



Utilidad de la citometría de flujo y del panel SST de EuroFlow para la evaluación de infiltración tumoral extra ganglionar en pacientes con linfomas B en el Hospital Universitario San Ignacio.

Lina Paola Ladino Novoa

Trabajo de grado para optar al título de Bacterióloga

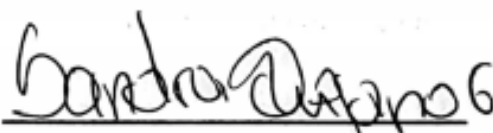
DIRECTORA:
Sandra Milena Quijano Gómez MSc. PhD.

CODIRECTOR:
Niyireth Peñaloza Castañeda. MSc.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ
2019**

**Utilidad de la citometría de flujo y del panel SST de EuroFlow para la evaluación de
infiltración tumoral extra ganglionar en pacientes con linfomas B en el Hospital
Universitario San Ignacio.**

Lina Paola Ladino Novoa



**DRA. SANDRA MILENA QUIJANO GOMEZ MSc. PhD.
DIRECTORA**



**DRA. NIYRETH PEÑALOZA CASTAÑEDA MSc.
CODIRECTORA**



**DR HUGO DIEZ ORTEGA PhD.
JURADO**



**DRA ROCIO ORDUZ RODRIGUEZ MD.
JURADO**

ARTÍCULO 23, RESOLUCIÓN #13 DE 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a mi directora de investigación, la Doctora Sandra Milena Quijano Gómez, a mi codirectora Niyireth Peñaloza y mi co-tutora Alba Campos por brindarme la oportunidad de hacer parte de su grupo de Investigación, así como también por haberme tenido paciencia para guiarme durante todo este proceso.

Al Hospital Universitario San Ignacio por permitirme estar en el Área de Citometría de flujo, para el desarrollo de este proyecto, y a la Pontificia Universidad Javeriana en especial a la Dirección de Carrera ya que fueron una parte fundamental en este proceso.

Adicionalmente, quiero agradecer de forma particular a mis padres, principalmente a mi Madre por haberme ofrecido la fortaleza y motivación necesaria en cada paso de mi carrera, por brindarme el apoyo y acompañamiento indispensable en cada paso de mi vida, gracias a ella por ser mi soporte y a quien le dedico cada uno de mis triunfos. De manera general agradezco a toda mi familia, ya que, ustedes son el motivo y la razón, por la cual sigo y seguiré persiguiendo mis sueños, además, a la amistad fiel e incondicional por parte de mis amigas y compañeras de la Pontificia Universidad Javeriana, quienes me apoyaron, me aconsejaron y me ofrecieron su ayuda en los momentos más difíciles de mi carrera.

CONTENIDO

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4. MARCO TEÓRICO

4.1 CITOMETRÍA DE FLUJO

4.2 PANEL SST DE EUROFLOW

4.3 CELULAS B

4.4 LINFOMAS B

4.5 CLASIFICACIÓN DE LINFOMAS B SEGÚN OMS

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

7. METODOLOGIA

8. ANALISIS ESTADISTICO

9. RESULTADOS

10. DISCUSIÓN

11. BIBLIOGRAFIA

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición del panel SST para la detección de células linfoides.....	19
Tabla 2. Subtipos de linfomas B según la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud 2016.....	22
Tabla 3. Grados y patrones de Linfoma Folicular.....	29
Tabla 4: Composición del tubo convencional para el estudio de muestras especiales en el servicio de citometría del Hospital Universitario San Ignacio (previo a la implementación del tubo SST de EuroFlow).....	39
Tabla 5: Composición del <i>Small Sample Tube</i> de EuroFlow para el estudio de muestras especiales en el servicio de citometría del Hospital Universitario San Ignacio.....	39
Tabla 6. Resultados de citometría de flujo para la evaluación de infiltración tumoral en LCR en los linfomas B con clasificación.....	48
Tabla 7. Análisis de la celularidad de las muestras de LCR y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral.....	49
Tabla 8. Resultados de citometría de flujo para la evaluación de infiltración tumoral en muestras de líquido pleural en los linfomas B con clasificación.....	50
Tabla 9. Análisis de la celularidad de las muestras de Líquido pleural y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral.....	51
Tabla 10. Análisis de la celularidad de las muestras de Lavado bronco alveolar y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral.....	52
Tabla 11. Análisis de la celularidad de las muestras de Líquido peritoneal y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral.....	53

Tabla 12. Análisis de la celularidad de las muestras de Líquido ascítico y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral.....	54
Tabla 13. Análisis de la celularidad de las muestras de biopsias de ganglio y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral.....	55
Tabla 14. Análisis de la celularidad de las muestras de otras biopsias y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral.....	56
Tabla 15. Análisis comparativo entre la citometría y la morfología en la detección de células tumorales en muestras especiales.....	58

LISTA DE IMÁGENES Y FIGURAS

Imagen 1. Descripción de la morfología celular.....	34
Figura 1. Distribución de casos de acuerdo al tipo de muestra analizada por CMF. LCR: líquido cefalorraquídeo; LBA: lavado bronco alveolar.....	43
Figura 2. Volúmenes de muestra de cada líquido corporal. La línea media y las líneas verticales representan la mediana y rango, respectivamente. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ para comparación entre grupos de individuos mediante test U de Mann-Whitney. LCR: líquido cefalorraquídeo; LBA: lavado bronco alveolar.....	44
Figura 3. Distribución de los casos de acuerdo al diagnóstico LNH-B: Linfoma No Hodgkin de células B; LCG: Linfoma No Hodgkin B de Células Grandes; LM: Linfoma del Manto; LF: Linfoma Folicular; LLC: Leucemia Linfoide crónica; LNH-B SNC: Linfoma No Hodgkin B de Sistema Nervioso Central; LB: Linfoma de Burkitt; LP: Linfoma Plasmablástico.....	45
Figura 4. Número total de células/uL en cada muestra especial, analizado por citometría de flujo. La línea media y las líneas verticales representan la mediana y rango, respectivamente. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ para comparación entre grupos de individuos mediante test U de Mann-Whitney.....	46
Figura 5. Número total de células/uL en las muestras de biopsia, analizado por citometría de flujo. La línea media y las líneas verticales representan la mediana y rango, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el número de células al comparar los dos grupos mediante test U de Mann-Whitney.....	46
Figura 6. Frecuencia de casos de LCR con presencia y ausencia de infiltración tumoral detectada mediante citometría de flujo.....	48

Figura 7: Frecuencia de casos de líquido pleural con presencia y ausencia de infiltración tumoral detectada mediante citometría de flujo.....	50
Figura 8. Frecuencia de casos de LBA con presencia y ausencia de infiltración tumoral detectada mediante citometría de flujo.....	52
Figura 9. Frecuencia de casos de líquido peritoneal con presencia y ausencia de infiltración tumoral detectada mediante citometría de flujo.....	53
Figura 10. Frecuencia de biopsias de ganglio con presencia y ausencia de infiltración tumoral detectada mediante citometría de flujo.....	55
Figura 11. Frecuencia de biopsias distintas a ganglio, con presencia y ausencia de infiltración tumoral detectada mediante citometría de flujo.....	56
Figura 12. Análisis comparativo de los porcentajes y valores absolutos de linfocitos B tumorales: Entre las muestras citometría+/morfología+ y citometría+/morfología-. *p=0,001.....	58
Figura 13: Representación del análisis de una muestra de LCR de un paciente con sospecha de LNH-B, negativo para infiltración por células tumorales.....	59
Figura 14: Representación del análisis de una muestra de LCR de un paciente con sospecha de LNH-B, positivo para infiltración tumoral.....	60
Figura 15: Representación del análisis de una muestra de Líquido pleural de un paciente con sospecha de Síndrome linfoproliferativo crónico B, negativo para infiltración por células tumorales.....	61
Figura 16: Representación del análisis de una muestra de Líquido pleural de un paciente con Linfoma B de célula grande, positivo para infiltración tumoral.....	63

1. Resumen:

En las últimas décadas, una de las herramientas más utilizadas para el diagnóstico, clasificación y seguimiento de enfermedades hematológicas es la Citometría de flujo multiparamétrica (CMF). Esta herramienta, tiene múltiples ventajas que incluyen su elevada sensibilidad, especificidad, rapidez, aplicabilidad y reproducibilidad para la detección, clasificación y caracterización de linfomas de células B. Además, la CMF también se realiza con el fin de evaluar la efectividad del tratamiento y la evaluación de pacientes pre y post-trasplante de células madre hematopoyéticas.

De forma particular la CMF ha permitido evaluar con gran precisión y sensibilidad la infiltración tumoral a distancia de distintas neoplasias incluyendo los linfomas de células B. Los linfomas son tumores de origen hematopoyético que se originan por la transformación neoplásica de linfocitos B maduros. Estos se originan principalmente en los ganglios linfáticos y dependiendo de sus características biológicas, algunos son más agresivos como los linfomas de célula grande y tienen mayor capacidad de invasión e infiltración tumoral extra-ganglionar a tejidos como la médula ósea, la sangre periférica, el bazo y el sistema nervioso central, entre otros. Otros linfomas menos agresivos también pueden adquirir esta ventaja de crecimiento y de invasión, dependiendo de sus perfiles genéticos y moleculares.

Recientemente el Consorcio Europeo EuroFlow, desarrolló y estandarizó la detección de células tumorales de linfoma con aplicación a otros tumores hematopoyéticos y muestras reactivas, a través de un marcaje combinado en 8 fluorescencias distintas en un tubo denominado SST (*Small Sample Tube*), el cual, permite detectar con alta sensibilidad, la presencia de pequeñas o grandes clonas de células tumorales de linfomas B en muestras de LCR y humor vítreo, para el estudio de extensión de estas enfermedades.

A partir del año 2008 en el área de Citometría de flujo de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana se empezó a implementar el estudio de muestras especiales mediante CMF, posteriormente el servicio se trasladó al Hospital Universitario San Ignacio (HUSI) y en la actualidad se evalúan muestras variadas de líquidos corporales de pacientes con linfomas B. Desde el año 2017, se dio inicio a la implementación del panel SST de EuroFlow, lo cual ha representado un avance importante para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con linfoma. En el servicio de citometría de HUSI, el tubo SST ha sido utilizado no solo en muestras de LCR sino también en otras muestras de líquidos corporales.

En el presente trabajo se documentan los resultados de CMF de la evaluación de infiltración tumoral en muestras especiales en pacientes con sospecha de linfoma o con diagnóstico confirmado de linfoma B. Esta información incluye tipos de muestras evaluadas, resultados de infiltración tumoral detectada por CMF y en algunos casos en comparación con los resultados de los estudios morfológicos, celularidad de las muestras y se documenta la capacidad de detección de pequeñas cantidades de células tumorales por CMF.

Los hallazgos muestran claramente que esta herramienta diagnóstica es de gran utilidad, que de manera muy sensible permite detectar infiltración a distancia de estos tumores y por lo tanto estadificar la enfermedad. La implementación de SST para el estudio de linfomas ha permitido en el servicio de citometría de HUSI, avanzar mucho más en la realización de una citometría de mayor calidad, aplicando protocolos estandarizados desde la fase pre-analítica que aportan a la comunidad médica en la toma de decisiones terapéuticas y de seguimiento de estas patologías.

2. Introducción:

La citometría de flujo multiparamétrica (CMF) en los últimos años se ha convertido en una de las herramientas de mayor utilidad en el diagnóstico y seguimiento para las neoplasias hematológicas, debido a su elevada sensibilidad y especificidad en los distintos tipos de muestras, sea medula ósea (MO), sangre periférica (SP), líquidos especiales y tejidos. Nos permite identificar y caracterizar las subpoblaciones leucocitarias cuando existe una sospecha anormal en su desarrollo hematopoyético por medio de la inmunofenotipificación de las células, catalogando de esta manera, enfermedades hematológicas como lo son los Linfomas de células B, así mismo, permite definir si el linfoma se localiza en ganglios linfáticos solamente o realiza migración extra-ganglionar a otros tejidos afectando con mayor frecuencia médula ósea, sangre periférica y sistema nervioso central (Dominic E 2005).

Los linfomas se clasifican según su morfología, inmunofenotipo, inmunohistoquímica, alteración genética y la clínica, de igual manera, el tipo de linaje alterado, sea células T o células B, correspondiendo a lo anterior, en este estudio nos enfocamos en la evaluación de los Linfomas B por su alta prevalencia en Colombia (*Anuario Estadístico del Instituto Nacional de Cancerología, 2010*). Una de las características de los líquidos corporales y algunos tejidos para el diagnóstico de Linfomas B es la baja celularidad tumoral, por lo cual el grupo de EuroFlow diseñó el panel Small Sample Tube (SST) estandarizado para muestras pequeñas o de menor celularidad, evaluadas en el presente estudio. El tubo SST permite diferenciar el linaje y el estadio de Maduración de las células, por consiguiente, facilita la clasificación de los tipos de Linfomas B en correlación con otras herramientas diagnósticas como patología y el citoquímico de los líquidos especiales (van Dongen 2012).

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, en el presente estudio evaluamos la utilidad de la Citometría de Flujo frente a la infiltración extra ganglionar en pacientes con linfomas de células B empleando el panel SST de EuroFlow en comparación con el panel convencional del Hospital Universitario San Ignacio en muestras de celularidad baja como líquidos especiales y tejidos.

3. Justificación y Planteamiento del problema:

En las últimas décadas, una de las herramientas más utilizadas para el diagnóstico, clasificación y seguimiento de enfermedades hematológicas neoplásicas es la Citometría de flujo multiparamétrica (CMF). Esta herramienta, tiene múltiples ventajas que incluyen su elevada sensibilidad, especificidad, rapidez, aplicabilidad y reproducibilidad y de forma relevante, los resultados que se generan son utilizados en la rutina clínica para la definición del pronóstico de la enfermedad y en la selección de conductas terapéuticas (Jaye D 2012).

Una de las patologías hematológicas donde la CMF, ha sido empleada para clasificar y caracterizar la enfermedad desde el punto de vista biológico y pronóstico, son los linfomas de células B. En estos casos la CMF se utiliza desde el momento del diagnóstico para clasificar el tipo de linfoma, definir si el tumor se localiza en los ganglios linfáticos solamente o para definir este ha hecho migración extra-ganglionar a distancia en tejidos como la médula ósea, la sangre periférica, el sistema nervioso central y otros tejidos, donde se sospeche que las células neoplásicas se hayan diseminado empeorando el curso clínico y el pronóstico de la enfermedad. Adicionalmente, en estos casos, la CMF también se realiza con el fin de evaluar la efectividad del tratamiento (enfermedad mínima residual) y para la evaluación de pacientes pre y post-trasplante de células madre hematopoyéticas (Jaye D 2012).

Ahora bien, dentro de las patologías hematológicas donde la CMF ha sido una herramienta de diagnóstico y seguimiento son los linfomas, los cuales, constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades o desórdenes originados en linfocitos maduros, que difieren entre sí en base a sus características histológicas, citogenéticas y moleculares, inmunofenotípicas y clínicas. Estos tumores, se caracterizan desde el punto de vista biológico por la expansión clonal (monoclonal) de células linfoides

maduras aberrantes o malignas, principalmente de linaje B (95% de los casos) con una minoría de linaje T (<5% de los linfomas) (Lenz G 2010). Desde el punto de vista epidemiológico los linfomas constituyen una de las neoplasias más frecuentes en el mundo con una tasa de incidencia de 4,2 casos/100.000 habitantes/año y son la causa del 3% del total de muertes por neoplasia, afectando tanto a hombres como a mujeres mayores de 60 años. En Colombia los linfomas B aportan el 47,9% del total de nuevos casos de neoplasias de tejido hematopoyético y linfoide, con una mortalidad de 5,8%, superando la reportada a nivel mundial (*Anuario Estadístico del Instituto Nacional de Cancerología, 2010*) (Lenz G 2010; Jemal A 2011). Los linfomas que tienen mayor capacidad de infiltración extra-ganglionar son los linfomas B agresivos (Quijano S 2008; Quijano S 2009), pero también linfomas menos agresivos pueden adquirir esta ventaja de crecimiento y de invasión, dependiendo de las alteraciones genéticas del tumor, de su interacción con el microambiente tumoral y de las rutas de señalización que se activen o bloqueen en estas células (Quijano S 2008; Quijano S 2009).

En la actualidad para detectar con alta sensibilidad y precisión, la presencia de células tumorales de linfomas B en diversos tipos de muestras como los líquidos corporales, se emplea un panel de anticuerpos estandarizado por el Consorcio Europeo EuroFlow (Consortio científico internacional de citometría de flujo formado en 2005 e iniciado con apoyo de la comunidad Europea en abril de 2006) (van Dongen 2012). Este panel denominado *SST (small sample tube)* incluye combinaciones de anticuerpos monoclonales en ocho fluorescencias distintas y permite detectar con alta sensibilidad, la presencia de pequeñas o grandes clonas de linfomas B en estas muestras, en conjunto con la caracterización de otras poblaciones celulares hematopoyéticas que hacen parte del microambiente (van Dongen 2012). De forma

relevante, EuroFlow también ha estandarizado y validado los citómetros de flujo de 3 láseres con compensaciones y calibraciones de estos equipos que son reproducibles inter laboratorios en todo el mundo.

A partir del año 2008 en el Servicio de Citometría de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana se empezó a implementar el estudio de muestras especiales mediante CMF, posteriormente el servicio se trasladó al Hospital Universitario San Ignacio y en la actualidad se evalúan muestras de líquidos corporales de pacientes con linfomas B (Campos A et al 2017). Desde el año 2017, se dió inicio a la implementación del panel SST de EuroFlow, lo cual ha representado un avance importante para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con linfoma. Al igual que el Hospital Universitario San Ignacio, otros servicios de CMF en Colombia, también han implementado algunos de los desarrollos estandarizados por EuroFlow, pero hasta la fecha, no se han documentado en los linfomas B, los resultados de estos avances en términos de número de casos evaluados, tipos de linfoma B estudiados, tipos de muestras, resultados de infiltración tumoral positiva o negativa, momento clínico del paciente (diagnóstico, seguimiento post-tratamiento, recaída o progresión de la enfermedad), celularidad de las muestras y comparación de los resultados obtenidos por CMF respecto a los resultados de patología en términos de concordancia. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo se propone documentar los hallazgos de la evaluación de infiltración tumoral de muestras especiales de pacientes con linfomas B mediante citometría de flujo, empleando el panel SST de EuroFlow en el área de citometría del Hospital Universitario San Ignacio.

4. Referencias Conceptuales:

4.1 Utilidad de la Citometría de Flujo en el estudio de muestras especiales

Según la Organización Mundial de la Salud en el año 2016, la clasificación de neoplasias hematológicas debe incluir herramientas diagnósticas como la morfología, pruebas moleculares y genéticas, estudios inmunohistoquímicos e inmunofenotípicos mediante CMF, siendo esta última, una herramienta de gran utilidad empleada en la rutina clínica para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de neoplasias de origen hematológico (Swerdlow SH 2017). La CMF multiparamétrica se fundamenta en el paso de una suspensión de partículas o células alineadas y contenidas en un volumen determinado a través de uno o varios láseres. Las células están marcadas con paneles de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos y son específicos para una gran variedad de antígenos expresados en estas células. Una vez las células pasan frente a los láseres, hay emisión de fluorescencia, la cual es directamente proporcional a la concentración de antígenos; posteriormente se generan una serie de señales luminosas dependientes de la unión antígeno-anticuerpo y señales de dispersión de la luz dependientes de otros parámetros como el tamaño celular (*Forward Scatter*) y complejidad interna celular (*Side Scatter*). El análisis combinado de estos parámetros o análisis multiparamétrico permite identificar y caracterizar las distintas poblaciones celulares presentes en muestras biológicas. Estas señales se digitalizan por medio de sistemas de amplificación, lineal o logarítmico para permitir el análisis celular (Orfao A 2004).

La CMF multiparamétrica se ha convertido en una herramienta de mayor utilidad, debido a sus múltiples ventajas que incluyen su elevada sensibilidad, especificidad, rapidez, aplicabilidad y reproducibilidad, lo que permite su aplicación en áreas diversas como la detección y cuantificación de células tumorales, la monitorización de

diferentes procedimientos terapéuticos, entre otros (Saavedra C 2010). Además, la utilización en los distintos tipos de muestras como medula ósea (MO), sangre periférica (SP), aféresis, cordón umbilical, biopsias de tejido y líquidos corporales (líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido pleural, líquido peritoneal, lavado bronco alveolar, líquido ascítico, líquido pericárdico). Algunas muestras de líquidos corporales, principalmente en las de líquido cefalorraquídeo (LCR) se caracterizan por ser paucicelulares por lo que su evaluación debe ser realizada en condiciones de calidad y sensibilidad que detectar con gran precisión cantidades mínimas de poblaciones de células tumorales o de células normales.

4.2 Tubo SST (Small Sample Tube) estandarizado por el Consorcio Europeo EuroFlow para la evaluación de linfomas en muestras de LCR y humor vítreo

El *small sample tube* (SST) estandarizado por EuroFlow con el fin de evaluar la infiltración por linfomas de muestras de LCR y humor vítreo (estas últimas en el caso de linfomas orbitarios). Este tubo permite realizar una caracterización completa de la celularidad de estas muestras especiales con contenidos muy bajos de células y con una elevada sensibilidad. Además, permite evaluar una gran variedad de subpoblaciones celulares acompañantes de las células tumorales en estos microambientes como parte del infiltrado inflamatorio o como células normales residentes en estos tejidos. De forma importante, EuroFlow validó el uso de este tubo en estas muestras con condiciones clínicas diferentes, panel denominado *SST* incluye combinaciones de anticuerpos monoclonales en ocho fluorescencias distintas (Tabla 1) para la diferenciación de linaje y maduración celular además de los parámetros de dispersión de la luz *Forward Scatter* y *Side Scatter*, permitiendo detectar con alta

sensibilidad, la presencia de pequeñas o grandes clonas de células anormales (van Dongen 2012).

Tabla 1. Composición del panel SST para la detección de células linfoides.

Fluorocromos	PECy7	PacB	PacO	PE	FITC	PerCPCy 5.5	APC	APCH7
Marcadores	CD19	CD20	CD45	CD56 y SmlgLambda	CD8 y SmlgKappa	CD4	SmCD3 y CD14	CD38
Célula	Células B		Leucocitos	CD56: células NK; Cadena ligera de las Igs		Células T	CD3: Células T; CD14: monocitos y macrófagos	Células plasmáticas y otras

Abreviaturas: APC, alofocianina; Cy7, cianina7; FITC, isotiocianato de fluoresceína; H7, hilite7; V450, violeta 450; V500, violeta 500; PE, ficoeritrina; PerCPCy5.5, peridina-clorofila-proteína-cianina5.5; Sm, membrana superficial (van Dongen 2012).

De forma importante antes de la implementación de protocolos de marcaje de muestras estandarizados, en la fase pre-analítica es esencial emplear estabilizantes celulares como el Transfix™ Cytomark para la conservación y calidad de la muestra. Transfix™ (cytomark) tiene la ventaja de mantener la celularidad de las muestras por periodos hasta de 10 días después de la obtención de la muestra y también ha sido reportado para la preservación de la morfología celular en muestras de sangre periférica. En la actualidad se recomienda procesar los líquidos corporales, después de un contacto mínimo de 18 horas con Transfix™ ya que, previene la muerte celular gracias a la acción del aldehído alifático (AA) que fija leucocitos por entrecruzamiento con residuos de aminoácidos y también contiene sales de metal pesado que estabilizan leucocitos y reducen la autofluorescencia causada por AA, de esta manera mejora la capacidad de detección de células tumorales de origen hematopoyético y

permite la detección de recuentos absolutos superiores de leucocitos en comparación con las muestras que no se estabilizan (Jongste A 2014).

4.4 Linfomas de células B

Cuando ocurre una alteración clonal en la hematopoyesis como consecuencia de anomalías genéticas, ambientales o por reordenamientos, pueden conducir al desarrollo de células malignas generando patologías que aumenten o disminuyan la producción de células hematopoyéticas (como las leucemias y linfomas) (Arthur L 2012). A su vez, las células malignas expresarán antígenos aberrantes o pérdida y/o ganancia de otros antígenos anormales en su desarrollo madurativo y de diferenciación, permitiendo la clasificación del tipo de neoplasia maligna de células B presente en la línea de maduración, etapas I, II, III, IV. Los linfomas de células B son síndromes linfoproliferativos heterogéneos desde el punto de vista clínico y biológico. Son una de las neoplasias con mayor frecuencia a nivel mundial con una tasa de incidencia de 4,2 casos/100.000 habitantes por año y son la causa del 3% de muertes por neoplasia, afectando tanto a hombres como a mujeres mayores de 60 años. En Colombia los linfomas B aportan el 47,9% del total de nuevos casos de neoplasias de tejido hematopoyético y linfoide, con una mortalidad del 5,8%, superando la reportada a nivel mundial (*Anuario Estadístico del Instituto Nacional de Cancerología, 2010*). Los linfomas B se originan a partir de la expansión clonal de linfocitos B maduros por centros germinales (CG) o en estadios intermedios de maduración a nivel medular (Quijano S 2008). Los centros germinales son el sitio en el cual, las células B se someten a diferentes procesos genéticos para la producción de inmunoglobulinas de alta afinidad. Dentro de los CG las células sufren un proceso denominado hipermutación somática (HMS) para sustituciones o deleciones de la región variable

de las inmunoglobulinas, existen factores que alteran este proceso genético conllevando a la formación de linfocitos B anormales. El mecanismo por el cual se clasifican los linfomas B es determinado por la ruta de señalización activada en las células tumorales, definiendo su morfología, inmunofenotipo, genotipo y características clínicas de la enfermedad. Estos tumores se originan principalmente en los ganglios linfáticos, pero dependiendo de la interacción del tumor con el microambiente y de las características genéticas y moleculares, estos pueden infiltrar otros tejidos como la médula ósea, la sangre periférica (SP), o pueden migrar al sistema nervioso central y otros órganos (Quijano S 2008, Quijano S 2009, Swerdlow S 2016).

4.5 Clasificación de Linfomas B

En la actualidad se dispone de una gran cantidad de técnicas de laboratorio útiles para el diagnóstico, clasificación y seguimiento de estas patologías. Dentro de estas técnicas se encuentran los estudios morfológicos, moleculares y la citometría de flujo (van Dongen 2012). Así, la clasificación diagnóstica actual de los linfomas B incluye, además de criterios clínico-biológicos, citomorfológicos e histológicos convencionales, información derivada de los estudios inmunofenotípicos y de análisis genéticos/moleculares, para la definición de entidades diagnósticas concretas (Quijano S 2008). De este modo, de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Tabla 2) (Swerdlow S 2016), dentro de los linfomas se encuentran distintas entidades que varían desde linfomas menos agresivos (leucemia linfoide crónica B, la leucemia prolinfocítica B, la tricoleucemia), otros de grado intermedio como el linfoma folicular, el linfoma de células del manto, el linfoma linfoplasmocítico y linfomas agresivos como el linfoma B difuso de células grandes, el

linfoma de Burkitt, linfoma plasmablástico y linfomas asociados a infección por virus de Epstein Barr. Inicialmente se afectan los ganglios linfáticos y/o el bazo, pero estos pueden adquirir en sus rutas biológicas, la ventaja de hacer invasión y de infiltrar otros órganos a distancia (Swerdlow S 2016). De la clasificación descrita anteriormente, los linfomas No Hodgkin agresivos tienen mayor predominio de infiltración extra ganglionar (Roa D 2010).

Tabla 2. Subtipos de linfomas B según la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud 2016.

Linfomas de células B maduras
Leucemia linfoide crónica B/linfoma linfocítico
Linfocitosis B monoclonal
Linfoma de la zona marginal esplénica
Tricoleucemia
Linfoma B esplénico
Linfoma linfoplasmocítico/Macroglobulinemia de Waldenström
Gammapatía monoclonal de significado incierto
Mieloma de células plasmáticas
Linfomas tipo MALT
Linfomas de la zona marginal nodal
Linfoma folicular
Linfoma de célula grande con reordenamientos en IRF4
Linfoma del centro folicular primario cutáneo
Linfoma de células del manto
Linfoma B difuso de células grandes
Linfoma B difuso de células grandes primario de sistema nervioso central
Linfoma B difuso de células grandes primario de pierna
Linfoma B difuso de células grandes asociado a infección por virus de Epstein Barr
Linfoma de células grandes primario mediastinal
Linfoma de células grandes intravascular

Linfoma de efusión primaria
Linfoma de Burkitt
Linfoma de Burkitt con aberración 11q
Linfoma B difuso de células grandes con reordenamientos en MYC, BCL-2 y BCL6

4.5.1 Leucemia linfoide crónica B LLC/linfoma linfocítico: Neoplasia compuesta por células B maduras pequeñas monomorfas que co-expresan CD5 y CD23 con un conteo $\geq 5 \times 10^9/L$. Es la leucemia más común en adultos en los países occidentales, con una incidencia de 5 casos por 100.000 habitantes (Morton LM 2005). Su presentación clínica se basa en estudios de rutina en pacientes asintomáticos, sin embargo, se pueden encontrar linfadenopatías, esplenomegalia, anemia o trombocitopenia en algunos casos que pueden llevar al diagnóstico. La célula característica tanto en bazo, ganglios como en MO y SP es un pequeño linfocito con escaso citoplasma, un núcleo redondo con cromatina agrupada y ocasionalmente un pequeño nucléolo (Imagen 1A). Expresan CD19, IgM/IgD de superficie tenue, CD20, CD22, CD79b, CD5, CD43, fuertemente CD23 y CD200, son negativos para CD10 y FMC7, en algunos casos pueden presentar un fenotipo atípico con CD5 o CD23 negativo y FMC7 positivo (Matutes E 1994). A nivel genético pueden presentar mutaciones en el gen IGHV, con mayor frecuencia deleción del cromosoma 11q, 13q, 17p, trisomía del cromosoma 12, entre otras. Los pacientes con mutaciones presentan un mejor pronóstico en comparación a los pacientes sin mutaciones (Hamblin TJ 1999).

4.5.2 Linfocitosis B monoclonal: Células B monoclonales con un conteo $< 5 \times 10^9/L$ en pacientes sin ninguna asociación clínica a un síndrome linfoproliferativo B (Marti GE 2005). se clasifica en tres categorías en base a su fenotipo: 1. Tipo LLC, 2. Tipo LLC atípico y 3. Tipo no-LLC. Tipo LLC es el fenotipo más común con una incidencia

del 75% de los casos, se caracteriza por la co-expresión de CD19, CD5, CD23 y CD20 tenue y con restricción de las cadenas ligeras o ausencia de Inmunoglobulina (Ig) en más del 25% de los casos, pueden presentar mutaciones somáticas en los genes NOTCH1, SF3B1, ATM y TP53. Tipo LLC atípico expresan CD19, CD5, CD20 fuerte y expresión débilmente positiva de Ig con CD23 negativo (Fazi C 2011). Tipo no-LLC se caracteriza por la expresión de CD5 negativo o tenue en el 20% de los casos, CD19 y CD20 positivo con expresión débilmente positiva de Ig (Shanafelt TD 2010).

4.5.3 Linfoma de la zona marginal esplénica SMZL: Es una neoplasia de células B compuesta por pequeños linfocitos con cromatina más dispersa y abundante citoplasma peludo pálido (Imagen 1B) que rodean y reemplazan los centros germinales de la zona esplénica generando una expansión en la pulpa blanca e infiltración en pulpa roja. Es un raro desorden hematológico representando < 2% de las neoplasias linfoides en pacientes adultos. Los pacientes pueden presentar esplenomegalia con trombocitopenia autoinmune o anemia con presencia de linfocitos peludos en sangre periférica (Berger F 2000). Expresan IgM y IgD de superficie, CD20, CD79a y Ki-67, es negativo para CD5, CD10, CD23, CD43, CD103, Anexina 1 y Ciclina D1. En estudios genéticos presentan translocaciones cromosomales típicas de otros linfomas como t(14;18)(q32;q21) afectando el gen BCL2 presente en el linfoma folicular, t(11;14)(q13;q32) afectando el gen CCND1 presente en el linfoma del manto, t(11;18)(q21;q21), t(14;18)(q32;q21) y t(1;14)(p22;q32) estos tres últimos alteran el gen BIRC3 y BCL10 encontrándose en el linfoma de MALT1, pero, un pequeño grupo de los linfomas de zona marginal esplénica puede presentar t(2;7)(p12;q21) translocación que activa el gen CDK6, entre otros (Savilo E 1998). Su supervivencia es de 10 años en el 67% y 95% de los casos, su pronóstico es respondedor a la quimioterapia (Arcaini L 2006).

4.5.4 Tricoleucemia: Conocida también como Leucemia de células peludas, es una neoplasia de células linfoides maduras pequeñas con núcleo oval homogéneo, cromatina ligeramente compacta y abundante citoplasma pálido con proyecciones peludas (Imagen 1C) en sangre periférica y medula ósea, tiene una incidencia muy baja de 0.32 casos por 100.000 habitantes presentándose como una enfermedad rara con un predominio en hombres de edad adulta (Graça M 2008). La presentación clínica más típica es debilidad y fatiga, dolor en el cuadrante superior izquierdo, fiebre y sangrado, además, algunos pacientes pueden presentar esplenomegalia y pancitopenia o monocitopenia. Co-expresan CD20, CD22 y CD11c con expresión de CD103, CD25, CD123, TBX21, Anexina 1, FMC7, CD200 y Ciclina D1. A nivel genético se presenta con mayor frecuencia la mutación BRAF V600E, también se ha descrito hipermutación somática del gen IGHV y con poca frecuencia anomalías en los cromosomas 5 y 7. Presenta buen pronóstico con interferón alta o nucleosidos (Michael R. Grever 2010).

4.5.5 Linfoma B esplénico: Neoplasia que constituye una pequeña proliferación linfática que involucra el bazo pero que no encaja en ninguna de las neoplasias de la clasificación de la OMS. Dentro de esta encontramos dos categorías: 1. Linfoma de células B pequeño difuso de pulpa roja esplénico y 2. Variante de leucemia de células peludas (Swerdlow, S.H 2008).

- Linfoma de células B pequeño difuso de pulpa roja esplénico SDRPL: Es un linfoma poco frecuente con un patrón difuso de afectación de la pulpa roja esplénica por pequeños linfocitos B monoformos (Imagen 1D). Su frecuencia es muy baja siendo esta < 1% de los linfomas No Hodgkin. La presentación clínica de los pacientes se basa en esplenomegalia, sin embargo, en algunos casos pueden presentar trombocitopenia, leucopenia o anemia. A nivel morfológico se observan células

peludas similares a las reportadas en SMZL, expansión de células B clonales con un fenotipo de CD20, CD72, IgG positivo y negativo para IgD, Anexina A1, CD25, CD5, CD103, CD123, CD11c, CD10 Y CD23. presenta hipermutación somática en el gen IGHV. Tiene buena respuesta al tratamiento, pero es una enfermedad incurable (George Kanellis 2010).

- Variante de leucemia de células peludas: Abarca los casos de trastornos proliferativos crónicos de células B que se asemejan a la HCL clásica (Imagen 1E), pero presentan variantes características como leucocitosis, presencia de monocitos, células con nucléolos prominentes, además del inmunofenotipo variante con expresión de CD25, CD123, CD200, Anexina A1, Fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP). Son resistentes a la terapia convencional para HCL. Presenta una incidencia anual de 0.03 casos por 100.000 habitantes. Los pacientes manifiestan esplenomegalia y citopenias, leucocitosis con un conteo aproximado de $30 \times 10^9/L$. tienen una alta frecuencia para la mutación TP53 (Matutes E 2003).

4.5.6 Linfoma linfoplasmocítico LPL/Macroglobulinemia de Waldenström: Es una neoplasia de linfocitos B pequeños, linfocitos plasmocitoides y células plasmáticas (Imagen 1F), involucra medula ósea, nodos linfáticos y esplénicos, presentan un predominio en el género femenino. En el 90% de los casos generan la mutación MYD88 L265P y una minoría mutación del gen CXCR4, entre otros. Tiene una asociación con el virus de Hepatitis C. su presentación clínica es debilidad y fatiga relacionado con anemia, paraproteína sérica IgM, una minoría de casos presentan paraproteína IgM y IgM (Vijay A 2007). Su célula predominante se caracteriza por linfocitos pequeños mezclados con células plasmáticas y linfocitos plasmocitoides. Expresan inmunoglobulina de superficie, restricción de las cadenas ligeras en las células plasmáticas con expresión de inmunoglobulina citoplasmática, son positivas

para CD19, CD20, CD22, CD79a, CD25, CD38, CD45, algunas células plasmáticas expresan CD138 y son negativas para IgD, CD5, CD10, CD103, CD23 (Morice WG 2009).

4.5.7 Gammapatía monoclonal de significado incierto: Es definida por una concentración < 30 g/l de paraproteína IgM MGUS sérica y una infiltración en el 10% de los casos de linfoplasmocitos en medula ósea sin evidencia de anemia, con linfadenopatías y hepatoesplenomegalia. Su incidencia es del 3% en individuos ≥ 50 años. El fenotipo de estas células es CD19, CD20 positivos y CD5, CD10 y CD103 negativo. Su presentación genética es similar a la encontrada en LPL con mutación de MYD88 L265P y CXCR4 (Dispenzieri A 2010).

4.5.8 Mieloma de células plasmáticas: Es el resultado de una expansión de un clon de inmunoglobulina, células B de cadena pesada que segregan una sola inmunoglobulina monoclonal homogénea llamada “proteína M”. dentro de esta categoría se define una variedad de neoplasias según el origen y curso de la enfermedad. Dentro de ellas están las variantes de mieloma de células plasmáticas: 1. Mieloma de células plasmáticas latente (asintomático), 2. Mieloma no secretor, 3. Leucemia de células plasmáticas. Plasmocitoma: 1. Plasmocitoma solitario de hueso, 2. Plasmocitoma extra óseo (extra medular). Enfermedades de deposición de Inmunoglobulina monoclonal: 1. Amiloidosis primaria, 2. Enfermedades sistémicas de deposición de cadenas ligeras y pesadas. Neoplasias de células plasmáticas con síndrome paraneoplásico asociado: 1. Síndrome POEMS, 2. Síndrome TEMPI. El mieloma de células plasmáticas (Imagen 2) representa el 1% de los tumores malignos, 10-15% de las neoplasias hematopoyéticas y el 20% de las muertes por neoplasias hematológicas (Kyle RA 2003). Su presentación clínica se basa en hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia, lesiones a nivel del hueso, entre otras. Su

fenotipo es: expresión de Ig a nivel citoplasmático y de superficie, CD38 y CD138, negativo o débilmente positivo CD45, CD19, CD27, CD81 (Bataille R 2006). La célula característica es célula plasmática monoclonal (Imagen 1G).

4.5.9 Linfomas tipo MALT: Linfoma extra nodal de la zona marginal asociado a mucosas compuesto por células B pequeñas heterogéneas como células monocitoides, linfocitos pequeños, inmunoblastos y centroblastos, representan el 7-8% de los linfomas de células B presentan lesiones extra nodales. Son células B de pequeño a mediano tamaño con núcleo ligeramente regular y cromatina dispersa con un nucléolo, citoplasma abundante y pálido (Imagen 1H). Sus marcadores son CD20, CD79a positivo y CD5, CD10, CD23 negativo, CD43 y CD11c+/- . Presentan rearrreglos en los genes de cadenas pesadas y livianas, además, está asociado a translocaciones como t(11;18)(q21;q21), t(1;14)(p22;q32), t(14;18)(q32;q21) y t(3;14)(p14.1;q32) resultado de la producción de la proteína quimérica BIRC3-MALT1 y desregulación de BCL10, MALT1 y FOXP1 (Du MQ 2007).

4.5.10 Linfomas de la zona marginal nodal: neoplasia que involucra nodos linfáticos, representan 1.5 – 1.8% de todas las neoplasias linfoides con una incidencia de 0.8 casos por 100.000 adultos. Su presentación clínica es asintomática, pero pueden presentar linfadenopatías. Presentan células linfoides pequeñas en nodos linfoides que rodea los folículos reactivos y se expande hacia las áreas interfoliculares. A nivel fenotípico presentan los marcadores de células B con co-expresión en un 20 – 75% de CD43, negativo para CD23, pero puede expresarse en el 29% de los casos Ciclina D1. Puede haber co-expresión de CD5 en el 17%. Pueden tener genes mutado de la familia de las IG como IGHV3 y IGHV4, en casos asociados con el virus de hepatitis C tienen alterado IGHV1-69. La tasa de supervivencia general a 5 años es de aproximadamente 60-70% (Angelopoulou MK 2014).

4.5.11 Linfoma Folicular: Neoplasia compuesta de células B en centros foliculares.

Tienen diferentes grados de presentación. Grado 1, Grado 2, Grado 3A, Grado 3B y patrón (Tabla 3). Su incidencia es del 20% de todos los linfomas, a nivel clínico se observa linfadenopatías, esplenomegalia y compromiso de medula ósea en el 40 – 70% de los casos (Silver SR 2015). Son células de pequeño a mediano tamaño, núcleo elongado o cribado, cromatina dispersa con un nucléolo, citoplasma claro (Imagen 11). Su inmunofenotipo se caracteriza por inmunoglobulina de superficie positiva, antígenos de células B como CD19, CD20, CD22, CD79a, BCL2, BCL6, CD10 y negativo para CD5 y CD43 (Bosga-Bouwer AG 2006).

Tabla 3. Grados y patrones de Linfoma Folicular

Grados	Definición
Grado 1 – 2	0 – 15 centroblastos
1	0 – 15 centroblastos
2	6 – 15 centroblastos
Grado 3	> 15 centroblastos
3A	Presencia de centrocitos
3B	Capa solida de centroblastos
Patrón	Proporción
Folicular	> 75%
Folicular y difuso	25 – 75%
Focalmente folicular / predominantemente difuso	< 25%
Difuso	0%

Presentan alteraciones genéticas en los genes BCL2, BCL6, KMT2D, TNFRSR14, EZH2, entre otros. Su pronóstico varía según la extensión y subtipo. Dentro de esta neoplasia se encuentran linfomas con centrocitos y centroblastos, pero con una rara presentación: 1. Neoplasia folicular In Situ, 2. Linfoma folicular de tipo duodenal, 3.

Linfoma folicular de tipo pediátrico, 4. Linfoma de células grandes B con reordenamiento IRF4 (Green MR 2013).

4.5.12 Linfoma de células del Manto: Linfoma de células B maduras del manto compuesto por células de pequeño a mediano tamaño, núcleo irregular, cromatina dispersa con un nucléolo (Imagen 1J) con translocación CCND1. Es un linfoma agresivo e incurable, pero con variantes. Representan el 3 – 10% de los linfomas No Hodgkin. Presentan linfadenopatías, esplenomegalia y compromiso de medula ósea (Swerdlow SH 2002). Las células expresan IgM/IgD de superficie, restricción de cadenas Lambda con mayor frecuencia que Kappa, son BCL2, FMC7 positivos, expresan CD5 y CD43, pueden expresar IRF4/MUM1, son negativos para CD10 y BCL6. Presentan alteraciones genéticas en los genes IGV, translocaciones t(11;14)(q13;q32) entre el gen IGH y CCND1 en el > 95% de los casos y expresión anormal de SOX11. Se asocia con una vida media de 3 – 5 años (Al-Hamadani M 2015).

4.5.13 Linfoma B difuso de células grandes: Es una neoplasia de células linfoides B medianas o grandes cuyos núcleos son del mismo tamaño o más grandes que los de los macrófagos normales, o más del doble del tamaño de los linfocitos normales, con un patrón de crecimiento difuso (Imagen 1K). Constituyen el 25 – 35% de los linfomas no Hodgkin. La mayoría de los pacientes presentan un agrandamiento de masa tumoral sola o en múltiples zonas extra nodales (Abramson JS. 2006). A nivel morfológico estas células están acompañadas de células T y/o histiocitos. Presentan tres variantes morfológicas: 1. Centroblastico: células medianas a grandes, escaso citoplasma, núcleo vesiculoso con dos a cuatro nucléolos apoyados en la membrana nuclear. Son monomorfos o polimorfos con inmunoblastos, 2. Inmunoblástico: células grandes con citoplasma basófilo, núcleo vesiculoso y nucléolo central prominente, 3.

Anaplásico: Las células que lo componen infiltran sinusoides o se presentan en forma cohesiva simulando metástasis. Son de gran tamaño, con amplio citoplasma, núcleos bizarros que remedan células de Reed-Sternberg (RS) o linfoma anaplásico. Expresan marcadores de células B CD19, CD20, CD22, CD79a, PAX5 e Inmunoglobulina a nivel de superficie y citoplasmático. Presentan rearrreglos en los genes BCL2 (puede tener translocación t(14;18)(q32;q21.3), BCL6, MYC, entre otros. Su supervivencia es aproximadamente de 5 años (Slack GW 2014).

4.5.14 Linfoma B difuso de células grandes primario de sistema nervioso

central: linfoma que surge dentro del cerebro, la médula espinal, las leptomeninges o el ojo. Representan < 1% de los linfomas no Hodgkin y del 2.4 – 3% de los tumores a nivel del cerebro. Los pacientes presentan disfunción cognitiva, alteraciones psicomotoras, síntomas neurológicos como dolor de cabeza, convulsiones y parálisis de los nervios craneales. Estas células presentan marcadores de células B CD19, CD20, CD22, CD79a, IgM, IgD (superficie) y PAX5, IgG negativo con restricción de cadenas Kappa y Lambda, en algunos casos puede presentar BCL6 (60 – 80%) y IRF4/MUM1 (90%), presentan translocaciones que afectan los genes BCL6 y MYC. Pacientes > 65 años presentan mal pronóstico (Schlegel U 2009).

4.5.15 Linfoma B difuso de células grandes primario de pierna: Está compuesto exclusivamente por centroblastos y inmunoblastos en la pierna, comprende el 4% de los linfomas primarios cutáneos y el 20% de los linfomas B cutáneos. Presentan tumores en una o las dos piernas. Expresan inmunoglobulina, CD20 y CD79a, además de IRF4/MUM1, FOXP1, MYC y IgM citoplasmática con coexpresión de IgD. Se ven afectados los genes MYC y BCL6 (Hamilton SN 2013).

4.5.16 Linfoma B difuso de células grandes asociado a infección por virus de

Epstein Barr: Representan < 5 – 15% de los linfomas B de células grandes. La mitad

de los pacientes presentan alta progresión de la enfermedad, a nivel celular consiste en un número alto de inmunoblastos con células parecida al linfoma de Hodgkin (Sternberg Reed), comprende linfocitos pequeños, células plasmáticas, histiocitos y células epiteliales. Las células son positivas para el pan-B CD19, CD20, CD22, CD79a y PAX5, negativo para CD10 y BCL6. Su pronóstico no es muy bueno (Cohen JI 2009).

4.5.17 Linfoma de células grandes primario mediastinal: Linfoma de células B maduras timicas que surgen en el mediastino, representa el 2 – 3% de linfomas no Hodgkin. Presenta marcadores de linaje B CD19, CD20, CD22 y CD79a con expresión de factores de transcripción PAX5, BOB1, OCT2 y PU1. A nivel genético tienen rearrreglos (BCL2, BCL6 y MYC) e hipermutación somática en los genes de Inmunoglobulina (Savage KJ 2006).

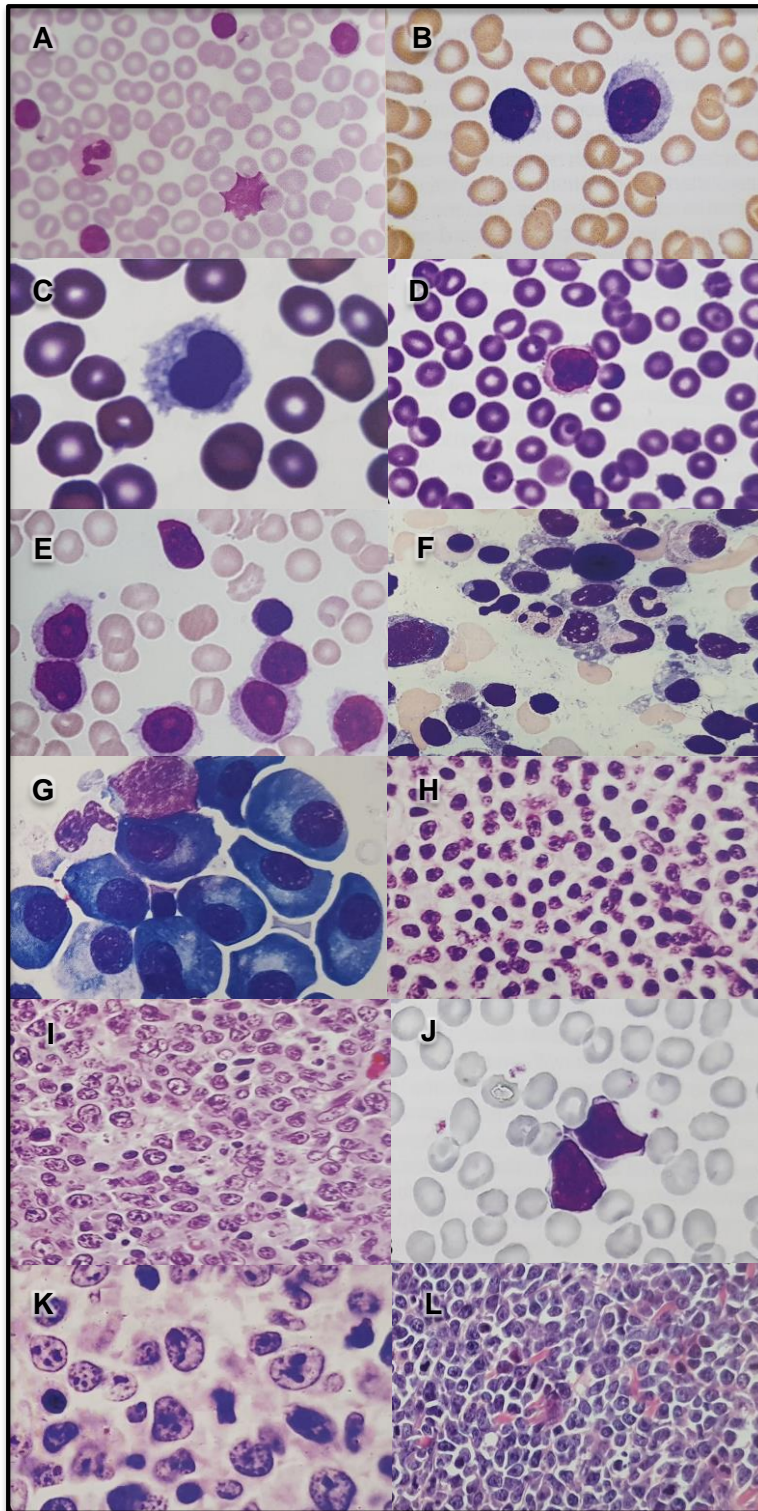
4.5.18 Linfoma de células grandes intravascular: es un raro tipo de linfoma extranodal caracterizado por el crecimiento selectivo de células de linfoma en vasos particularmente capilares y con excepción de arterias y venas. Presenta una edad media de 67 años con prevalencia en hombres que mujeres 1.1:1, su clínica es alteraciones sintomáticas neurológicas o cutáneas. Las células co-expresan CD5 y CD10, IRF4/MUM1 positivo, su pronóstico es generalmente agresivo ().

4.5.19 Linfoma de efusión primaria: Se presenta como efusiones serosas sin masas tumorales detectables, está asociado con herpes virus 8. La edad media es de 42 años con HIV y 73 años en general. Se observan células de aspecto blástico con núcleo de forma irregular con un nucléolo predominante. Puede tener abundante citoplasma basófilo con ocasionales vacuolas. Su inmunofenotipo es CD45, CD19, CD20 y CD79a, inmunoglobulina citoplasmática y de superficie ausente, BCL6

negativo. Presenta alteraciones genéticas en los genes de Inmunoglobulina. Su pronóstico es extremadamente favorable (Courville EL 2014).

4.5.20 Linfoma de Burkitt: Linfoma de alta agresividad, pero curable, presenta alteraciones extranodales. Este compuesto por células B de mediano tamaño, con citoplasma basófilo (Imagen 1L). Usualmente con translocación MYC, presenta un subtipo con coinfección de EBV. La frecuencia de esta neoplasia es según la distribución geográfica y presentación clínica. 1. Tipo endémico: se presenta en niños y adolescentes, principalmente en zonas africanas, se caracteriza por estar correlacionado con infección por el virus de Epstein Barr (EBV). Los pacientes que presentan linfomas de Burkitt tipo endémico generalmente tienen tumores que comprometen la mandíbula, órbitas y otros huesos faciales, 2. Tipo esporádico: No presenta una distribución geográfica definida, puede asociarse con el virus de EBV. Este tumor afecta la cavidad abdominal, específicamente la región ileocecal, y compromete regiones de pared intestinal y del mesenterio. La cabeza, el cuello y los ganglios linfáticos son otros lugares que pueden verse comprometidos por este subtipo, 3. Asociado a inmunodeficiencia: Se observa principalmente en pacientes con VIH. La localización de los tumores suele ser nodal. presencia de múltiples macrófagos dispersos, de citoplasma abundante y claro, con cuerpos fagocitados que contienen células tumorales apoptóticas (Mbulaitey MS 2012). Su inmunofenotipo es fuertemente IgM, restricción de cadenas livianas, CD19, CD20 CD22, CD79a, PAX5 y marcadores de centro germinal como CD10 y BCL6. CD38, CD77 y CD43 con una frecuencia positiva y expresión fuerte de proteína MYC, por ende, la translocación con mayor frecuencia es MYC t(8;14)(q24;q32). Dentro de esta neoplasia está el Linfoma de Burkitt con aberración 11q (Naresh NK 2011).

Imagen 1. Descripción de la morfología celular.



A. Leucemia linfóide crónica B LLC/linfoma linfocítico. **B.** Linfoma de la zona marginal esplénica. **C.** Tricoleucemia. **D.** Linfoma de células B pequeño difuso de pulpa roja esplénica. **E.** Variante de leucemia de células peludas. **F.** Linfoma linfoplasmocítico. **G.** Mieloma múltiple. **H.** Linfoma tipo MALT. **I.** Linfoma folicular. **J.** Linfoma de células del Manto. **K.** Linfoma B difuso de células grandes. **L.** Linfoma de Burkitt.

Imágenes tomadas de: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Arber D, Hasserjian R, Bean M, Orazi A, Slebert R. WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2017 Lyon, France: IARC Press; 4th Edition.

En la actualidad para detectar con alta sensibilidad y precisión, la presencia de células tumorales de linfomas B en diversos tipos de muestras como los ganglios linfáticos y líquidos corporales, se emplean paneles de anticuerpos estandarizados por el Consorcio Europeo EuroFlow como el tubo LST (lymphoid screening tube) y paneles de caracterización de estos linfomas en biopsias, sangre y médula ósea (van Dongen 2012) y el tubo SST (*small sample tube*) para el estudio de muestras con baja celularidad como LCR y humor vítreo, para estudios de extensión (van Dongen 2012). Además de la CMF, para el estudio de linfomas se emplean otras herramientas diagnósticas que incluyen métodos morfológicos, inmunohistoquímicos, citogenéticos y moleculares, que en conjunto contribuyen a la clasificación de la enfermedad, a definir estadio clínico y el pronóstico. Los métodos moleculares detectan las alteraciones genéticas asociadas al desarrollo, evolución y pronóstico de los linfomas; estos incluyen técnicas como PCR, qPCR, Hibridación in situ y análisis de clonalidad B; entre otros (Vives J 2014). (Vives J 2014).

5. Pregunta de investigación:

¿Cuál es la utilidad de la citometría de flujo convencional y del tubo SST de EuroFlow, para la evaluación de infiltración tumoral en muestras especiales en pacientes con linfomas B, en comparación con los estudios morfológicos en el Hospital Universitario San Ignacio?

6. Objetivo general:

Documentar los hallazgos de la evaluación de infiltración tumoral de muestras especiales de pacientes con linfomas B mediante citometría de flujo convencional y del tubo SST de EuroFlow en el área de citometría del laboratorio clínico del Hospital Universitario San Ignacio.

6.1. Objetivos específicos:

- Determinar la utilidad de la Citometría de flujo convencional y del tubo SST de EuroFlow para la evaluación de infiltración tumoral de muestras especiales en pacientes con diagnóstico de linfomas de células B.
- Caracterizar y comparar las diferentes subpoblaciones celulares presentes en muestras especiales infiltradas o no por linfoma de células B mediante citometría de flujo.
- Comparar los resultados obtenidos mediante Citometría de flujo con los estudios morfológicos, para la evaluación de infiltración tumoral por linfomas B en muestras especiales.

7. Metodología:

Registro de la información de los casos incluidos

Se realizó una base de datos de todas las muestras especiales de líquidos corporales de pacientes con linfomas B que se analizaron en el área de Citometría del laboratorio clínico del Hospital Universitario San Ignacio desde el año 2014, donde se recolectó la información de un total de 662 casos. Esta base incluye la siguiente información: género y edad del paciente, tipo de linfoma tipo de muestra especial, volumen de muestra, celularidad de las muestras según los resultados de citometría teniendo en cuenta porcentajes y valores absolutos de poblaciones normales y tumorales. Además, se registraron los resultados de los estudios morfológicos (citología en el Servicio de Hematología Especial) y/o los resultados descritos en el laboratorio de patología del Hospital Universitario San Ignacio, de las muestras que tuvieron estudios de citometría y morfología de forma simultánea.

Protocolo de marcaje de las muestras especiales mediante citometría de flujo

El Protocolo empleado para el procesamiento, marcaje, adquisición y análisis de muestras especiales (líquidos biológicos) por CMF es el recomendado por el Consenso Colombiano de CMF realizado en el año 2008 y por van Dongen et al 2012, el cual recomienda utilizar estabilizantes en las muestras especiales, principalmente en las muestras de LCR, debido a que estudios recientes (Subirá D 2015; Kraan J 2008) demuestran que el empleo de una solución estabilizante previene la pérdida celular producida por los efectos citotóxicos *in vitro* del LCR sobre los leucocitos, manteniendo estable la muestra por periodos superiores a 24-48 horas después de su obtención (Kraan J 2008).

Fase Pre-analítica:

- a) Los médicos tratantes solicitan en la unidad de citometría de flujo un tubo que contiene el estabilizante (TransFix™).
- b) La muestra especial se recolecta directamente en el tubo que contiene el estabilizante (la mezcla final queda en una dilución 1/10).
- c) La muestra se transporta a la Unidad de Citometría en condiciones de refrigeración (temperatura de 4°C). Según las recomendaciones descritas por Jongste A, et al 2014, las muestras se dejan en contacto con el estabilizante por un periodo aproximado de 18 horas.

Fase Analítica:

- a) Medir el volumen total de la muestra recibida y registrarla.
- b) Transferir a otro tubo 200 µl de la muestra total y guardar en nevera de seguridad para almacenar.
- c) De la muestra restante adicionar 2 mL de PBS filtrado + albúmina 0,5% para realizar un lavado de la muestra.
- d) Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm para concentrar las células.
- e) Retirar el sobrenadante obtenido con pipeta Pasteur o con micropipeta.
- f) Resuspender el pellet celular con 300 µl de PBS + albúmina 0,5%.
- g) Realizar el marcaje utilizando 100 µl de la muestra y emplear el panel convencional (marcaje combinado en 7 fluorescencias previo a la implementación del tubo SST) (Campos A et al 2017) o el tubo

SST de EuroFlow (marcaje combinado en 8 fluorescencias) (van Dongen 2012) (Tablas 4 y 5).

Tabla 4: Composición del tubo convencional para el estudio de muestras especiales en el servicio de citometría del Hospital Universitario San Ignacio (previo a la implementación del tubo SST de EuroFlow)

Fluorocromos	V450	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
Marcadores evaluados	CD20	Kappa	Lambda	CD19	CD3	CD14	CD45
Células identificadas	Linfocitos B	Cadenas ligeras de las inmunoglobulinas		Linfocitos B	Linfocitos T	Monocitos	Leucocitos
Cantidad	3ul	10ul		10ul	3ul	3ul	3ul

FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCPCy5, peridina clorofila proteína cianina 5; PECY7, PE cianina (Cy)7; APC, alofocianina; APC7, APC cianina 7; V450, violeta 450.

Tabla 5: Composición del *Small Sample Tube* de EuroFlow para el estudio de muestras especiales en el servicio de citometría del Hospital Universitario San Ignacio

Fluorocromos	PECy7	V450	V500	PE	FITC	PerCPCy5.5	APC	APCH7
Marcadores evaluados	CD19	CD20	CD45	CD56 Kappa	CD8 Lambda	CD4	CD3-CD14	CD38
Células identificadas	Células B		Leucocitos	CD56: células NK; CD8: células T; Kappa y Lambda: cadenas ligeras de las inmunoglobulinas		Células T y monocitos	Células T y monocitos/macrófagos	Células plasmáticas y otros tipos celulares
Cantidad	5ul	5ul	5ul	10ul	10ul	10ul	3ul / 5ul	3ul

FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCPCy5, peridina clorofila proteína cianina 5; PECY7, PE cianina (Cy)7; APC, alofocianina; APC7, APC cianina 7; V450, violeta 450; V500, violeta 500.

- h) Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
- i) Adicionar 2,0 ml de solución de lisis de eritrocitos.
- j) Incubar 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad.
- k) Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm a 2°C.

- l) Retirar el sobrenadante obtenido con pipeta Pasteur o con micropipeta.
- m) Resuspender el pellet celular en 0,3 ml de PBS + albúmina 0,5% y adicionar las esferas fluorescentes con el fin de realizar los recuentos absolutos de las diferentes poblaciones celulares presentes en la muestra.
- n) Mezclar y adquirir todo el volumen de muestra en el Citómetro de flujo *FACS Canto II BD*. Nota: Antes de la adquisición, es necesario limpiar el citómetro con una solución de lavado durante al menos 5 minutos para evitar la contaminación de la muestra con otras que hayan sido previamente adquiridas.

Fase post-analitica: El análisis se realizó empleando el software multiparamétrico desarrollado por EuroFlow, INFINICYT™ Cytognos, SL. Las células de interés se seleccionaron de acuerdo a la expresión del marcador CD45 (antígeno común leucocitario) y otros marcadores específicos de línea y su granularidad y complejidad interna. Además, las esferas fluorescentes que se añadieron al tubo de manera artificial también fueron seleccionadas y calculadas. Una vez se registró el número total de células y de esferas identificadas en el análisis, se procedió a calcular el número absoluto de cada subpoblación celular, aplicando la siguiente fórmula:

$$Celulas\ uL = \left[\frac{\# de\ células\ en\ Gate}{\# de\ microesferas\ en\ Gate} * \frac{\# de\ microesferas\ añadidas\ por\ tubo(a)}{volumen\ de\ muestras\ uL\ (b)} * Factor\ de\ conversión\ (b) \right]$$

Donde:

- a. El número total de esferas añadidas al tubo se calcula de la siguiente forma: (volumen de microesferas añadidas al tubo x

concentración de microesferas/u) (este dato lo provee el fabricante).

- b. Volumen total de la muestra en el momento de su obtención.
- c. El factor de corrección es igual al volumen inicial de la muestra dividido por el volumen de la muestra concentrada utilizada para el marcaje en cada tubo.

8. Análisis estadístico

Utilizando el programa estadístico SPSS versión 20, se realizaron análisis descriptivos para obtener los valores promedio, rangos y frecuencias de cada uno de los datos obtenidos y de los resultados de las poblaciones celulares registrados en las muestras agrupadas por tipo de diagnóstico y presencia o ausencia de infiltración, determinando diferencias significativas entre cada grupo evaluado. Con el fin de establecer diferencias entre grupos independientes se aplicó el test U de Mann-Whitney. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

9. Resultados

Descripción de las características de las muestras especiales evaluadas

Entre abril de 2014 a marzo de 2019 se analizaron en total 662 muestras especiales de pacientes de sexo masculino 414 (62,5%) y 248 muestras de pacientes de sexo femenino (37,5%). La edad promedio de los pacientes fue de 55 años con un rango entre 20 a 92 años.

El mayor número de muestras correspondieron a LCR (n=540; 81,6% de los casos), seguido de muestras de líquido pleural (n=63; 9,5%), lavado bronco alveolar (LBA) (n=28; 4,2%), líquido peritoneal (n=3; 0,5%), líquido ascítico (n=2; 0,3%), biopsias de Ganglio (n=14; 2,1%) y otras biopsias diferentes de ganglio (n=12; 1,8%) (Figura 1).

Los volúmenes de muestra recolectados varían entre mínimo 0,05 ml (en el caso de LCR) hasta 5 ml (en el caso de líquidos pleurales); como es de esperar las muestras de LCR son las de menor volumen respecto a las demás muestras analizadas ($p < 0,05$) (Figura 2).

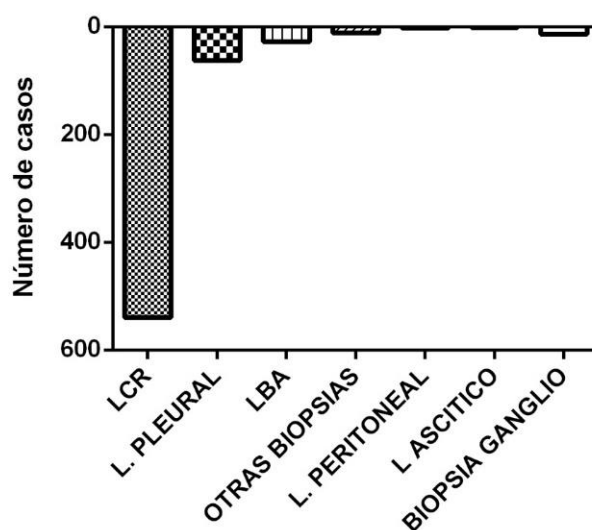


Figura 1. Distribución de casos de acuerdo al tipo de muestra analizada por CMF.
LCR: líquido cefalorraquídeo; LBA: lavado bronco alveolar.

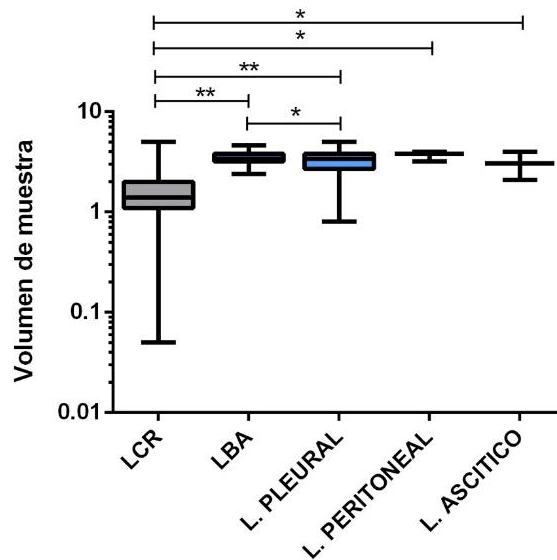


Figura 2. Volúmenes de muestra de cada líquido corporal. La línea media y las líneas verticales representan la mediana y rango, respectivamente. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ para comparación entre grupos de individuos mediante test U de Mann-Whitney. LCR: líquido cefalorraquídeo; LBA: lavado bronco alveolar.

En relación al tipo de Linfoma, un número importante de casos corresponde a linfomas no clasificados en el momento del estudio ($n = 250$; 37,8%), casos con sospecha de linfoma sin confirmación en el momento del estudio por patología ($n = 72$; 10,9%), linfomas B de células grandes ($n = 176$; 26,6%), linfoma del manto (LM) ($n = 69$; 10,4%), linfoma de Burkitt ($n = 31$; 4,7%), linfoma plasmablastico ($n = 27$; 4,1%), linfoma folicular (LF) ($n = 16$; 2,4%), leucemia linfoide crónica (LLC) ($n = 10$; 1,5%), linfoma B de sistema nervioso central ($n = 5$; 0,8%), linfoma de Burkitt asociado a SIDA ($n = 4$; 0,6%) y tricoleucemia ($n = 2$; 0,3%) (Figura 3).

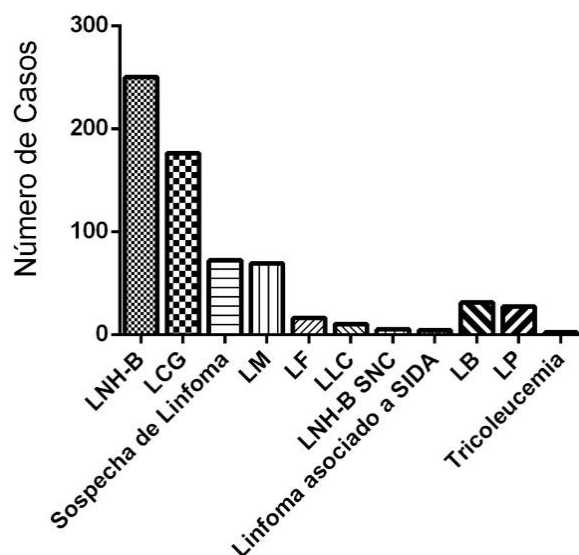


Figura 3. Distribución de los casos de acuerdo al diagnóstico.

LNH-B: Linfoma No Hodgkin de células B; LCG: Linfoma No Hodgkin B de Células Grandes; LM: Linfoma del Manto; LF: Linfoma Folicular; LLC: Leucemia Linfoide crónica; LNH-B SNC: Linfoma No Hodgkin B de Sistema Nervioso Central; LB: Linfoma de Burkitt; LP: Linfoma Plasmablástico.

Al comparar el número total de células/ul, evaluado por citometría de flujo en las diferentes muestras, se encontró que las muestras de líquido pleural corresponden a las que tienen mayor contenido de células respecto a las muestras de LBA y LCR ($p < 0,05$) (Figura 4) y las muestras de LCR como es de esperarse tienen menores números de células respecto a las demás ($p < 0,05$). Es importante resaltar que las muestras de LCR tienen un número elevado de células respecto al intervalo biológico de referencia, hecho que se relaciona con la infiltración tumoral en los casos positivos y a la inflamación local que se genera como consecuencia de la presencia de células tumorales a nivel de sistema nervioso central. En relación a las muestras de biopsia, no se encontraron diferencias significativas en el número de células al comparar las biopsias de ganglio respecto a otras biopsias (Figura 5).

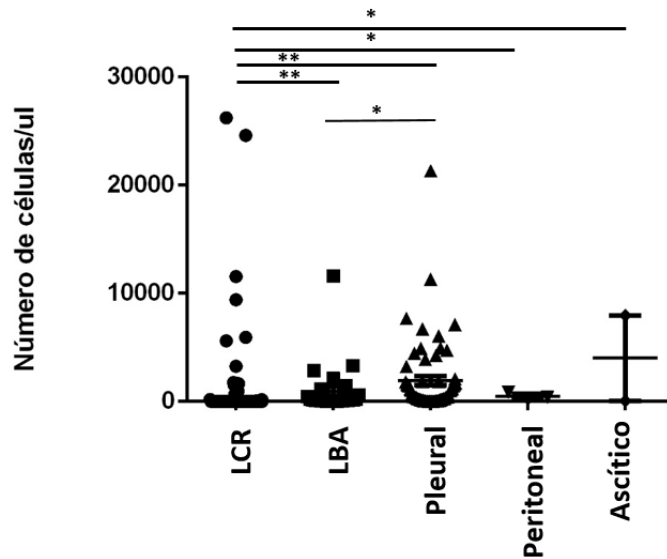


Figura 4. Número total de células/uL en cada muestra especial, analizado por citometría de flujo. La línea media y las líneas verticales representan la mediana y rango, respectivamente. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ para comparación entre grupos de individuos mediante test U de Mann-Whitney.

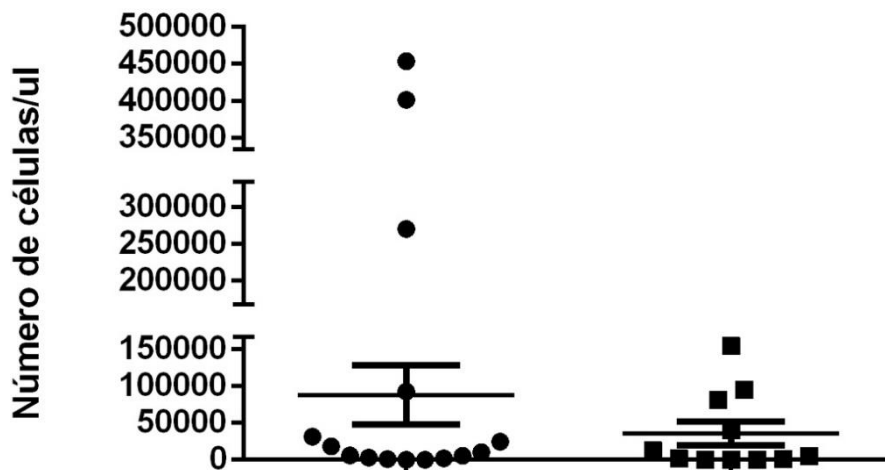


Figura 5. Número total de células/uL en las muestras de biopsia, analizado por citometría de flujo. La línea media y las líneas verticales representan la mediana y rango, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el número de células al comparar los dos grupos mediante test U de Mann-Whitney.

Análisis de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR)

El total de muestras de LCR analizadas fue de 540 y del total de muestras de LCR evaluadas, se encontró que el 12.4% (n=67) tenían infiltración tumoral y el 87.6% (n=472) restante estaban libres de tumor (Figura 6).

Dentro de los linfomas que contaron con clasificación, el 32,8% de los linfomas del manto (20/61 casos) mostraron infiltración tumoral en LCR mediante citometría de flujo. De forma interesante, solo el 5,2% de los casos de linfoma B de célula grande fueron positivos para infiltración en LCR, teniendo en cuenta que un número importante de casos no contaban con clasificación de la enfermedad al momento de su análisis en el servicio de citometría (casos con pregunta clínica: linfoma o sospecha de linfoma). Adicionalmente, 2/7 casos de LLC-B (28,6%) fueron positivos para infiltración, este porcentaje es muy alto, teniendo en cuenta que la LLC-B es un tumor poco agresivo, con baja probabilidad de diseminación hacia sistema nervioso central. Sin embargo, consideramos que el número de muestras con diagnóstico de LLC-B es muy bajo y no representa la realidad clínica de esta patología (Tabla 6).

Es importante destacar, que los LCR con infiltración tumoral mostraron un número significativamente superior de células totales/ul y estas células incluyen linfocitos T y de manera contraria, tienen un número menor de linfocitos B normales y células NK (Tabla 7). En términos de sensibilidad, la citometría es capaz de detectar un mínimo de 0,0026 células tumorales/ul, lo cual demuestra la capacidad de detección de células tumorales de esta técnica. En las figuras 13-14 se muestran ejemplos de análisis de LCR sin y con infiltración tumoral con el panel SST.

Tabla 6. Resultados de citometría de flujo para la evaluación de infiltración tumoral en LCR en los linfomas B con clasificación.

Tipo de linfoma	-	+
L. Manto (n=61)	67,2%	32,8%
L. Plasmablástico (n=22)	86,4%	13,6%
L. Célula Grande (n=153)	94,8%	5,2%
LLC (n=7)	71,4%	28,6%
L. Folicular (n=8)	100%	0%
L. Burkitt (n=30)	100%	0%
L. Burkitt VIH+(n=3)	66,7%	33,7%

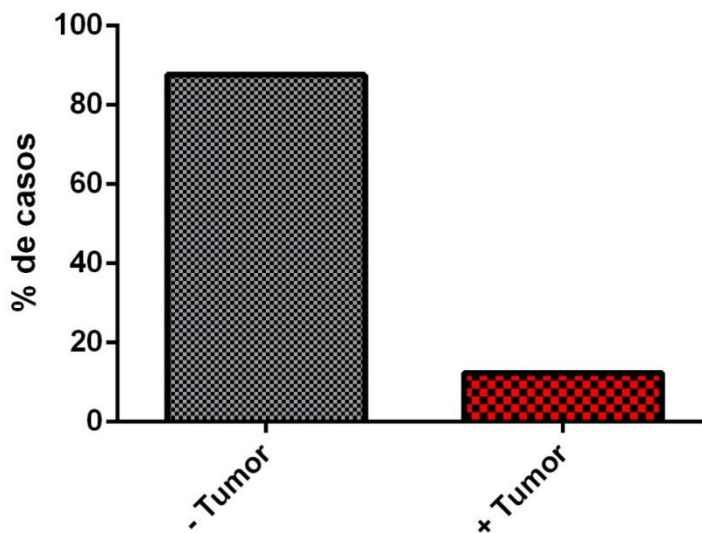


Figura 6. Frecuencia de casos de LCR con presencia y ausencia de infiltración tumoral detectada mediante citometría de flujo.

Tabla 7. Análisis de la celularidad de las muestras de LCR y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral.

Tipo de muestra	Sin infiltración		Con infiltración tumoral		P valor
	media	rango	media	rango	P valor
Líquido cefalorraquídeo (LCR)					
Número de células/ul	32	0.001-5601	1267	0.080-26226	<0.001
Monocitos/ul	6.0	0.001-935	15.30	0.040-319	<0.001
Linfocitos T/ul	17	0.001-3875	38	0.153-590	0.002
Linfocitos B/ul	4.2	0.004-117	0.63	0.1-4.95	0.002
Células NK/ul	15.7	0.01-588	5.8	0.044-26.22	0.002
Células dendríticas/ul	7.6	0.01-62.7	0.33	0.33	NS
Linfocitos B patológicos/ul	-	-	1153	0.002-24180	NA
Células plasmáticas patológicas/ul	-	-	1911	0.170-5730	NA

NS: no significativo, NA: no aplica

Análisis de muestras de líquido pleural

Después del análisis de los casos (n=63), se encontró que el 44.4% (n=25) estaban infiltrados por células tumorales y los casos restantes el 55.6% (n=38) fueron negativos para tumor (Figura 7).

Se encontró que el 83,3% de los casos de linfoma del manto (n=5/6 casos) son positivos en LCR mediante citometría, seguidos del 66,7% de los casos de linfoma folicular y linfoma plasmablástico; respectivamente (n=2/3) (Tabla 8). En los casos con infiltración tumoral la CMF permitió detectar un mínimo de 0,23 células tumorales/ul. Las muestras de líquido pleural con infiltración tumoral, tienen un número superior de células totales/ul (p=0,01). Adicionalmente, en estas muestras se encontraron diversos tipos celulares que incluyen linfocitos T, linfocitos B, células NK, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, células plasmáticas y macrófagos. Sin embargo, al comparar los números/ul de estas poblaciones celulares entre las muestras infiltradas o no por tumor, no se encontraron diferencias significativas (Tabla 9). En

las figuras 15-16 se muestran ejemplos de análisis de LCR sin y con infiltración tumoral con el panel SST.

Tabla 8. Resultados de citometría de flujo para la evaluación de infiltración tumoral en muestras de líquido pleural en los linfomas B con clasificación.

Tipo de linfoma	-	+
L. Folicular (n=3)	33,3%	66,7%
L. Manto (n=6)	16,7%	83,3%
L. Burkitt VIH (n=1)	0%	100%
L. Plasmablástico (n=3)	33,3%	66,7%
LLC (n=1)	0%	100%
L. Célula Grande (n=14)	78,6%	21,4%

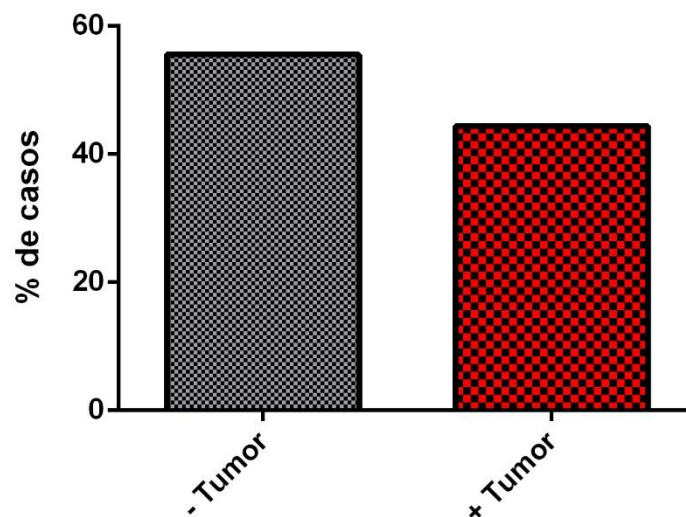


Figura 7: Frecuencia de casos de líquido pleural con presencia y ausencia de infiltración tumoral detectada mediante citometría de flujo.

Tabla 9. Análisis de la celularidad de las muestras de Líquido pleural y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral.

Tipo de muestra	Sin infiltración		Con infiltración tumoral		P valor
	media	rango	media	rango	
Líquido pleural					
Número de células/ul	1524	14-21335	2365	29-11321	0,01
Monocitos/ul	189	0.840-2060	207	0.99-2377	NS
Linfocitos T/ul	748	2.7-15361	705	4.06-3761	NS
Linfocitos B/ul	294	0.275-4331	119	0.098-1880	NS
Células NK/ul	49.47	0.270-704	37.84	0.28-158	NS
Neutrófilos/ul	338	0.420-3506	37.84	3.84-892	NS
Eosinófilos/ul	30.23	0.920-85.26	7.98	1.72-15.73	NS
Células plasmáticas/ul	44.58	0.420-277	6.09	0.350-19.74	NS
Macrófagos/ul	33.94	3.1-102	59.54	12.77-126	NS
Linfocitos B patológicos/ul	-	-	1298	0.232-5131	NA
Células plasmáticas patológicas/ul	-	-	302	244.60-360-19	NA

NS: no significativo; NA: no aplica

Análisis de muestras de lavado bronco alveolar (LBA)

Después del análisis de los casos (n=28), se encontró que el 21.4% (n=6) de las muestras fueron positivas para infiltración tumoral respecto a un 78.6% (n=22) de casos no infiltrados (Figura 8).

Se detectó presencia de infiltración tumoral en el 20% de los casos de linfoma de células grandes (1/5 casos). Adicionalmente, se estudiaron dos muestras con diagnóstico de LLC-B y de Tricoleucemia y estas también se encontraban infiltradas por linfoma. En los casos con infiltración tumoral la citometría detectó un número mínimo de 0,83 células tumorales/ul. En estas muestras se encontraron otras poblaciones celulares que incluyen linfocitos T, linfocitos B, células NK, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. Al comparar los números/ul de estas poblaciones celulares

entre las muestras infiltradas o no por tumor, no se encontraron diferencias significativas (Tabla 10).

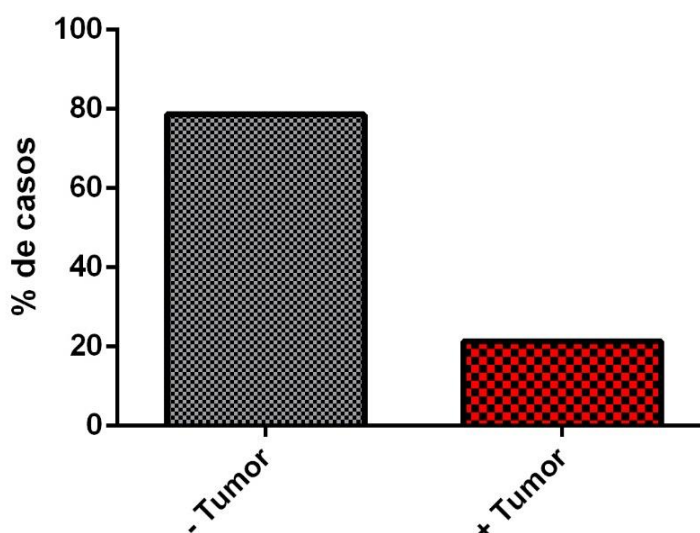


Figura 8. Frecuencia de casos de LBA con presencia y ausencia de infiltración tumoral detectada mediante citometría de flujo

Tabla 10. Análisis de la celularidad de las muestras de Lavado bronco alveolar y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral

Tipo de muestra	Sin infiltración		Con infiltración tumoral		P valor
	media	rango	media	rango	P valor
Lavado bronco alveolar (LBA)					
Número de células/ul	913	0.600-11623	784	76-2873	NS
Monocitos/ul	326	0.002-5241	247	0.152-939	NS
Linfocitos T/ul	166	0.312-2557	486	29.64-1781	NS
linfocitos B/ul	7.7	0.033-34	6.18	0.152-17.23	NS
Células NK/ul	7.9	0.090-58.11	7.59	2.28-17.23	NS
Neutrófilos/ul	239	0.049-2599	289	1.54-1107	NS
Eosinófilos/ul	261	0.170-1510	0.38	0.38	NS
Linfocitos B patológicos/ul	-	-	112.32	0.836-247.18	NA

NS: no significativo, NA: no aplica

Análisis de muestras de líquido peritoneal:

Se analizaron 3 muestras de líquido peritoneal (n=3) de pacientes con linfoma plasmablastico mediante citometría y se encontró que el 33.3% (n=1) de las muestras fueron positivas para infiltración tumoral respecto a un 66.7% (n=2) de casos no

infiltrados (Figura 9). El número promedio de células tumorales encontradas en estas muestras fue de 456.66/ul con un rango entre 106-873 células/ul. La comparación del número total de células/uL y los números de otras poblaciones celulares encontradas en estas muestras, no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 11).

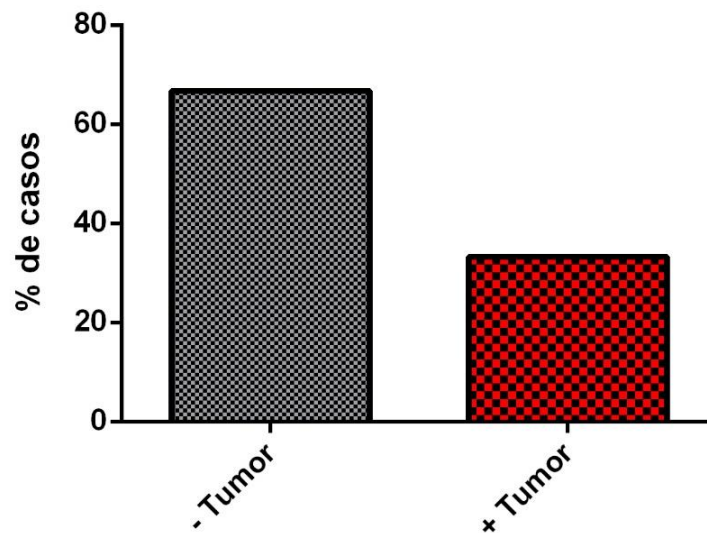


Figura 9. Frecuencia de casos de líquido peritoneal con presencia y ausencia de infiltración tumoral detectada mediante citometría de flujo.

Tabla 11. Análisis de la celularidad de las muestras de Líquido peritoneal y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral

Tipo de muestra	Sin infiltración		Con infiltración tumoral		P valor
	media	rango	media	rango	P valor
Líquido peritoneal					
Número de células/ul	489	106-873	391	391	NS
Monocitos/ul	10	6,04-13,96	50,83	50,83	NS
Linfocitos T/ul	50,7	12,22-89,04	230	230	NS
Linfocitos B/ul	3,8	3,8	0	0	NS
Células NK/ul	1,8	1,8	7,82	7,82	NS
Neutrófilos/ul	426	5,3-846	73,89	73,89	NS
Linfocitos B patológicos/ul	-	-	15,64	15,64	NA

NS: no significante, NA: no aplica

Análisis de muestras de líquido ascítico:

Se analizaron en total 2 muestras de líquido ascítico de las cuales una corresponde a linfoma del manto y fue positiva para infiltración y la segunda a un LNH-B sin clasificación, que se encontraba negativo. El número de células tumorales detectadas en el caso de linfoma del manto fue de 4004.5/ul. En la tabla 12 se muestran las poblaciones celulares encontradas en estas muestras.

Tabla 12. Análisis de la celularidad de las muestras de Líquido ascítico y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral

Tipo de muestra	Normal		Con infiltración tumoral	
	media	rango	media	rango
Líquido ascítico				
Número de células/ul	7956	7956	53	53
Monocitos/ul	2116	2116	5,83	5,83
Linfocitos t/ul	343	343	18.02	18.02
Linfocitos b/ul	3,97	3,97	0,100	0,100
Células NK/ul	63,64	63,64	1,11	1,11
Neutrófilos/ul	5323	5323	26,65	26,65
Linfocitos B patológicos/ul	-	-	1,06	1,06

Análisis de biopsias de ganglio

Se analizaron en total 14 muestras correspondientes a biopsia de ganglio, de las cuales 6 (42,9%) fueron positivas para infiltración tumoral; mientras que 8 muestras (57,1%) fueron negativas (Figura 10). as cuales se observó infiltración por Linfocitos B patológicos por Linfoma Folicular (33.3% (n=1/3 de los casos) y Linfoma de Burkitt (100% n=1/1).

Después del análisis de los casos se encontró que el 42.9% (8) de las muestras fueron positivas para infiltración tumoral respecto a un 57.1% (6) de casos no infiltrados (Figura 11). De los 6 casos positivos por citometría en biopsia, 3 corresponde a linfoma folicular, 1 a linfoma de Burkitt y 2 a linfomas B de célula grande. En el análisis

de la celularidad de las muestras entre muestras infiltradas y no infiltradas, no se encontraron diferencias significativas (Tabla 13)

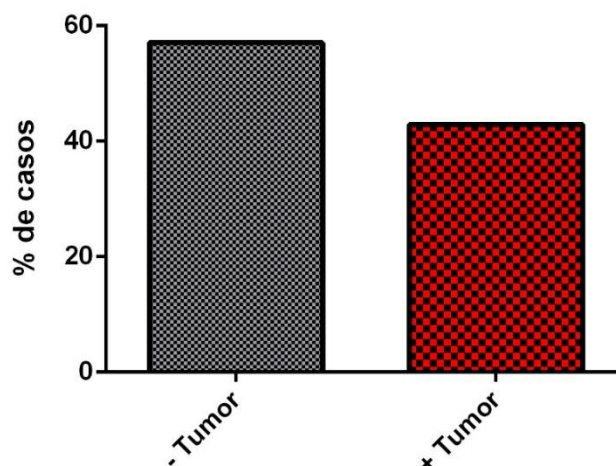


Figura 10. Frecuencia de biopsias de ganglio con presencia y ausencia de infiltración tumoral detectada mediante citometría de flujo.

Tabla 13. Análisis de la celularidad de las muestras de biopsias de ganglio y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral

Tipo de muestra	Sin infiltración		Con infiltración tumoral		P valor
	media	rango	media	rango	P valor
Biopsia de ganglio					
Número de células/ul	79424	1277-45370	93952	121-401436	NS
Monocitos/ul	621	453-937	936	2,92-3780	NS
Linfocitos T/ul	13171	131-58983	32915	24,13-183107	NS
Linfocitos B/ul	294	294	11045	65,86-64816	NS
Células NK/ul	98	98	2898	1,46-9306	NS
Neutrófilos/ul	1151	395-1969	1234	4,69-5097	NS
Eosinófilos/ul	114	114	13,6	0,120-77,08	NS
Linfocitos B patológicos/ul	-	-	53657	59,27-329578	NA

NS: no significativo, NA: no aplica

Análisis de otras biopsias distintas a ganglio:

Se analizaron 12 muestras de otras biopsias distintas a ganglio que corresponden a biopsias de amígdala, bazo, entre otras. Después del análisis por citometría se encontró que el 58,3% (n=7) de las muestras fueron positivas para tumor y 41.7%

(n=6) fueron negativas (Figura 11). De los 7 casos positivos por citometría en las biopsias, 2 corresponden a linfoma folicular, 1 a linfoma plasmablastico, 1 a linfoma B de célula grande y los 3 restantes corresponden a LNH-B sin clasificación. En el análisis no se presenta un número significativo de las células totales/ul y celularidad (Tabla14)

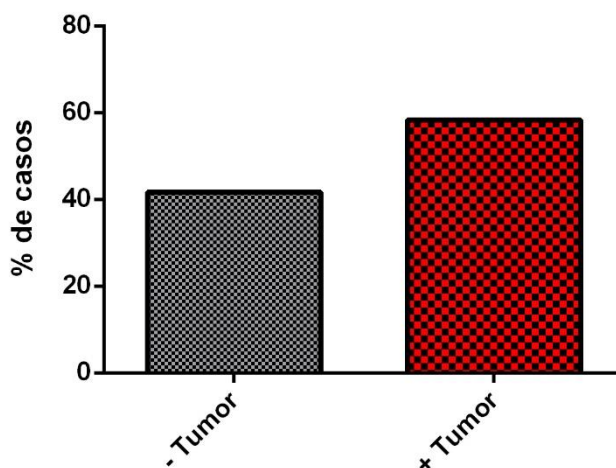


Figura 11. Frecuencia de biopsias distintas a ganglio, con presencia y ausencia de infiltración tumoral detectada mediante citometría de flujo.

Tabla 14. Análisis de la celularidad de las muestras de otras biopsias y comparación entre casos con y sin infiltración tumoral

Tipo de muestra	Sin infiltración		Con infiltración tumoral		P valor
	media	rango	Media	rango	P valor
Otras Biopsias					
Número de células/ul	16674	83-81510	65673	6-154845	NS
Monocitos/ul	1447	4,95-6447	393	309-477	NS
Linfocitos T/ul	3987	83-24419	18472	5,28-41808	NS
Linfocitos B/ul	1512	16,04-4432	16056	30969	NS
Células NK/ul	486	22,80-1289	190	190	NS
Linfocitos B patológicos/ul	-	-	80364	0,72-80364	NA
Células plasmáticas patológicas/ul	-	-	1921	1921	NA

NS: no significativo; NA: no aplica

Comparación de los hallazgos de infiltración tumoral entre la citometría y la morfología

La citometría de flujo reportó los resultados de los análisis como positivos o negativos para tumor; mientras que el estudio morfológico reportó los resultados como positivos, sospechosos de infiltración o negativos. De todos los casos evaluados en este trabajo (n=662), solo 147 tuvieron estudio simultáneo de citometría y morfología.

Es importante resaltar que la citometría fue positiva para tumor en 46/147 muestras (41,3%), mientras que la morfología solo reporta como positivas 13/147 (8,8%). Además, mediante morfología se reportó que 9 muestras eran sospechosas y de estas, la citometría confirmó que 6 eran positivas y 3 negativas. Al comparar la capacidad de detección de linfocitos B tumorales de las dos técnicas, es claro que la citometría es una técnica muy superior en términos de sensibilidad ($p < 0,001$) (Tabla 15).

De forma importante, la morfología se reporta como positiva para tumor en conjunto con la citometría, cuando las muestras tienen un porcentaje promedio de 63% de linfocitos B tumorales y un valor absoluto promedio de 12222 linfocitos B tumorales/uL; mientras que los casos reportados como citometría+/morfología- tenían en promedio 24% de linfocitos B tumorales y un valor absoluto promedio de 537 linfocitos B tumorales/uL ($p = 0,001$) (Figura 12).

Tabla 15. Análisis comparativo entre la citometría y la morfología en la detección de células tumorales en muestras especiales.

Morfología Celular	Citometría de Flujo		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	13 (8.8%)	0 (0%)	13/147 (8.8%)
Negativo	27 (18.4%)	98 (66.7%)	125/147 (85.1%)
Sospechoso	6 (4.1%)	3 (2%)	9/147 (6.1%)
Total	46/147 (31.3%)	101/147 (68.7%)	

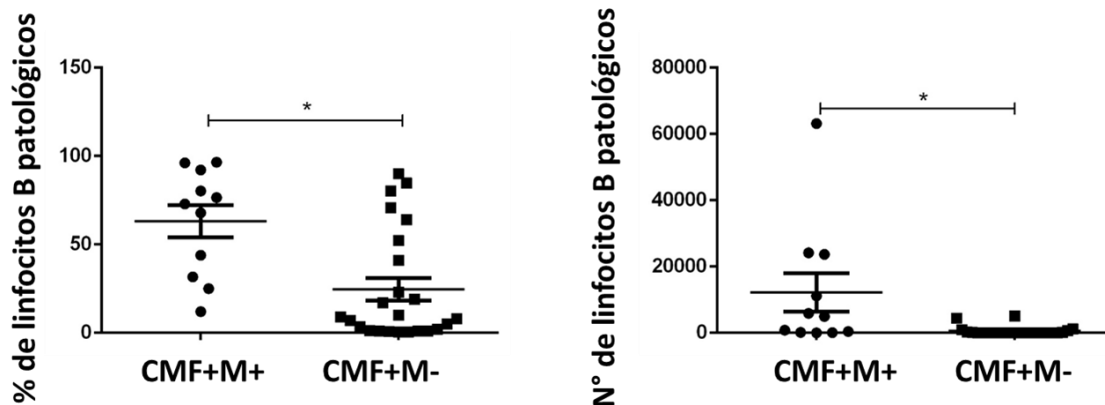


Figura 12. Análisis comparativo de los porcentajes y valores absolutos de linfocitos B tumorales: Entre las muestras citometría+/morfología+ y citometría+/morfología-. *p=0,001.

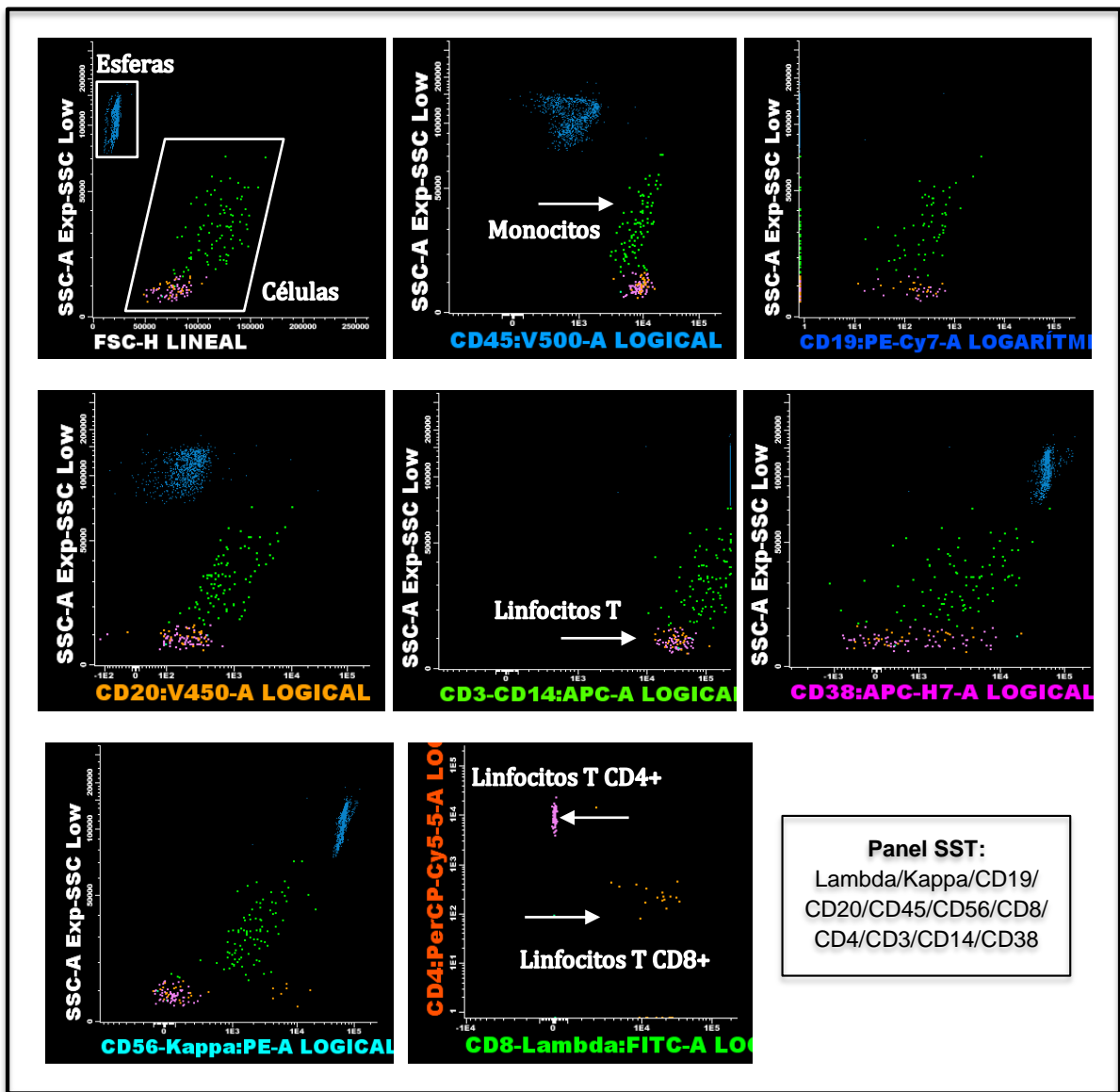
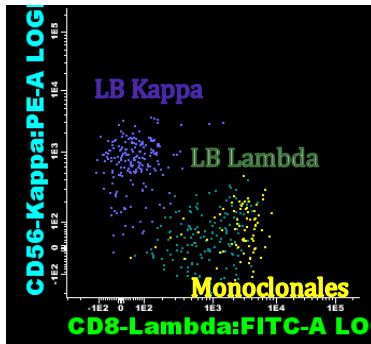
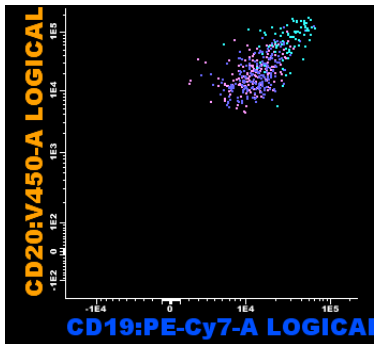
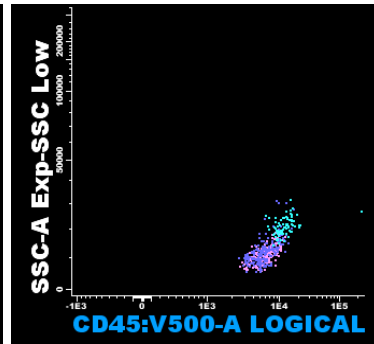
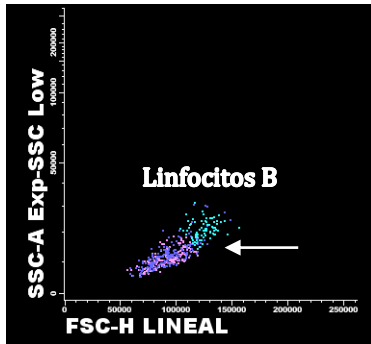
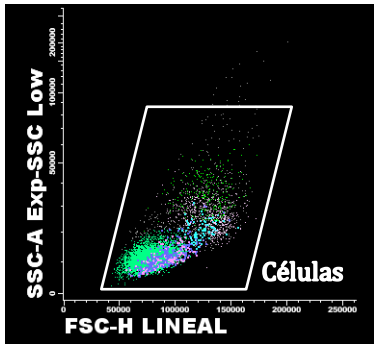
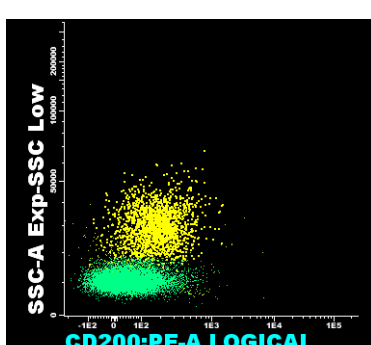
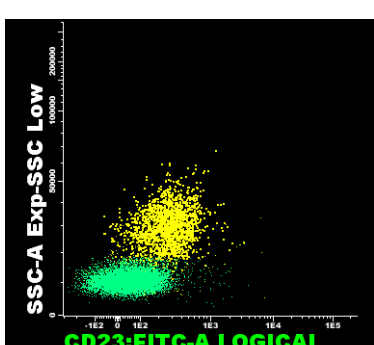
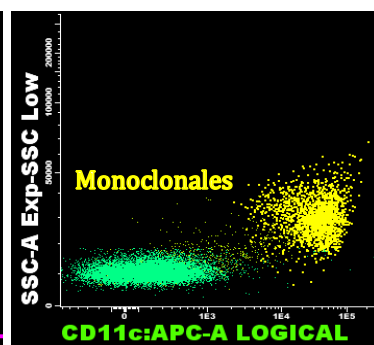
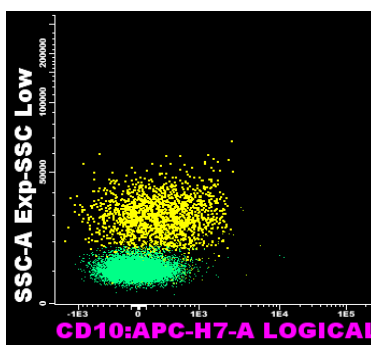
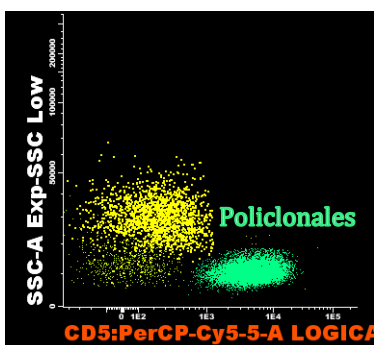
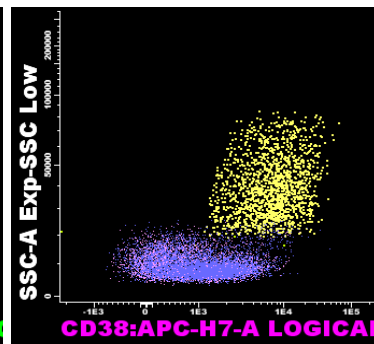
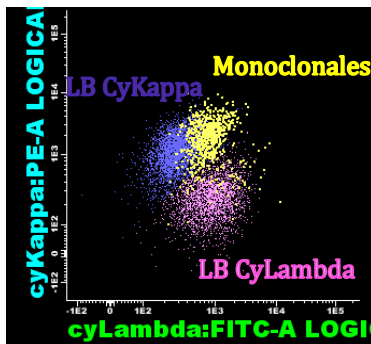
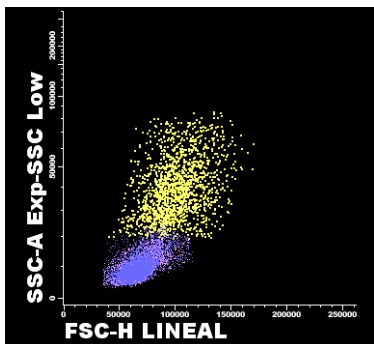


Figura 13: Representación del análisis de una muestra de LCR de un paciente con sospecha de LNH-B, negativo para infiltración por células tumorales. En esta muestra se detectaron Monocitos (CD4+/CD14+), Linfocitos T (CD3+/45+), además de LTCD4+ y LTCD8+ con predominio de LTCD4. En el dot plot de *Side Scatter* –SSC- vs. *Forward Scatter* –FSC- se muestra la selección de la población de esferas (azul) y de las células según su codificación colorimétrica. En el área de citometría de flujo del Hospital Universitario San Ignacio se selecciona las células de interés por su expresión de marcadores de línea específicos y sus parámetros de tamaño y complejidad.



Linfocitos B monoclonales:
 Lambda+ debil
 Kappa-
 CD19+
 CD20+
 CD45+
 Tamaño:
 grandes



Linfocitos B monoclonales:
 CyLambda+
 CyKappa-
 CD10-
 CD5-
 CD23-
 CD11c+
 CD200-

Figura 14: Representación del análisis de una muestra de LCR de un paciente con sospecha de LNH-B, en el que se detectaron células tumorales (1% que equivalen en números absolutos a 1 célula/ul representadas de color amarillo). En el dot plot de *Side Scatter* –SSC- vs. *Forward Scatter* –FSC- se representa una población celular de tamaño grande y mediana complejidad. Se observaron linfocitos B policlonales Lambda y Kappa con una población de Linfocitos B monoclonales Lambda + débil empleando el panel SST, por lo cual, se decide ampliar el panel para la detección de las cadenas ligeras Kappa y Lambda a nivel citoplasmático (CyKappa, CyLambda) y detección de otros marcadores como CD11c+.

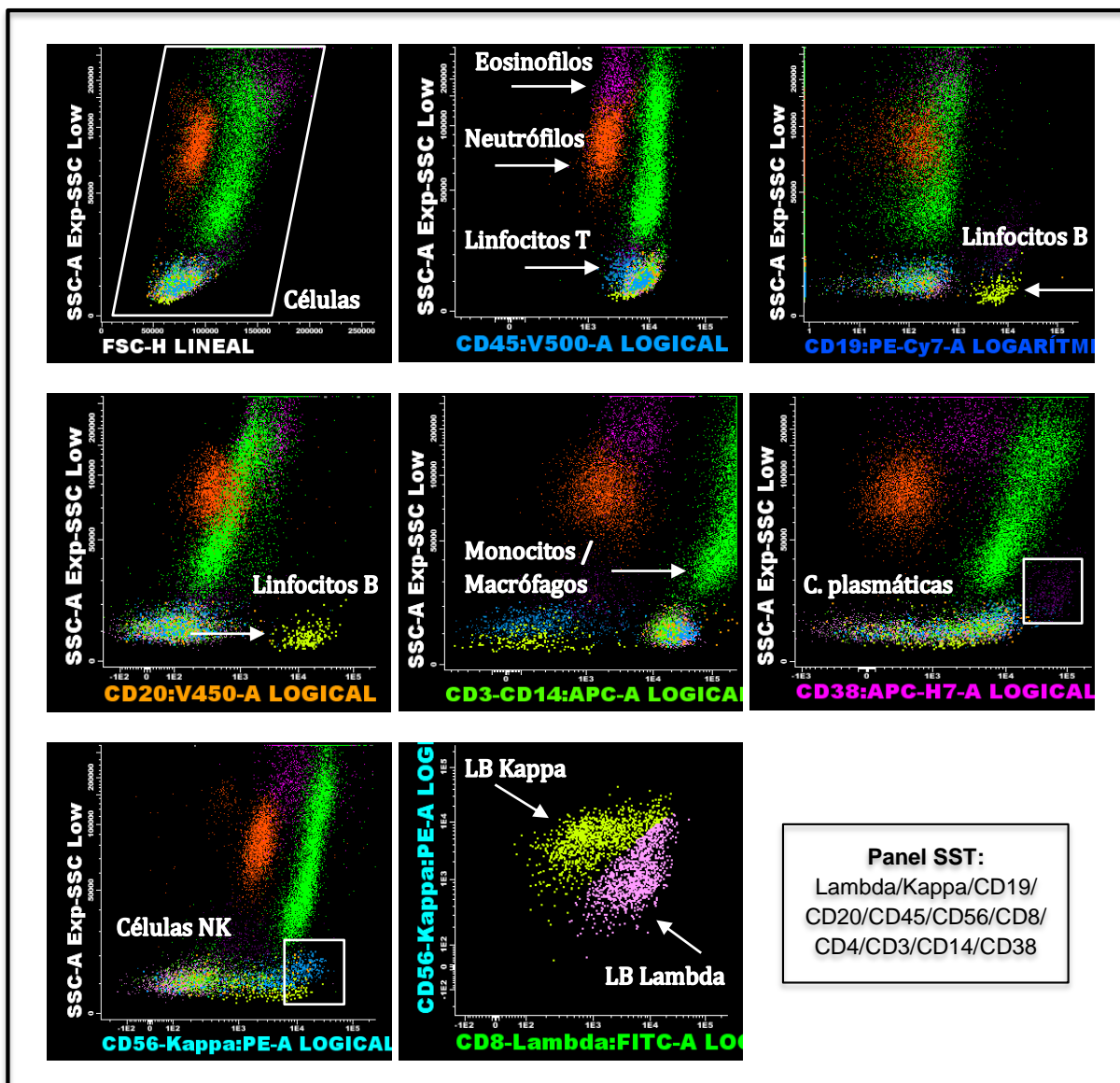
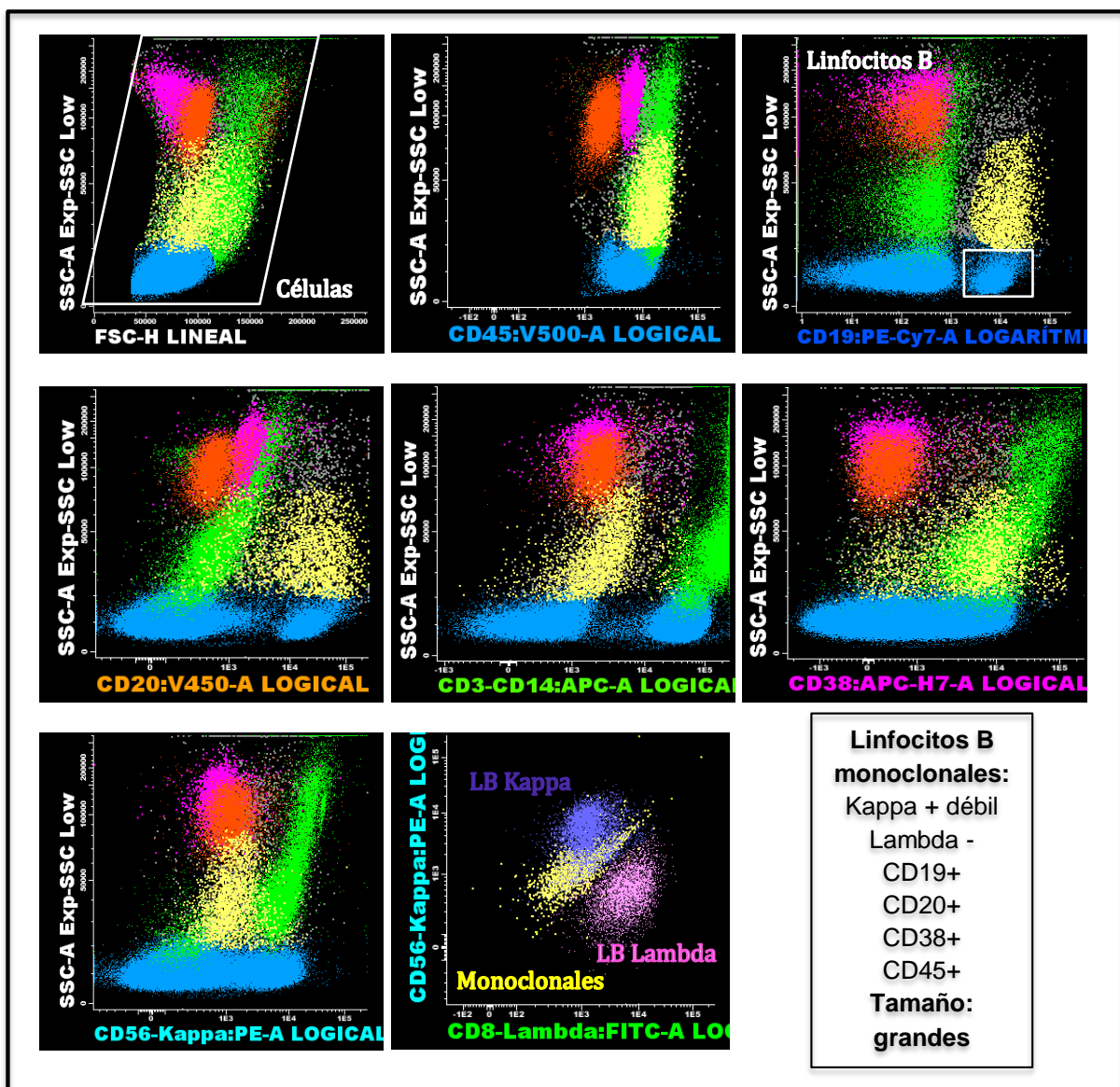


Figura 15: Representación del análisis de una muestra de Líquido pleural de un paciente con sospecha de Síndrome linfoproliferativo crónico B, negativo para infiltración por células tumorales. En esta muestra se detectaron neutrófilos, eosinófilos, monocitos (CD4+/CD14+) macrófagos, linfocitos T (CD3+), linfocitos B (CD19+/CD20+), linfocitos B Kappa+ y Lambda+, células NK (CD56+/CD38+) y células plasmáticas (CD38+/CD19+). En el dot plot de *Side Scatter*–SSC- vs. *Forward Scatter*–FSC- se muestra la selección de la población de células y en el dot plot de CD45-V500 se observa de forma clara las diferentes poblaciones presentes en la muestra.



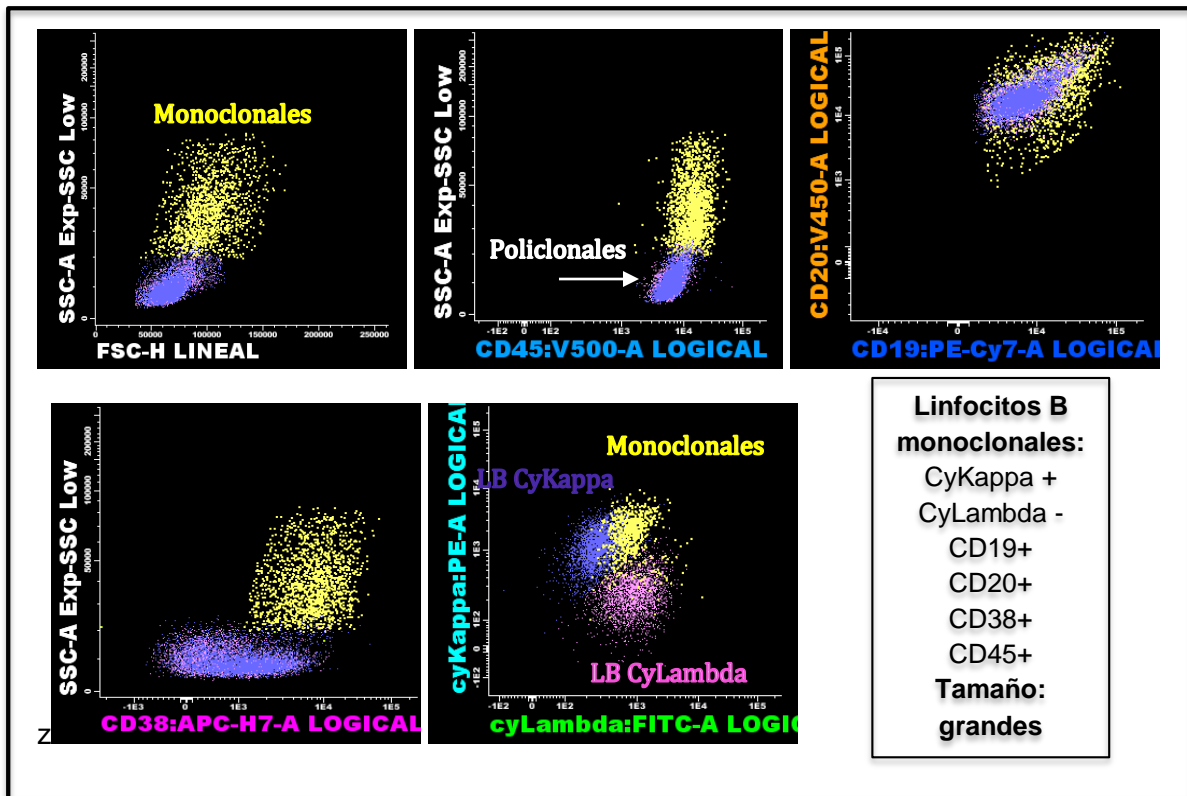


Figura 16: Representación del análisis de una muestra de Líquido pleural de un paciente con Linfoma B de célula grande, en el que se detectaron células tumorales (0.9% que equivalen en números absolutos a 14 células/ul representadas en color amarillo). En el dot plot de *Side Scatter* –SSC- vs. *Forward Scatter* –FSC- se representa una población celular de tamaño grande y mediana complejidad. Se observan linfocitos B policlonales Lambda y Kappa con una población de Linfocitos B monoclonales Kappa +/- empleando el panel SST, por lo cual, se decide ampliar el panel para la detección de las cadenas ligeras Kappa y Lambda a nivel citoplasmático (CyKappa, CyLambda).

Análisis de casos empleando el tubo SST de EuroFlow

Del total de 662 muestras incluidas en este estudio, se evaluaron 49 (7,4%) empleando el tubo SST estandarizado por el Consorcio Europeo EuroFlow, para el estudio de infiltración por linfomas B. De los casos evaluados 15 tenían sospecha de linfoma (30,6%), 12 tenían diagnóstico de linfoma B sin clasificar (24,5%), 14 correspondían a linfoma B de células grandes (28,6%), 3 a linfoma de Burkitt (6,1%), 2 a linfoma del manto (4,1%), 2 a linfoma en sistema nervioso central (4,1%) y 1 a leucemia linfocítica crónica B (2%). En relación al tipo de muestra, la mayoría correspondió a LCR (n= 35; 71,4%), seguidas de biopsias de ganglio (n= 5; 10,2%), líquido pleural (n= 4; 8,2%), otras biopsias distintas a ganglio (n= 3; 6,1%), lavado bronco alveolar (n= 1; 2%) y líquido ascítico (n= 1; 2%).

Los análisis de CMF, mostraron que 38 muestras eran negativas para tumor (77,6%) y las 11 muestras restantes (22,4%), fueron positivas. Del total de muestras evaluadas con el tubo SST (n=49), 14 muestras (28,6%) se estudiaron de forma simultánea mediante CMF y morfología, encontrando que 3 muestras fueron reportadas como CMF+/Morfología- (21,4%), 9 muestras fueron CMF-/Morfología- (64,3%) y 2 muestras CMF-/Morfología sospechosa (14,3%) ($p < 0,001$). De las 15 muestras que venían como sospechosas para linfoma, 5 fueron positivas para infiltración tumoral empleando el tubo SST (33,3%).

Al analizar las poblaciones celulares detectadas con el tubo SST en comparación con el tubo convencional que se venía trabajando en el servicio, se observa que independientemente del protocolo, la CMF puede detectar una gran variedad de poblaciones celulares, pero al implementar el tubo SST se identifica con mayor frecuencia células dendríticas, células plasmáticas, células NK y linfocitos B normales (Tabla 16). Esto refleja que los marcadores del tubo SST, permiten identificar con mayor precisión estas células por los anticuerpos incluidos (células NK: CD45+/CD56+/CD38+; células dendríticas: CD45+/CD4+/CD38+/CD14-; células plasmáticas: CD45+/CD38++/CD19variado/CD20- y linfocitos B normales: CD45+/CD19+/CD20+/CD38+ débil/Kappa+ en una proporción de células y Lambda+ en una proporción de células).

Tabla 16. Tipos celulares (no tumorales) identificados en los análisis de CMF mediante el uso del tubo convencional y del tubo SST

Tipo de células detectado	Tubo Convencional (n= 613 muestras)	Tubo SST (n= 49 muestras)
Neutrófilos	20%	37%
Eosinófilos	2,9%	8%
Monocitos	93%	97,9%
Linfocitos T	100%	98,7%
Linfocitos B	16%	55%
Células NK	20%	44%
Células dendríticas	0,7%	28%
Células plasmáticas	3,4%	12%

10. Discusión:

En las últimas décadas, una de las herramientas de mayor utilidad en la rutina clínica ha sido la Citometría de flujo multiparamétrica (CMF), la cual se caracteriza por su elevada sensibilidad, especificidad, rapidez, aplicabilidad y reproducibilidad para el análisis de muestras donde se sospeche enfermedades hematológicas benignas o malignas. La CMF se utiliza desde el momento del diagnóstico para clasificar el tipo de neoplasia, para evaluar refractariedad al tratamiento, recaídas y progresión (Jaye D 2012, Saavedra C 2010). En este estudio de forma particular, se demuestra que la CMF permitió definir si el tumor se localizaba en los ganglios linfáticos o para definir si este había hecho migración extra-ganglionar en tejidos como el sistema nervioso central y otros líquidos corporales.

Una de las grandes ventajas de la CMF es que se puede aplicar en diversas muestras biológicas como médula ósea (MO), sangre periférica (SP) y muestras especiales como biopsias de ganglio, líquidos corporales (LCR, Lavado bronco alveolar, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido pericárdico, líquido ascítico, líquido sinovial, entre otros) y de forma reciente, según los protocolos estandarizados por el Consorcio Europeo EuroFlow, para la evaluación de muestras de humor vítreo en linfomas intraoculares y de sistema nervioso central (Van Dongen 2012). En general, la CMF obtiene información sobre los linajes celulares, estadios madurativos, fenotipos aberrantes, números absolutos y relativos de células normales y tumorales en las diferentes muestras biológicas evaluadas (Del P 2014) y de forma relevante, los resultados y análisis obtenidos por CMF son implementados y extrapolables a nivel clínico.

En el caso de las muestras de líquidos especiales, en la fase pre-analítica era fundamental que los tiempos entre la obtención de la muestra y su procesamiento no

superaran entre 30 minutos y 24 horas, debido al alto porcentaje de muerte celular dependiendo además del tipo de muestra. Gracias al uso de estabilizantes celulares, estos periodos son superiores a 24 horas, lo que permite evaluar con calidad estas muestras y proporcionar resultados relacionados con la condición clínica del paciente (Van Dongen 2012, Saavedra C 2010; Jongste A 2014).

De forma particular, la mayoría de estudios reportados en la literatura sobre muestras especiales evaluadas por CMF, se han llevado a cabo en muestras de LCR de pacientes con linfomas de células B agresivos con alto riesgo de infiltración en sistema nervioso central (S Quijano 2009, Campos A 2017) y en pacientes con leucemias agudas (Torres Y 2016). En algunos de estos trabajos se han estabilizado las muestras de LCR en la fase pre-analítica y se han comparado los resultados de la CMF con la técnica gold estándar que es la citología convencional, demostrando que la CMF tiene una sensibilidad muy superior, ya permite detectar mínimas cantidades de células tumorales en estas muestras, con mayor capacidad de detección de otras poblaciones celulares y con aplicabilidad al 100% de los casos (A. Orfao 2006, S. Quijano 2007, S. Quijano 2008, S Quijano 2009, Contreras S 2010).

En Colombia desde el año 2008, algunos servicios de citometría comenzaron a implementar el uso de estabilizantes para la evaluación de muestras de LCR principalmente según las recomendaciones internacionales y las recomendaciones del Consenso Colombiano de Citometría de Flujo publicado en 2010 (Saavedra C 2010, Quijano 2008). A partir del año 2008 en el área de Citometría de Flujo del Hospital Universitario San Ignacio se empezaron a recolectar las muestras de LCR y de otros líquidos corporales de pacientes con distintas patologías en tubos con el estabilizante TransFix™ y en 2017 la experiencia de 6 años de trabajo con 1070 muestras de líquidos corporales fue documentada, demostrando que la CMF apoya

el diagnóstico y seguimiento de una gran variedad de condiciones clínicas benignas/reactivas y neoplásicas (Campos A et al 2017).

Los resultados del presente trabajo donde se documentan los hallazgos obtenidos del estudio de 662 muestras evaluadas durante el periodo comprendido entre abril del 2014 a marzo del 2019, demuestra también la utilidad de la CMF para el estudio de casos de linfomas de células B en muestras especiales (algunas con baja celularidad) en comparación con los resultados de morfología en aquellos casos donde se realizó la evaluación simultánea. Tal como se espera, el mayor porcentaje de infiltración tumoral corresponde a pacientes con linfomas más agresivos, con porcentajes variables según el tipo de muestra y el tipo de linfoma estudiado. De forma relevante, la morfología se reportó como positiva cuando la CMF encontró en promedio 67% de linfocitos B patológicos que en números absolutos correspondían en promedio a 12.222 células tumorales/ μ L, lo que demuestra que la morfología es positiva únicamente cuando el paciente tiene una gran cantidad de células tumorales en estas muestras, principalmente en las de LCR.

Del total de muestras estudiadas, 49 (7,4%) fueron evaluadas por CMF empleando el tubo SST estandarizado por el Consorcio Europeo EuroFlow, para el estudio de infiltración por linfomas B y de estas, 14 (22,4%) fueron positivas para tumor y al comparar los resultados simultáneos de la CMF versus la morfología, se demuestra de nuevo, que la CMF tiene mayor capacidad de identificación de casos positivos confirmando su sensibilidad y además respecto a la CMF realizada de forma convencional en el servicio de HUSI, identifica con mayor precisión otras poblaciones celulares como células dendríticas, células plasmáticas, linfocitos B y células NK, por los marcadores fenotípicos adicionales incluidos en el tubo SST. Como perspectiva del trabajo se deben consultar los diagnósticos definitivos para los casos que se

recibieron como sospecha de linfoma y como linfoma sin clasificar, para terminar de realizar las asociaciones de los resultados encontrados.

En conclusión, este trabajo documenta el uso de la CMF para el análisis de muestras especiales de pacientes con diagnóstico presuntivo o confirmado de linfomas B, para la evaluación de infiltración tumoral, además de la comparación de los resultados obtenidos mediante CMF y los análisis morfológicos. Los hallazgos muestran la sensibilidad, especificidad y aplicabilidad de la CMF en la rutina clínica.

11. Bibliografía:

1. **Jaye DL, Bray RA, Gebel HM, Harris W, Waller EK.** Translational Applications of Flow Cytometry in Clinical Practice. *Journal of Immunology*. 2012; 188: 4715–19.
2. **Lenz, G., Staudt, L.M.** Aggressive lymphomas. *The New England Journal of Medicine*. 2010; 362:1417-1429.
3. **Quijano S, López A, Rasillo A, Barrena S, Luz Sánchez M, Flores J, Fernández C, Sayagués JM, Osuna CS, Fernández N, González M, Giraldo P, Giralt M, Pérez MC, Martin-Antoran JM, Gutiérrez O, Perdiguier L, Díaz Mediavilla J, González Silva M, Asensio Del Rio A, Cerveró C, Guerra JL, Butrón R, García Mdel C, Almeida J, Orfao A.** Association between the proliferative rate of neoplastic B-cells, their maturation stage and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: analysis of a series of 432 patients. *Blood* 2008; 111:5130-41.
4. **Quijano S, López A, Sancho JM, Panizo C, Rodríguez-Otero P, Debén G, Castilla C, Pérez-Ceballos E, García-Vela JA, Monteserin MC, et al.** Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: 462-9.
5. **Van Dongen JJM, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al.** EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012; 26:1908–75. doi: 10.1038/leu.2012.120.

6. **Campos A, Trujillo L, López D, Beltrán L, Arias E, Vélez G, Infante A, De Los Reyes I, Vizcaíno M, Guzmán P, Herrera M, Solano J, Londoño D, Cañas A, Pretelt F, Pérez J, Cardozo C, Fiorentino S and Quijano S.** Study of body fluid samples using flow cytometry: 6 years of experience at the Hospital Universitario San Ignacio-Pontificia Universidad Javeriana Bogota-Colombia. *Universitas Scientiarum* 22: 123-143, 2017.
7. **Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES.** The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19; 127(20):2375-90.
8. **Roa D, Fiorentino S, Rodríguez V, Campos A, Infante A, Cardozo C, et al.** Análisis inmunofenotípico de muestras normales de médula ósea: aplicaciones en el control de calidad en los laboratorios de citometría. *Universitas Scientiarum*. 2010; 15: 206-23.
9. **Vives J, Aguilar J.** Manual de técnicas de laboratorio en hematología. Elsevier Health Sciences. Spain, 2014.
10. **Subirá D, Simó M, Illán J, Serrano C, Castañón S, Gonzalo R, et al.** Diagnostic and prognostic significance of flow cytometry immunophenotyping in patients with leptomeningeal carcinomatosis. *Clin Exp Metastasis*. 2015; 32: 383-91.
11. **Kraan J, Gratama JW, Haioun C, Orfao A, Plonquet A, Porwit A, et al.** Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid. *Curr. Protocol. Cytom.* 2008; Supplement 45: 6.25.16.25.16. 16 p.
12. **Van E, Wind H, Malverde J, Westerdaal N, Van J.** Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow:

Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts. *Clinical Cytometry*. 2004; 60B:1–13.

13. **Arthur L. Shaffer III, Ryan M. Young, and Louis M. Staudt.** Pathogenesis of Human B cell lymphomas: *Annual Review of Immunology*. 2012; 30: 565-610.
14. **Dominic E, Louis J, Hanson M, Swindells S, Samuel J, Wayne L.** Stabilization of white blood cells and immunologic markers for extended analysis using flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 2005; 305: 107-119.
15. **Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
16. **Londoño B, et al.** Anuario Estadístico. Instituto Nacional de Cancerología E.S.E. 2010.
17. **Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Arber D, Hasserjian R, Bean M, Orazi A, Slebert R.** WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2017 Lyon, France: IARC Press; 4th Edition.
18. **Orfao A, Ortuño F, de Santiago M, López A, San Miguel J.** Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry*. 2004; 58:62–71.
19. **Saavedra C, Quijano S, Romero M, Jaramillo R, Orduz R, Echeverri C, Londoño M, Orfao A.** Reporte del Primer Consenso Colombiano de Citometría de Flujo para el estudio de trastornos hematológicos. *Biomedica* 2010; 30(Supl):11-21.

- 20. Jongste A, et al.** Use of TransFix cerebrospinal fluid storage tubes prevents cellular loss and enhances flow cytometric detection of malignant hematological cells after 18 hours of storage. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014. 86(4): p. 272-9.
- 21. Del Principe M, Buccisano F, Cefalo M, Maurillo L, Di Caprio L, Di Piazza F, et al.** High sensitivity of flow cytometry improves detection of occult leptomeningeal disease in acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma. *Ann Hematol*. 2014; 93:1509–13.
- 22. Torres Y.** Análisis de la utilidad de la citometría de flujo en la identificación de infiltración neoplásica del líquido cefalorraquídeo en pacientes con leucemia aguda y su asociación con parámetros clínico-biológicos de importancia pronóstica. Trabajo para el título de Magíster en Ciencias Biológicas, Facultad de ciencias Pontificia Universidad Javeriana. 2016.
- 23. Contreras S.** Utilidad diagnóstica de la citometría de flujo en el análisis de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes con linfomas B agresivo. Trabajo de grado carrera bacteriología, Facultad de ciencias Pontificia Universidad Javeriana. 2010.
- 24. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS.** Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2005; 107:265-276.
- 25. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D.** The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemis*. 1994; 1640-5.

- 26. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK.** Unmutated Ig V (H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 15; 94(6):1848-54.
- 27. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, Hillmen P, Houlston RS, Kay N, Schleinitz TA, Caporaso N; International Familial CLL Consortium.** Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 2005; 130(3):325-32.
- 28. Fazi C, Scarfò L, Pecciarini L, Cottini F, Dagklis A, Janus A, Talarico A, Scielzo C, Sala C, Toniolo D, Caligaris-Cappio F, Ghia P.** General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood*. 2011;118(25):6618-25.
- 29. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC.** Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia*. 2010;24(3):512-20.
- 30. Berger F, Felman P, Thieblemont C, Pradier T, Baseggio L, Bryon PA, Salles G, Callet-Bauchu E, Coiffier B.** Non-MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. *Blood*. 2000;15;95(6).
- 31. Savilo E, Campo E, Mollejo M, Pinyol M, Piris MA, Zukerberg LR, Yang WI, Koelliker DD, Nguyen PL, Harris NL.** Absence of cyclin D1 protein expression in splenic marginal zone lymphoma. *Mod Pathol*. 1998;11(7):601-6.
- 32. Arcaini L, Lazzarino M, Colombo N, Burcheri S, Boveri E, Paulli M, Morra E, Gambacorta M, Cortelazzo S, Tucci A, Ungari M, Ambrosetti A, Menestrina F, Orsucci L, Novero D, Pulsoni A, Frezzato M, Gaidano G, Vallisa D, Minardi V, Tripodo C, Callea V, Baldini L, Merli F, Federico**

- M, Franco V, Iannitto E; Interguppo Italiano Linfomi.** Splenic marginal zone lymphoma: a prognostic model for clinical use. *Blood*. 2006;107(12):4643-9.
- 33. Graça M. Dores, Rayna K. Matsuno, Dennis D. Weisenburger, Philip S. Rosenberg, and William F. Anderson.** Hairy cell leukaemia: a heterogeneous disease?. *Br J Haematol*. 2008; 142(1): 45–51.
- 34. Michael R. Grever.** How I treat hairy cell leukemia. *Blood* 2010; 115:21-28.
- 35. Swerdlow, S.H, Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S, Pileri, S.A, Stein, H, Thiele, J, Vardiman, J.W.** WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC.
- 36. George Kanellis, Manuela Mollejo, Santiago Montes-Moreno, Socorro-María Rodríguez-Pinilla, Juan C. Cigudosa, Patricia Algara, Carlos Montalban, Estella Matutes, Andrew Wotherspoon, Miguel A. Piris.** Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: revision of a series of cases reveals characteristic clinico-pathological features. *Haematologica*. 2010; 95(7): 1122–1129.
- 37. Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D.** The variant form of hairy-cell leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003;16(1):41-56.
- 38. Vijay A, Gertz MA.** Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2007;109(12):5096-103.
- 39. Morice WG, Chen D, Kurtin PJ, Hanson CA, McPhail ED.** Novel immunophenotypic features of marrow lymphoplasmacytic lymphoma and correlation with Waldenström's macroglobulinemia. *Mod Pathol*. 2009;22(6):807-16
- 40. Dispenzieri A, Katzmann JA, Kyle RA, Larson DR, Melton LJ 3rd, Colby CL, Therneau TM, Clark R, Kumar SK, Bradwell A, Fonseca R, Jelinek**

- DF, Rajkumar SV.** Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *Lancet.* 2010;375(9727):1721-8.
- 41. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR.** Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2003;78(1):21-33.
- 42. Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C.** The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica.* 2006;91(9):1234-40.
- 43. Du MQ.** MALT lymphoma: recent advances in aetiology and molecular genetics. *J Clin Exp Hematop.* 2007;47(2):31-42.
- 44. Angelopoulou MK, Kalpadakis C, Pangalis GA, Kyrtsionis MC, Vassilakopoulos TP.** Nodal marginal zone lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(6):1240-50.
- 45. Silver SR, Bertke SJ¹, Hines CJ, Alavanja MC, Hoppin JA, Lubin JH, Rusiecki JA, Sandler DP, Beane Freeman LE.** Cancer incidence and metolachlor use in the Agricultural Health Study: An update. *Int J Cancer.* 2015;137(11):2630-43.
- 46. Bosga-Bouwer AG, van den Berg A, Haralambieva E, de Jong D, Boonstra R, Kluin P, van den Berg E, Poppema S.** Molecular, cytogenetic, and immunophenotypic characterization of follicular lymphoma grade 3B; a separate entity or part of the spectrum of diffuse large B-cell lymphoma or follicular lymphoma?. *Hum Pathol.* 2006;37(5):528-33.

- 47. Ottensmeier CH, Thompsett AR, Zhu D, Wilkins BS, Sweetenham JW, Stevenson FK.** Analysis of VH genes in follicular and diffuse lymphoma shows ongoing somatic mutation and multiple isotype transcripts in early disease with changes during disease progression. *Blood*. 1998;91(11):4292-9.
- 48. Green MR, Gentles AJ, Nair RV, Irish JM, Kihira S, Liu CL, Kela I, Hopmans ES, Myklebust JH, Ji H, Plevritis SK, Levy R, Alizadeh AA.** Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood*. 2013;121(9):1604-11.
- 49. Swerdlow SH, Williams ME.** From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. *Hum Pathol*. 2002;33(1):7-20.
- 50. Al-Hamadani M, Habermann TM, Cerhan JR, Macon WR, Maurer MJ, Go RS.** Non-Hodgkin lymphoma subtype distribution, geodemographic patterns, and survival in the US: A longitudinal analysis of the National Cancer Data Base from 1998 to 2011. *Am J Hematol*. 2015;90(9):790-5.
- 51. Abramson JS.** T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: biology, diagnosis, and management. *Oncologist*. 2006;11(4):384-92.
- 52. Slack GW, Steidl C, Sehn LH, et al.** CD30 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study for British Columbia. *Br J Haematol* 2014; 164:608-17.
- 53. Schlegel U.** Primary CNS lymphoma. *Ther Adv Neurol Disord*. 2009;2(2):93-104.
- 54. Hamilton SN, Wai ES, Tan K, Alexander C, Gascoyne RD, Connors JM.** Treatment and outcomes in patients with primary cutaneous B-cell lymphoma:

the BC Cancer Agency experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013;87(4):719-25.

55. Cohen JI, Kimura H, Nakamura S, Ko YH, Jaffe ES. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting, 8-9 September 2008. *Ann Oncol.* 2009;20(9):1472-82.

56. Savage KJ, Al-Rajhi N, Voss N, Paltiel C, Klasa R, Gascoyne RD, Connors JM. Favorable outcome of primary mediastinal large B-cell lymphoma in a single institution: the British Columbia experience. *Ann Oncol.* 2006;17(1):123-30.

57. Courville EL, Sohani AR, Hasserjian RP, Zukerberg LR, Harris NL, Ferry JA. Diverse clinicopathologic features in human herpesvirus 8-associated lymphomas lead to diagnostic problems. *Am J Clin Pathol.* 2014;142(6):816-29.

58. Sam M. Mbulaiteye, William F. Anderson, Jacques Ferlay, Kishor Bhatia, Cindy Chang, Philip S. Rosenberg, Susan S. Devesa, Donald M. Parkin. Pediatric, elderly, and emerging adult-onset peaks in Burkitt lymphoma incidence diagnosed in four continents, excluding Africa. *Am J Hematol.* 2012; 87(6): 573–578.

59. Naresh NK, Ibrahim HA, Lazzi S, Rince P, Onorati M, Maria R. Ambrosio, Bilhou-Nabera C, Amen F, et al. Diagnosis of Burkitt lymphoma using an algorithmic approach - applicable in both resource-poor and resource-rich countries. *Br J Haematol.* 2011;154:770-6.

60. S Quijano. Identification of neoplastic infiltration of the cerebrospinal fluid in aggressive B-NHL: A multicenter study comparing the utility of flow cytometry vs conventional cytology. *The Hematology Journal*. 2007;92.

61. A. Orfao, S. Quijano, A. Lopez, et al. Identification of Neoplastic Infiltration of the Cerebrospinal Fluid (CSF) in Patients with Aggressive B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma (B-NHL) without Clinical Evidence of Leptomeningeal Disease: A Comparative Analysis of the Utility of Flow Cytometry (FCM) Versus Conventional Cytology (CC). *Blood*. 2006;108:4605.