirkin MI: Die Intravitale Untersuchungsmethodik des Knochenmarks. *Folia Haematologica* 38: 233-240., 1929
187. Peabody FW: Pathology of bone marrow in pernicious anaemia . *American Journal of Pathology* 3:179-202, 1927
188. Arjeff MJ: Zur Methodik der Diagnostischen Punktion des Brustbeines. *Folia Haematologica* 45:55, 1931
189. Grunke W: Der Diagnostische Wert der Sternalpunktion . *Medizinische Klinik* 34:1295, 1938
190. Custer RPA, F.E. : Studies on the structure and function of bone marrow. II. Variations in cellularity in various bones with advancing years of life and their relative response to stimuli. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine* 17: 960, 1932
191. Klima RR, H. : Zur methodik der diagnostischen sternalpunktion. *Klinische Wochenschrift* 14:541-542, 1935
192. Leitner SI: *Bone marrow biopsy* (ed [1st English]). New York,, Grune & Stratton, 1949
193. Henning NK, J.: Die diagnostische sternaspulung. *Klinische Wochenschrift* 13: 1219, 1934
194. Whitby LEH, Britton CJC: *Disorders of the blood; diagnosis, pathology, treatment, technique* (ed 6th). Philadelphia,, Blakiston, 1950
195. Turkel HB, F.H.: Biopsy of the bone marrow performed by a new and simple instrument. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 28 46-51, 1943
196. Rubinstein MA: The technic and diagnostic value of aspiration of bone marrow from the iliac crest. *Ann Intern Med* 32:1095-8, 1950

197. Bierman HR: Bone marrow aspiration of the posterior iliac crest, an additional safe site. *California Medicine* **77**,: 138–139, 1952
198. Sacker LS, Nordin BE: A simple bone biopsy needle. *Lancet* 266:347, 1954
199. McFarland WD, W. : Biopsy of the bone marrow with the Vim-Silverman needle. *Journal of the American Medical Association* 166:1464–1466., 1958
200. Silverman I: Improved Vim-Silverman biopsy needle. *J Am Med Assoc* 155:1060-1, 1954
201. Ellis LDW, P.W.: Needle biopsy of the bone marrow. *Archives of Internal Medicine* 114 213–221, 1964
202. Bordier P, Matrajt H, Miravet L, et al: [Histological Measure of the Volume and Resorption of Bone Joints]. *Pathol Biol (Paris)* 12:1238-43, 1964
203. Parapia LA: Trepanning or trephines: a history of bone marrow biopsy. *Br J Haematol* 139:14-9, 2007
204. Jamshidi K, Windschitl HE, Swaim WR: A new biopsy needle for bone marrow. *Scand J Haematol* 8:69-71, 1971
205. Burkhardt R: Bone marrow and bone tissue; color atlas of clinical histopathology. Berlin, New York,, Springer-Verlag, 1971
206. Islam A: A new bone marrow biopsy needle with core securing device. *J Clin Pathol* 35:359-64, 1982
207. Voigt J, Mosier M: A powered bone marrow biopsy system versus manual methods: a systematic review and meta-analysis of randomised trials. *J Clin Pathol* 66:792-6, 2013
208. Brunning RD, Bloomfield CD, McKenna RW, et al: Bilateral trephine bone marrow biopsies in lymphoma and other neoplastic diseases. *Annals of internal medicine* 82:365-6, 1975
209. Juneja SK, Wolf MM, Cooper IA: Value of bilateral bone marrow biopsy specimens in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol* 43:630-2, 1990
210. Luoni M, Fava S, Declich P: Bone marrow biopsy for staging Hodgkin's lymphoma: the value of bilateral or unilateral trephine biopsy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 14:682-3, 1996
211. Bain BJ: Bone marrow trephine biopsy. *J Clin Pathol* 54:737-42, 2001
212. Wang J, Weiss LM, Chang KL, et al: Diagnostic utility of bilateral bone marrow examination: significance of morphologic and ancillary technique study in malignancy. *Cancer* 94:1522-31, 2002
213. Ebie N, Loew JM, Gregory SA: Bilateral trephine bone marrow biopsy for staging non-Hodgkin's lymphoma--a second look. *Hematologic pathology* 3:29-33, 1989
214. Campbell JK, Matthews JP, Seymour JF, et al: Optimum trephine length in the assessment of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma. *Ann Oncol* 14:273-6, 2003
215. Budde R, Schaefer HE: [Value of "non-specific" lymphoid infiltrates in bone marrow in high grade malignant peripheral non-Hodgkin's lymphomas]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 76:136-9, 1992

216. Talaulikar D, Shadbolt B, Dahlstrom JE, et al: Routine use of ancillary investigations in staging diffuse large B-cell lymphoma improves the International Prognostic Index (IPI). *J Hematol Oncol* 2:49, 2009
217. Palacio C, Acebedo G, Navarrete M, et al: Flow cytometry in the bone marrow evaluation of follicular and diffuse large B-cell lymphomas. *Haematologica* 86:934-40, 2001
218. Sah SP, Matutes E, Wotherspoon AC, et al: A comparison of flow cytometry, bone marrow biopsy, and bone marrow aspirates in the detection of lymphoid infiltration in B cell disorders. *J Clin Pathol* 56:129-32, 2003
219. Stacchini A, Demurtas A, Godio L, et al: Flow cytometry in the bone marrow staging of mature B-cell neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom* 54:10-8, 2003
220. Mancuso P, Calleri A, Antoniotti P, et al: If it is in the marrow, is it also in the blood? An analysis of 1,000 paired samples from patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *BMC Cancer* 10:644, 2010
221. Elstrom R, Guan L, Baker G, et al: Utility of FDG-PET scanning in lymphoma by WHO classification. *Blood* 101:3875-6, 2003
222. Khan AB, Barrington SF, Mikhaeel NG, et al: PET-CT staging of DLBCL accurately identifies and provides new insight into the clinical significance of bone marrow involvement. *Blood* 122:61-7, 2013
223. Ben-Chetrit E, Flusser D, Assaf Y: Severe bleeding complicating percutaneous bone marrow biopsy. *Arch Intern Med* 144:2284, 1984
224. Pedersen LM, Jarner D, Winge J: Bone-marrow biopsy of the iliac bone followed by severe retroperitoneal hemorrhage. *Eur J Haematol* 51:52, 1993
225. Gladden K, Spill GR: Iliac fracture after a bone marrow biopsy. *PM R* 3:1150-2, 2011
226. Pascali VL, Lazzaro P, Fiori A: Is sternal bone marrow needle biopsy still a hazardous technique? Report of three further fatal cases. *Am J Forensic Med Pathol* 8:42-4, 1987
227. Puschel K, Mattern R, Mittmeyer HJ, et al: [Errors and hazards: fatalities through sternal puncture]. *Dtsch Med Wochenschr* 110:1611-3, 1985
228. Steinke B: [Complications after bone marrow biopsy]. *Dtsch Med Wochenschr* 117:1003-4, 1992
229. Jennings CD, Foon KA: Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 90:2863-92, 1997
230. Anderson KC, Bates MP, Slaughenhaupt BL, et al: Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood* 63:1424-33, 1984
231. Wells DA, Hall MC, Shulman HM, et al: Occult B cell malignancies can be detected by three-color flow cytometry in patients with cytopenias. *Leukemia* 12:2015-23, 1998
232. Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA, et al: Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood* 98:29-35, 2001

233. Lanasa MC, Allgood SD, Slager SL, et al: Immunophenotypic and gene expression analysis of monoclonal B-cell lymphocytosis shows biologic characteristics associated with good prognosis CLL. *Leukemia* 25:1459-66, 2011
234. Martinez-Ramirez A, Cigudosa JC, Maestre L, et al: Simultaneous detection of the immunophenotypic markers and genetic aberrations on routinely processed paraffin sections of lymphoma samples by means of the FICTION technique. *Leukemia* 18:348-53, 2004
235. Crotty PL, Smith BR, Tallini G: Morphologic, immunophenotypic, and molecular evaluation of bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphoma. *Diagn Mol Pathol* 7:90-5, 1998
236. Gudgin EJ, Erber WN: Immunophenotyping of lymphoproliferative disorders: state of the art. *Pathology* 37:457-78, 2005
237. Laane E, Tani E, Bjorklund E, et al: Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom* 64:34-42, 2005
238. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, et al: Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry* 46:23-7, 2001
239. Stevenson FK, Sahota SS, Ottensmeier CH, et al: The occurrence and significance of V gene mutations in B cell-derived human malignancy. *Adv Cancer Res* 83:81-116, 2001
240. Rozman C, Montserrat E: Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 333:1052-7, 1995
241. Matos DM, Rizzatti EG, Garcia AB, et al: Adhesion molecule profiles of B-cell non-Hodgkin's lymphomas in the leukemic phase. *Braz J Med Biol Res* 39:1349-55, 2006
242. Palumbo GA, Parrinello N, Fargione G, et al: CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 33:1212-6, 2009
243. Brunetti L, Di Noto R, Abate G, et al: CD200/OX2, a cell surface molecule with immuno-regulatory function, is consistently expressed on hairy cell leukaemia neoplastic cells. *Br J Haematol* 145:665-7, 2009
244. Hulkkonen J, Vilpo L, Hurme M, et al: Surface antigen expression in chronic lymphocytic leukemia: clustering analysis, interrelationships and effects of chromosomal abnormalities. *Leukemia* 16:178-85, 2002
245. Kuppers R: Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5:251-62, 2005
246. Zucchetto A, Bomben R, Dal Bo M, et al: CD49d in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlated expression with CD38 and prognostic relevance. *Leukemia* 20:523-5; author reply 528-9, 2006
247. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al: ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 363:105-11, 2004
248. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al: ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 348:1764-75, 2003

249. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, et al: Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study. *Blood* 109:2989-98, 2007
250. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al: Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1840-7, 1999
251. Bain BJ, Catovsky D: The leukaemic phase of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol* 48:189-93, 1995
252. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al: Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 130:325-32, 2005
253. Nieto WG, Almeida J, Romero A, et al: Increased frequency (12 %) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* 114:33-7, 2009
254. Nieto WG, Almeida J, Teodosio C, et al: Commentary: Comparison of current flow cytometry methods for monoclonal B cell lymphocytosis detection. *Cytometry B Clin Cytom* 78 Suppl 1:S4-9, 2010
255. Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, et al: Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* 100:2289-90, 2002
256. Almeida J, Nieto WG, Teodosio C, et al: CLL-like B-lymphocytes are systematically present at very low numbers in peripheral blood of healthy adults. *Leukemia* 25:718-22, 2011
257. Klein U, Goossens T, Fischer M, et al: Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev* 162:261-80, 1998
258. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F: Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 103:4389-95, 2004
259. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M: Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 352:804-15, 2005
260. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al: Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 194:1625-38, 2001
261. Karhu R, Tobin G, Thunberg U, et al: More extensive genetic alterations in unmutated than in hypermutated cases of chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 37:417-20, 2003
262. Schade U, Bock O, Vornhusen S, et al: Bone marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is related to immunoglobulin heavy-chain variable region mutation status and expression of 70-kd zeta-associated protein (ZAP-70). *Hum Pathol* 37:1153-61, 2006
263. Mauerer K, Zahrieh D, Gorgun G, et al: Immunoglobulin gene segment usage, location and immunogenicity in mutated and unmutated chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 129:499-510, 2005
264. Catherwood MA, Matthews C, Niblock R, et al: ZAP-70 mRNA quantification in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol* 76:294-8, 2006
265. Catovsky D: Chronic lymphoproliferative disorders. *Curr Opin Oncol* 7:3-11, 1995

266. Melo JV, Catovsky D, Galton DA: The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. II. Patterns of evolution of 'prolymphocytoid' transformation. *Br J Haematol* 64:77-86, 1986
267. Ruchlemer R, Parry-Jones N, Brito-Babapulle V, et al: B-prolymphocytic leukaemia with t(11;14) revisited: a splenomegaly form of mantle cell lymphoma evolving with leukaemia. *Br J Haematol* 125:330-6, 2004
268. Krishnan B, Matutes E, Dearden C: Prolymphocytic leukemias. *Semin Oncol* 33:257-63, 2006
269. Frassoldati A, Lamparelli T, Federico M, et al: Hairy cell leukemia: a clinical review based on 725 cases of the Italian Cooperative Group (ICGHCL). Italian Cooperative Group for Hairy Cell Leukemia. *Leuk Lymphoma* 13:307-16, 1994
270. Polliack A: Hairy cell leukemia and allied chronic lymphoid leukemias: current knowledge and new therapeutic options. *Leuk Lymphoma* 26 Suppl 1:41-51, 1997
271. Troussard X, Flandrin G: Hairy cell leukemia. An update on a cohort of 93 patients treated in a single institution. Effects of interferon in patients relapsing after splenectomy and in patients with or without maintenance treatment. *Leuk Lymphoma* 14 Suppl 1:99-105, 1994
272. Matutes E WISLDMCD: Advances in the lymphoproliferative disorders. Review of our experience in the study of over 1000 cases. *Biol Clin Hematol* 11:53-62, 1989
273. Del Giudice I, Davis Z, Matutes E, et al: IgVH genes mutation and usage, ZAP-70 and CD38 expression provide new insights on B-cell prolymphocytic leukemia (B-PLL). *Leukemia* 20:1231-7, 2006
274. Forconi F, Sahota SS, Raspadori D, et al: Hairy cell leukemia: at the crossroad of somatic mutation and isotype switch. *Blood* 104:3312-7, 2004
275. DiGiuseppe JA, Borowitz MJ: Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. *Semin Oncol* 25:6-10, 1998
276. Ahmad E, Garcia D, Davis BH: Clinical utility of CD23 and FMC7 antigen coexistent expression in B-cell lymphoproliferative disorder subclassification. *Cytometry* 50:1-7, 2002
277. Nieto WG, Teodosio C, Lopez A, et al: Non-CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis in the general population: prevalence and phenotypic/genetic characteristics. *Cytometry B Clin Cytom* 78 Suppl 1:S24-34, 2010
278. Alizadeh AA, Staudt LM: Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells. *Curr Opin Immunol* 12:219-25, 2000
279. Bench AJ, Erber WN, Follows GA, et al: Molecular genetic analysis of haematological malignancies II: Mature lymphoid neoplasms. *Int J Lab Hematol* 29:229-60, 2007
280. Weisenburger DD, Armitage JO: Mantle cell lymphoma-- an entity comes of age. *Blood* 87:4483-94, 1996
281. Jaffe ES, Bookman MA, Longo DL: Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation--mantle zone lymphoma: a distinct subtype of B-cell lymphoma. *Hum Pathol* 18:877-80, 1987
282. Orchard J, Garand R, Davis Z, et al: A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* 101:4975-81, 2003

283. Walsh SH, Thorselius M, Johnson A, et al: Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood* 101:4047-54, 2003
284. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84:1361-92, 1994
285. Gao J, Peterson L, Nelson B, et al: Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 132:699-706, 2009
286. Bernard M, Gressin R, Lefrere F, et al: Blastic variant of mantle cell lymphoma: a rare but highly aggressive subtype. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 15:1785-91, 2001
287. Goy A, Remache YK, Gu J, et al: Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line M-1. *Leuk Lymphoma* 45:1255-60, 2004
288. Ondrejka SL, Lai R, Smith SD, et al: Indolent mantle cell leukemia: a clinicopathological variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Haematologica* 96:1121-7, 2011
289. Furtado M, Rule S: Indolent mantle cell lymphoma. *Haematologica* 96:1086-8, 2011
290. Martin P, Chadburn A, Christos P, et al: Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 27:1209-13, 2009
291. Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McLaughlin P, 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* 11 Suppl 1:137-40, 2000
292. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403:503-11, 2000
293. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, et al: Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med* 350:1828-37, 2004
294. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al: Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103:275-82, 2004
295. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, et al: A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res* 15:5494-502, 2009
296. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346:1937-47, 2002
297. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M, et al: De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood* 99:815-21, 2002
298. Piris M, Brown DC, Gatter KC, et al: CD30 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 17:211-8, 1990
299. Haralambieva E, Boerma EJ, van Imhoff GW, et al: Clinical, immunophenotypic, and genetic analysis of adult lymphomas with morphologic features of Burkitt lymphoma. *Am J Surg Pathol* 29:1086-94, 2005

300. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC: Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 104:3009-20, 2004
301. Ogden CA, Pound JD, Batth BK, et al: Enhanced apoptotic cell clearance capacity and B cell survival factor production by IL-10-activated macrophages: implications for Burkitt's lymphoma. *J Immunol* 174:3015-23, 2005
302. Mollejo M, Camacho FI, Algara P, et al: Nodal and splenic marginal zone B cell lymphomas. *Hematol Oncol* 23:108-18, 2005
303. Chacon JI, Mollejo M, Munoz E, et al: Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood* 100:1648-54, 2002
304. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 89:3909-18, 1997
305. Doglioni C, Wotherspoon AC, Moschini A, et al: High incidence of primary gastric lymphoma in northeastern Italy. *Lancet* 339:834-5, 1992
306. Attygalle AD, Liu H, Shirali S, et al: Atypical marginal zone hyperplasia of mucosa-associated lymphoid tissue: a reactive condition of childhood showing immunoglobulin lambda light-chain restriction. *Blood* 104:3343-8, 2004
307. Michael CW, Richardson PH, Boudreaux CW: Pulmonary lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue type: Report of a case with cytological, histological, immunophenotypical correlation, and review of the literature. *Ann Diagn Pathol* 9:148-52, 2005
308. Rottnek M, Strauchen J, Moore F, et al: Primary dural mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphoma: case report and review of the literature. *J Neurooncol* 68:19-23, 2004
309. Wenzel C, Dieckmann K, Fiebiger W, 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* 42:823-9, 2001
310. Bossuyt X, Bogaerts A, Schiettekatte G, et al: Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system. *Clin Chem* 44:944-9, 1998
311. San Miguel JF, Vidriales MB, Ocio E, et al: Immunophenotypic analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 30:187-95, 2003
312. Paiva B, Montes MC, Garcia-Sanz R, et al: Multiparameter flow cytometry for the identification of the Waldenstrom's clone in IgM-MGUS and Waldenstrom's Macroglobulinemia: new criteria for differential diagnosis and risk stratification. *Leukemia* 28:166-73, 2014
313. Garcia-Sanz R, Ocio E, Caballero A, et al: Post-treatment bone marrow residual disease > 5 % by flow cytometry is highly predictive of short progression-free and overall survival in patients with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 11:168-71, 2011
314. Vega F, Chang CC, Medeiros LJ, et al: Plasmablastic lymphomas and plasmablastic plasma cell myelomas have nearly identical immunophenotypic profiles. *Mod Pathol* 18:806-15, 2005
315. Stellmacher F, Sotlar K, Balleisen L, et al: Bone marrow mastocytosis associated with IgM kappa plasma cell myeloma. *Leuk Lymphoma* 45:801-5, 2004

316. Funaro A, Malavasi F: Human CD38, a surface receptor, an enzyme, an adhesion molecule and not a simple marker. *J Biol Regul Homeost Agents* 13:54-61, 1999
317. Leo R, Boeker M, Peest D, et al: Multiparameter analyses of normal and malignant human plasma cells: CD38++, CD56+, CD54+, clg+ is the common phenotype of myeloma cells. *Ann Hematol* 64:132-9, 1992
318. San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, et al: Immunophenotype and DNA cell content in multiple myeloma. *Baillieres Clin Haematol* 8:735-59, 1995
319. Mateo Manzanera G, San Miguel Izquierdo JF, Orfao de Matos A: Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Methods Mol Med* 113:5-24, 2005
320. Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, et al: A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 94:318-23, 1996
321. Sezer O, Heider U, Zavrski I, et al: Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica* 86:837-43, 2001
322. Hata H, Matsuzaki H, Sonoki T, et al: Establishment of a CD45-positive immature plasma cell line from an aggressive multiple myeloma with high serum lactate dehydrogenase. *Leukemia* 8:1768-73, 1994
323. Tominaga N, Katagiri S, Ohnishi M, et al: Analysis of surface antigen expression of human immunoglobulin-secreting cells: phenotypic heterogeneity in normal counterparts of myeloma cells. *Br J Haematol* 73:302-8, 1989
324. Van Camp B, Durie BG, Spier C, et al: Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood* 76:377-82, 1990
325. Ocqueteau M, Orfao A, Garcia-Sanz R, et al: Expression of the CD117 antigen (c-Kit) on normal and myelomatous plasma cells. *Br J Haematol* 95:489-93, 1996
326. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, et al: Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 99:1853-6, 2002
327. Pope B, Brown RD, Gibson J, et al: B7-2-positive myeloma: incidence, clinical characteristics, prognostic significance, and implications for tumor immunotherapy. *Blood* 96:1274-9, 2000
328. Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Robillard N, et al: Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood* 84:2597-603, 1994
329. Lin P, Owens R, Tricot G, et al: Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 121:482-8, 2004
330. Lemoli RM, Fortuna A, Grande A, et al: Expression and functional role of c-kit ligand (SCF) in human multiple myeloma cells. *Br J Haematol* 88:760-9, 1994
331. Almeida J, Orfao A, Mateo G, et al: Immunophenotypic and DNA content characteristics of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Pathol Biol (Paris)* 47:119-27, 1999
332. Schmidt-Hieber M, Perez-Andres M, Paiva B, et al: CD117 expression in gammopathies is associated with an altered maturation of the myeloid and lymphoid

- hematopoietic cell compartments and favorable disease features. *Haematologica* 96:328-32, 2011
333. Costello R, Sainty D, Bouabdallah R, et al: Primary plasma cell leukaemia: a report of 18 cases. *Leuk Res* 25:103-7, 2001
334. Garcia-Sanz R, Orfao A, Gonzalez M, et al: Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 93:1032-7, 1999
335. Perez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso 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* 19:449-55, 2005
336. Dronca RS, Jevremovic D, Hanson CA, et al: CD5-positive chronic B-cell lymphoproliferative disorders: diagnosis and prognosis of a heterogeneous disease entity. *Cytometry B Clin Cytom* 78 Suppl 1:S35-41, 2010
337. Morice WG, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al: Predictive value of blood and bone marrow flow cytometry in B-cell lymphoma classification: comparative analysis of flow cytometry and tissue biopsy in 252 patients. *Mayo Clin Proc* 83:776-85, 2008
338. Jevremovic D, Dronca RS, Morice WG, et al: CD5+ B-cell lymphoproliferative disorders: Beyond chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Leuk Res* 34:1235-8, 2010
339. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al: Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 108:378-82, 1997
340. McCarron KF, Hammel JP, Hsi ED: Usefulness of CD79b expression in the diagnosis of B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 113:805-13, 2000
341. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, et al: Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 51:364-9, 1998
342. Deneys V, Michaux L, Leveugle P, et al: Atypical lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma immunologically very close: flow cytometric distinction by the use of CD20 and CD54 expression. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 15:1458-65, 2001
343. Ho AK, Hill S, Preobrazhensky SN, et al: Small B-cell neoplasms with typical mantle cell lymphoma immunophenotypes often include chronic lymphocytic leukemias. *Am J Clin Pathol* 131:27-32, 2009
344. Schlette E, Fu K, Medeiros LJ: CD23 expression in mantle cell lymphoma: clinicopathologic features of 18 cases. *Am J Clin Pathol* 120:760-6, 2003
345. Matutes E, Brito-Babapulle V, Swansbury J, et al: Clinical and laboratory features of 78 cases of T-prolymphocytic leukemia. *Blood* 78:3269-74, 1991
346. Pekarsky Y, Hallas C, Isobe M, et al: Abnormalities at 14q32.1 in T cell malignancies involve two oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2949-51, 1999
347. Yamaguchi K, Takatsuki K: Adult T cell leukaemia-lymphoma. *Baillieres Clin Haematol* 6:899-915, 1993

348. Shimoyama M: Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol* 79:428-37, 1991
349. Scott CS, Richards SJ, Sivakumaran M, et al: Persistent clonal expansions of CD3+TCR gamma delta+ and CD3+TCR alpha beta+CD4-CD8- lymphocytes associated with neutropenia. *Leuk Lymphoma* 14:429-40, 1994
350. Lamy T, Loughran TP: Large Granular Lymphocyte Leukemia. *Cancer Control* 5:25-33, 1998
351. Herling M, Khoury JD, Washington LT, et al: A systematic approach to diagnosis of mature T-cell leukemias reveals heterogeneity among WHO categories. *Blood* 104:328-35, 2004
352. Rose MG, Berliner N: T-cell large granular lymphocyte leukemia and related disorders. *Oncologist* 9:247-58, 2004
353. Semenzato G, Zambello R, Starkebaum G, et al: The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood* 89:256-60, 1997
354. Lima M, Almeida J, Dos Anjos Teixeira M, et al: TCRalpha beta+/CD4+ large granular lymphocytosis: a new clonal T-cell lymphoproliferative disorder. *Am J Pathol* 163:763-71, 2003
355. Rodriguez-Caballero A, Garcia-Montero AC, Barcena P, et al: Expanded cells in monoclonal TCR-alpha beta+/CD4+/NKa+/CD8-/dim T-LGL lymphocytosis recognize hCMV antigens. *Blood* 112:4609-16, 2008
356. Wlodarski MW, O'Keefe C, Howe EC, et al: Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 106:2769-80, 2005
357. Ralfkiaer E: Immunohistological markers for the diagnosis of cutaneous lymphomas. *Semin Diagn Pathol* 8:62-72, 1991
358. Catovsky D: Current approach to the biology and treatment of chronic lymphoid malignancies other than CLL. *Hematol Cell Ther* 38 Suppl 2:S63-6, 1996
359. Berger R, Bernheim A: Cytogenetic studies of Sezary cells. *Cancer Genet Cytogenet* 27:79-87, 1987
360. Johnson GA, Dewald GW, Strand WR, et al: Chromosome studies in 17 patients with the Sezary syndrome. *Cancer* 55:2426-33, 1985
361. Limon J, Nedoszytko B, Brozek I, et al: Chromosome aberrations, spontaneous SCE, and growth kinetics in PHA-stimulated lymphocytes of five cases with Sezary syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 83:75-81, 1995
362. Jones D, Dorfman DM: Phenotypic characterization of subsets of T cell lymphoma: towards a functional classification of T cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 40:449-59, 2001
363. Attygalle AD, Chuang SS, Diss TC, et al: Distinguishing angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified, using morphology, immunophenotype and molecular genetics. *Histopathology* 50:498-508, 2007
364. Attygalle A, Al-Jehani R, Diss TC, et al: Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood* 99:627-33, 2002

365. Grogg KL, Attygalle AD, Macon WR, et al: Expression of CXCL13, a chemokine highly upregulated in germinal center T-helper cells, distinguishes angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Mod Pathol* 19:1101-7, 2006
366. Dorfman DM, Brown JA, Shahsafaei A, et al: Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 30:802-10, 2006
367. Baseggio L, Berger F, Morel D, et al: Identification of circulating CD10 positive T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia* 20:296-303, 2006
368. Rizvi MA, Evens AM, Tallman MS, et al: T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107:1255-64, 2006
369. Lee SS, Rudiger T, Odenwald T, et al: Angioimmunoblastic T cell lymphoma is derived from mature T-helper cells with varying expression and loss of detectable CD4. *Int J Cancer* 103:12-20, 2003
370. Went P, Agostinelli C, Gallamini A, et al: Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. *J Clin Oncol* 24:2472-9, 2006
371. Ahmad E, Kingma DW, Jaffe ES, et al: Flow cytometric immunophenotypic profiles of mature gamma delta T-cell malignancies involving peripheral blood and bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom* 67:6-12, 2005
372. Wei SZ, Liu TH, Wang DT, et al: Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma. *World J Gastroenterol* 11:3729-34, 2005
373. Ho FC, Srivastava G, Loke SL, et al: Presence of Epstein-Barr virus DNA in nasal lymphomas of B and 'T' cell type. *Hematol Oncol* 8:271-81, 1990
374. Chim CS, Ma SY, Au WY, et al: Primary nasal natural killer cell lymphoma: long-term treatment outcome and relationship with the International Prognostic Index. *Blood* 103:216-21, 2004
375. Lee J, Kim WS, Park YH, et al: Nasal-type NK/T cell lymphoma: clinical features and treatment outcome. *Br J Cancer* 92:1226-30, 2005
376. Gniadecki R, Rossen K, Ralfkier E, et al: CD56+ lymphoma with skin involvement: clinicopathologic features and classification. *Arch Dermatol* 140:427-36, 2004
377. Kwong YL: Natural killer-cell malignancies: diagnosis and treatment. *Leukemia* 19:2186-94, 2005
378. Ng SB, Lai KW, Murugaya S, et al: Nasal-type extranodal natural killer/T-cell lymphomas: a clinicopathologic and genotypic study of 42 cases in Singapore. *Mod Pathol* 17:1097-107, 2004
379. Yuan CM, Stein S, Glick JH, et al: Natural killer-like T-cell lymphoma of the small intestine with a distinct immunophenotype and lack of association with gluten-sensitive enteropathy. *Arch Pathol Lab Med* 127:e142-6, 2003
380. Katoh A, Ohshima K, Kanda M, et al: Gastrointestinal T cell lymphoma: predominant cytotoxic phenotypes, including alpha/beta, gamma/delta T cell and natural killer cells. *Leuk Lymphoma* 39:97-111, 2000
381. Wright DH: Enteropathy associated T cell lymphoma. *Cancer Surv* 30:249-61, 1997

382. Schmitt-Graff A, Hummel M, Zentgraf M, et al: Intestinal T-cell lymphoma: a reassessment of cytomorphological and phenotypic features in relation to patterns of small bowel remodelling. *Virchows Arch* 429:27-36, 1996
383. Willemze R, Meijer CJ: Primary cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders. *Hematol Oncol Clin North Am* 17:1319-32, vii-viii, 2003
384. Lamant L, Meggetto F, Saati T, et al: High incidence of the t(2;5)(p23;q35) translocation in anaplastic large cell lymphoma and its lack of detection in Hodgkin's disease. Comparison of cytogenetic analysis, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and P-80 immunostaining. *Blood* 87:284-91, 1996
385. Lima M, Almeida J, Montero AG, et al: Clinicobiological, immunophenotypic, and molecular characteristics of monoclonal CD56-/dim chronic natural killer cell large granular lymphocytosis. *Am J Pathol* 165:1117-27, 2004
386. Lamy T, Loughran TP, Jr.: Clinical features of large granular lymphocyte leukemia. *Semin Hematol* 40:185-95, 2003
387. Oshimi K: Leukemia and lymphoma of natural killer lineage cells. *Int J Hematol* 78:18-23, 2003
388. Kamarashev J, Burg G, Mingari MC, et al: Differential expression of cytotoxic molecules and killer cell inhibitory receptors in CD8+ and CD56+ cutaneous lymphomas. *Am J Pathol* 158:1593-8, 2001
389. Melioli G, Semino C, Margarino 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* 25:297-305, 2003
390. Suzuki R, Suzumiya J, Nakamura S, et al: Aggressive natural killer-cell leukemia revisited: large granular lymphocyte leukemia of cytotoxic NK cells. *Leukemia* 18:763-70, 2004
391. Kwong YL, Chan AC, Liang R, et al: CD56+ NK lymphomas: clinicopathological features and prognosis. *Br J Haematol* 97:821-9, 1997
392. Loughran TP, Jr.: Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood* 82:1-14, 1993
393. Ryder J, Wang X, Bao L, et al: Aggressive natural killer cell leukemia: report of a Chinese series and review of the literature. *Int J Hematol* 85:18-25, 2007
394. Bartl R, Frisch B, Kettner G, et al: Histologic classification of lymphoproliferative disorders in the bone marrow. *Bibliotheca haematologica*:98-127, 1984
395. San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, et al: Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 98:1746-51, 2001
396. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, et al: Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 90:1365-72, 2005
397. Paiva B, Gutierrez NC, Rosinol L, et al: High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* 119:687-91, 2012

398. Wood BL, Arroz M, Barnett D, et al: 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 72 Suppl 1:S14-22, 2007
399. Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, et al: 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 72 Suppl 1:S3, 2007
400. Abati A, Fetsch P, Filie A: If cells could talk. The application of new techniques to cytopathology. *Clin Lab Med* 18:561-83, 1998
401. Sevilla DW, Gong JZ, Goodman BK, et al: Clinicopathologic findings in high-grade B-cell lymphomas with typical Burkitt morphologic features but lacking the MYC translocation. *American journal of clinical pathology* 128:981-91, 2007
402. Taberero D, San Miguel JF, Garcia-Sanz M, et al: Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *Am J Pathol* 149:153-61, 1996
403. Quijano S, Lopez A, Rasillo A, et al: Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 74:139-49, 2008
404. Andersen NS, Donovan JW, Borus JS, et al: Failure of immunologic purging in mantle cell lymphoma assessed by polymerase chain reaction detection of minimal residual disease. *Blood* 90:4212-21, 1997
405. Fend F, Kremer M: Diagnosis and classification of malignant lymphoma and related entities in the bone marrow trephine biopsy. *Pathobiology* 74:133-43, 2007
406. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 111:5477-85, 2008
407. Loken MR, Alonzo TA, Pardo L, et al: Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group. *Blood* 120:1581-8, 2012
408. Bottcher S, Ritgen M, Fischer K, et al: Minimal Residual Disease Quantification Is an Independent Predictor of Progression-Free and Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Multivariate Analysis From the Randomized GCLLSG CLL8 Trial. *J Clin Oncol*, 2012
409. Pedreira CE, Costa ES, Almeida J, et al: A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Cytometry A* 73A:1141-50, 2008
410. Hanson CA, Kurtin PJ, Katzmann JA, et al: Immunophenotypic analysis of peripheral blood and bone marrow in the staging of B-cell malignant lymphoma. *Blood* 94:3889-96, 1999
411. Liu W, Medeiros LJ, Lin P, et al: Usefulness of flow cytometric immunophenotyping for bone marrow staging in patients with mantle cell lymphoma after therapy. *Am J Clin Pathol* 137:634-40, 2012
412. Merli M, Arcaini L, Boveri E, et al: Assessment of bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphomas: comparison between histology and flow cytometry. *Eur J Haematol* 85:405-15, 2010

413. Gomyo H, Shimoyama M, Minagawa K, et al: Morphologic, flow cytometric and cytogenetic evaluation of bone marrow involvement in B-cell lymphoma. *Haematologica* 88:1358-65, 2003
414. Iancu D, Hao S, Lin P, et al: Follicular lymphoma in staging bone marrow specimens: correlation of histologic findings with the results of flow cytometry immunophenotypic analysis. *Arch Pathol Lab Med* 131:282-7, 2007
415. Dunphy CH: Combining morphology and flow cytometric immunophenotyping to evaluate bone marrow specimens for B-cell malignant neoplasms. *Am J Clin Pathol* 109:625-30, 1998
416. Duggan PR, Easton D, Luider J, et al: Bone marrow staging of patients with non-Hodgkin lymphoma by flow cytometry: correlation with morphology. *Cancer* 88:894-9, 2000
417. Schmidt B, Kremer M, Gotze K, et al: Bone marrow involvement in follicular lymphoma: comparison of histology and flow cytometry as staging procedures. *Leuk Lymphoma* 47:1857-62, 2006
418. Inamdar KV, Medeiros LJ, Jorgensen JL, et al: Bone marrow involvement by marginal zone B-cell lymphomas of different types. *Am J Clin Pathol* 129:714-22, 2008
419. Boveri E, Arcaini L, Merli M, et al: Bone marrow histology in marginal zone B-cell lymphomas: correlation with clinical parameters and flow cytometry in 120 patients. *Ann Oncol* 20:129-36, 2009
420. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, et al: EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 26:1908-75, 2012
421. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al: EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 26:1986-2010, 2012
422. Faulkner-Jones BE, Howie AJ, Boughton BJ, et al: Lymphoid aggregates in bone marrow: study of eventual outcome. *J Clin Pathol* 41:768-75, 1988
423. Thiele J, Zirbes TK, Kvasnicka HM, et al: Focal lymphoid aggregates (nodules) in bone marrow biopsies: differentiation between benign hyperplasia and malignant lymphoma--a practical guideline. *J Clin Pathol* 52:294-300, 1999
424. Pott C, Hoster E, Delfau-Larue MH, et al: Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood* 115:3215-23, 2010
425. Pileri SA, Falini B: Mantle cell lymphoma. *Haematologica* 94:1488-92, 2009
426. Kelemen K, Peterson LC, Helenowski I, et al: CD23+ mantle cell lymphoma: a clinical pathologic entity associated with superior outcome compared with CD23- disease. *Am J Clin Pathol* 130:166-77, 2008
427. Angelopoulou MK, Siakantariz MP, Vassilakopoulos TP, et al: The splenic form of mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 68:12-21, 2002
428. Remstein ED, Kurtin PJ, Buno I, et al: Diagnostic utility of fluorescence in situ hybridization in mantle-cell lymphoma. *Br J Haematol* 110:856-62, 2000

429. Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A, et al: CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood* 121:1394-402, 2013
430. Mozos A, Royo C, Hartmann E, et al: SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 94:1555-62, 2009
431. Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, et al: Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood* 98:3479-82, 2001
432. Fernandez V, Salamero O, Espinet B, et al: Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 70:1408-18, 2010
433. Bertoni F, Zucca E, Cotter FE: Molecular basis of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 124:130-40, 2004