

## DIFERENCIACION INMUNOFENOTIPICA DE UN SINDROME LINFOPROLIFERATIVO CRONICOY LINFOMA PERIFERICO

Dr. Joao Ml. Baptista<sup>1</sup>, Dra. Ma. de los Angeles Alvarado<sup>2</sup> Dra. Berta Valverde<sup>2</sup>, Dr. German F. Sáenz Renault<sup>2</sup>

### RESUMEN

Paciente de 80 años, a quien cuatro años atrás se le trató un linfoma gástrico de células grandes. En la visita actual mostró un hemograma básicamente normal, salvo ligera leucocitosis linfocítica, en la que un 50% de sus elementos eran de aproximadamente 15 µm de diámetro y mostraban características prolinfocíticas de tipo neoplásico, por la presencia de un prominente nucleólo inserto en una matriz cromatínica de textura intermedia. A fin de aclarar la naturaleza del larvado proceso leucémico, se utilizaron técnicas citoquímicas (ANAE, CAE, PX y FAC), y un panel de Ac monoclonales para los estudios en el citómetro de flujo. Los resultados demostraron la índole linfosarcomatosa del proceso, el cual inmunofenotípicamente resultó ser un linfoma periférico de células tumorales B diferenciadas (CD5+/CD19+) tipo kappa. (*Rev. Cost. de Cienc. Méd. 1.996) 17-2: 83-87*).

**Palabras Clave:** Linfoma periférico; leucolinfosarcoma; citometría y linfoma.

### INTRODUCCION

En ocasiones es difícil establecer si un proceso es leucémico, en el sentido hemopoyético matriz o si es una fase periférica o leucemizante de un linfoma, por lo general de la variedad maligna no Hodgkin (1). El diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC) se basa en las características morfológicas e inmunofenotípicas de las células (1,3,13). Aunque generalmente es suficiente para su identificación la microscopía de luz, en ocasiones el examen ultraestructural puede ser de gran ayuda. Los estudios inmunofenotípicos han permitido comprobar que las distintas variantes morfológicas establecidas poseen rasgos antigénicos singulares, tanto en la línea linfoide B como en la T, si bien se han descrito formas con fenotipo híbrido (12). Citoquímicamente la peroxidasa (PX) y la cloroacetato esterasa (CAE) identifican la serie mieloide, y las pruebas de alfa naftil acetato esterasa (ANAE) y fosfatasa ácida (FAC) son de mucha utilidad en la identificación de linfocitos de estirpe T (4,7,9,11). A nivel ultraestructural, la reacción de la FAC se localiza en la zona de Golgi, con una reacción llamada centrosómica o polar. En las células de origen B, la reacción de la FAC es frecuentemente débil o negativa, excepto en la leucemia de células peludas (variante no nucleolada) y en la leucemia de células plasmáticas

- 1.- Servicio de Onco-Hematología, Hospital San Juan de Dios.
- 2.- CIHATA, Cátedra de Hematología, Fac. Microbiología, Universidad de Costa Rica, Hospital San Juan de Dios;
- 3.- Laboratorio de Investigación, Hospital Nacional de Niños

reacción de ANAE corre paralela a la de la FAC, con una reacción centrosómica. Finalmente, con la ayuda de la citometría de flujo es posible establecer con suficiente seguridad la índole filogénica de este tipo de hemopatías, tal y como se relata en esta comunicación.

#### **Presentación del caso:**

Paciente de ochenta años clínicamente normal, sometido a revisión rutinaria. Cuatro años atrás le habían diagnosticado y tratado un linfoma gástrico de células grandes. En esta oportunidad tuvo un hemograma normal, salvo ligera leucocitosis de predominio linfocítico (51%). El 28% de estas células eran elementos inmaduros de regular tamaño, mononucleolares, algunos con planos de segmentación nuclear. Con el fin de determinar la estirpe de las células malignas, se realizaron pruebas citoquímicas en frotis hechos a partir de un concentrado de leucocitos, los cuales se fijaron con un reactivo a base de formolcitrato acetona, pH 5,35. El estudio inmunofenotípico se realizó en sangre periférica anticoagulada con EDTA. El panel de anticuerpos monoclonales (AcMo) incluyó CD19 FITC, CD5 PE, HLA-DR PerCP, CD4 F1TC, CD8 PE, CD3 PerCP, Kappa FITC y Lambda PE de Becton Dickinson. El marcaje directo de las células se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron suspendidas en tampón isotónico de fosfatos (PBS) y el análisis se realizó en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) con el programa CELL-quest.

#### **RESULTADOS**

Las pruebas de PX, CAE y ANAE

fueron negativas. La FAC dio una reacción débil positiva, difusa, en el 15% de las células. Con base en los resultados se concluyó que las células malignas eran de estirpe linfoide B. Por la citometría de flujo, en la población de linfocitos (36%) se identificó aproximadamente un 60% de células con reacción positiva para los siguientes marcadores: CD19, HLA-DR, CD5, kappa, y negativa para los demás AcMo del panel. El análisis de la médula ósea mostró una buena celularidad (60%), con número apropiado de megacariocitos funcionales. La relación G:E fue de 5:1, con ligero incremento de células plasmáticas (5%) y de eosinófilos (6%). En el análisis se destacó un infiltrado de 40% de células linfoides, con un 50% de ellas mostrando el mismo citotipo descrito en la sangre periférica, con una cromatina intermedia y un núcleo en ocasiones convoluto o con planos de segmentación, y un único y conspicuo nucleólo de posición principalmente excéntrica. Se trata pues de una médula ósea con buena reserva celular y un infiltrado de 20% de células malignas de línea linfoide, irregularmente distribuida en la población celular del extendido.

#### **DISCUSION**

Varios aspectos hacen interesantes el caso en estudio. En primer lugar, se trata de un paciente de 80 años de edad, quien hace 4 años fue tratado por un linfoma maligno de células grandes. En segundo término, estando clínicamente bien, acude al Laboratorio enviado por su médico para una revisión convencional, que incluía valoración de la función hepática. En tercer lugar, un hemograma básicamente normal, indica ligera leucocitosis de 5800/ul, en la cual se

destaca que aproximadamente un 30% de esas células son de estirpe linfoide además, presentan; un nucleolo prominente; el núcleo es de aspecto redondo, con cromatina de textura intermedia, en el 75% de las células. La citometría de flujo en sangre periférica demostró que estas células tumorales componían el 60% de la población linfocítica, es decir, el doble de lo detectado citomorfológicamente. Por otra parte, las finas técnicas de citoquímica (ANAE, CAE y FAC) dieron un patrón de células B, perfectamente definidas por la citometría como células tumorales (CD5+/CD19+) cuya monoclonalidad fue definida por la presencia de cadena ligera kappa. Con esta evidencia inmunofenotípica se clasificó el proceso linfoproliferativo como linfoma periférico de células B diferenciadas, el cual, por lo general, presenta un bajo grado de proliferación (15), y una citogenética particular (7).

La proliferación clonal de células linfoides no blásticas (B ó T) se conoce con el nombre genérico de síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC) con expresión hemoperiférica, en los cuales se incluyen los primarios o propiamente leucémicos: leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia prolinfocítica, tricoleucemia, y aquellos con leucemización secundaria a partir de tejidos linfático o piel (linfomas leucemizados, linfomas cutáneos T, y leucemia/linfoma de células T adultas). En el caso que se relata, el citotipo que se observó era semejante al prolinfocito neoplásico (6). El prolinfocito B, aunque de apariencia morfológica más inmadura que la del linfocito de la LLC, presenta características antigénicas con mayor grado de diferenciación, como la expresión del FMC7 y del CD22, Igs de alta densidad y nueva tendencia a la formación de rosetas con eritrocitos de ratón y del antígeno CDS, y es positivo

para el CD11c (2,13). Los linfomas no Hodgkin-B (LNH) con expresión periférica, inicialmente fueron descritos como leucemia de células linfoesarcomatosas (7,10,15). Teóricamente estos linfomas (tanto B como T) pueden leucemizarse y en ellos se pueden detectar en circulación células linfoides clonales (7). Cuando se sospecha que la linfocitosis es derivada de un LNH se debe efectuar biopsia ganglionar (1,3,7,8,12,13). El tipo de leucemia que se llega a desarrollar estaría influenciado por el tipo de célula linfoesarcomatosa original (15). El linfoma linfocítico de células pequeñas presenta un fenotipo de membrana muy similar al de la LLC-B, con positividad para el CD19 y CD5; mientras que las positividades para el FMC7 y las Igs son débiles, prácticamente negativas. Para los linfomas foliculares el inmunofenotipo revela expresión intensa de las Igs y de los Ags CD10 y FMC7, mientras que el CD5 y las rosetas con eritrocitos de ratón suelen ser débiles o negativas. En los linfomas intermedios (LNH) se forman rosetas de ratón y expresan el CD5, pero además presentan fuerte positividad para el FMC7 y el CD10; no obstante este último marcador no es constante. En los LNH de células grandes, la leucemización puede prestarse a confusión con leucemia aguda (15). El análisis inmunofenotípico permitirá afirmar el carácter "maduro" de sus células tumorales. Inmunofenotípicamente tendrá positividad para el CD5, IgS, FMC7, CD20 y CD22 (12).

Queremos destacar la citomorfolología del proceso, que parece corresponder a un linfoma B centro folicular clásico de células hendidas, pequeñas o grandes, ya que el predominio (75%) era de elementos con

un solo y predominante nucleólo excéntrico, que recordaba al prolinfocito maligno.

Los planos de segmentación que pueden apreciarse en diversas proporciones en todos los SLPC, no comprendían en este caso el 20% de las células y por lo general eran incospicuos, contrario a la florida preponderancia que se ve de incisuras amitóticas en la sangre periférica del linfoma folicular de células hendidas pequeñas. El citotipo estudiado, en todo su contexto celular, no encajaba claramente desde un punto de vista citomorfológico en ninguno de los tipos de linfoma de conversión hemoperiférica, y de allí a necesidad de proceder a identificar -como se logró-la verdadera índole germinal y fenotípica de esas células tumorales, a despecho de una impresión preliminar de aparente estirpe prolinfocítica o blástica.

#### ABSTRACT

80 years old patient, four years ago was treated by a large cell gastric lymphoma, shows a basically normal hemogram, characterized by a light lymphocytosis. 50% of this cells of approximately 15  $\mu\text{m}$  in diameter, shown polymphocytic features of neoplastic type with a prominent nucleoli and mean chromatin.

In order to clarify the nature of the leukemic process, the citochemical techniques ANAE, CAE, PX and FAC, and a panel of monoclonal antibodies (flow cytometry) were used. The results shows a process of a lymphosarcomatous type characterized by peripheral lymphoma of tumoral differentiated B cells of Kappa type (CD5+/CD19+).

#### REFERENCIAS

1. Bennett, J.M, Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D., Gralnick, H.R. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukemias. *J. Clin. Path.* 1989; 42: 567-584.
2. Berliner, N. & Smith, B.R. The pathobiology of lymphoproliferative disease. Hematology: Basic principles and practice. First ed., Churchill Livingstone, New York, 1991; 897-972.
3. Catovsky, D. Chronic lymphoid leukaemias. Postgraduate Haematology. Third ed., Butterworth Heinemann, 1989: 418-449.
4. Catovsky, D. Chronic lymphoid leukaemias. Postgraduate Haematology. Third ed., Butterworth-Heinemann, London, 1992; 434-442.
5. Dacie, J.V., Lewis, S.M. Hematología Práctica. Tercera ed., Ediciones Toray, Barcelona, 1987; 99-101.
6. Enno, A., Catovsky, D., O'Brien, M. Polymphocytoid transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Br. J. Haematol.* 1979; 41: 9-13.
7. Frizzera, G. Pathology and clinical correlations of the nonHodgkin's lymphomas. Hematology: Basic principles and practice. First ed., Churchill Livingstone, New York, 1991; 739-763.
8. Matutes, E., Worner, I., Sainati, de Oliviera. MP., Catovsky, D. Ad

- vances in the lymphoproliferative disorders. Review of our experience in the study of over 1000 cases. *Biol. Clin. Hemat.* 1989; 11: 53- 62.
9. Namba, K., Flandrin, G., Lewis, S.M., Polliack, A. Recommended procedures for the classification of acute leukaemias. Leukemia and lymphoma. 1993; 11, 37- 50.
  10. Rapaport. S.I. Linfomas no Hodgkinianos. Introducción a la Hematología, 2<sup>a</sup> ed., Editorial Salvat, Barcelona, 1988; 317-348.
  11. Sáenz,G.F., Alvarado, M.A., Arroyo, G. Técnicas citoquímicas, métodos e interpretaciones. Hematología Analítica, 3<sup>a</sup> Ed., Tomo II, Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social, 1995; 201-209.
  12. San Miguel, J.F., Foroni, L., González, M. Coexpression of T and B markers in a lymphoproliferative disorder. *Scan. J. Haemat.* 1986; 37:10-17.
  13. San Miguel, J.F., González, M.,Orfao, A., López-Borrasca, A.Inmunopatología de leucemias y linfomas. Mta. Med. Intern. 1988; 6: 9-46.
  14. Schrek, R., Donnelly, W.J. Cytology in lymphosarcoma cell leukemia. *J. Lab. Clin. Med.* 1971; 55: 646-651.
  15. Wintrobe, M.M., Lee, R.G., Boggs. D.R., Bithell, T.C., Athens, J.W., Foerster, J. Clinical Hematology, Seventh ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1974; 1579-1580.