

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE
ADHESIÓN CELULAR EN LEUCEMIA LINFÁTICA
CRÓNICA Y OTROS SÍNDROMES
LINFOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS CON EXPRESIÓN
LEUCÉMICA.

ANA ISABEL ROSELL MAS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 29 de Novembre de 2002 davant un tribunal format per:

- D. Samuel Navarro Fos
- D. José Enrique O'coner Blasco
- D. Francisco Javier Rafecas Renau
- D. Alberto Álvarez Barriento
- D. Francisco Martínez Díaz

Va ser dirigida per:

D^a. Pilar León Moreno

D^a. Esther Roselló Sastre

D. Antonio Cremades Mira

©Copyright: Servei de Publicacions
Ana Isabel Rosell Mas

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5958-5

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y CIRUGÍA

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN
CELULAR EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA Y OTROS
SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS CON
EXPRESIÓN LEUCÉMICA”**

PRESENTADA POR:
ANA ISABEL ROSELL MAS
CURSO ACADÉMICO 2002-2003

DÑA. PILAR LEÓN MORENO
DÑA. ESTHER ROSELLÓ SASTRE
D. ANTONIO CREMADES MIRA

Dña. Esther Roselló Sastre, Doctora en Medicina, Patóloga del Hospital Universitario Dr. Peset:

CERTIFICA

Que Dña. Ana Isabel Rosell Mas, ha realizado personalmente y bajo su dirección el trabajo, para Tesis Doctoral con el título:

“Análisis De La Expresión De Moléculas De Adhesión Celular En Leucemia Linfática Crónica Y Otros Síndromes Linfoproliferativos Crónicos Con Expresión Leucémica”.

Trabajo que ha sido finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme para obtener el grado de Doctor siempre que así lo estime el tribunal que designe la Universidad de Valencia. Y para que así conste, a efectos académicos, se expide el presente certificado en el lugar y fecha indicados.

Valencia 12 de Junio de 2002.

Dña. Pilar León Moreno, Doctora en Medicina, Hematóloga del Hospital Universitario Dr. Peset:

CERTIFICA

Que Dña Ana Isabel Rosell Mas, ha realizado personalmente y bajo su dirección el trabajo, para Tesis Doctoral con el título:

“Análisis De La Expresión De Moléculas De Adhesión Celular En Leucemia Linfática Crónica Y Otros Síndromes Linfoproliferativos Crónicos Con Expresión Leucémica”.

Trabajo que ha sido finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme para obtener el grado de Doctor siempre que así lo estime el tribunal que designe la Universidad de Valencia. Y para que así conste, a efectos académicos, se expide el presente certificado en el lugar y fecha indicados.

Valencia 12 de Junio de 2002.

D. Antonio Cremades Mira, Doctor en Medicina, Patólogo del Instituto Valenciano de Oncología:

CERTIFICA

Que Dña Ana Isabel Rosell Mas, ha realizado personalmente y bajo su dirección el trabajo, para Tesis Doctoral con el título:

“Análisis De La Expresión De Moléculas De Adhesión Celular En Leucemia Linfática Crónica Y Otros Síndromes Linfoproliferativos Crónicos Con Expresión Leucémica”.

Trabajo que ha sido finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme para obtener el grado de Doctor siempre que así lo estime el tribunal que designe la Universidad de Valencia. Y para que así conste, a efectos académicos, se expide el presente certificado en el lugar y fecha indicados.

Valencia 12 de Junio de 2002.

- A Pilar León por la seguridad, esperanza y alegría que transmite una incansable luchadora como ella. Así como por su iniciativa y soporte en el desarrollo de este trabajo.
- A Esther Roselló por dedicar tantos esfuerzos a tantos pequeños detalles, por sus horas dedicadas a este proyecto, y su infinita paciencia.
- A Antonio Cremades por su esmero y cuidada labor en el estudio estadístico, así por la preocupación que ha demostrado en todo el proyecto.
- A todos aquellos que han contribuido a la realización del trabajo de laboratorio, en especial mención por el interés, preocupación y tiempo dedicado de Amparo Pinilla.
- Al Dr. Francisco J Rafecas Renau cuyo apoyo, comprensión y ejemplo durante mis años de residente y de adjunto, que han hecho mantener mis ilusiones en nuestra profesión.
- A todos mis compañeros del Servicio de Hematología del Hospital Dr. Peset por su apoyo y continuo ánimo en los momentos más áridos en la recopilación de datos, en especial a la Dra. M^o Luz Juan Marco.
- A mi madre sin cuyo cariño, insistencia y supervisión durante los años de estudiante, sin cuyo apoyo no hubiera llegado a conseguir mis sueños.

A mis seres más queridos, en especial a mi marido, sin cuya comprensión y paciencia, no hubiera podido llevar a buen puerto la realización de esta tesis.

ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	19
<u>INTRODUCCIÓN</u>	23
1. Moléculas de adhesión	25
1.1.Integrinas	27
1.2.Familias de las Inmunoglobulinas	32
1.3.Selectinas	34
1.4.Familia CD44	36
2. Moléculas de adhesión en síndromes linfoproliferativos crónicos	38
2.1.Leucemia linfática crónica	38
2.1.1 Integrinas	
2.1.2 Familia de las Inmunoglobulinas	
2.1.3 Selectinas	
2.1.4 Familia de CD44	
2.2.Tricoleucemia	40
2.3.Linfoma linfoplasmocítico	40
2.4.Linfoma B esplénico de la zona marginal con linfocitos vellosos	41
2.5.Linfoma del manto	41
2.6.Linfoma folicular	42
3. Generalidades de las patologías a estudio	43
3.1. Leucemia linfática crónica	44
3.2. Tricoleucemia	51
3.3. Linfoma linfoplasmocítico	54
3.4. Linfoma B esplénico de la zona marginal con linfocitos vellosos	56
3.5. Linfoma del manto	59
3.6. Linfoma folicular	61
4. Citometría de flujo	64
4.1. Características de los anticuerpos utilizados en el diagnóstico.....	65
4.2. Componentes de un citómetro de flujo.....	68
<u>OBJETIVOS</u>	71

<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	75
1. Pacientes	77
1.1 Población y criterios de inclusión/ exclusión.....	77
1.1.1 Criterios diagnósticos.	
1.1.2 Estratificación clínica.	
1.2 Material biológico.....	79
1.2.1 Estudio morfológico.	
1.2.2 Estudio serológico.	
1.2.3 Otras muestras.	
1.3 Evaluación clínica.....	80
1.3.1 Intervalos de evaluación clínica	
1.3.2 Criterios de curación y recaída.	
1.3.3 Causas de exitus.	
2. Citometría de Flujo	83
2.1 Panel de anticuerpos utilizados.....	83
2.1.1 Anticuerpos monoclonales utilizados en el diagnóstico.	
2.1.2 Moléculas de adhesión analizadas.	
2.1.3 Panel utilizado en el estudio de SLPC y panel de MA.	
2.2 Preparación de muestras.....	85
2.2.1 Toma y procesado de muestras.	
2.2.2 Separación de células mononucleadas.	
2.2.3 Preparación de las muestras.	
2.3 Análisis en el Citómetro.....	86
3. Material	89
3.1 Instrumentos.....	89
3.2 Reactivos y productos.....	90
4. Estudio estadístico	90
4.1 Variables estudiadas.....	90
4.2 Métodos utilizados para su análisis.....	91
<u>RESULTADOS</u>	93
1. Descripción clínica de los pacientes	95
2. Parámetros clínico-biológicos	95
2.1 Analítica.....	95
2.2 Estadíaje.....	96
2.3 Estudio de médula ósea.....	96
2.4 Evolución clínica.....	96

3. Resultados del inmunofenotipaje.....	98
4. Expresión de MA.....	98
4.1 Estudio multivariante.....	102
Anexo 1.	
Anexo 2.	
Anexo 3.	
<u>DISCUSIÓN</u>.....	103
1. Expresión de las MA y de las diferentes entidades.....	106
2. Correlación entre las MA y los estadios clínicos.....	110
3. MA y factores pronósticos clásicos.....	113
4. Progresión.....	116
5. Relación entre la expresión de las MA, la necesidad de tratamiento y la supervivencia.....	118
<u>CONCLUSIONES</u>.....	123
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>.....	127

ABREVIATURAS

TL	Tricoleucemia.
TL-V	Tricoleucemia variante.
LEV	Linfoma B esplénico de la zona marginal con linfocitos vellosos.
LF	Linfoma folicular.
LHR	Receptor del homing linfocitario.
Lin	Linfoma linfocítico.
LLC	Leucemia linfática crónica.
LLP	Linfoma linfoplasmocítico.
LM	Linfoma del manto.
LNH	Linfoma no Hodgkin.
LP	Leucemia prolinfocítica.
MA	Moléculas de adhesión.
NK	Células Natural Killer.
SLPC	Síndrome linfoproliferativo crónico.
SLPC-B	Síndrome linfoproliferativo crónico estirpe B.
SLPC-T	Síndrome linfoproliferativo crónico estirpe T.

INTRODUCCIÓN

1. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.

Las moléculas de adhesión (MA) son glicoproteínas que constituyen un conjunto de receptores de membrana encargados de mediar las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular a través de la unión ligando-receptor. Cada uno de estos receptores muestra especificidad a su ligando, cualidad que es necesaria para su función específica en la migración leucocitaria y recirculación linfocitaria (Drillenburg P, et al 2000). Intervienen en gran número de procesos fisiológicos como: la regulación de la extravasación de los leucocitos durante la respuesta inflamatoria y los fenómenos de recirculación y entrada selectiva de los linfocitos en los órganos linfoides o "homing"; en el desarrollo de la respuesta inmune, potenciando los fenómenos de adhesión y coestimulación necesarios para una adecuada respuesta citotóxica y en los fenómenos de progresión y diseminación tumoral. La regulación natural de las MA es particularmente evidente en el sistema hematopoyético, donde las células muestran fenotipo adherente y no adherente durante su diferenciación y respuesta a estímulos en la circulación o extravasación tisular.

Las MA son esenciales en el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares. Facilitan la comunicación intercelular (célula-célula y célula-matriz) definiendo la arquitectura de los órganos. El microambiente medular es un órgano complejo en el que las células estromales son responsables de proporcionar la mayoría de los factores necesarios para el desarrollo ordenado de las células madre, estando sujetas a interacciones con citoquinas promotoras e inhibitoras del crecimiento, así como con componentes de la matriz extracelular y ligandos estromales que permiten la adhesión de las células.

TABLA DE LAS PRINCIPALES MOLÉCULAS DE ADHESIÓN:

Denominación	Distribución celular VLA(<i>very late activation antigens</i>)	Ligandos
β1- Integrinas		
α 1 β 1 (VLA-1,CD49a/CD29)	L-T activados	Colágeno, laminina
α 2 β 1 (VLA-2,CD49b/CD29)	L-B, Mo, P	Colágeno, laminina
α 3 β 1 (VLA-3,CD49c/CD29)	Amplia(B)	Fibronectina, colágeno
α 4 β 1 (VLA-4,CD49d/CD29)	Leucocitos y melanocitos	VCAM-1, fibronectina
α 5 β 1 (VLA-5,CD49e/CD29)	Amplia (L-T, L-B, Mo, etc.)	Fibronectina
α 6 β 1 (VLA-6,CD49f/CD29)	Mo, P, L-T	Laminina
α 7 β 1 (H36b1)	Músculo, melanocitos	Laminina
α 8 β 1	SNC, melanocitos	
α v β 1 (VLA-V, CD51/CD29)	Epitelio, riñón	Vitronectina, fibronectina
β2 -Integrinas		
α L β 2 (LFA-1,CD11a/CD18)	Panleucocitaria	ICAM-1,2,3
α M β 2 (Mac-1,CD11b/CD18)	G y Mo	C3bi, fibrinógeno, CAM-1
α X β 2 (P150,95,CD11c/CD18)	Macrófagos, Mo, L-T	C3bi, fibrinógeno
3- Superfamilia de inmunoglobulinas		
CD31 (PECAM-1)	L-B, G, Mo	PECAM-1, α V β 3
CD50 (ICAM-3)	Leucocitos	LFA-1
CD54 (ICAM-1)	Células endoteliales activadas	LFA-1
CD56 (NCAM)	Células NK	
CD102 (ICAM-2)	Linfocitos y Mo	
CD106 (VCAM-1)	Células endoteliales activadas	VLA-4
4- Selectinas		
CD62L (L-selectina)	Leucocitos	Lewis-X
CD62E (E-selectina)	Endotelio	Adresinas
CD62P (P-selectina)	P, endotelio	Lewis-X sializado
5- CD44	amplia	Ac.hialurónico.

L-B: linfocitos B, L-T: linfocitos T, Mo: monocitos, G: granulocitos, P: plaquetas.

Las MA constituyen un grupo diverso de receptores de membrana que pertenecen a diferentes familias, como las integrinas, la superfamilia de las superinmunoglobulinas, selectinas, y la familia CD44. Las MA se expresan de forma variable en la oncogenia de células B, así como en los SLPC. La expresión de las MA en los SLPC ha sido estudiada a fin de entender y predecir el comportamiento y heterogeneidad de estas enfermedades (localizada, enfermedad diseminada, linfadenopatía, esplenomegalia, etc.), o determinar si las MA expresadas en la superficie de las células linfomatosas pueden servir para ayudar en el diagnóstico diferencial de estas entidades, así como investigar su posible significación pronóstica (Angelopoulou MK et al, 1999).

1.1. INTEGRINAS

Son una familia de glicoproteínas de la superficie celular dependientes de cationes divalentes y responsables de la adhesión de las células a la matriz extracelular compleja y a otras células, regulando con ello la extravasación leucocitaria en la inflamación, el inicio de la respuesta inmune y el tráfico linfocitario en condiciones fisiológicas (Hynes RO, 1992).

Las integrinas son heterodímeros de membrana de naturaleza proteica, como resultado de la unión no covalente entre dos cadenas polipeptídicas α y β (Verfaillie CM, et al 1998). De las combinaciones resultantes de la asociación de una misma cadena β con diversos tipos de cadena α , se generó la 1ª clasificación en tres subfamilias, presentando cada subgrupo una subunidad β idéntica y la cadena α diferente para cada una. En cada subgrupo la subunidad β es igual y homóloga pero diferente a la de los otros subgrupos: las β -1 integrinas (VLA) con estructura $\beta 1\alpha 1-8$, las β -2 integrinas con estructura $\beta-2\alpha, L, M, P$

y las β 3-integrinas o citoadhesinas. En la actualidad dicha clasificación ha sido ampliada, aunque de toda la familia de las integrinas sólo cinco hasta ahora muestran implicación en la adhesión leucocitaria al endotelio: la β 2 (CD11a/CD18, CD11b/CD18 y CD11c/CD18), la β 1 integrina VLA-4 (α 4 β 1, CD49d/CD29) y α 4 β 7.

1.1.1 β -1 integrinas.

Las β 1 integrinas tienen CD29 como subunidad β común. Esta amplia familia contiene una serie de receptores celulares para las proteínas de la matriz extracelular, incluyendo fibronectina, colágeno, laminina, y vitronectina (Timothy M y Harlan J.M 1994). El gen que codifica la cadena β está en el cromosoma 10 y los que codifican la subunidad α están en el cromosoma 5 para VLA-1 y 2, en el 17 para VLA-3 y se desconocen en el resto (Umbría et al, 1990).

La CD49a/CD29 se expresa en las células endoteliales y en las células dendríticas del centro germinal del tejido linfoide normal de la lengua, apéndice, bazo y ganglio linfático, mientras que no se expresa en los linfocitos de sangre periférica.

La CD49b/CD29 es un miembro de la familia de las integrinas, que se expresa en numerosos tipos celulares, incluidas células T activadas y plaquetas. Este anticuerpo inhibe la adhesión de las plaquetas al colágeno. Este anticuerpo es útil para el estudio de la expresión y función de las integrinas (Springer SJ, 1992).

La CD49c/CD29 se expresa de forma intensa en las células endoteliales y epitelio del timo, con expresión débil en el 5-10% de las células linfoides del centro germinal, así como expresión moderada en los linfocitos interfoliculares.

La CD49d/CD29 es expresada intensamente por las células del manto de los ganglios

linfáticos y la amígdala lingual, con expresión débil en la zona clara del centro germinal. Los linfocitos T interfoliculares presentan un nivel intermedio de expresión, así como los linfocitos T medulares.

La CD49e/CD29 es expresada en las células reticulares y en los linfocitos del centro germinal y manto. También de forma débil en los linfocitos interfoliculares. Es capaz de inhibir la unión de fibroblastos, plaquetas y linfocitos a fibronectina, y bloquea parcialmente la invasión celular (McIntyre BW et al, 1991).

La CD49f/CD29 no se expresa en los linfocitos y sí se expresa de forma intensa en las células foliculares dendríticas y en las endoteliales.

Las β -1 integrinas desempeñan dos funciones:

-. Reconocimiento de los componentes de la matriz extracelular, ya que todas funcionan como receptores de los componentes de la matriz extracelular (Terol M J y Prosper F 1998). La especificidad ligando-receptor es muy variable; una misma integrina puede poseer diferentes ligandos en función del tejido en que se encuentre, y un mismo ligando puede ser reconocido por diversas integrinas a través de distintas secuencias peptídicas.

-. Adhesión molecular, siendo capaces de mediar interacciones célula-célula. Así, CD49d/CD29 es capaz de mediar la unión de los linfocitos y monocitos a las células endoteliales activadas, a través del reconocimiento y unión de su ligando CD106 presente en el endotelio activado. Esto constituye el mecanismo fundamental de la extravasación de los linfocitos T memoria en los órganos linfoides secundarios (Butcher EC y Picker LJ, 1996).

También se ha descrito el reconocimiento y unión de VLA-4 a otro ligando de la familia de las inmunoglobulinas, la NCAM.

1.1.2 β -2 integrinas.

Las β -2 integrinas tienen una parte común de cadena β (CD18) que tiene una estructura típica y tres subunidades que tienen asociación no covalente con CD18: CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1, Mo-1) y CD11c (p150,95). La expresión de las β -2 integrinas está restringida a los leucocitos, pero entre los diferentes subtipos de leucocitos la distribución de los CD11/CD18 difiere (Arnaout MA, 1990):

- . CD11a-. Con un PM de 180 kD, está presente en todos los leucocitos y es una MA implicada en las funciones de los linfocitos y granulocitos. CD11a media la adhesión de las células linfoides al endotelio vascular en asociación con el ligando CD54 (ICAM-1), el cual se ha encontrado en leucocitos, pero también en células endoteliales de venas de cordón umbilical (Umbría et al, 1990). Otros ligandos son CD102 (ICAM-2) y CD50 (ICAM-3). (Prieto J et al, 1988).

- . CD11b. Con un PM de 165 kD, se expresa en la superficie de linfocitos activados, granulocitos y monocitos y un subtipo de células NK. El CD11b actúa interaccionando célula-célula y célula-sustrato y como receptor para el fragmento del complemento C3bi, CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2) y CD50 (ICAM-3) (Prieto J et al, 1988).

- . CD11c-. Su PM es de 150 kD. Se expresa normalmente en macrófagos tisulares, monocitos y algunos linfocitos T citotóxicos, y parece ser que es necesario para la adhesión molecular célula-célula y célula-matriz (Curtis A et al, 1990). Sus ligandos son iCb3 y fibrinógeno (Sánchez-Madrid F et al, 1983). Ha sido detectado de forma reiterada en TL, y sólo en raras ocasiones se expresa en LLC u otros SLPC, por lo que ha ganado la categoría de marcador diagnóstico de la TL entre las neoplasias de células B (Falini B et al, 1986) (Curtis A et al, 1990)(Martota G et al, 2000).

- CD18-. Con un PM de 90-95 kD, está implicado en la interacción célula-célula. Está fuertemente expresado en todos los tipos de leucocitos (siendo negativo en las plaquetas). Es considerado un marcador pan-leucocitario, también utilizado en los estudios por deficiencia de adhesión leucocitaria, en carcinomas indiferenciados y algunos tipos de linfomas, así como en el estudio de adhesión celular (Sánchez-Madrid F et al, 1983) (Prieto J et al, 1988).

Las β -2 integrinas desempeñan las siguientes funciones:

- Se encuentran implicadas en los fenómenos de adhesión intercelular.
- La CD11a/CD18 interviene en los fenómenos de citotoxicidad mediada por linfocitos T y por las células NK.
- Fenómenos de proliferación B y T.
- Citotoxicidad dependiente de anticuerpo.
- Adhesión y extravasación de los leucocitos al endotelio activado en los focos de la inflamación.

Todas las funciones anteriormente mencionadas, las desarrollan a través de la unión con al menos uno de los 3 ligandos identificados: CD54, CD102, CD50, perteneciendo todos ellos a la familia de las inmunoglobulinas.

En condiciones basales, las integrinas se encuentran en estado inactivo, y presentan una baja afinidad por sus ligandos, por lo que requieren una activación inducida por otras moléculas (factores solubles, citoquinas, etc.) que provocan un cambio conformacional en su estructura, el cual se traducirá en una mayor avidéz por su ligando y en algunas ocasiones en un aumento de la densidad antigénica de la molécula.

1.2. FAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

La superfamilia del gen de inmunoglobulinas está constituida por un conjunto de proteínas de membrana, caracterizadas por contener, en su secuencia polipeptídica, el dominio de las inmunoglobulinas ("inmunoglobulin-like"), con conservación de secuencias que forman enlaces disulfuro estabilizando su estructura terciaria (Williams AF, Barclay AN 1988). Mediante su acción a través de uniones homófilas y heterófilas intervienen en una gran cantidad de procesos, como el sistema inmune y también en los mecanismos de reconocimiento celular y embriogénesis.

1.2.1 CD54

Es una glicoproteína codificada por un gen localizado en el cromosoma 19, con un peso molecular de 80-120 kD, distribuida en los granulocitos y células del endotelio activado (Buck CA, 1992). El CD54, localizado en la membrana de las células endoteliales, facilita la adhesión leucocitaria y la trans migración celular (Timothy M y Harlan J.M, 1994).

La unión a su ligando es un proceso activo que requiere de un citoesqueleto íntegro, es dependiente de la temperatura y de la presencia de magnesio. A través de la unión a su ligando, CD54 participa en gran cantidad de funciones orgánicas:

- Participa en la respuesta inflamatoria permitiendo la extravasación de los leucocitos del torrente circulatorio, mediante su expresión en el endotelio activado del foco inflamatorio.
- Actúa como una molécula coestimuladora en la respuesta inmune, potenciando la respuesta proliferativa del linfocito T frente al antígeno.
- Participa en las reacciones alérgicas cutáneas tipo IV.
- Hiperreactividad bronquial: la expresión de CD54 en la mucosa bronquial media la adhesión de los eosinófilos a la mucosa bronquial.
- Diseminación tumoral (Staunton DE et al, 1989).

- . Procesos infecciosos respiratorios y sistémicos: CD54 constituye el receptor de los rinovirus y del plasmodium.

- . Es un ligando para CD11a.

1.2.2 CD102

Está codificado por el cromosoma 17. Es una glicoproteína de cadena simple, con un PM de 46 kD. Se encuentra casi de forma exclusiva en endotelio vascular, linfocitos y monocitos y no parece estar sujeto a mecanismos importantes de regulación (De Fougerolles AR et al, 1991). Participa fundamentalmente en la extravasación de los leucocitos fuera del torrente vascular en la respuesta inflamatoria.

1.2.3 CD50

Presenta un PM de 120 kD. También es llamado ICAM-3, de la familia de las inmunoglobulinas. Constituye el tercer ligando conocido de CD11a/CD18, cuya distribución queda restringido al sistema hematopoyético (neutrófilos, monocitos, basófilos, macrófagos, células Kuffer, de Langerhans, dendríticas y endoteliales implicadas en la angiogénesis). Actúa como molécula coestimuladora en el inicio de la respuesta inmune, aumentando la afinidad de las integrinas linfocitarias CD49d/CD29 y CD49e/CD29 por sus ligandos (Cordell JL et al, 1994).

1.2.4 CD106

Es una glicoproteína de membrana de 102 kD y un núcleo proteico de 81 kD, constituida por 6 dominios “inmunoglobulin-like”. Se expresa fundamentalmente en el endotelio vascular activado, pero también se expresa en las células foliculares dendríticas del centro germinal. Su principal función es la extravasación leucocitaria en la respuesta inflamatoria a través de la unión a la integrina CD49d/CD29, presente en la superficie de los leucocitos.

1.2.5 CD56.

Molécula presente en las células del sistema nervioso y en las células NK. Su expresión en determinadas neoplasias linfoides se asocia a procesos linfoproliferativos con afinidad por su extensión a territorios extraganglionares (sistema nervioso, gastrointestinal, piel). Se expresa también en el carcinoma de células pequeñas de pulmón y neuroblastomas.

1.2.6 CD31

Es una glicoproteína de 130 kD que se encuentra en células endoteliales, plaquetas y algunos leucocitos (Stockinger H et al, 1990). El CD31 está expresado constitucionalmente en las células endoteliales, en más del 95% de los monocitos y neutrófilos, pero solo se expresan el 50% de los linfocitos en la sangre periférica (Stockinger H et al, 1990). Parece tener un importante papel en la adhesión leucocitaria al endotelio y en especial en la trans migración leucocitaria a través del mismo.

1.3 SELECTINAS

Las selectinas son una familia compuesta de tres proteínas designadas por el prefijo E (endotelio), P (plaqueta), y L (leucocito) (Timothy M y Harlan J.M, 1994): la E-selectina o ELAM-1 expresada fundamentalmente en células endoteliales; la P-selectina o CD62P presente en la superficie de plaquetas activadas, y la L-selectina o CD62L se expresa en leucocitos.

El rasgo estructural común de las selectinas es que son proteínas ancladas en la membrana celular mediante una estructura común, formada por un fragmento extracitoplásmico con el extremo NH₂-terminal que contiene el dominio tipo lecitina, un dominio tipo EGF (Epidermal Growth Factor), 2-9 dominios tipo CR (complement

regulatory), una pequeña porción transmembranosa y un corto dominio intracitoplásmico con el extremo COOH-terminal.

Los ligandos de las selectinas (adresinas) son estructuras ricas en ácido siálico que se encuentran formando parte de las células hematopoyéticas (en el caso de las selectinas E y P) o bien de las células endoteliales activadas de órganos o tejidos inflamados (selectinas L). Los genes que codifican la familia de las selectinas esta íntimamente unido al cromosoma 1 (q21-24) (Collins T et al, 1991)

1.3.1 CD62E.

Fue inicialmente descrito como una proteína de 155-kD de PM, inducida tras estimulación con interleukina-1 en un cultivo de endotelio de vena umbilical y fue implicada en la adhesión de neutrófilos y varias líneas celulares leucocitarias (Bevilacqua MP et al, 1987). Constituyen un receptor linfocitario de homing, es decir, es capaz de reconocer y unirse específicamente a determinados antígenos ricos en ácido siálico (“adresinas”) presentes en la superficie de las células endoteliales de las vénulas postcapilares de los órganos linfoides, permitiendo así la entrada de los linfocitos a dichos órganos.

1.3.2 CD62P.

El núcleo proteico tiene un PM de 86 kD. CD62P fue en un principio identificada en plaquetas, siendo con posterioridad también identificada en células endoteliales (Bonfanti R et al, 1989). CD62P es sintetizada y almacenada en gránulos citoplásmicos, (en las plaquetas en los gránulos α y en las células endoteliales en los llamados cuerpos de Weibel-Palade (Bonfanti R et al, 1989)). Con una activación adecuada, CD62P es movilizada a la membrana plasmática externa.

1.3.3 CD62L.

Aunque el CD62E y el CD62P-selectina están expresadas en las células endoteliales, CD62L se ha encontrado solo en los leucocitos, y ha sido implicada en la adherencia del leucocito al ganglio periférico linfático y luz endotelio-venosa (Lewisohn DM et al, 1987) (Spertini O et al, 1991), con lo que participa en la entrada selectiva de los linfocitos en los ganglios linfáticos, y puede modular la adhesión leucocitaria al endotelio durante la inflamación (Timothy M y Harlan J.M, 1994).

La concentración plasmática en individuo sano de la L-selectina soluble es de 1.6 µg/mL, siendo esta concentración suficiente para inhibir parcialmente la adhesión leucocitaria al endotelio citoquin-estimulado (Schleiffenbaum B et al, 1992).

Los estudios del CD62L en LNH han mostrado que la mayoría de los linfomas ganglionares expresan CD62L, tanto linfomas de bajo grado como los linfomas agresivos B y también linfomas T con localización primaria ganglionar, en contraste con la expresión de la CD62L en linfomas extraganglionares que es variable (Drillenburger P et al, 2000).

1.4. FAMILIA DEL CD44

Representa a una familia de glicoproteínas codificadas en un gen del cromosoma 11. Los miembros de esta familia tienen una amplia distribución tisular y están implicados en importante número de procesos biológicos, incluyendo la activación y entrada selectiva de los linfocitos en los ganglios linfáticos, hematopoyesis, progresión tumoral y metástasis (Naor D et al, 1997). Están expresados sobre todo en células epiteliales, en linfocitos activados y linfomas agresivos. Durante la oncogenia y activación linfocitaria, el CD44 está rigurosamente regulado, sugiriendo esto que desempeña un importante papel en este proceso (Horst E et al, 1990). El CD44 está implicado en la linfopoyesis, y activación, migración y homing linfocitario (Huet et al, 1989). En el proceso de homing el CD44

media entre los linfocitos y la luz endotelial venosa, así como en la extravasación durante la inflamación (Sanders ME et al, 1988) (Drillenbug P 2000).

Varios estudios clínicos y experimentales sugieren un importante papel en el comportamiento biológico de los LNH e indican que el CD44 representa un útil marcador clínico predictivo de los resultados (Drillenbug P 2000), ya que la expresión intensa del CD44 se asocia a estadios avanzados de la enfermedad y a una menor supervivencia (Jalkanen S et al, 1991). En un estudio multicéntrico (Drillenbug P 1999), la expresión del CD44 fue un fuerte factor pronóstico en supervivencia global y libre de enfermedad en pacientes con enfermedad localizada.

El CD44 presenta diversas isoformas derivadas de la inserción del producto de determinados exones en la porción extracelular de la molécula.

2. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LOS SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS.

2.1. LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA (LLC).

2.1.1. Integrinas.

-CD11a/CD18 está expresado en un porcentaje variable de LLC (Rabinowitz R et al, 1991). Sin embargo la LLC muestra débil expresión del CD11a/CD18, si lo comparamos con otro SLPC; y esto parece ser característico de esta entidad (Csanaky G et al, 1997; Da Silva PJM et al, 1998; Domingo A et al, 1997; Pinto A et al, 1993; Rabinowitz R et al, 1991). Incluso algunos investigadores le atribuyen un valor pronóstico, ya que encuentran una baja expresión en los estadios III y IV de la enfermedad comparado con estadios precoces (Domingo A et al, 1997; Rabinowitz R et al, 1991).

-. CD11c/CD18. La expresión de esta molécula en la LLC ha sido asociada con una mayor agresividad (De Rossi G et al, 1993) o por el contrario, con un curso indolente de la enfermedad (Domingo A et al, 1997).

-. CD49d/CD29 es débilmente positivo en las LLC, a diferencia que en los linfocitos normales y otros SLPC (Da Silva PJM et al, 1998). También se ha demostrado una correlación entre la fuerte intensidad del CD29 y esplenomegalia. Por otra parte hay que considerar que la fibronectina es el ligando para la CD49d/CD29 y este hallazgo está en relación con la adhesividad de los linfocitos a la matriz extracelular, la cual cambia durante la progresión de la enfermedad, dependiendo de la expresión de las MA en la superficie de las células leucémicas.

2.1.2. Familia de las Inmunoglobulinas.

Dentro de la amplia superfamilia de las inmunoglobulinas destacan las MA intercelulares CD54, CD102 y CD50, que actúan como ligandos de CD11a/CD18 e intervienen en la extravasación de los leucocitos fuera del torrente circulatorio, así como en la interacción entre los linfocitos B y T en los folículos linfoides.

- CD54 es negativo en la mayoría de los casos (menos del 30% lo expresan). Sin embargo en pacientes con estadios de Binet B o C (Da Silva PJM et al, 1998), con tiempo de duplicación linfocitario corto, los linfocitos expresan CD54 con gran intensidad. A través de la unión a su ligando, el CD54 ejerce diversas funciones, entre las que destacan la extravasación de los leucocitos fuera del torrente circulatorio, así como un papel coestimulador en la activación del linfocito T. Se ha sugerido que la pérdida de esta molécula en superficie constituiría un fenómeno de escape del sistema de inmunovigilancia, favoreciendo la diseminación del linfoma (Da Silva Lúcio et al, 1998).

2.1.3. Selectinas.

Las células de la LLC exhiben la más alta expresión de CD62L comparadas con otros SLPC (Csanaky G et al, 1997; De Rossi G et al, 1993; Pinto A et al, 1993; Da Silva et al, 1998). Sin embargo no todas las LLC son positivas para la CD62L (Csanaky G et al, 1997). Esta MA ha sido asociada con una linfocitosis progresiva, sin linfadenopatías ni organomegalias (Angelopoulou MK et al, 1999). En todos los casos de LLC-B con esplenomegalia dicha MA es negativa.

2.1.4. Familia de CD44.

El CD44 se encuentra ampliamente distribuido en el organismo. Se conoce también como receptor del homing linfocitario (LHR). El CD44 está implicado en la entrada selectiva de los linfocitos en los ganglios linfáticos, así como en las interacciones con la matriz extracelular a través de la unión al ácido hialurónico. En la LLC se expresa de forma uniformemente intensa, pero muchos son los estudios que han intentado asociarlo a otros parámetros sin encontrar ninguna relación, excepto uno en el que se correlacionó con una mayor supervivencia (Dogan A et al, 1997).

2.2. TRICOLEUCEMIA (TL).

Lo característico de este desorden en el inmunofenotipo de las MA es la fuerte expresión del CD11c/CD18 (Cawley JC et al, 1992; Da Silva PJM et al, 1998), por lo que ha sido incorporado como criterio diagnóstico en el inmunofenotipo. El CD62L y el CD11a/CD18 son normalmente negativos en la mayoría de los casos (Da Silva PJM et al, 1998). CD54 es casi siempre expresado con gran intensidad (Da Silva PJM et al, 1998; Csanaky G et al, 1997) y refleja la activación/estadio de maduración del clon leucémico. El CD49d/CD29 en contraste al CD11a/CD18, se expresa con alta intensidad (Csanaky G et al, 1997; Da Silva PJM et al, 1998).

2.3. LINFOMA LINFOPLASMOCÍTICO (LLP).

Los hallazgos en la expresión del CD11a/CD18 son controvertidos. Así, CD11a/CD18 se ha encontrado negativo (Caligaris-Cappio et al, 1989), aunque hay series que aportan más del 50% de casos positivos (Angelopoulou et al, 1999), expresándose con fuerte intensidad en el 78% de los casos en el estudio realizado por Angelopoulou MK et al, (1999), implicando que esta MA puede ser usada como un posible marcador diferenciador entre LLC-B y LLP, especialmente cuando la morfología de los linfocitos en sangre periférica no es concluyente. CD54 es positivo con alta intensidad, hasta en un 44% en contraposición a la LLC. CD44 se expresa en todos los casos.

2.4. LINFOMA B ESPLÉNICO DE LA ZONA MARGINAL CON LINFOCITOS VELLOSO (LEV).

La expresión de las MA constituyen una herramienta útil para el diagnóstico diferencial entre LEV y LLC o TL. El LEV se caracteriza por una expresión débil de

CD62L y fuerte en CD11a, CD11c, CD18, CD54, CD44, CD49d, y CD29 (Csanaky G et al, 1997). Así, la fuerte expresión del CD11a puede diferenciar el LEV de la TL, mientras que la débil expresividad de la CD62L y fuerte expresión CD11a, CD49d, y CD54 puede discriminar el LEV frente a la LLC (Angelopoulou MK et al, 1999).

2.5. LINFOMA DEL MANTO(LM).

- . CD11a/CD18 habitualmente es negativo o débilmente positivo, aunque han sido aportados casos positivos (Angelopoulou MK et al, 1997; Pinto A et al, 1993; Horts E et al, 1991).

- . CD54. Ha sido encontrado positivo en el 50-60% de los casos (Pinto A et al, 1993; Horts E et al, 1991), incluso hasta en un 80% (Angelopoulou MK et al, 1999). Sin embargo Terol et al 1998 encuentra que el CD54 es negativo en todos los casos, demostrando que existe una correlación entre ausencia o baja expresión de CD54 y enfermedad diseminada, así como una peor supervivencia.

- . CD49d/CD29. Ha sido aplicado como marcador útil en el diagnóstico diferencial entre LLC y LM, mostrando una fuerte intensidad en esta última (Baldini L et al, 1992).

2.6. LINFOMA FOLICULAR (LF).

Los LF se caracterizan por la fuerte expresión del CD11a/CD18 y/o CD54 en más del 50% de los casos (Horts E et al, 1991; Terol et al, 1998) e incluso hasta en un 77% (Angelopoulou MK et al, 1999), imitando al inmunofenotipo de las MA del centro germinal normal. El CD11a/CD18 ha sido asociado a un patrón de crecimiento nodular intraganglionar con baja tendencia a la diseminación en el LNH de bajo grado. Así, está demostrado que el LF confinado en ganglios es CD11a/CD18 positivo, mientras que en los

leucemizados no se expresa esta MA, indicando que esta MA podría influir en el patrón de diseminación de esta enfermedad.

-. CD44. Se expresa en la mitad de los casos de LF (Parls et al, 1989). Además parece correlacionarse con estadios III/IV por lo que parece estar implicado en la diseminación del linfoma (Horst et al, 1990).

-. CD62L. No se expresan en la sección de ganglios linfoides de LF, imitando el perfil de MA de ganglios normales.

3. GENERALIDADES DE LAS PATOLOGÍAS A ESTUDIO

Los SLPC con expresión leucémica constituyen un grupo de enfermedades caracterizadas por la circulación en sangre periférica de una clona de células linfoides maduras no inmunocompetentes, detenidas en distintas etapas de su proceso de diferenciación. Además del aspecto morfológicamente maduro de las células neoplásicas, estos síndromes tienen en común su tendencia a invadir, no solo la médula ósea y sangre periférica, sino tejidos de estirpe linfoide como ganglios y bazo. El diagnóstico de los

SLPC se establece tras la integración de los datos de laboratorio y clínicos. Los datos de laboratorio que pueden contribuir al diagnóstico son:

- Citomorfología de las células linfoides de sangre periférica.
- Fenotipo inmunológico mediante una batería de anticuerpos monoclonales.
- Histopatología de la médula ósea y de los órganos linfoides afectados.
- Citogenética y biología molecular.

Clasificación de los SLPC de expresión leucémica (Jarke I. 1998).

SLPC-B

Leucemias

1. Leucemia linfática crónica
2. Leucemia prolinfocítica.
3. Tricoleucemia.
4. Leucemia de células plasmáticas.

Linfomas leucemizados

1. Linfoma B esplénico de la zona marginal con linfocitos vellosos circulantes.
2. Linfoma folicular.
3. Linfoma del manto.
4. Linfoma de células grandes.

SLPC-T

Leucemias

1. Leucemia de linfocitos granulares y células NK.
2. Leucemia prolinfocítica.

Linfomas leucemizados

1. Leucemias-linfoma T del adulto.
2. Síndrome de Sézary.
3. Linfomas T periféricos no cutáneos.

3.1. LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA (LLC).

La LLC es una neoplasia de linfocitos B activados. Las células de la LLC se asemejan morfológicamente a linfocitos pequeños maduros de la sangre periférica, acumulándose en la médula ósea, sangre periférica, ganglios linfáticos y el bazo, en grandes cantidades.

Actualmente conocemos su origen monoclonal y su procedencia de los centros germinales normales, donde estos linfocitos sufren una detención en un estadio intermedio de diferenciación. La mayoría de las células se hallan en la fase G0 del ciclo celular, lo que corrobora el clásico concepto expuesto por Galton DAG en 1966 de que la LLC es más una enfermedad linfoacumulativa que linfoproliferativa, en la que existe un bloqueo de la apoptosis (Kipps TJ 1997).

3.1.1. Clínica y hallazgos de laboratorio.

La LLC es la leucemia más frecuente del adulto en los países occidentales, representando alrededor del 30% de todas las leucemias. La edad media de los pacientes al diagnóstico es de 65 años, con menos del 15% por debajo de 50 años, y suele ser más frecuente en los varones (1,5:1), según se demostró en el primer ensayo del Medical Research Council (Catovsky D 1989).

Los síntomas más frecuentes son adenopatías generalizadas, astenia y pérdida de peso. No es infrecuente una historia previa de infecciones recurrentes, causadas por la hipogammaglobulinemia que suelen presentar estos enfermos.

El 70% de los pacientes son diagnosticados a raíz de una analítica de rutina con una linfocitosis absoluta que varía de 5 a 500 x 10⁹/l, pero en la mayoría de los casos es superior a 20 x 10⁹/l. En el 20% de los pacientes se halla anemia o plaquetopenia. Un 10-25% de los casos desarrollan anemia hemolítica autoinmune que en ocasiones se pone de manifiesto al iniciar el tratamiento. La plaquetopenia autoinmune es poco frecuente (2%), y la aplasia pura de la serie roja y neutropenia autoinmune son todavía más raras.

Morfología.

- Sangre periférica: se distingue la variante clásica o típica constituyendo 1/3 del total de LLC-B (Woessner S 2000), representando 2/3 las atípicas, dentro de las cuales se incluyen la LLC/LP y la mixta (Figura A).

Extensión de médula ósea: para establecer el diagnóstico se exige una infiltración superior al 30% evaluada en una muestra hiper celular o en las zonas de grumo aplastado.

Biopsia de médula ósea: se reconoce cuatro patrones histológicos (Rozman C et al, 1997):

- a) Forma intersticial, en la que la infiltración linfocitaria respeta la arquitectura medular normal, entremezclándose con la celularidad hematopoyética (Fig. C izq.).
- b) Forma nodular, en la que existen formaciones redondeadas compuestas por linfocitos pequeños y de tamaño superior al de un folículo normal (Fig. B izq.).
- c) Forma difusa, existe una infiltración linfocitaria masiva (Fig. C dech).

d) Tipo mixto, que se asocian características morfológicas típicas de la intersticial y la nodular (Fig B dech).

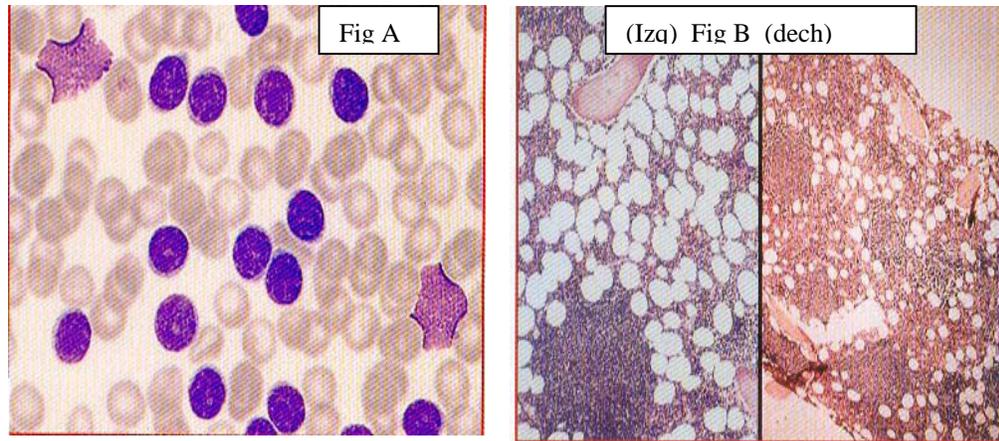
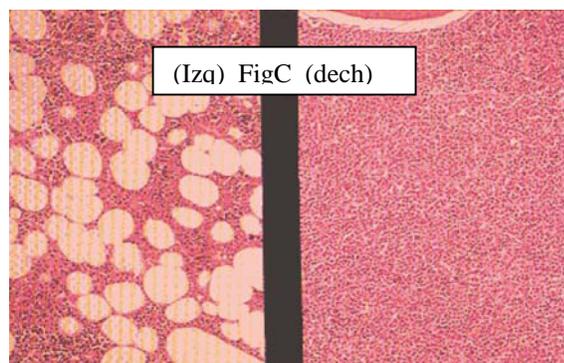


Fig A: LLC-B, frotis de sangre periférica mostrando linfocitos de contorno nuclear redondo con cromatina cuarteada en algunos elementos. Se observan sombras de Gumprecht.

Fig B: LLC-B, biopsia de médula ósea mostrando patrón de infiltración nodular (izq) y patrón mixto (nodular + intersticial)(dech).

Fig. C: LLC-B, biopsia de médula ósea mostrando patrón de infiltración intersticial (izq) y difuso (dech).



En general el patrón es intersticial y en menos del 10% nodular, siendo ambos propios de las fases iniciales, y el mixto y difuso de los estadios avanzados.

3.1.2. Inmunofenotipo.

Los linfocitos expresan antígenos de la línea B (CD19, CD20, CD24, CD37, CD21), siendo también el CD23 positivo en la mayoría de los casos. El CD 23, es un receptor de baja afinidad para Ig E y es raro en otras neoplasias B (Matutes E et al, 1994). El CD22, CD35, CD79b o el FMC7 (antígenos solo expresados en los linfocitos B) suelen ser negativos en la LLC, aunque son positivos en otros tipos de neoplasias de estirpe B, lo que sirve para su diagnóstico diferencial. Particularmente importante es el FMC7, siendo muy positivo en la LP y en la leucemia de células peludas, y su positividad en la LLC se asocia a un mal pronóstico (Catovsky D et al., 1987). Especial interés merece el CD5, ya que a pesar de ser un antígeno de la línea T, es positivo en más del 80% de las LLC-B (Geisler CH et al, 1991).

Aproximadamente el 80% de los linfocitos LLC-B expresan en su membrana inmunoglobulinas de superficie, por lo que se consideran de estirpe B. Los linfocitos leucémicos que expresan inmunoglobulinas de superficie expresan sólo una cadena ligera κ ó λ , fundamentando su clonalidad.

Matutes y sus colaboradores (1994) han propuesto un sistema de valoración objetiva para el diagnóstico de los SLPC (véase Tabla 1). Se trata de un sistema de puntuación según las características inmunofenotípicas más frecuentemente observadas en la LLC típica. La puntuación varía desde un máximo de 5 a un mínimo de 0. Así se diagnosticarán como LLC típicas aquellos SLPC con puntuación de 4 ó 5, siendo etiquetados como otros SLPC no LLC los de puntuación menor de 3. Queda un grupo dudoso, que representa menos del 15%, con puntuación de 3.

Tabla 1: Sistema para el diagnóstico de la LLC o SCORE (Matutes E et al, 1994).

Marcador de membrana	1 punto	0 puntos
SmIg	Ligero	Moderado/Fuerte
CD5	Positivo	Negativo
CD23	Positivo	Negativo
CD22	Ligero/Negativo	Moderado/Fuerte
FMC7	Negativo	Positivo

Posteriormente el sistema se ha modificado sustituyendo el CD22 por CD79b, lo cual incrementa el potencial para distinguir la LLC de otros SLPC (Moreau E et al., 1997). La máxima puntuación corresponde a un fenotipo característico de LLC (5/5) y la mínima (0/5) al fenotipo de la TL. Tanto la LLC como otros linfomas pueden tener fenotipos diferentes, con score entre 5 y 0. (Domingo A 1999).

3.1.3 Evolución.

Indolente. Se define como aquella LLC con Hb \geq 13 g/dl, recuento linfocitario \leq 30 x 10⁹/L, tiempo de duplicación linfocitario > 12 meses, infiltración linfocitaria no difusa en médula ósea, estadio A de Binet (Montserrat E, Rozman C 1993).

Transformación. El 3-10% de los pacientes presentan transformación a un linfoma de células grandes (síndrome de Richter). El pronóstico es muy desfavorable, con una media de supervivencia menor a 6 meses (Robertson LE et al, 1993; Rozman C et al, 1995).

Otro tipo de transformación es hacia LP. La LLC/LP tienen peor pronóstico que la LLC clásica (Oscier DG et al, 1997).

Segundas neoplasias. Los enfermos con LLC tienen un riesgo por encima del 28% que la población general de presentar segundas neoplasias, que con mayor frecuencia afectan a piel, pulmón y aparato gastrointestinal (Travis LB et al, 1992).

3.1.4. Tratamiento.

La evolución es indolente en la mayoría de los pacientes en estadios iniciales, cuyo tratamiento se pospondrá hasta la aparición de signos de progresión, momento en el que la administración de un tratamiento de carácter paliativo puede ser aceptable (Cheson B et al, 1996). En líneas generales y de acuerdo con las directrices propuestas por el grupo británico para el estudio de LLC (NCI/WG), el tratamiento está indicado en pacientes en estadio B o C y A con evidencia de progresión (Zwiebel et al,1998).

3.1.5. Factores pronósticos.

La LLC es una enfermedad biológicamente heterogénea, con un curso clínico variable. Con frecuencia presenta una historia natural indolente que varía de pocos años a décadas.

La introducción de opciones terapéuticas más efectivas, como los análogos de purinas o el trasplante de progenitores hematopoyéticos, ha estimulado a los investigadores a tratar de perfilar los factores pronósticos. Actualmente, se consideran como factores pronósticos con impacto en la supervivencia los que se enumeran en la tabla 2, dividiéndose en factores clásicos, cuyo valor se halla plenamente establecido y factores nuevos, el interés de los cuales debiera de confirmarse con más estudios (Hallek M et al, 1997), siendo la morfología atípica un factor de pronóstico adverso (Oscier DG et al, 1997).

Tabla 2: Factores pronósticos (Monserrat E 2001).

PARÁMETRO (supervivencia)	BUEN PRONÓSTICO (>10 años)	MAL PRONÓSTICO (<10 años)
Factores clásicos		
Estadio	Binet A; Rai 0	Binet B-C; Rai I-IV
Biopsia médula ósea	Patrón no difuso	Patrón difuso
Infiltración médula (% linfo)	<80 %	>80 %

Cifra de leucocitos	Baja (<50.000/dl)	Alta (>50.000/dl)
Morfología linfocitaria	<10 % células atípicas	>10 % células atípicas
Tiempo duplicación linfo	Largo (>12 meses)	Corto (<12 meses)

Factores nuevos

β -2-microglobulina	Normal	Elevada
CD23 sérico	Normal	Elevada
Timidin-quinasa	Normal	Elevada
Citogenética	del (13q) aislada	del(11q), del(17p)
Expresión CD38	<30%	>30%
Mutaciones IgVH	sí	No

Linfo: linfocitos

Para la estratificación clínica de la LLC se han propuesto dos sistemas de estadiaje: el de Rai (Rai KR, et al 1975) (Tabla 5) y el de Binet (Binet JL et al 1981) (Tabla 6) y en el resto de SLPC no LLC utilizamos el sistema de estadios de Ann Arbor (Tabla 7), descritos en anexo 1.

De los parámetros nuevos, los más importantes son la citogenética y la tasa sérica de β 2-microglobulina. Las mutaciones de los genes IgVH, aunque identifican distintas formas evolutivas de la LLC, no son fáciles de estudiar, limitando su aplicación clínica. Sí que parece que la expresión de CD38 posee valor pronóstico por sí misma.

3.2. TRICOLEUCEMIA (TL).

La TL se trata de una proliferación clonal de linfocitos B tardíos, post-foliculares, con baja actividad proliferativa a pesar de presentar un fenotipo activado.

3.2.1. Clínica y datos de laboratorio.

La TL, o leucemia de células peludas, es un desorden linfoproliferativo poco frecuente (2-4% de todas las leucemias) (Jarque I 1998), descrito por Bouroncle (1958). La presentación clásica de un paciente con TL es varón de edad media, con esplenomegalia (presente en el 80% de los pacientes)(Flandin et al, 1984), pancitopenia en el 50% de los

casos y tricoleucocitos circulantes. La cifra de leucocitos es inferior a $3 \times 10^9/l$ en la mitad de los pacientes; valores superiores son poco frecuentes en la TL típica, siendo la neutropenia constante y la monocitopenia un hallazgo analítico importante.

Los pacientes con TL son más susceptibles que la población normal a las infecciones por bacterias gram-positivas (p.e: Listeria)(Guerin JM et al, 1987), gram-negativas (p.e: Legionella) (Cordonnier C et al, 1984), micobacterias atípicas, infecciones fúngicas y toxoplasma (Knecht et al, 1986).

Morfología:

Sangre periférica. Se detecta una proporción variable de tricoleucocitos, que son células linfoides de mediano y gran tamaño, con núcleo de posición algo excéntrica y de contorno redondo, ovoide e indentado, pudiendo presentar un pequeño nucleolo. De citoplasma amplio y claro, presentan largas y numerosas proyecciones a modo de pelos (Woessner S, et al 2000).

Aspirado de médula ósea. Es a menudo seco, pudiendo ser explicado por la intensa fibrosis que suele existir, producido por la síntesis de fibronectina por los tricoleucocitos (Bartl R et al, 1983). En el caso de ser exitoso el aspirado de médula ósea, la morfología de los tricoleucocitos es similar a la visualizada en sangre periférica.

Biopsia de la médula ósea. Es fundamental en el diagnóstico de la TL por la apariencia histopatológica (Burke JS et al, 1978). Suele ser una médula ósea hiper celular, con infiltración difusa o focal por células linfoides de citoplasma abundante y rodeadas de un halo claro característico (patrón en huevo frito).

La infiltración esplénica se caracteriza por la infiltración difusa de los sinusoides y cordones de la pulpa roja por una población linfóide de células de citoplasma claro, con

atrofia o sustitución de la pulpa blanca, al contrario que en los demás SLPC (Cawley JC et al, 1980).

3.2.2. Inmunofenotipo:

Los tricoleucocitos expresan un fenotipo de célula B madura, con intensa expresión de inmunoglobulinas de superficie, positividad de FMC7 y CD22 y negatividad de CD5 (Robbins BA et al, 1993) y CD23. El marcador típico de TL, aunque no específico, es CD103, el cual tiene una alta sensibilidad para ser utilizado como marcador de la TL (Möller P et al, 1990). También hay fuerte expresión del CD11c, CD25 y el receptor de la interleukina-2 (Robbins BA et al, 1993) (Möller P et al, 1990).

3.2.3. Diagnóstico diferencial.

El rasgo citoquímico más característico, considerado como un auténtico marcador de estas células, es una intensísima positividad de fosfatasa ácida, y se expresa la actividad enzimática en forma de un precipitado granular rojizo sobre un fondo difuso (Yam LT et al, 1971). En la mayoría de los tricoleucocitos esta positividad es tartrato resistente.

El diagnóstico diferencial de la TL debe realizarse con la LLC en su forma esplenomegálica, a diferencia de los linfocitos de la LLC, las células en la TL expresan inmunoglobulinas de membrana con elevada intensidad, así como el CD22 y FMC7, mientras que son negativas para el CD5 y CD23 (Matutes E, 1999)(Burke JS et al, 1984). El diagnóstico diferencial entre TL, LP y LEV lo realizaremos utilizando 4 anticuerpos monoclonales (CD11c, CD25, HC2, CD103) debiendo ser positivos al menos 3 de estos 4 anticuerpos en la TL típica, en tanto que las otras 2 entidades no presentan más de 2 marcadores (Matutes E et al, 1994).

3.2.4. Tratamiento.

La TL suele tener un curso indolente, no precisando tratamiento tras meses o años de haber sido diagnosticada. El tratamiento está indicado cuando el paciente muestra una citopenia significativa; organomegalias sintomáticas o adenopatías; infecciones o síntomas constitucionales tales como fiebre, sudoración nocturna o fatiga (Tallman MS et al, 2000). El tratamiento de elección de la TL son los análogos de las purinas, desoxicoformicina (DFC, pentostatina) y clorodesoxiadenosina (2-CDA, cladribina), obteniéndose mejores resultados que con interferón alfa (Grever M et al, 1995; Hoffman MA et al, 1997). Asimismo, la esplenectomía sigue teniendo un cierto papel en el tratamiento de la TL, especialmente en los casos con gran esplenomegalia, ya que permite reducir la masa tumoral y las citopenias, pudiendo facilitar el tratamiento sistémico (Matutes E 1999).

3.2.5. Tricoleucemia variante.

La tricoleucemia variante (TL-V) es una forma intermedia entre la TL y la LP B, cuyas células muestran características de tricoleucocito como el citoplasma vellosos abundante y de prolinfocito como el núcleo redondo con nucleolo prominente. Afecta a varones de edad avanzada y se caracteriza por esplenomegalia marcada sin adenopatías y recuentos leucocitarios elevados sin monocitopenia. En cuanto al inmunofenotipo, en la mayoría de casos son CD11c+ y la mitad de los mismos expresan el CD103, siendo de forma constante negativas para el CD25 y HC2, anticuerpos monoclonales que son positivos prácticamente en todos los casos de TL típica. La histología medular y esplénica es similar a la de la TL (Sainati et al, 1990).

El diagnóstico diferencial de la TL-V debe realizarse con la LP B.

En la actualidad no se dispone de un tratamiento eficaz para la TL-V, dado que los pacientes presentan resistencia al interferón alfa y la mitad de los mismos no responden a los análogos de las purinas, y en aquellos en los que se documenta respuesta, ésta es parcial, siendo la esplenectomía la primera medida terapéutica, mejorando considerablemente las citopenias.

3.3. LINFOMA LINFOPLASMOCÍTICO (LLP).

Es un LNH que se origina a partir de un linfocito B post-folicular y previo a la etapa de célula plasmática. En función de que exista en suero una banda monoclonal de tipo M o células proliferantes, se hace sinónimo de macroglobulinemia de Waldenström o LLP respectivamente.

3.3.1 Clínica y hallazgos de laboratorio.

La expresión hemoperiférica de este tipo de linfoma es poco frecuente, aunque en ocasiones se llega hasta entre un 30% y un 50% de células patológicas circulantes. Mientras que en el LLP sólo presenta una única célula proliferante, que exhibe características intermedias entre linfocitos y células plasmáticas, en el caso de proliferar linfocitos y células plasmáticas, se etiqueta al proceso de LLP (Woessner S 2000). En el suero se objetiva un componente monoclonal en una tercera parte de estos linfomas y, esporádicamente, una banda biclonal (D'Angelo G et al, 1994).

Morfología:

Las células monoclonales tienen un núcleo de cromatina bastante condensada, con escasa capacidad mitótica, y pueden contener cuerpos de Dutcher (inclusiones intranucleares de inmunoglobulinas, PAS positivas). El perfil citoplásmico no presenta

vellosidades (Woessner S 2000). El patrón de crecimiento es difuso y a menudo interfolicular.

3.3.2 Inmunofenotipo.

La célula neoplásica muestra Ig de superficie y marcadores pan-B, pero lo más característico es la presencia de Ig intracitoplasmáticas, generalmente de tipo Ig M. El CD5 y CD23 son negativos, pero si predominan las características linfoplasmocitoides pueden ser CD5 positivo hasta en un 80% de los casos (Besses C et al , 1994). Suelen ser FMC7 y CD22 positivos de forma intensa, y asimismo, pueden expresar CD38, CD138 y otros marcadores de línea plasmocelular.

3.3.3 Diagnóstico diferencial.

La presencia de cuerpos de Dutcher en el núcleo ayudan al diagnóstico diferencial con la LLC atípica con células linfoplasmocitoides, ya que los cuerpos de Dutcher están siempre ausentes en esta última entidad. Debemos realizar diagnóstico diferencial con la LLC atípica y el LEV en los que se detecte una banda monoclonal. También el inmunofenotipo juega un importante papel en el diagnóstico diferencial de estas patologías.

3.3.4 Tratamiento.

La remisión, rara vez completa y en general de poca duración, se consigue en alrededor de la mitad de los pacientes con clorambucilo combinado con prednisona y vincristina y más recientemente con la cladribina.

3.4. LINFOMA B ESPLÉNICO DE LA ZONA MARGINAL CON LINFOCITOS VELLOSOSES CIRCULANTES (LEV).

El LEV es una entidad linfoproliferativa ya definida por Melo JV et al en 1987, en realidad, lo que se reconoce como entidad es el linfoma esplénico de zona marginal,

considerándose la presencia de linfocitos vellosos como algo independiente del diagnóstico, ya que dichos linfocitos pueden aparecer en otras entidades también, como LM. Además, en estos momentos se está discutiendo si realmente el origen el linfocito de zona marginal, pensando incluso algunos autores que puede originarse en el linfocito del manto, sin ser un LM (Campo E et al, 2002).

3.4.1. Clínica y hallazgos de laboratorio.

La mayoría de los pacientes son mayores de 50 años, con síntomas inespecíficos relacionados a una moderada anemia, suele cursar con una esplenomegalia de tamaño variable y ausencia de adenopatías. La linfocitosis varían entre 10 y 40 $\times 10^9/l$ con una media de 25 $\times 10^9/l$ (Catovsky D et al, 1999).

El LEV se acompaña de leucemización en dos terceras partes de los pacientes (Woessner S et al, 2000), observándose unos linfocitos que ofrecen un aspecto vellosos.

Morfología:

En sangre periférica. Los linfocitos son de tamaño celular superior al de un linfocito normal, pero inferior al del tricoleucocito. El núcleo presenta una cromatina condensada con contorno redondeado u oval, sin nucleolo visible, y con tendencia a la excentricidad. El citoplasma es menos abundante y bastante más basófilo que el tricoleucocito, características ambas importantes a la hora del diagnóstico diferencial. Las prolongaciones vellosas son cortas, con una base de implantación estrecha y con frecuencia adoptan una disposición bipolar, o bien en un solo polo.

En médula ósea se observan regueros de linfocitos con prolongaciones vellosas en el interior de los sinusoides, útil para el diagnóstico diferencial con la infiltración por TL (Labouyrie E et al, 1997). Pueden aparecer también agregados nodulares centrales de

linfocitos pequeños, parecidos a los LF, o bien presentar una infiltración intersticial. La fibrosis reticulínica es focal y poco evidente.

En los linfocitos vellosos medulares, la fosfatasa ácida muestra intensa positividad difusa pero, a diferencia de la TL, es tartrato sensible.

Morfología del bazo. Muestra expansión de la pulpa blanca, preferentemente de la zona marginal, con centros germinales atróficos o hiperplásicos, y una infiltración variable de la pulpa roja. Es frecuente observar la presencia de células de mayor tamaño, con halo citoplásmico claro, en la periferia de la pulpa blanca, lo cual se aprecia como una zona o franja clara que se designa fenómeno de marginación (Isaacson et al, 1994). Hay generalmente un fuerte acompañamiento de células plasmáticas.

3.4.2. Inmunofenotipo.

El inmunofenotipo de las células neoplásicas presentan marcadores Pan B (CD19, CD20, CD22, CD24 y CD79b) (Matutes E et al, 1994), expresan intensamente inmunoglobulinas de superficie, y son CD5-, CD23-, CD79b+ y FMC7+, pudiendo ser CD5+ o CD23+ hasta en un 20-30% de los casos, pudiendo confundirse con la TL, por lo que usaremos un panel que incluya CD25, HC2, CD103 y CD11c, siendo CD11c+ en al 50%, CD25+ y CD103+ hasta en un 25% y rara vez HC2+ (Matutes et al, 1994).

3.4.3. Diagnóstico diferencial

Debe realizarse con la LLC, TL y con otros linfomas leucemizados, especialmente con el LLP, con el LM, y con los raros casos de linfomas ganglionares B monocitoides leucemizados.

El estudio inmunofenotípico es muy útil, siendo otra característica diferencial el patrón de infiltración medular intrasinusoidal con fibrosis escasa y localizada en el LEV y difuso con fibrosis difusa y marcada en la TL, así como la infiltración del bazo con

predominio en pulpa roja con patrón difuso de la TL y de la pulpa blanca de forma nodular en el LEV (Isaacson PG et al, 1994).

3.4.4. Tratamiento.

El curso clínico es crónico y solapado en la mayoría de los pacientes con una supervivencia del 75%-80% a los 5 años. Algunos pacientes no requieren tratamiento. La esplenectomía es el tratamiento de elección. En caso de progresión la fludarabina es el tratamiento indicado, ya que solo el 20% de los LEV responden a agentes alquilantes.

3.5. LINFOMA DEL MANTO (LM).

El origen de este linfoma es la zona del manto folicular; este tipo de linfoma parte de una célula virgen localizada en los folículos primarios o en la zona del manto de los folículos secundario (Woessner S et al, 2000).

3.5.1. Clínica y datos de laboratorio.

El LM representa entre el 5%-10% de los LNH (Woessner S, et al 2000), predomina en varones de edad avanzada (50-70 años) y en el 30% de los casos presentan síntomas B (Armitage JO et al, 1998). En un 12% de los casos desarrolla infiltración del sistema nervioso central durante el curso de la enfermedad (Bosch F et al, 1998)(Montserrat E et al, 1996). Suele expresarse como estadios clínicos avanzados hasta en un 80% (III y IV), con una médula ósea infiltrada en aproximadamente el 70% de los casos y expresión en sangre periférica en el 35% de los mismos (Woessner S et al, 2000), al diagnóstico o durante su evolución.

En cuanto a los diferentes patrones histológicos según la clasificación del M.D. Anderson: se distinguen: variante zona, nodular, difusa y blastoide (García-Conde J et al, 1996). La variante *zona* (25%) representa la forma de mejor pronóstico y tiene un curso indolente, una buena respuesta a la quimioterapia convencional, y una supervivencia prolongada (Majlis A et al, 1997), caracterizándose porque las células del manto proliferan y oprimen los folículos que aparecen en ocasiones atróficos (Bookman MA et al, 1990). La variante *nodular* (13%) presenta un crecimiento tanto centrípeto como centrífugo de las células del manto, formando nódulos que borran el centro germinal. La variante *difusa* (60%) constituye la forma clásica más frecuente y en ella las células de pequeño tamaño o medio con núcleo hendido e irregular, cromatina dispersa y citoplasma escaso. La variante *blastoide* es una variante más agresiva con una supervivencia media inferior a los 18 meses, cuyos linfocitos son de mayor tamaño y más atípicos, por lo que deben distinguirse del linfoma linfoblástico.

Las extensiones medulares muestran infiltración por células neoplásicas, que habitualmente son más grandes que los linfocitos pequeños, con núcleo de contorno irregular, ligeramente hendido (en boca de pez), patrón cromatínico menos condensado, nucleolo evidente, escaso citoplasma y un índice mitótico variable.

3.5.2. Inmunofenotipo.

Las células neoplásicas del LM presentan positividad para marcadores pan-B: CD19, CD20, CD22, HDL-DR, coexpresan el marcador pan-T CD5 y no suelen expresar el CD23, este último muy útil en la distinción con la LLC (Weisenburger D et al, 1996), ni CD10. Otros marcadores B como el FMC-7 que detecta linfocitos B en estadio más maduro y el CD79b son positivos con intensidad media (Domingo-Claros A et al, 2000).

3.5.3. Diagnóstico diferencial.

El diagnóstico diferencial se realizara con LLC, LF, LEV, utilizando estudio morfológico e inmunofenotípico (ver tabla 8 anexo1).

3.5.4 Tratamiento.

Los tratamientos que contienen platino o fludarabina también han sido decepcionantes (Coiffier B 1998). Recientemente el régimen hiper-CVAD se ha utilizado como tratamiento del LM seguido de trasplante de médula ósea autólogo o alogénico, induciendo rangos de respuestas de buena duración (Khoury IF et al, 1998). Actualmente en pacientes mayores de 65 años, existen estudios de terapia alternante con Hyper-CVAD y metotrexate/ara-C con un 68% de respuestas completas, con un seguimiento de 17 meses (Romaguera JE et al, 2000).

3.6. LINFOMA FOLICULAR (LF).

Es una neoplasia derivada de los linfocitos B del centro germinal del folículo linfoide que presentan un patrón de crecimiento folicular, pudiendo existir en el ganglio áreas difusas con esclerosis. En función del área del folículo ocupado por las células grandes o centroblastos la clasificación de la OMS (Organización Mundial de la Salud) recomienda su clasificación en dos grados: grado I cuando los centroblastos constituyen menos del 50% del folículo y grado II cuando éstos ocupan más del 50% del área folicular.

3.6.1. Clínica y datos de laboratorio.

El LF es una enfermedad con un pico de incidencia en la 5ª y 6ª década de la vida, dándose de forma excepcional en adolescentes y adultos jóvenes, teniendo una misma prevalencia en hombres que en mujeres.

La presentación clínica es normalmente ganglionar, y la infiltración medular está presente en la mayoría de los pacientes al diagnóstico. La expresión leucémica de los LF es

muy frecuente (60-80%), pudiendo estar presente también al diagnóstico (Bain BJ et al, 1995).

Aunque tienen un curso clínico indolente se consideran incurables, con una media de supervivencia de 8-10 años (Gallagher CJ et al, 1986), y una tasa de recaídas del 10-15% al año (Horning SJ 1993). La media de duración de la respuesta es de 3-4 años.

Hasta un 60% de los LF llegan a transformarse con el tiempo en un linfoma de células grandes, que suele estar asociado a los genes p53 y p16, transformándose con menor frecuencia en linfoma Burkitt-like, LLA o un linfoma anaplásico CD30+ (Stein H et al, 1992).

Morfología:

La biopsia ganglionar muestra un patrón de infiltración nodular principalmente, con folículos grandes que contienen dos tipos de células linfoides B: unas de núcleo hendido y otras de núcleo no hendido, pudiendo ser ambas de pequeño y gran tamaño (Woessner S et al, 2000).

La biopsia médula ósea está infiltrada en un 50-60% de los pacientes con LF, predominando el patrón focal o nodular de disposición paratrabecular.

3.6.2. Inmunofenotipo.

Los LF muestran una intensa expresión de inmunoglobulinas de superficie, principalmente Ig M o Ig D, a diferencia de las células de la LLC con cadenas ligeras Kappa. Expresan también antígenos del sistema HLA-DR y antígenos de diferenciación linfoide B (CD19, CD20, CD21, CD22 y CD79b). No expresan CD5, CD43, ni CD11c y ocasionalmente pueden ser positivos para el CD23. Los centroblastos expresan CD10. La positividad para la proteína BCL-2 es de gran utilidad para la diferenciación de los

folículos neoplásicos de los hiperplásicos que no la expresan, pero no es útil en la diferenciación con otros tipos de linfomas de bajo grado, algunos de los cuales también expresan la proteína. (Ngan B et al, 1988).

3.6.3. Diagnóstico diferencial.

Existen entidades capaces de mostrar patrón folicular asemejándose al LF:

- Enfermedad de Hodgkin de tipo predominio linfocítico, con nódulos de mayor tamaño, contenido celular variado, población B policlonal reactiva y presencia de células LH. Clínicamente el paciente presenta enfermedad cervical localizada.
- LLC/linfoma linfocítico de células pequeñas con pseudopatrón nodular, que muestran prolinfocitos e inmunoblastos con nucleolo prominente, ausencia de patrón reticulínico o de células dendríticas foliculares en los centros de proliferación y un inmunofenotipo con positividad de CD5, CD23 y CD43 de los linfocitos que rodean a los centros de proliferación, que no se ve en el LF.
- Linfoma B monocitoide, linfomas del manto nodular o linfoma de la zona marginal de origen extranodal que pueden presentar un crecimiento nodular por colonización de centros germinales reactivos, por lo que en ambos casos el inmunofenotipo y la morfología ayudara a la correcta identificación del linfoma (Alvaro T 1999).

3.6.4. Tratamiento.

El tratamiento del LF va, desde utilizar monoquimioterapia de forma paliativa, hasta terapia de primera línea con altas dosis de quimioterapia, seguida de trasplante autólogo de rescate. Otra estrategia de tratamiento es la que utilizan fludarabina sola o combinada con mitoxantrone, idarrubicina y ciclofosfamida, que ha mostrado rangos de respuestas

superiores a los regímenes que utilizan monoterapia con fludarabina (Zinzani PL et al, 2000). También en pacientes con baja masa tumoral se ha demostrado la eficacia y buena tolerancia del tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-CD20 (Solal-Celigny P 2001).

4. CITOMETRÍA DE FLUJO.

La citometría de flujo es, básicamente, un método analítico que permite la medida de emisión de fluorescencia y dispersión de luz, inducidas por la iluminación apropiada de células o partículas microscópicas, a medida que desfilan, de una en una y arrastradas por un flujo portador, frente a un sistema de detección. En algunos sistemas, además, las células o partículas pueden ser separadas físicamente, de acuerdo a las propiedades exhibidas.

La citometría de flujo aprovecha el desarrollo de un amplio número de moléculas fluorescentes, que se unen específicamente a moléculas celulares, se acumulan selectivamente en compartimentos celulares o que modifican sus propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas. De esta forma, la citometría de flujo permite detectar y cuantificar estructuras y funciones de células individuales o partículas biológicas aisladas, a elevada velocidad y siguiendo una aproximación multiparamétrica. Estas características la convierten en una técnica especialmente valiosa para caracterizar poblaciones celulares heterogéneas a través de un amplio rango de propiedades biológicas.

Debido al creciente número de parámetros biológicos analizables y al desarrollo de citómetros de coste accesible, dotados de sistemas informáticos, a la vez de uso relativamente sencillo y de alta capacidad operativa; la citometría de flujo tiene en la actualidad un amplio abanico de aplicaciones en muchos campos básicos y clínicos, donde se requiera identificar

células o partículas biológicas, caracterizar sus propiedades y respuestas funcionales y, en algunos casos, separarlas físicamente.

La citometría aporta a la hematología un método objetivo y reproducible para el diagnóstico y el control terapéutico de hemopatías malignas, basándose en la identificación y caracterización de clonas celulares anormales de varias líneas hematopoyéticas, siendo el valor diagnóstico del inmunofenotipo de médula ósea o sangre periférica establecido para las siguientes hemopatías malignas fundamentalmente:

- Leucemias agudas (linfoblásticas/mieloblásticas).
- Crisis blástica en síndromes mieloproliferativos crónicos o transformación leucémica de síndromes mielodisplásicos.
- SLPC (T, B y NK).
- Así como estudio de enfermedad mínima residual y estudio del ciclo celular.

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS EN EL DIAGNÓSTICO.

CD2-. Está presente hasta en el 95% de linfocitos T y en las células NK, pero no en los linfocitos B.

CD3-. Este anticuerpo es un marcador pan-T presente en la membrana de células T normales y su antígeno se encuentra en la mayoría de células T neoplásicas (Jones M et al, 1993).

CD4-. Es un monoclonal útil en la detección de los linfocitos T helper, cuyo antígeno está presente también en monocitos y células mieloides inmaduras (Rothe G et al, 1996).

CD5-. Se expresa en el 95% de los linfocitos T periféricos. También se encuentra en los LM, en las LLC-B y en una pequeña subpoblación de linfocitos B normales. El ligando para el CD5 es el CD72 (Erber WN et al, 1986).

CD8-. Es un marcador para linfocitos T citotóxicos y supresores normales y neoplásicos.

CD10-. Presente en células linfoides de leucemia linfoblástica aguda tipo común y ausente en otras leucemias agudas, aunque está presente en una pequeña población de la médula ósea normal; también podemos observarlo en otros tejidos, como el epitelio renal, hígado, granulocitos, fibroblastos y sistema nervioso. Se expresa también en los linfocitos del centrofolículo así como en los LF, derivados de ellos. (Greaves MF et al, 1983).

CD19-. Este anticuerpo es un marcador pan-B, cuyo antígeno es el más amplio expresado en el estadio pre-B del proceso de maduración de linfocitos B, y manteniéndose su expresión hasta la etapa de célula madura (De Rie MA et al, 1989) (Uckun FM et al, 1988).

CD20-. Su antígeno está expresado en los todos los linfocitos B desde la sangre periférica hasta ganglios, bazo, amígdalas y médula ósea, pero no se expresa en las células plasmáticas. Está implicado en la regulación de la activación de los linfocitos-B. Un

pequeño subgrupo de linfocitos T circulantes normales presentan baja expresión de CD20 (Uckun FM et al, 1988).

CD22-. Se expresa en la superficie de los linfocitos B normales y neoplásicos en sangre periférica, así como en tejido linfoide. El CD22 participa en la activación de linfocitos B y también en la adhesión molecular. (Campana D et al, 1985).

CD23-. Se expresa principalmente en linfocitos-B maduros, células B de la zona del manto y células dendríticas, pero no en las células de proliferación en el centro germinal. El CD23 también es detectado en monocitos y eosinófilos. La expresión en linfocitos T es controvertida (Sarfati M, 1997).

CD24-. El anticuerpo reconoce células B, desde estadios pre-B a estadios B maduros. Además reconoce la mayoría de las células de la serie granulocítica en médula. Su antígeno no se expresa en linfocitos T ni en monocitos, pero sí lo hace en neutrófilos. El anticuerpo se utiliza para estudiar células B en sangre periférica y es útil en la clasificación de leucemias (Kersey J et al, 1982) (Perri RT et al, 1983).

CD25-. Su antígeno se expresa en linfocitos T, B y en macrófagos activados, estando ausentes en los timocitos y restos de células B, T y NK. El anticuerpo se utiliza como marcador de leucemias de estirpe T, rechazo agudo de trasplante renal y algunas enfermedades autoinmunes. (Erber WN et al, 1988).

CD38-. Es una molécula asociada a células B, expresada también en timocitos, y en granulocitos en sangre periférica y en una subpoblación de células T. El CD38 se adquiere en estadios precoces B, es perdido durante la maduración, y adquirido de nuevo durante estadios tardíos de la maduración y presente en células plasmáticas. El anticuerpo reacciona con el 30% de linfocitos de sangre periférica y con monocitos. En médula ósea reacciona

con 60% de linfocitos y fuertemente con las células plasmáticas, siendo positivo en el 70-100% de las células mielomatosas (Jackson DG et al, 1990).

CD79 β -. El antígeno CD79 presenta un componente α y uno β . Estos componentes son parte del complejo antígeno-receptor de los linfocitos B asociado a las Ig de superficie en los linfocitos B maduros. La expresión del antígeno CD79 está restringido a linfocitos B normales y neoplásicas, estando ausente en el resto de tipos celulares. El CD79 aparece en estadios precoces de la diferenciación de linfocitos B, probablemente antes de expresión citoplásmica de las cadenas α , y persiste hasta las células plasmáticas. El anticuerpo es útil para la demostración de células B y es valioso para el inmunofenotipaje de leucemias y linfomas. (Engel P et al, 1995) (Zomas A et al, 1994).

CD103-. Su anticuerpo marca linfocitos T en lamina propia del intestino. Además el antígeno se expresa también en otros tejidos como la pulpa roja esplénica, área extrafolicular de los ganglios linfoides y amígdalas, así como en <3% de los linfocitos T en sangre periférica (Cepek KL et al, 1995).

FMC7-. Se encuentra solo en una subpoblación de linfocitos B circulantes y leucemias de células B muy diferenciadas, como la prolinfocítica o la tricoleucemia, pero no en la mayoría de casos de LLC. No está presente en granulocitos, monocitos, plaquetas, eritrocitos y linfocitos T. (Ferro LM, 1990) (Zola H et al, 1987).

Los principales monoclonales estudiados recomendados por Domingo (1999) en el diagnóstico de SLPC-B son:

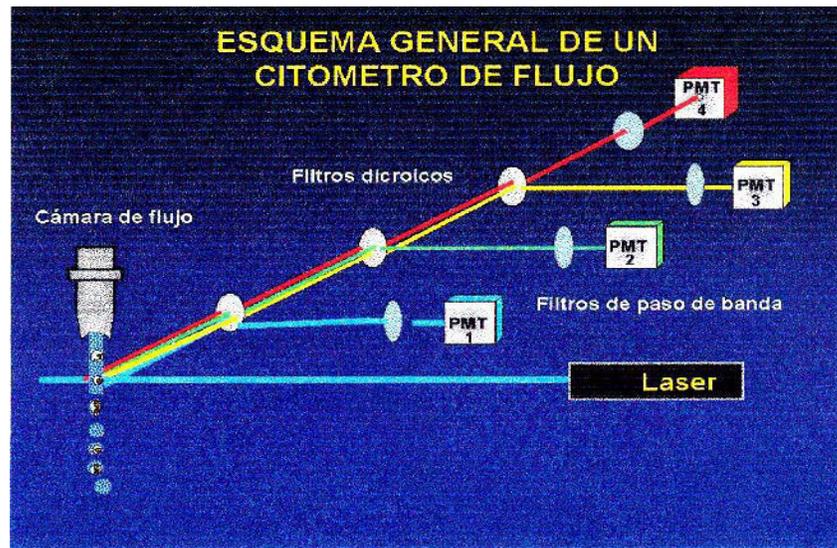
<u>Protocolo básico</u>	<u>Opcionales</u>
CD19/CD5	CD24
CD22/CD10	CD11c
CD23	CD43
CD79b	CD25

4.2 COMPONENTES DE UN CITÓMETRO DE FLUJO

Los componentes básicos de un citómetro de flujo que, con mayor o menor complejidad técnica, se encuentran en la mayoría de los instrumentos actuales son:

- a) Sistema hidráulico: Rodea la suspensión celular en flujo con una vaina externa, formada por un fluido libre de partículas, que mueve la muestra a velocidad constante, a través de la zona de detección (cámara de flujo), donde las células son expuestas, una a una, al haz iluminador.
- b) Sistema de iluminación: Produce un haz de luz que ilumina la muestra. La mayor parte de los citómetros utilizan luz láser, por ser coherente, monocromática, polarizada, estrecha, estable y de intensidad conocida, aunque hay sistemas que disponen de lámparas de mercurio.
- c) Sistema óptico: Enfoca la iluminación de las partículas, detecta la luz dispersada por ellas y selecciona la fluorescencia emitida, a medida que las partículas atraviesan el haz luminoso.
- d) Sistema electrónico: Proporciona una iluminación de intensidad constante, detecta y amplifica la respuesta de las partículas en forma de pulso analógico, transforma las señales en forma digital y controla el proceso de separación celular ("Cell Sorting").
- e) Sistema de adquisición y análisis de datos: La mayoría de los citómetros son compatibles con ordenadores y sistemas operativos comunes (plataformas Ms-DOS, Windows y MacIntosh). Permite la adquisición multiparamétrica de datos y el análisis en tiempo real y en modo de lista, así como el análisis restringido a subpoblaciones seleccionadas ("gating"). Los datos se presentan en forma de histogramas monoparamétricos o representaciones biparamétricas de la distribución, junto con información estadística de las distribuciones.

Fig. D: Esquema de un citómetro de flujo.



OBJETIVOS

- 1.-Expresión de las MA en las diferentes entidades estudiadas.
- 2.-Correlación de la expresión de las MA y estadios clínicos en LLC.
- 3.-Correlación de la expresión de las MA y factores pronósticos clásicos.
- 4.-Valor pronóstico y predictivo de las MA en los SLPC:
 - 1.1.1 Supervivencia global.
 - 1.1.2 Supervivencia libre de enfermedad.
 - 1.1.3 Respuesta al tratamiento/resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.PACIENTES.

1.1 POBLACIÓN Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN/EXCLUSIÓN.

Se incluyeron inicialmente 123 pacientes diagnosticados de SLPC (103 LLC-B, 3 LLP, 2 TL, 1 TL-V, 4 LF, 7 LEV, 1 LM, 1 LLC/LP, 1 Linfoma linfocítico) siguiendo la clasificación de la OMS (ver tabla 3) (Harris NL et al, 1999), en el Servicio de Hematología del Hospital Dr. Peset, entre Enero de 1990-Junio de 2001. La media de edad de los pacientes fue de 68.28 años (entre 42 y 91 años), con un ratio hombres y mujeres de 1/1.2.

Tabla 3: Clasificación de la OMS en linfomas de células B:

	<u>Células precursoras</u>
	Linfoma / leucemia linfoblástica B
	<u>Células maduras</u>
	Leucemia linfocítica crónica B/ linfoma de linfocitos pequeños
	Leucemia prolinfocítica B
	Linfoma B esplénico de la zona marginal (\pm linfocitos vellosos)
	Leucemia de células peludas
	Linfoma linfoplasmocítico
	Linfoma de células del manto
	Linfoma folicular
mucosas	Linfoma B de la zona marginal, del tejido linfoide asociado a
	Linfoma ganglionar de la zona marginal (\pm células monocitoides)
	Linfoma B de células grandes difuso
	Linfoma de Burkitt
	Mieloma Múltiple / plasmocitoma

Incluimos todos aquellos enfermos diagnosticados de SLPC con expresión leucémica a los que habíamos realizado estudio mediante CMF de MA. El estudio de las

MA se inició en Julio de 1998, por lo que los enfermos incluidos en el estudio son: todos aquellos enfermos que habiendo sido diagnosticados con anterioridad permanecían vivos a fecha de Julio de 1998, y también todos aquellos enfermos diagnosticados después de Julio de 1998 hasta Junio del 2001, quedando excluidos aquellos pacientes diagnosticados de SLPC que han fallecido con anterioridad a Julio de 1998.

1.1.1 Criterios diagnósticos

El diagnóstico de LLC-B se realizó según recomendaciones establecidas por dos grupos de trabajo: el internacional para el estudio de la LLC (IWCLL) y el grupo británico (NCIWG) National Cancer Institute-sponsored Working Group (Cheson BD et al.,1988) (Cheson BD et al, 1996), quienes han propuesto una serie de requisitos mínimos para diagnosticar esta entidad, que se resumen en la tabla 4 (anexo 1).

Según la National Cancer Institute-sponsored Working Group (NCI-WG) recomienda el cumplimiento de los criterios citados para el diagnóstico. No obstante, es suficiente con una linfocitosis morfológicamente e inmunofenotípicamente compatible en sangre periférica para el diagnóstico (Cheson BC et al, 1996).

Los criterios seguidos para el diagnóstico en el resto de SLPC (TL, LLP, LEV, LM, LF) siguen la clasificación de la OMS (Harris NL et al, 1999), sobre la base de características clínico-patológicas, morfológicas, genéticas e inmunofenotípicas

1.1.2.Estratificación clínica.

Para la estratificación clínica de la LLC se han propuesto dos sistemas de estadiaje: el de Rai (Rai KR et al, 1975) (Tabla 5) y el de Binet (Binet JL et al, 1981) (Tabla 6) y en el resto de SLPC no LLC utilizamos el sistema de estadios de Ann Arbor (Tabla 7), expuestos en anexo 1. y con ellos la supervivencia esperada para cada grupo:

Para la evaluación del estado general de los pacientes se utilizó la escala ECOG:

- 0 Normalidad. Sin limitaciones.
- 1 Limitación para actividades que requieren grandes esfuerzos.
Puede hacer trabajo sedentario.
- 2 Se vale por sí mismo. Incapaz de realizar cualquier actividad.
Puede deambular más del 50% del tiempo.
- 3 No se vale por sí mismo. Encamado más del 50% del tiempo.
- 4 Inválido. Encamado permanentemente.

1.2 MATERIAL BIOLÓGICO.

1.2.1 Estudio morfológico.

Extensión de sangre periférica: Se realiza estudio microscópico con tinción panóptica del frotis sanguíneo realizando un recuento celular de 100 células nucleadas, obteniendo el porcentaje de linfocitos y descripción de las características nucleares y citoplásmicas.

Extensión de aspirado de médula ósea: Se obtiene con la aguja Illinois, realizándose extensiones sobre portas por presión del grumo medular o deslizamiento de la muestra. Utilizando el objetivo de inmersión se realiza un recuento porcentual de las diferentes líneas hematopoyéticas hasta un total de 500-1.000 células, sobre laminillas teñidas con Giemsa. En aquellas ocasiones en que no se ha realizado biopsia medular, se ha estudiado también el aspirado fijado en formol mediante laminas histológicas del copo medular.

Biopsia medular: Una vez obtenido el cilindro óseo con una aguja Jamshidi trocar, se introduce en un tubo con SURGIPATH, líquido comercial para la fijación y

descalcificación simultánea, durante un máximo de 24 horas. Después se incluye en parafina y se realizan cortes sucesivos de 5 micras, que son teñidas con Hematoxilina-Eosina, PAS, PAS-diestasa, Tricrómico, Reticulina, Giemsa y Perls.

1.2.2 Estudio serológico.

En el suero obtenido del paciente determinamos el proteinograma, Coombs directo, LDH, β 2-microglobulina al diagnóstico, y en las posteriores visitas de seguimiento continuaron realizándose determinaciones estándar.

1.2.3 Otras muestras.

Además del estudio realizado para el diagnóstico con la realización de aspirado y biopsia de médula ósea, también se realizó adenectomía en caso de linfomas para su diagnóstico anatomopatológico. Además se realizaron 7 esplenectomías diagnóstico-terapéuticas.

1.3 EVALUACIÓN CLÍNICA.

1.3.1 Intervalos de evaluación clínica.

El intervalo de tiempo en los enfermos en estadios de bajo riesgo (Binet A, Rai 0) o en SLPC con enfermedad estable, realizándose estudios cada 6 meses, en donde evaluamos: recuento de linfocitos, hemoglobina, recuento plaquetar, Giemsa de sangre periférica, β 2-microglobulina, LDH, sintomatología B, nuevas adenopatías, visceromegalias.

En el resto de enfermos se inició tratamiento, por lo que los controles se realizaron: previos a cada ciclo de quimioterapia, en la fecha aproximada de recuperación de neutropenia, ante sangrado o astenia para valoración de soporte transfusional, en caso de tratamiento quirúrgico se realizaran controles previos y tras cirugía.

Se considera indicado iniciar tratamiento en la LLC, cuando existe cualquiera de los siguientes datos:

Síntomas generales (fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna).

Anemia o plaquetopenia crecientes debida a la infiltración linfoide de la médula ósea.

Adenopatías grandes o crecientes.

Gran esplenomegalia o en aumento.

Citopenias autoinmunes que no responden a corticoides.

Tiempo de duplicación menor de 12 meses.

La indicación terapéutica en el resto de SLPC es al diagnóstico salvo en el LF donde el criterio es progresión de enfermedad.

1.3.2 Criterios de curación y recaída.

Los criterios clínico-hematológicos de remisión completa de una LLC-B se concretan en una exploración física negativa, ausencia de signos constitucionales y los siguientes datos analíticos: hemoglobina superior a 11 g/dl, cifras de linfocitos en sangre periférica inferiores a $4.0 \times 10^9/l$ e inferior al 30% de la totalidad celular medular con una histología medular normal, cifra de neutrófilos y plaquetas superior a $1.5 \times 10^9/l$ y $150 \times 10^9/l$, respectivamente (Woessner S et al, 2000).

Los criterios de progresión de enfermedad en LLC son:

- . Duplicación de linfocitos en menos de un año.
- . Progresión a siguiente estadio de Binet.
- . Aparición de sintomatología sistémica.
- . Desarrollo de síndrome de Richter.
- . Disminución de la hemoglobina y recuento plaquetar.

En el resto de SLPC definimos respuesta según las siguientes recomendaciones publicadas por Cheson B et al, 1999.

Remisión Completa: se define como la desaparición de todas las manifestaciones clínicas de la enfermedad, con normalización de las alteraciones radiológicas y de los datos analíticos que fueron anormales antes del inicio del tratamiento. Una vez finalizado el tratamiento, la respuesta se mantendrá al menos 3 meses.

Remisión parcial: reducción de más del 50% de la enfermedad mensurable, durante al menos 1 mes.

Enfermedad estable: regresión inferior al 50% sin manifestaciones nuevas y, si hay progresión, ésta será inferior al 25%.

Fracaso y/o progresión: aumento en la frecuencia o en la severidad de los síntomas, o aparición de nuevas áreas afectadas o progresión en más de 25% en sitios iniciales.

Recaída: reaparición de síntomas o signos de la enfermedad en pacientes que habían estado en remisión durante al menos 2 meses.

1.3.3 Causas de exitus.

Los exitus recogidos los englobamos como:

- Muerte por progresión (intra / post-tratamiento).
- Muerte por complicaciones secundarias al tratamiento (toxicidad, insuficiencia respiratoria, neumonía o sepsis en neutropenia y hemorragia).
- Muerte secundaria a proceso infeccioso, fuera de neutropenia (hipogammaglobulinemia).
- Muerte secundaria a tumor sólido.
- Muerte no relacionada con la enfermedad o el tratamiento de la misma (infarto de miocardio, accidente isquémico cerebral en ausencia de trombopenia).

2.-CITOMETRÍA DE FLUJO.

2.1 PANEL DE ANTICUERPOS UTILIZADOS.

2.1.1 Anticuerpos monoclonales utilizados en el diagnóstico.

Las características de los anticuerpos monoclonales empleados en el estudio se muestran en la tabla 9, en la que se detallan las características de los monoclonales al diagnóstico, los cuales han sido utilizados con triple marcaje cuyas combinaciones vienen reflejadas en la tabla 11.

Tabla 9: Monoclonales utilizados al diagnóstico.

	Casa Comercial	Especificidad	Clon	Isotipo	Fluorocromo
CD2	IMM	L-T	39C1.5	IgG2a	FITC
CD3	C	L-T	UCHT1	Ig G1, kappa	CY5
CD4	C	L-T, Mo	SFC12T4D11	Ig G1, kappa	PE
CD5	D	Linfocitos T	DK23	Ig G1, kappa	PE
CD8	C	L-T, NK	SFC121ThyD3	Ig G1, kappa	FITC
CD10	D	Progenitores linfocitos	SS2/36	Ig G1, kappa	PE
CD19	D	L-B	HD37	Ig G1, kappa	CY5
CD19	D	L-B	HD37	Ig G1, kappa	RD1
CD19/λ/κ	D	L-B	HD37	Ig G1, kappa	CY5/PE/ FITC
CD20	D	L-B	B9E9	Ig G2a	FITC
CD22	IMM	L-B	4KB128T15	Ig G1	PE
CD23	D	L-B	MHM6	Ig G1, kappa	PE
CD24	IMM	L-B	ALB 9	Ig G1 κ	PE
CD25	IMM	L-B	B1.49.9	Ig G2a κ	PE
CD38	D	L, células plasmáticas.	AT13/5	Ig G1, kappa	FITC
CD79b	D	L-B	SN8	Ig G1, kappa	FITC
CD103	D	L- T, tricoleucocitos.	Ber-ACT8	Ig G1	FITC
FMC7	D	L-B	FMC7	Ig M, Kappa	FITC
Ig G	D	L-B normales y neoplásicos	A57H	Ig G1, kappa	FITC
Ig D	D	L-B normales y neoplásicos	IgD26	Ig G1, kappa	FITC
Ig A	D	L-B normales y neoplásicos	6E2C1	Ig G1, kappa	FITC
Ig M	D	L-B normales y neoplásicos	R1/69	Ig G1, kappa	FITC
CD43	D	Linfocito T	DF-T1	Ig G1, kappa	FITC
CD95	D	L-B, L-T y NK	DX2	Ig G1, kappa	RD1
Ki67	D	Células en proliferación	Ki-67	Ig G1, kappa	FITC
CD45	C	L, Mo, granulocitos	KC56	Ig G1	CY5

Linfocitos: L; Linfocitos T: L-T; Linfocitos B: L-B; células Natural Killer: NK; monocitos: Mo;
D: Dako; **IMM:** Immunotech; **C:** Coulter.

Además de los anticuerpos monoclonales anteriormente enunciados utilizamos las siguientes combinaciones de anticuerpos monoclonales en el diagnóstico diferencial de los SLPC (Woessner S 2000) (Stetler-Stevenson M 2001) (tabla 8 anexo 1).

2.1.2 Moléculas de adhesión analizadas.

Tabla 10: Características de las MA.

	<i>Casa Comercial</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Clon</i>	<i>Isotipo</i>	<i>Fluorocromo</i>
CD11a	IMM	INTEGRINA α L	25.3.1	Ig G1, kappa	PE
CD11b	IMM	INTEGRINA α M	BEAR 1	Ig G1, kappa	RD1
CD11c	IMM	INTEGRINA α X	BU15	Ig G1	PE
CD18	IMM	β 2-INTEGRINA	7E4	Ig G1	PE
CD44	D	L-T y B, Mo, granulocitos	DF1485	Ig G1, kappa	FITC
CD49b	IMM	INTEGRINA α 2	Gi9	Ig G1	FITC
CD49d	IMM	INTEGRINA α 4	HP2/1	Ig G1	FITC
CD49e	IMM	INTEGRINA α 5	SAM1	Ig G2b	FITC
CD50	IMM	ICAM-3	HP2/19	Ig G2a	PE
CD54	IMM	ICAM-1	84H10	Ig G1 κ	FITC
CD62L	IMM	LECAM-1	Dreg 56	Ig G1	FITC

Linfocitos: L; Linfocitos T: L-T; Linfocitos B: L-B; células Natural Killer: NK; monocitos: Mo; D: Dako; IMM: Immunotech; C: Coulter.

2.1.3 Panel utilizado en el estudio de SLPC y panel de MA.

Tabla 11: PANEL UTILIZADO EN EL ESTUDIO DE SLPC

<i>Nº Tubo</i>	<i>Monoclonales</i>
1	Igg1 FITC/RD1/CY5
2	CD3 CY5/ CD4 PE/ CD8 FITC
3	CD45 CY5/ CD19 PE/ CD2 FITC
4	CD19 CY5/ CD5 PE/ CD38 FITC
5	CD19 CY5/ CD10 PE/ CD20 FITC
6	CD19 CY5/ CD23 PE/FMC7 FITC
7	CD19 CY5/ CD25 PE/ CD103 FITC
8	CD19 CY5/ LAMBDA PE/KAPPA FIT
9	CD19 CY5/ CD24 PE/ CD43 FITC
10	CD19 CY5/ CD22 PE/ CD79b FITC
11	CD19 CY5/ IgA FITC/
12	CD19 CY5/ IgD FITC/
13	CD19 CY5/ IgG FITC/
14	CD19 CY5/ IgM FITC/

Tabla 12: PANEL DE MA.

<i>Nº Tubo</i>	<i>Monoclonales</i>
1	Igg1 FITC/RD1/CY5
2	CD19 CY5/CD18 PE/CD44 FITC
3	CD19 CY5/CD 11a PE/CD 49b FITC
4	CD19 CY5/CD62L FITC/CD11b RD1
5	CD19 CY5/CD11c PE/CD49d FITC
6	CD19 CY5/CD50 PE/CD54 FITC
7	CD19 CY5/CD49e FITC

2.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

2.2.1 Toma y procesado de muestras:

Las muestras de sangre total fueron obtenidas por punción venosa periférica. Se recogieron en tubos cónicos de 5 ml con EDTA. En todos los casos la sangre periférica fue procesada en las dos horas siguientes a su extracción. Se incluyeron pacientes en todos los estadios al diagnóstico. De ellos, en 56 pacientes las MA se realizaron tras un periodo prolongado de tiempo desde el diagnóstico.

2.2.2 Separación de células mononucleadas:

Para el análisis citométrico de la clonalidad no se utilizó sangre entera, sino una suspensión de células mononucleadas por gradiente de densidad, basada en el método de Böyum, según la modificación de E. Matutes (1988).

1. Depositar 4 ml de sangre completa sobre 3 ml de Lymphoprep, dejando resbalar la muestra por la pared del tubo inclinado, de forma que la sangre quede sobre la superficie del Lymphoprep, sin mezclarse con él.
2. Centrifugar durante 15 minutos a 3.400 rpm, a temperatura ambiente, evitando usar el freno de la centrífuga, con el fin de no perturbar el anillo celular formado.
3. Observamos los diferentes estratos en orden ascendente: en el fondo del tubo se depositan los hematíes y granulocitos; por encima, se encuentra una capa de Isolymp que contiene las plaquetas. A continuación se observa un anillo, más o menos denso, de células mononucleares a recuperar; por encima, se encuentra el plasma diluido.
4. Con una pipeta Pasteur, retiramos el sobrenadante superior, con cuidado de no alterar los estratos inferiores.
5. Aspirar a continuación todo el anillo, procurando no tomar el Isolymp que hay debajo:
6. A continuación, lavar tres veces con PBS.
7. Tras lo cual añadimos 2 ml de PBS.

2.2.3 Preparación de las muestras:

1. En tubos de polipropileno de 12 x 75 mm, se dispensan 50 a 100 μ l de suspensión celular correspondiente (sangre entera o células monoclonales) previamente ajustada a una concentración de 1×10^6 cel/ml. Se añaden 5-10 μ l de cada anticuerpo monoclonal conjugado o del correspondiente control isotipo y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
2. Añadir 500 μ l de OptiLyse C a cada muestra e incubar 10 minutos en la oscuridad. Así se consigue la lisis eritrocitaria y se fija y estabiliza la muestra de sangre entera.
3. Lavar con 1 ml de PBS, centrifugar y decantar, resuspendiendo en el mismo volumen.

2.3 ANÁLISIS EN EL CITÓMETRO.

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo EPICS XL-MCL con cargador automático de muestras. Los parámetros del análisis incluyen:

1. Dispersión frontal de luz láser (FS): es proporcional al tamaño de la partícula analizada. Es recogida y amplificada por un fotodetector dotado de un filtro de densidad neutra (ND1).
2. Dispersión lateral de luz de láser (SS): es proporcional a la granularidad o complejidad de la partícula analizada. Es recogida y amplificada en dirección perpendicular al haz de láser mediante un fotomultiplicador provisto de los filtros: 488DC+488BP.
3. Fluorescencia verde (Log FL1): es proporcional a los antígenos revelados con un anticuerpo monoclonal conjugado con fluoresceína (FITC) o a la fluorescencia inespecífica de un isotipo adecuado. Es recogida y amplificada en modo logarítmico mediante un fotomultiplicador provisto de los filtros. 550DC +525BP.
4. Fluorescencia amarilla-anaranjada (Log FL2): es proporcional a los antígenos revelados con un anticuerpo monoclonal conjugado con ficoeritrina (PE o RD-1) o a la fluoresceína

inespecífica de un isotipo adecuado. Es recogida y amplificada en modo logarítmico mediante un fotomultiplicador provisto de los filtros: 575DC +550BP.

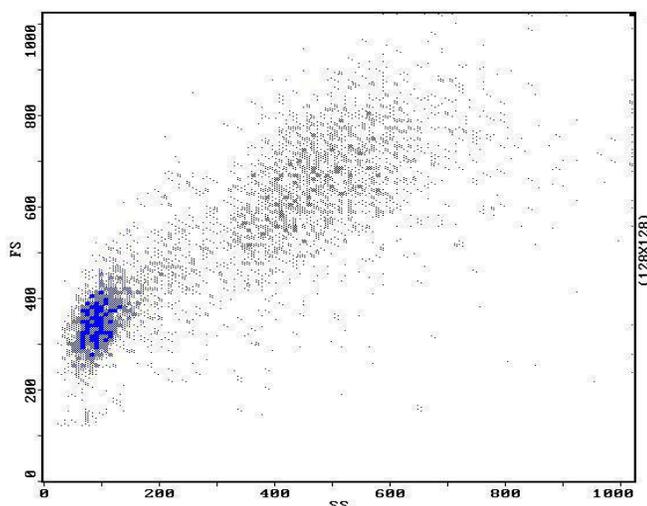
5. Fluorescencia anaranjado-roja(Log FL3): es proporcional a los antígenos revelados con un anticuerpo monoclonal conjugado con fluorocromos duales (PerCP o PE/ECD), o a la fluorescencia inespecífica de un isotipo adecuado. Es recogida y amplificada en modo logarítmico mediante un fotomultiplicador provisto de filtros: 615 DC+ 600BP.

6. Fluorescencia roja (Log FL4): es proporcional a los antígenos revelados como un anticuerpo monoclonal conjugado con fluorocromos duales (PE/Cy5) o la fluorescencia inespecífica de un isotipo adecuado. Es recogida y amplificada en modo logarítmico mediante un fotomultiplicador provisto de los filtros: 575DC + 550BP.

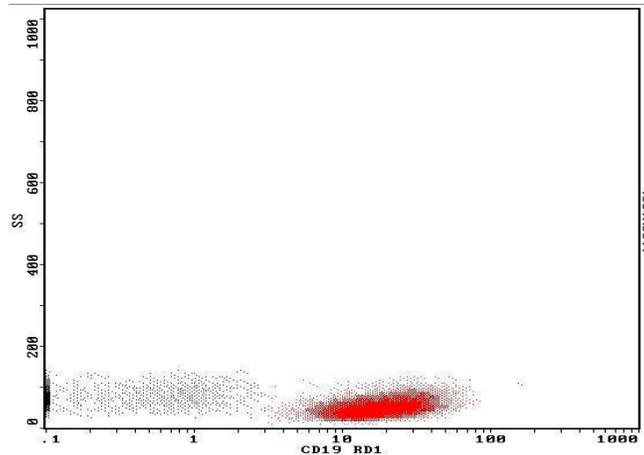
Las señales de FS y de intensidad de fluorescencia fueron calibradas diariamente en los fotomultiplicadores logarítmicos, utilizando microesferas (Flow-Check Beckman-Coulter, Hialeah, FL).

Los datos fueron adquiridos en forma de histogramas (mono y biparamétricos) y en “modo de lista”. La adquisición en “modo de lista” permite el análisis posterior de los datos utilizando el software system II (Belckman-Coulter, Hialeah FL), en el cual es posible recombinar los parámetros obtenidos y redefinir diferentes regiones de selección.

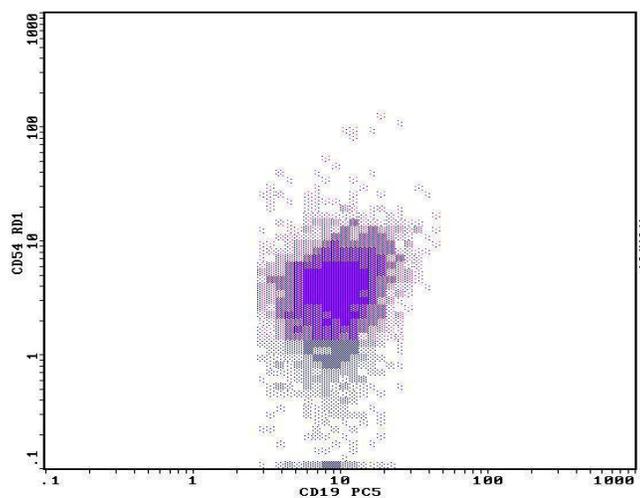
Mediante el ordenador del citómetro (programa System II v. 3.0) se define un protocolo de adquisición de datos que incluye los siguientes histogramas:



Un histograma biparamétrico de FS frente a SS: en él se acotó una región que corresponde a los



Un histograma biparamétrico de FS frente a SS: en él se acotó una región que corresponde a los



Un histograma biparamétrico de SS frente a CD19: definiéndose la región que incluye los L-B (CD19+), sobre los que se determina cada

La adquisición fue como mínimo de 20.000 eventos sobre la región de los linfocitos, utilizando los monoclonales siempre combinados con el CD19. Los parámetros citométricos se analizaron a partir de ficheros almacenados en forma de matriz multidimensional (modo lista), que permite reproducir de forma rápida y en tiempo diferido el proceso de análisis, así como modificar, en caso necesario, las regiones acotadas inicialmente. La visualización y el análisis de los datos, se realiza en programas de análisis

celular compatibles con la configuración de los citómetros empleados (Cytologic, XL Worxs station).

Consideramos que un marcador es positivo cuando el porcentaje de células positivas es superior al 20% referido al total de linfocitos B (CD19+). La intensidad de expresión la valoramos en tres grados: 1-débil ($\log < 10.2$), 2-media ($\log 10.2$) y 3-intensa ($\log > 10.2$).

3. MATERIAL.

3.1. INSTRUMENTOS.

1. Citómetro de Flujo EPICS-XL-MCL (Beckman-Coulter), equipado con láser monocromático de ión argón a 488 nm.
2. Estación semiautomatizada de preparación de muestras SISTEMAS EPILS Multi Q-PREP (Coulter). Con la realización de lisado eritrocitario, fijado y estabilización de la muestra de sangre entera.
3. Centrifuga clínica: modelo Omnifugue 2.0 RS (Heraeus-Sepatech): Con rotor modelo 3360 y temperatura regulable.
4. Contador hematológico: sistema Coulter STKS (Beckman-Coulter).
5. Microscopio óptico convencional Olympus B H-2.

3.2 REACTIVOS Y PRODUCTOS.

- Solución de lisis OptiLyse C: (Immunotech, Marsella, Francia).
- Solución salina tamponada de fosfatos (PBS, Phosphate Buffered Saline).
- Medio de separación de células mononucleares Ficoll-Paque, densidad: 1.077 g/cm^3 (Pharmacia).

- May Grünwald puro, agua tamponada y Giemsa. Para la tinción de May-Grünwald-Giemsa.
- Fluoroesferas Flow-Check que permite verificar el ajuste de los sistemas ópticos y fluídico del citómetro.

4. ESTUDIO ESTADISTICO.

4.1 VARIABLES ESTUDIADAS.

Todos los pacientes se incluyeron en una base de datos en las que se recogieron los siguientes parámetros.

Datos demográficos:

Número de historia clínica, nombre, apellidos, fecha de diagnóstico, edad y sexo.

Datos clínicos:

Estadio según la clasificación de Rai y Binet, Escala ECOG.

Datos hematológicos en sangre periférica:

Hemoglobina, recuento de leucocitos, tiempo de duplicación linfocitaria, recuento de plaquetas, recuento y morfología de linfocitos en sangre periférica y VSG.

Datos hematológicos en médula ósea:

Porcentaje y tipo de infiltración linfocitaria y morfología de linfocitos.

Datos bioquímicos:

Proteinograma, dosificación de Inmunoglobulinas, test de Coombs directo, niveles séricos de LDH y de β 2- microglobulina.

Datos de la terapia:

Tratamiento de primera de línea, fecha de comienzo, respuesta, duración de la misma, tratamiento de segunda línea, duración y respuesta, procedimientos quirúrgicos, complicaciones, segundas neoplasias, así como muerte, causa y fecha de la misma.

Datos citométricos de inmunofenotipo de superficie:

Expresión de los diferentes anticuerpos marcados con fluorocromo, siendo estas definidas como positivas cuando se identificaban en más del 20% de las células y su intensidad de fluorescencia, de los siguientes antígenos de membrana: CD19, CD20, CD5, CD23, CD19/cadenas Kappa, CD19/cadenas Lambda, CD38 (los valores positivos con 30% de células positivas), CD79, CD103, CD10, CD43, CD22, FMC7, CD44, CD49b, CD49d, CD49e, CD62L, CD18, CD54, CD11a, CD11b, CD11c, CD50. Se contempló también el porcentaje de células marcadas en valor absoluto para los estudios estadísticos.

4.2 MÉTODOS UTILIZADOS PARA SU ANÁLISIS.

Para el estudio estadístico se elaboró una tabla con las variables arriba mencionadas, que fue analizada con la ayuda del programa SPSS para ordenador personal.

Análisis descriptivo univariante

Obtención de estadísticos descriptivos de las variables continuas (media, desviación típica, mínimo y máximo) y tablas de frecuencias para las variables categóricas junto con gráficos de barras o sectores expresando frecuencias o porcentajes.

Análisis descriptivo bivalente

Se realizó test de correlación (r de Pearson) para comparar variables cuantitativas y tabla de contingencia con el test de Chi-cuadrado para las variables cualitativas, aplicando

test no paramétricos (Kruskal-Wallis, validado con el estadístico de Chi-cuadrado) para la comparación de variables cuantitativas que no seguían una distribución normal con variables cualitativas.

Análisis de supervivencia

Se hizo estudio de supervivencia con las curvas actuariales de Kaplan-Meier, comparando los resultados con el log-rank test.

Análisis multivariante

Tras observar los resultados obtenidos en el estudio univariante y en las curvas de supervivencia, planteamos un análisis multivariante mediante una regresión logística de Cox mediante el método de “estudio hacia delante” para observar qué moléculas de adhesión intervenían en el pronóstico de los pacientes (exitus, no-exitus) y una segunda regresión logística con el mismo método “hacia delante” para identificar las moléculas de adhesión que tienen valor predictivo en cuanto a las necesidades terapéuticas (grupo de pacientes tratados-grupo de pacientes no tratados).

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES.

Se incluyeron 123 pacientes diagnosticados de SLPC en el Servicio de Hematología del H Dr. Peset, entre Enero de 1990 y de Junio de 2001, con edad media de 68.28 años (42-91), de los cuales 68 (55.2%) eran varones y 55 (44.7%) mujeres.

De los 123 pacientes pudimos realizar diagnóstico de la entidad en 122, por pérdida de un paciente al que no se le pudo finalizar estudio por traslado a otro centro. El 84.4% (103 pacientes) fueron diagnosticados de LLC-B y el 16% (19 pacientes) de otros SLPC. Dentro de los SLPC diferentes de LLC-B, 7 pacientes fueron diagnosticados de LEV, 4 LF, 3 LLP, 2 TL y un paciente de TL-V, otro de LM y por último uno de Lin. (Ver tabla 13)

Respecto a la distribución de los pacientes según el sistema de puntos de Matutes et al (1994) o score, el grupo principal de pacientes está en puntuaciones 4-5, correspondientes a diagnósticos de LLC.

2. PARÁMETROS CLÍNICO-BIOLÓGICOS.

2.1 Analítica:

En el **hemograma** realizado al diagnóstico presentaban una Hb con cifras dentro de la normalidad el 87.8% (108 pacientes) y tan solo un 12.2% (15 pacientes) mostraban anemia.

Respecto al recuento leucocitario solo el 9.8% de los casos estaban dentro de la normalidad y con valores superiores obtuvimos un 90.2% de los enfermos estudiados, cuya distribución según valores absolutos se refleja en la tabla 14, así como respecto a la linfocitosis absoluta obtenida.

Respecto a las plaquetas, 5 pacientes presentaban trombocitopenia con cifras por debajo de 100.000/ μ L y por encima de dicho valor obtuvimos el 95.9% (118 pacientes).

En el **estudio bioquímico** los resultados obtenidos para la LDH, β_2 -microglobulina, proteinograma y VSG, se muestran en la tabla 15.

2.2 Estadíaje.

De las 103 LLC-B estudiadas, evaluamos 102 pacientes cuya distribución por estadios, según la clasificación de Binet y la clasificación de Rai, se muestra en la tabla 16.

2.3 Estudio de médula ósea:

El patrón de infiltración en la biopsia de médula ósea, distribuidos según las diferentes entidades diagnósticas se detallan en la tabla 17.

2.4 Evolución clínica.

El seguimiento medio de los pacientes fue de 50 meses, con un rango de (1.5-354 meses). De los 123 enfermos de nuestro estudio, precisaron tratamiento 44 pacientes (38%), que fue el que se expone en la tabla 18.

Tras evaluar **la respuesta a tratamiento** en 41 pacientes que pudieron seguirse alcanzaron remisión completa el 34.2% (14 pacientes), remisión parcial el 51.2% (21 pacientes) y progresaron intratamiento el 14.6% (6 pacientes).

El **tiempo de duración de respuesta** se muestra en la tabla 19, quedando 4 enfermos por evaluar.

En su conjunto, la supervivencia media del grupo ha sido de 50 meses. El estado de los pacientes es: 11.3% vivos libres de enfermedad tras tratamiento, 69% vivos con

enfermedad estable y un 20 % (25 pacientes) han fallecido, de los cuales 6 lo hicieron por causas ajenas a la enfermedad.

Por diagnósticos, las LLC-B han tenido una supervivencia media de 222.7 meses, con 83.3% vivos. El grupo otros SLPC tiene una supervivencia mucho más baja, con media de 63.9 meses y 61.9% de pacientes vivos. Ver Curva de Kaplan-Meier figura 1 anexo 3. Las diferencias son significativas, con un log rank= 0.0027.

En la figura 2 anexo 3, observamos que los Scores más altos corresponden a supervivencias mayores, que corresponderían a diagnósticos de LLC-B.

Por otro lado obtuvimos que el número de pacientes vivos es muy superior en el grupo de pacientes no tratados (80%) que en el grupo que recibió tratamiento y en progresión de enfermedad (20% de vivos). Las diferencias son significativas, con un long rank 0.04, según se muestra en la figura 3 anexo 3.

También estudiamos la supervivencia por grupos según estadios de Binet, Rai y Ann-Arbor, no encontrando diferencias significativas, las curvas de supervivencias se muestran en la figura 4 anexo 3.

Evaluamos el **tiempo de duplicación linfocitaria** (es decir, tiempo en el que se produce la duplicación numérica en el recuento de linfocitos en sangre periférica), siendo este menor de 12 meses en el 35.3% (42 pacientes) y mayor de 12 meses en el 13.4% (16 pacientes) y no se produjo duplicación durante el seguimiento en el 51.3% (61 pacientes).

En el figura 5 anexo 3, podemos observar diferencias en la supervivencia de los pacientes dependiendo del tiempo de duplicación, pero no fueron estadísticamente significativas ($p=0.7$).

3. RESULTADOS DEL INMUNOFENOTIPAJE.

El análisis por CMF de la expresión de antígenos de superficie mostró que en todos los casos se expresó el CD19, definiendo como positivo cuando su expresión es positiva en más del 20% de las células analizadas, excepto para CD38 que consideramos positivo a partir del 30%. La expresión de otro marcador característico de células B, como es el CD20, fue positivo en el 98.4% de los casos.

Sobre la población de células monoclonales acotada por su expresión de CD19, analizamos diferentes anticuerpos monoclonales para el diagnóstico y la frecuencia de positividad de los mismos según patología la reflejamos en la tabla 20 anexo 1.

4. EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN:

En la tabla 21 anexo 1, se exponen la media y desviación de las MA obtenidas en los 123 pacientes estudiados. La MA expresada en la totalidad de los pacientes fue CD44, a continuación la MA más expresada es el CD50. No obtuvimos expresión del CD49e en ningún paciente, y hubo escasa positividad para CD49b y CD11b.

En la tabla 22 anexo 1, se exponen las distribuciones de los pacientes por patologías y positividad de las diferentes MA (números absolutos de pacientes positivos/porcentajes respecto al total de pacientes).

Por **diagnósticos** observamos que CD49d y CD54 están más expresadas en el grupo de SLPC no LLC-B ($p=0.002$) ($p=0.048$); mientras CD62 estaba más expresada en las LLC que en el resto de grupos ($p=0.004$) (Ver tabla 23 anexo 2).

Para el resto de MA, la distribución en los diferentes grupos diagnósticos fue bastante homogénea, sin observarse diferencias significativas (Ver tabla 23 anexo 2).

El estudio realizado con relación al **Score** y MA, observamos que pacientes con alto número de células positivas para las siguientes MA: CD11a, CD54, CD62 y valores bajos

para CD18 y CD49d, presentaban al diagnóstico Scores más altos, pudiendo demostrar existencia de significación estadística entre las MA y el Score ($p=0.007$, 0.017 y 0.02 ; 0.004 y 0.002 respectivamente) (Ver tabla 24 anexo 2).

Así mismo, cuando efectuamos un estudio de correlación entre las diferentes MA observamos que la expresión de CD18 está ligada a la expresión de CD49d y CD54. A su vez, CD11a, CD11b y CD11c están también relacionados entre sí y con los 3 anteriores ($p<0.005$).

Por **Estadios** no hubo diferencias significativas, entre los grupos, ni para ECOG/OMS, ni para Binet-Rai (Ver tablas 25 y 26 anexo 2) en la expresión de las MA.

En las **biopsias de médula ósea**, el patrón de infiltración linfocitaria fue nodular en un 17%, intersticial en un 14%, difuso en el 4% y de tipo mixto en un 14.6% de casos, y no se realizó en el 44.6%. Aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos, sí se observa una mayor expresión de CD18 y CD11a-CD11c en los casos con infiltración nodular de la médula mientras los casos con infiltración difusa expresaron un mayor porcentaje de células CD62+. En la tabla 27 anexo 2, se asignan las medias y desviaciones según patrón y positividad de MA.

Cuando se intentó establecer la correlación entre los parámetros clínicos establecidos como de mal pronóstico, se apreció la limitación de que la mayoría de los pacientes analizados se hallaban en estadios iniciales de la enfermedad, y con ello haber preseleccionado un grupo de pacientes con mejor pronóstico, pero este sesgo es debido al grupo de pacientes que pudimos recoger y se corresponde bastante con el tipo de pacientes que llegan a nuestro Centro.

Al estudiar la correlación de las MA en valores absolutos con los diferentes factores pronóstico recogidos en el estudio, nos encontramos en el estudio univariante los siguientes datos:

a.-Respecto a la correlación entre MA y **ECOG/OMS**, no hay significación estadística (Ver tabla 25 anexo 2).

b.-En cuanto al **estadio de Binet-Rai**, en general las MA presentan valores más elevados en E-IV, siendo este resultado significativo para CD54 ($p=0.05$) (Ver tabla 26 anexo 2).

c.-En cuanto al **patrón de infiltración medular**, no hay relación estadísticamente significativa, aunque se aprecia una tendencia a presentar valores altos de CD11a y CD11c en los patrones nodulares, mientras CD49d está más elevado en el patrón difuso y CD49c está más bajo en el patrón nodular (Ver tabla 27 anexo 2).

d.-En cuanto al **tiempo de duplicación linfocitaria**, aparecen los valores máximos de CD44 en los pacientes con tiempo de duplicación largo (>12 meses)($p=0.03$) y en el grupo de pacientes sin duplicación. Para el resto de MA, no hubo diferencias entre los grupos (Ver tabla 28 anexo 2).

e.-En cuanto al grado de **infiltración linfoide** en el aspirado medular, no hemos encontrado ninguna diferencia con significación estadística, siendo la distribución de las MA bastante homogénea entre los grupos (Ver tabla 29 anexo 2).

f.-Respecto al **recuento de linfocitos** en sangre periférica, demostramos significación estadística entre altos recuentos de linfocitos y alto número de células positivas para CD44 ($p=0.058$), también entre bajos recuentos de linfocitos y alto número de células positivas para CD18 ($p=0.007$) y para CD11b ($p=0.009$) (Ver tabla 30 anexo 2).

g.-Cuando correlacionamos **Progresión** y MA obtuvimos que los pacientes que presentaron los valores superiores para el CD50, CD49e y CD18 fueron los del grupo con progresión de enfermedad ($p=0.051$, $p=0.017$, $p=0.057$).

Respecto al CD11b y CD11c no pudimos demostrar significación estadística, quedando en el límite ($p=0.064$) entre los valores más altos de estas MA y los pacientes que no progresaron.

h.-Se observó en que solamente pudimos demostrar relación significativamente estadística para respuesta a tratamiento en la MA CD18 ($p=0.057$) (Ver tabla 31 anexo 2).

g.-Pudimos establecer correlación estadísticamente significativa entre los pacientes **que murieron** y negatividad para CD11b ($p=0.055$) y de CD11c ($p=0.001$), de nuestro estudio y valores bajos de CD11b ($p=0.055$) y de CD11c ($p=0.001$), mientras el resto de las MA presentaron valores similares en ambos grupos (Ver tabla 32 anexo 2).

i.-En el estudio univariante para vivos y muertos, se observó que la positividad de CD11c se correlacionaba con un número mayor casos vivos ($p=0.023$) (Ver tabla 33 anexo 2).

4.1 Estudio multivariante

Al hacer una regresión logística de Cox, el mejor modelo de regresión de Cox obtenido para explicar la supervivencia de nuestros pacientes es el que incluye como variables independientes con valor pronóstico a CD11c ($p=0.009$) y CD62L ($p=0.02$), mostrando los pacientes con positividad a estas dos MA una mayor supervivencia.

Volvimos entonces a estudiar las curvas de supervivencia para estas dos moléculas y observamos que en el estudio para CD11c (figura 6 anexo 3), los casos positivos presentaron una supervivencia media de 189 meses (intervalo de confianza al 95% 128-251) mientras los casos negativos tuvieron una supervivencia media de 157 meses

(intervalo de confianza al 95% 127-183). Las diferencias en las curvas de supervivencia son estadísticamente significativas también, con un log rank=0.08.

Si valoramos con una nueva regresión logística el requerimiento de tratamiento, el modelo discrimina como variables significativas CD54 (p=0.01), CD49d (p=0.03) y CD62L (p=0.04), con una odd ratio de 1.5, 1.8 y 0.7 respectivamente. Así, la positividad para CD49d y CD54 aumenta el riesgo de requerir tratamiento mientras la positividad a CD62 lo disminuye.

ANEXO 1

Tabla 4: Criterios diagnósticos de LLC

1.- Linfocitosis absoluta en sangre mantenida más de 4 semanas.

>5 x 10⁹/L (según NCI/WG)

>10 x 10⁹/L (según IWCLL)

2.-Subtipos morfológicos

LLC típica o clásica: ≤10% de linfocitos atípicos

Atípica: LLC/LP: prolinfocitos en sangre >11% y <54%.

Mixta: porcentaje variable de linfocitos atípicos >10% y <11% de prolinfocitos.

3.- Características inmunofenotípicas

SmIg +/-, CD5+, CD19+, CD23+, CD22+/-, FMC7-/-, CD79b-, CD38+/-.

4.- Infiltración en la médula ósea

>30% de linfocitos en el aspirado de médula ósea ó patrón infiltrativo en la biopsia ósea.

Tabla 5: Estadios clínicos de Rai

Estadio	Hallazgos clínicos	Supervivencia (meses)
0	Linfocitosis	<120
I	Linfocitosis y adenopatías	95
II	Linfocitosis y hepato y/o esplenomegalia	75
III	Linfocitosis y anemia (Hb < 11 gr/dl)	30
IV	Linfocitosis y trombocitemia (Plts <100 x 10 ⁹ /l)	30

Hb: hemoglobina; Plts: plaquetas.

Tabla 6: Estadios clínicos de Binet

Estadio	Hallazgos clínicos	Supervivencia(meses)
A	Hb ≥ 10 gr/dl Plts ≥ 100 x10 ⁹ /l <3 áreas afectas*	<120
B	Hb ≥ 10 gr/dl Plts ≥ 100 x10 ⁹ /l ≥3 áreas afectas	61
C	Hb < 10 gr/dl Plts < 100 x10 ⁹ /l	32

*Las áreas ganglionares linfoides incluye: cervical, axilar, inguinal (uni o bilateral), el bazo y el hígado.

Hb: hemoglobina; Plts: plaquetas.

Tabla 7: Sistema de estadios de Ann Arbor.

Estadio I	Afectación de una única región ganglionar o única localización extralinfática.
Estadio II	Afectación de dos regiones ganglionares al mismo lado del diafragma. También puede incluir la afectación localizada de una localización extralinfática (IIE).
Estadio III	Afectación de regiones ganglionares o localizaciones extralinfáticas a ambos lados del diafragma.
Estadio IV	Afectación diseminada de uno o más órganos extralinfáticos con/sin afectación ganglionar.

Tabla 8: Combinaciones de anticuerpos monoclonales en el diagnóstico diferencial de los SLPC.

	LLC/LPC	TL/TLV	LP	LEV	LM	LF
IgS	- +débil/++	++	+	+/-	+	+
CD19	+	++	+	+	+	+
CD20	+	++	+	+	+	+
CD22	+	+++	+	+	+	+
CD23	+/-	-	-	-/+	-	-
CD5	+/-	-	-/+	-/+	+	-
CD10	-/	-	-	-	-	+
CD79b	-	+	+	+	+	+
CD11c	- +débil/-	+	-/+	+/-	-	-
CD103	-	+	-	-/+	-	-
FMC7	+ -/+	+	+	+	+	+

Tabla 13: Distribución de casos por Diagnósticos.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos LLC	102	82,9	82,9	82,9
OTROS	21	17,1	17,1	100,0
Total	123	100,0	100,0	

Tabla 14: Distribución de pacientes según recuento leucocitario y linfocitario al diagnóstico.

Grupos	Leucocitos x10 ⁹ /L	Linfocitos x10 ⁹ /L
<10 x10 ⁹ /L	9.8% (12 pacientes)	29.3% (36 pacientes)
11-25 x10 ⁹ /L	52% (64 pacientes)	40.7% (50 pacientes)
26-50 x10 ⁹ /L	21.1% (26 pacientes)	16.3% (20 pacientes)
>50 x10 ⁹ /L	17.1% (21 pacientes)	13.8% (17 pacientes)

Tabla 15: Distribución por grupos de diferentes parámetros de laboratorio.

Parámetros	Normal	Patológico	No realizado
LDH	86.2% (106 pacientes)	11.4% (14 pacientes)	2.4% (3 pacientes)
β ₂ -microglobulina	83.6% (102 pacientes)	10.7% (13 pacientes)	5.7% (7 pacientes)
Proteinograma	54.5% (67 pacientes)	41.5% (51 pacientes)	4.1% (5 pacientes)
VSG	74.8% (92 pacientes)	23.6% (29 pacientes)	1.6% (2 pacientes)
Coombs directo	67.5% (83 pacientes)*	8.9% (11 pacientes)*	23.6% (29 pacientes)

*Dando normal como negativo y positivo como patológico.

Tabla 16: Distribución de pacientes por grupos según la clasificación Binet y Rai.

Clasificación de Binet	Clasificación de Rai
68.7% pacientes en estadio O	91.2% de los pacientes en estadio A
18.6% pacientes en estadio I	5.9% de los pacientes en estadio B
8.8% pacientes en estadio II	2.9% de los pacientes en estadio C
2.9% pacientes en estadio III	
0.9% pacientes en estadio IV	

Tabla 17: Patrones de infiltración según los diferentes SLPC.

Patrón infiltración	LLC	Lin	TL/TL-V	LLP	LEV	LM	LF	nº pacientes
Nodular	13	1	0	1	4	0	1	20
Intersticial	16	0	0	0	1	0	0	17
Difuso	4	0	1/0	0	0	0	0	5
Mixto	18	0	0	0	0	0	0	18
No infiltración	0	0	0	0	0	1	0	1
No hecho	46	1	0/1	2	2	0	3	55

Tabla 18: Quimioterapia utilizada en los pacientes tratados y distribución de los mismos.

Esquema de tratamiento	44 Pacientes incluidos
CHOP	5 pacientes (4.3%)
Clorambucil:	23 pacientes (19.8%)
2CDA	4 pacientes (3.5%)
Esplenectomía	9 pacientes (7.7%)
CVP	1 paciente (0.9%)
Corticoides	1 paciente (0.9%)
Esplenectomía+CHOP	1 paciente (0.9%)

Tabla 19: Tiempo de duración de respuesta.

Tiempo (meses)	Nº de pacientes
0	5 (10.8%)
0-6	9 (19.6%)
7-12	6 (13%)
13-24	11 (23.9%)
25-36	4 (8.7%)
37-48	1 (2.2%)
49-60	2 (4.3%)
> 61	4 (8.7%)

Tabla 20: Población de linfocitos CD19+ para diferentes anticuerpos monoclonales distribuidos según patologías.

Linfocitos CD19+	LLC	Lin	TL/TL-V	LLP	LEV	LM	LF	Total positivos
CD5	95	1	0	3	2	1	3	105
CD23	96	1	1/0	3	6	0	3	110
CD10	9	0	0	1	1	0	3	15
FMC7	21	0	2/1	2	7	1	2	37
CD25	12	+	2/1	1	1	0	2	20
CD103	8	+	2/1	0	1	0	0	13
CD38*	17	-	1/0	1	2	1	3	26
CD79b	60	+	2/1	1	6	1	2	74
CD22	92	+	1/1	3	7	1	3	109
CD43	87	+	0	2	1	1	2	94
Kappa/Lambda	64/32	1/0	1/0	0/2	5/2	0/1	2/1	63/39
Sin clonalidad	8	0	1/1	0	0	0	0	10

*Tomando como positivo un porcentaje de células marcadas superior al 30%.

Tabla 21: Valores de la Media y desviación de las MA estudiadas en los 123 pacientes.

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
CD19/CD50	121	94,1463	17,2038	,00	100,00
CD19/CD11c	123	23,2707	24,2707	,10	100,00
CD19/CD11b	122	6,2074	13,5407	,10	85,00
CD19/CD11a	123	13,5102	23,9805	,10	100,00
CD19/CD54	123	19,6114	30,1243	,10	99,80
CD19/CD18	123	30,2837	38,3123	,20	99,20
CD19/CD62 2L	123	23,8642	28,2450	,10	95,00
CD19/CD49 e	123	,8480	1,2337	,00	7,70
CD19/CD49d	123	15,2154	30,2458	,10	100,00
CD19/CD49b	123	5,0154	13,0204	,10	86,00
CD19/CD44	123	97,2398	4,2749	65,60	100,00

Tabla 22: Expresión de las MA según patologías.

MA	LLC	Lin	TL/TL-V	LLP	LEV	LM	LF	Total positivos
CD11a	11	0	1/1	1	3	0	0	17
CD11b	6	1	0	0	0	0	0	7
CD11c	41	1	2/1	3	2	0	0	50
CD44	103	1	2/1	3	7	1	4	122
CD49b	3	1	0	1	1	0	0	6
CD49d	11	1	1/1	3	3	0	1	21
CD49e	0	0	0	0	0	0	0	0
CD50	100	1	1/1	2	7	1	4	117
CD54	21	1	2/0	2	3	1	1	31
CD62	43	1	0	2	1	0	0	46
CD18	33	0	2/0	2	3	0	1	41

ANEXO 2

Tabla 23: Distribución de las MA por Diagnósticos.

	diagnostico								
	LLC			OTROS			Total		
	Media	N	Desv. típ.	Media	N	Desv. típ.	Media	N	Desv. típ.
CD19/CD44	97,6735	102	2,7801	95,1333	21	8,1748	97,2398	123	4,2749
CD19/CD49b	4,0275	102	10,1802	9,8143	21	21,9458	5,0154	123	13,0204
CD19/CD49d	10,5902	102	25,3305	37,6810	21	41,2437	15,2154	123	30,2458
CD19/CD49 e	,7451	102	1,0633	1,3476	21	1,8052	,8480	123	1,2337
CD19/CD62 2L	26,1029	102	28,6350	12,9905	21	23,9982	23,8642	123	28,2450
CD19/CD18	29,5324	102	38,8181	33,9333	21	36,4330	30,2837	123	38,3123
CD19/CD54	15,8000	102	26,6417	38,1238	21	38,9522	19,6114	123	30,1243
CD19/CD11a	11,0676	102	20,3606	25,3738	21	35,1595	13,5102	123	23,9805
CD19/CD11b	6,4663	101	14,5465	4,9619	21	7,0217	6,2074	122	13,5407
CD19/CD11c	23,6294	102	23,4315	21,5286	21	28,5802	23,2707	123	24,2707
CD19/CD50	94,1248	101	16,9256	94,2550	20	19,0131	94,1463	121	17,2038

Estadísticos de contrast^{a,b}

	CD19/CD44	CD19/CD49b	CD19/CD49d	CD19/CD49 e	CD19/CD62 2L	CD19/CD18	CD19/CD54	CD19/CD11a	CD19/CD11b	CD19/CD11c	CD19/CD50
Chi-cuadrado	,469	,208	9,168	3,718	9,176	7,622	5,778	5,035	1,335	3,265	2,113
gl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,791	,901	,010	,156	,010	,022	,056	,081	,513	,195	,348

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: LLC-B TÍPICA

Tabla 24: Distribución de la MA según SCORE de Matutes et al.

SCORE	CD19/CD44	CD19/CD49b	CD19/CD49d	CD19/CD49 e	CD19/CD62 2L	CD19/CD18	CD19/CD54	CD19/CD11a	CD19/CD11b	CD19/CD11c	CD19/CD50	
1/5	Media N Desv. típ.	91,1000 2 9,7581	1,3500 2 1,0607	50,5500 2 69,9329	,7500 2 7,071E-02	1,9000 2 ,9899	9,4500 2 2,7577	,9000 2 ,2828	1,2500 2 ,2121	2,3000 2 ,5657	2,8500 2 3,6062	98,8500 2 1,2021
2/5	Media N Desv. típ.	95,0625 16 8,5689	7,9375 16 18,8711	33,9688 16 41,7919	1,0875 16 1,4877	9,5250 16 15,7879	54,2750 16 35,0496	36,7000 16 40,7168	39,3813 16 40,7168	8,6813 16 13,7284	20,4000 16 29,2610	91,2800 15 25,1966
3/5	Media N Desv. típ.	97,7417 24 2,2378	7,3125 24 17,3284	24,2250 24 36,7138	1,3083 24 1,9549	38,1417 24 33,6205	38,3333 24 40,7161	26,1500 24 35,2958	22,5292 24 32,2323	16,2250 24 25,4760	24,7333 24 25,0664	90,1583 24 25,8848
4/5	Media N Desv. típ.	97,7905 42 1,9953	3,1524 42 7,9405	10,7381 42 24,7031	,6548 42 ,6519	19,6357 42 26,4196	26,5262 42 36,7999	12,1238 42 22,1690	6,7131 42 8,5424	2,9000 42 3,5307	19,9333 42 20,9165	96,3976 41 4,5731
5/5	Media N Desv. típ.	97,4921 38 3,9473	4,7026 38 12,0688	4,9658 38 16,0246	,6947 38 1,0150	27,3053 38 27,5687	20,7342 38 34,8567	15,5895 38 27,7925	5,3474 38 4,8337	2,7676 37 3,5324	28,9289 38 25,1389	94,9711 38 16,0783
Total	Media N Desv. típ.	97,2205 122 4,2872	5,0516 122 13,0679	15,2926 122 30,3584	,8541 122 1,2369	24,0484 122 28,2872	30,4041 122 38,4469	19,0016 122 29,4765	13,5939 122 24,0614	6,2570 121 13,5859	23,4607 122 24,2788	94,0992 120 17,2681

Estadísticos de a,

	CD19/CD	CD19/CD4	CD19/CD4	CD19/CD4	CD19/CD62	CD19/CD	CD19/CD	CD19/CD1	CD19/CD1
Chi-	3,11	4,88	16,59	3,69	16,99	15,54	12,00	14,09	
gl	4	4	4	4	4	4	4	4	
Sig.	,53	,30	,00	,44	,00	,00	,01	,00	

a. Prueba de Kruskal-

b. Variable de agrupación:

Tabla 25: Distribución de las MA por Estadiaje de ECOG/OMS.

	ECOG/OMS											
	0			1			2			Total		
	Media	N	Desv. t.p.	Media	N	Desv. t.p.	Media	N	Desv. t.p.	Media	N	Desv. t.p.
CD19/CD44	97,0500	80	4,9585	97,3667	36	2,7311	98,4000	3	1,0392	97,1798	119	4,3303
CD19/CD49b	4,3100	80	10,3040	4,8861	36	12,6436	3,0333	3	3,4790	4,4521	119	10,9007
CD19/CD49d	13,9850	80	29,4599	17,8389	36	31,9372	3,8667	3	4,5567	14,8958	119	29,8367
CD19/CD49 e	,6975	80	,9804	1,1917	36	1,7117	1,1000	3	,3000	,8571	119	1,2518
CD19/CD62 2L	24,3963	80	28,3459	22,0944	36	27,4467	12,3667	3	10,2080	23,3966	119	27,7025
CD19/CD18	29,3375	80	38,3959	30,4000	36	37,3133	25,0667	3	38,9423	29,5513	119	37,7680
CD19/CD54	18,5775	80	27,5393	18,8889	36	33,5173	26,1333	3	42,3217	18,8622	119	29,5419
CD19/CD11a	13,4587	80	24,2434	13,0264	36	21,0818	3,2333	3	3,2624	13,0702	119	22,9795
CD19/CD11b	5,5875	80	11,0522	6,2800	35	14,9712	,5667	3	,3215	5,6653	118	12,1818
CD19/CD11c	26,1413	80	25,5353	19,9167	36	22,1673	11,0333	3	11,0907	23,8773	119	24,4302
CD19/CD50	93,2873	79	19,0037	95,3171	35	14,4286	99,3333	3	,5774	94,0496	117	17,4775

Estadísticos de contraste^b

	CD19/CD44	CD19/CD49b	CD19/CD49d	CD19/CD49 e	CD19/CD62 2L	CD19/CD18	CD19/CD54	CD19/CD11a	CD19/CD11b	CD19/CD11c	CD19/CD50
Chi-cuadrado	,282	,337	,432	3,861	,098	,523	1,443	,857	3,382	2,168	2,764
gl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,868	,845	,806	,145	,952	,770	,486	,651	,184	,338	,251

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: ECOG/OMS

Tabla 26: Distribución de las MA por Estadios de Binet-Rai.

	Est# B/R																	
	0			I			II			III			IV			Total		
	Media	N	Desv. t.p.	Media	N	Desv. t.p.	Media	N	Desv. t.p.	Media	N	Desv. t.p.	Media	N	Desv. t.p.	Media	N	Desv. t.p.
CD19/CD44	97,7253	75	2,9702	96,1762	21	7,3531	97,5727	11	1,8155	92,0500	4	4,6950	97,4000	11	4,9398	97,2295	122	4,2910
CD19/CD49b	4,7840	75	11,7315	3,3905	21	3,9512	,9455	11	,8836	1,1750	4	,8382	15,5545	11	29,3853	5,0508	122	13,0682
CD19/CD49d	11,7480	75	26,2912	14,2810	21	30,4895	27,5364	11	43,4995	,8750	4	,7274	34,5364	11	39,1155	15,3057	122	30,3539
CD19/CD49 e	,9227	75	1,4262	,5048	21	,4599	,5364	11	,5537	1,4000	4	,9416	1,1455	11	1,3736	,8516	122	1,2381
CD19/CD62 2L	24,8107	75	26,5118	21,3190	21	29,6529	25,1727	11	37,1721	20,0500	4	25,1230	16,4455	11	26,2998	23,3320	122	27,7351
CD19/CD18	27,5573	75	36,0959	34,9000	21	44,2855	48,3545	11	47,5433	4,6750	4	6,4231	33,1545	11	36,0301	30,4508	122	38,4253
CD19/CD54	16,7333	75	27,4530	15,0810	21	27,4533	14,8727	11	22,7987	1,4500	4	,7326	52,9364	11	38,7886	19,0443	122	29,5819
CD19/CD11a	12,3387	75	21,2028	16,1143	21	32,2374	16,4227	11	26,8468	2,6000	4	2,9496	18,7455	11	27,5529	13,6152	122	24,0510
CD19/CD11b	6,5986	74	13,9492	6,8476	21	18,3425	2,6909	11	4,2446	,5750	4	,4856	7,4909	11	8,6512	6,1686	121	13,5902
CD19/CD11c	24,3333	75	24,2266	24,9333	21	24,2533	20,4182	11	20,2039	3,9750	4	3,6473	24,2455	11	32,4561	23,4082	122	24,3227
CD19/CD50	94,3787	75	16,1403	92,8200	20	22,0935	97,0700	10	2,6742	98,4250	4	1,1500	91,0182	11	25,6562	94,1700	120	17,2739

Estadísticos de contraste^{a,b,c}

	CD19/CD44	CD19/CD49b	CD19/CD49d	CD19/CD49 e	CD19/CD62 2L	CD19/CD18	CD19/CD54	CD19/CD11a	CD19/CD11b	CD19/CD11c	CD19/CD50
Chi-cuadrado	7,448	7,978	7,787	4,189	3,462	7,116	9,293	5,300	7,332	4,741	1,427
gl	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Sig. asintót.	,114	,092	,100	,381	,484	,130	,054	,258	,119	,315	,840

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Est# B/R

c. No es posible calcular algunas o todas las significaciones exactas porque no hay suficiente memoria.

Tabla 27: Distribución de MA por patrones medulares.

	BMO																				
	Nodular			Intersticial			Difuso			Mixto			No hecho			Revisión			Total		
	Media	N	Desv. típ.	Media	N	Desv. típ.	Media	N	Desv. típ.	Media	N	Desv. típ.	Media	N	Desv. típ.	Media	N	Desv. típ.	Media	N	Desv. típ.
CD19/CD44	96,7100	20	4,0633	96,6941	17	5,0051	91,9200	5	14,7896	97,4333	18	2,5862	97,8382	55	2,4177	98,3429	7	2,0057	97,2205	122	4,2872
CD19/CD49b	4,6250	20	16,2280	6,7765	17	18,0575	5,8800	5	6,1218	4,3056	18	5,6139	5,1327	55	13,3377	2,7714	7	2,7663	5,0516	122	13,0679
CD19/CD49d	24,3250	20	38,2976	21,3176	17	36,4916	17,1600	5	24,6984	11,7667	18	29,6491	11,2800	55	25,5903	14,1143	7	32,1763	15,2926	122	30,3584
CD19/CD49 e	,8350	20	,7795	1,0000	17	1,1308	,6000	5	,7314	,9889	18	1,6492	,8709	55	1,3655	,2571	7	,2936	,8541	122	1,2369
CD19/CD62 2L	18,5500	20	27,3812	22,4176	17	27,0815	27,6800	5	26,7173	22,6556	18	29,0168	26,4691	55	28,6963	25,6857	7	36,7708	24,0484	122	28,2872
CD19/CD18	36,3500	20	40,9836	22,8941	17	34,4478	7,6200	5	9,5377	36,6444	18	42,5117	30,5418	55	38,8826	30,8000	7	41,3651	30,4041	122	38,4469
CD19/CD54	19,7850	20	30,0195	24,3294	17	33,0695	12,3600	5	19,2629	13,5833	18	24,4733	18,1000	55	30,3170	29,5857	7	34,5005	19,0016	122	29,4765
CD19/CD11a	19,2875	20	25,8664	11,3882	17	15,0012	3,8800	5	1,8620	10,2167	18	22,8464	12,1800	55	24,0344	29,4143	7	41,6122	13,5939	122	24,0614
CD19/CD11b	4,3650	20	4,7350	9,4294	17	20,2193	1,7000	4	1,7907	8,9944	18	18,5939	5,7527	55	12,6752	3,4857	7	3,8938	6,2570	121	13,5859
CD19/CD11c	33,3150	20	27,1816	27,7294	17	23,4403	21,1000	5	19,5969	18,5111	18	22,5462	18,0473	55	21,0579	41,8857	7	35,7385	23,4607	122	24,2788
CD19/CD50	97,5850	20	2,3043	96,6625	16	6,1556	99,0000	4	,8165	91,7778	18	22,8685	93,7345	55	17,5071	84,3143	7	36,8617	94,0992	120	17,2681

Tabla 28: Distribución de las MA por Tiempo de duplicación linfocitaria.

	tiempo cate											
	<12			>12			No hubo			Total		
	Media	N	Desv. típ.	Media	N	Desv. típ.	Media	N	Desv. típ.	Media	N	Desv. típ.
CD19/CD44	95,9333	42	6,3348	98,8188	16	1,1339	97,6613	62	2,6780	97,2108	120	4,3236
CD19/CD49b	3,7857	42	8,4831	3,3000	16	3,8859	6,5113	62	16,7891	5,1292	120	13,1632
CD19/CD49d	12,3190	42	27,4581	17,2313	16	34,4434	17,3032	62	31,7958	15,5492	120	30,5483
CD19/CD49 e	,9571	42	1,3839	,8250	16	1,4341	,7823	62	1,1108	,8492	120	1,2483
CD19/CD62 2L	25,0262	42	29,7402	22,3500	16	27,0094	23,1645	62	27,0755	23,7075	120	27,8117
CD19/CD18	28,3405	42	39,2461	29,0563	16	40,8787	33,1935	62	37,9838	30,9433	120	38,5538
CD19/CD54	21,0119	42	30,6886	13,3500	16	24,0202	19,6581	62	30,6931	19,2908	120	29,7654
CD19/CD11a	11,1060	42	20,6019	11,9688	16	25,8925	16,1452	62	26,0874	13,8246	120	24,1966
CD19/CD11b	2,6381	42	4,3448	10,2125	16	19,4056	7,7262	61	15,6748	6,2647	119	13,6843
CD19/CD11c	18,4571	42	21,4677	29,5688	16	29,0187	25,7065	62	24,7867	23,6842	120	24,4191
CD19/CD50	97,8146	41	2,8250	90,5067	15	25,5045	92,5258	62	20,3004	94,1068	118	17,4134

Estadísticos de contraste^b

	CD19/CD50	CD19/CD11c	CD19/CD11b	CD19/CD11a	CD19/CD54	CD19/CD18	CD19/CD62 2L	CD19/CD49 e	CD19/CD49d	CD19/CD49b	CD19/CD44
Chi-cuadrado	2,767	2,756	9,755	2,329	,772	3,198	1,073	2,909	4,639	1,506	8,171
gl	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Sig. asintót.	,429	,431	,021	,507	,856	,362	,784	,406	,200	,681	,043

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: T DUPLICACIÓN

Tabla 29: Distribución de las MA por grado de infiltración medular.

	INF/LINF MO																	
	0-20			21-50			51-75			>75			4			Total		
	Media	N	Desv. tıp.	Media	N	Desv. tıp.	Media	N	Desv. tıp.	Media	N	Desv. tıp.	Media	N	Desv. tıp.	Media	N	Desv. tıp.
CD19/CD44	98,0000	9	1,8708	97,3125	8	3,0107	97,3000	52	4,9975	96,7375	40	4,3303	97,7923	13	3,0004	97,2205	122	4,2872
CD19/CD49b	3,7444	9	5,2944	1,2000	8	1,5964	4,7019	52	10,9680	4,2600	40	11,6594	12,1615	13	26,0792	5,0516	122	13,0679
CD19/CD49d	10,8333	9	28,2746	35,6375	8	45,8599	15,0519	52	28,8488	13,9200	40	30,5219	11,0462	13	25,5279	15,2926	122	30,3584
CD19/CD49 e	,4667	9	,3905	1,2125	8	1,0439	,9596	52	1,3100	,8075	40	1,4159	,6231	13	,7540	,8541	122	1,2369
CD19/CD62 2L	21,9778	9	31,2543	18,4750	8	31,0653	23,7923	52	25,0400	23,1825	40	29,8779	32,6000	13	34,3841	24,0484	122	28,2872
CD19/CD18	31,6222	9	41,9324	55,7750	8	44,3581	22,8788	52	31,5649	35,0200	40	42,5256	29,8462	13	41,5453	30,4041	122	38,4469
CD19/CD54	2,9111	9	2,9148	17,0375	8	30,8436	16,6385	52	26,4480	24,8800	40	34,0331	22,7154	13	33,3498	19,0016	122	29,4765
CD19/CD11a	15,9889	9	32,0814	20,8187	8	30,0768	17,9500	52	27,2025	6,7900	40	12,0607	11,0000	13	26,8950	13,5939	122	24,0614
CD19/CD11b	4,2444	9	5,0570	5,5875	8	5,1908	5,3882	51	10,2228	7,5075	40	17,0919	7,6231	13	20,3556	6,2570	121	13,5859
CD19/CD11c	14,8444	9	9,4591	32,7250	8	24,0631	25,7500	52	25,8145	22,8700	40	25,9601	16,3846	13	18,2454	23,4607	122	24,2788
CD19/CD50	98,2444	9	2,3917	97,9875	8	2,7987	93,0980	50	18,3626	92,4100	40	21,6047	97,8846	13	1,6175	94,0992	120	17,2681

Estadísticos de contraste ^{a,b}

	CD19/CD44	CD19/CD49b	CD19/CD49d	CD19/CD49 e	CD19/CD62 2L	CD19/CD18	CD19/CD54	CD19/CD11a	CD19/CD11b	CD19/CD11c	CD19/CD50
Chi-cuadrado	1,267	2,562	3,664	3,819	1,463	3,626	3,582	6,056	,643	2,226	2,290
gl	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Sig. asintót.	,737	,464	,300	,282	,691	,305	,310	,109	,887	,527	,514

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: INF/LINF MO

Estadísticos de contraste^{a,b}

	CD19/CD50	CD19/CD11c	CD19/CD11b	CD19/CD11a	CD19/CD54	CD19/CD18	CD19/CD62 2L	CD19/CD49 e	CD19/CD49d	CD19/CD49b	CD19/CD44
Chi-cuadrado	3,001	6,973	2,110	7,218	1,417	5,456	1,159	2,387	3,185	4,023	2,088
gl	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Sig. asintót.	,558	,137	,715	,125	,841	,244	,885	,665	,527	,403	,720

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: BMO

Tabla 30: Distribución de MA por grado de linfocitosis.

	LINF/ABS/SP														
	<10			10-25			26-50			>50			Total		
	Media	N	Desv. tıp.	Media	N	Desv. tıp.	Media	N	Desv. tıp.	Media	N	Desv. tıp.	Media	N	Desv. tıp.
CD19/CD44	96,5333	36	4,3139	97,7180	50	2,8885	96,2450	20	7,4643	98,5000	17	1,4701	97,2398	123	4,2749
CD19/CD49b	7,2611	36	18,6938	2,2840	50	2,8950	9,8500	20	18,9139	2,6059	17	2,7763	5,0154	123	13,0204
CD19/CD49d	18,5833	36	32,9406	15,8420	50	31,9408	11,5900	20	25,4521	10,5059	17	25,3257	15,2154	123	30,2458
CD19/CD49 e	1,0444	36	1,5769	,6460	50	,7552	1,3200	20	1,7588	,4706	17	,3197	,8480	123	1,2337
CD19/CD62 2L	15,4861	36	20,7301	30,0220	50	32,3233	18,0350	20	23,0912	30,3529	17	30,7655	23,8642	123	28,2450
CD19/CD18	43,6028	36	40,2855	22,2780	50	34,9025	27,3100	20	36,2922	29,1235	17	41,6581	30,2837	123	38,3123
CD19/CD54	24,6750	36	34,2792	18,9000	50	29,7775	19,7250	20	30,1294	10,8471	17	20,3626	19,6114	123	30,1243
CD19/CD11a	20,0069	36	28,8077	12,2500	50	22,3861	13,9250	20	26,1439	2,9706	17	2,2242	13,5102	123	23,9805
CD19/CD11b	11,0083	36	19,7189	3,3388	49	3,6088	6,5650	20	14,9560	3,8882	17	12,1814	6,2074	122	13,5407
CD19/CD11c	27,0583	36	26,9304	23,5100	50	25,1718	16,0450	20	19,9275	23,0471	17	19,8835	23,2707	123	24,2707
CD19/CD50	89,7306	36	26,0945	95,6120	50	14,4147	96,7105	19	2,9480	96,4563	16	4,6656	94,1463	121	17,2038

Estadísticos de contrast^{a,b}

	CD19/CD44	CD19/CD49b	CD19/CD49d	CD19/CD49 e	CD19/CD62 2L	CD19/CD18	CD19/CD54	CD19/CD11a
Chi-cuadrado	7,490	5,760	5,962	1,695	2,302	11,979	1,231	7,36
gl	3	3	3	3	3	3	3	3
Sig. asintót.	,058	,124	,113	,638	,512	,007	,746	,06

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: LINF/ABS/SP

Tabla 31: Distribución de MA por Grado de Respuesta a Tratamiento.

	RESPUESTA 1ª														
	RC			RP			E Progre			notto			Total		
	Media	N	Desv. ttp.	Media	N	Desv. ttp.	Media	N	Desv. ttp.	Media	N	Desv. ttp.	Media	N	Desv. ttp.
CD19/CD44	97,2786	14	3,6703	95,3381	21	7,9055	96,7800	5	4,3188	97,7422	83	2,7760	97,2398	123	4,2749
CD19/CD49b	10,4143	14	23,1800	6,2857	21	15,7533	1,5800	5	1,7513	3,9904	83	9,9597	5,0154	123	13,0204
CD19/CD49d	19,4643	14	33,6018	26,3048	21	38,9331	28,9000	5	40,9295	10,8687	83	25,7976	15,2154	123	30,2458
CD19/CD49 e	,9214	14	1,2116	1,4476	21	1,9732	,9400	5	,9762	,6783	83	,9555	,8480	123	1,2337
CD19/CD62 2L	17,6643	14	25,5160	17,8619	21	20,3119	1,7000	5	,9192	27,7639	83	30,3631	23,8642	123	28,2450
CD19/CD18	28,2500	14	39,4387	19,4619	21	33,4896	52,3000	5	41,3475	32,0386	83	38,9479	30,2837	123	38,3123
CD19/CD54	28,3714	14	29,8571	26,2762	21	34,6248	51,3000	5	46,8345	14,5386	83	26,4132	19,6114	123	30,1243
CD19/CD11a	19,3643	14	31,8832	15,0190	21	28,7965	25,9500	5	31,8532	11,3916	83	20,5492	13,5102	123	23,9805
CD19/CD11b	4,6143	14	5,7983	5,8524	21	14,0042	10,6000	5	14,3529	6,3024	82	14,4302	6,2074	122	13,5407
CD19/CD11c	25,6143	14	30,6318	14,8524	21	17,2932	19,0800	5	28,7117	25,2578	83	24,2972	23,2707	123	24,2707
CD19/CD50	97,9786	14	1,3752	97,5895	19	4,4238	81,6400	5	37,9449	93,4651	83	18,5212	94,1463	121	17,2038

Estadísticos de contraste^{a,b}

	CD19/CD50	CD19/CD11c	CD19/CD11b	CD19/CD11a	CD19/CD54	CD19/CD18	CD19/CD62 2L	CD19/CD49 e	CD19/CD49d	CD19/CD49b	CD19/CD44
Chi-cuadrado	1,042	,858	,337	,941	,636	5,735	4,730	1,646	3,207	1,395	,471
gl	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,594	,651	,845	,625	,727	,057	,094	,439	,201	,498	,790

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: RESPUESTA 1ª

Tabla 32: Distribución de las MA por Estado del paciente.

	COMENTARIO								
	Vivo			Exitus			Total		
	Media	N	Desv. ttp.	Media	N	Desv. ttp.	Media	N	Desv. ttp.
CD19/CD44	97,5367	98	4,0899	96,0760	25	4,8498	97,2398	123	4,2749
CD19/CD49b	5,2847	98	14,3801	3,9600	25	4,9560	5,0154	123	13,0204
CD19/CD49d	17,9694	98	33,1158	4,4200	25	8,1002	15,2154	123	30,2458
CD19/CD49 e	,7888	98	1,0894	1,0800	25	1,6941	,8480	123	1,2337
CD19/CD62 2L	26,4827	98	29,9457	13,6000	25	17,1254	23,8642	123	28,2450
CD19/CD18	32,1071	98	39,7686	23,1360	25	31,6644	30,2837	123	38,3123
CD19/CD54	18,4898	98	28,5923	24,0080	25	35,8270	19,6114	123	30,1243
CD19/CD11a	14,6648	98	25,4680	8,9840	25	16,5823	13,5102	123	23,9805
CD19/CD11b	6,8133	98	14,6362	3,7333	24	7,2936	6,2074	122	13,5407
CD19/CD11c	26,3929	98	25,2254	11,0320	25	15,0595	23,2707	123	24,2707
CD19/CD50	94,0361	97	17,2727	94,5917	24	17,2819	94,1463	121	17,2038

Estadísticos de contraste^{a,b}

	CD19/CD44	CD19/CD49b	CD19/CD49d	CD19/CD49 e	CD19/CD62 2L	CD19/CD18	CD19/CD54	CD19/CD11a	CD19/CD11b	CD19/CD11c	CD19/CD50
Chi-cuadrado	2,246	1,051	,001	,263	2,136	,005	,015	2,483	3,675	11,531	,007
gl	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sig. asintót.	,134	,305	,971	,608	,144	,945	,901	,115	,055	,001	,935

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: COMENTARIO

Tabla 33: Distribución de CD11c en grupo de pacientes Vivos/Exitus

			cd11ccategorizada		Total
			<20	>20	
COMENTARIO	Vivo	Recuento	54	44	98
		% de COMENTARIO	55,1%	44,9%	100,0%
		% de cd11ccategorizada	73,0%	89,8%	79,7%
		% del total	43,9%	35,8%	79,7%
	Exitus	Recuento	20	5	25
		% de COMENTARIO	80,0%	20,0%	100,0%
		% de cd11ccategorizada	27,0%	10,2%	20,3%
		% del total	16,3%	4,1%	20,3%
Total		Recuento	74	49	123
		% de COMENTARIO	60,2%	39,8%	100,0%
		% de cd11ccategorizada	100,0%	100,0%	100,0%
		% del total	60,2%	39,8%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asint. (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)	Probabilidad en el punto
Chi-cuadrado de Pearson	5,152 ^b	1	,023	,038	,018	
Corrección de continuidad ^a	4,165	1	,041			
Razón de verosimilitud	5,543	1	,019	,024	,018	
Estadístico exacto de Fisher				,024	,018	
Asociación lineal por lineal	5,110 ^c	1	,024	,038	,018	,014
N de casos válidos	123					

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 9,96.

c. El estadístico tipificado es -2,261.

ANEXO 3

Figura 1: Curva de Kaplan-Meier de supervivencia de LLC y otros SLPC.

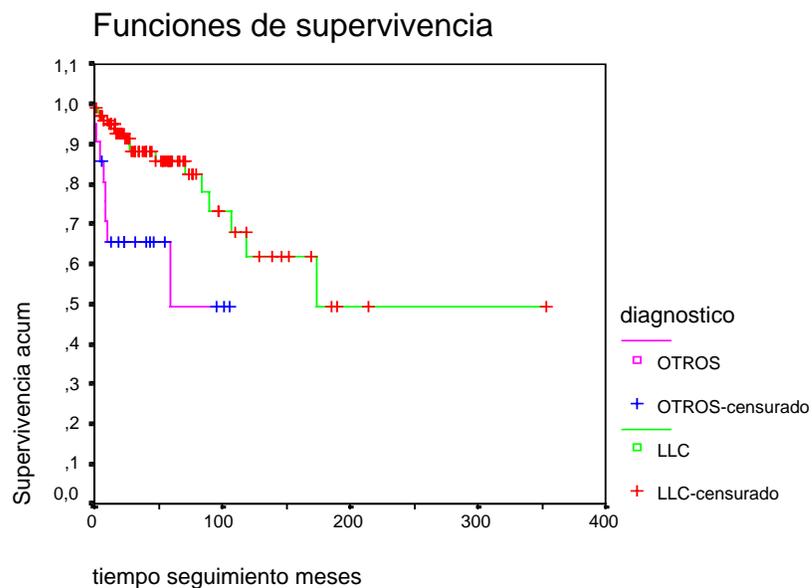


Figura 2: Supervivencia distribuida por grupos de pacientes según score.

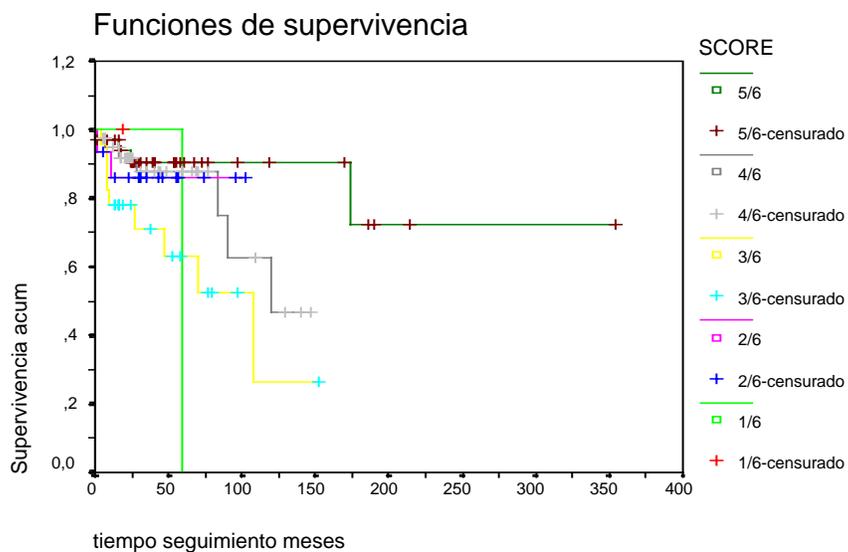


Figura 3: Curva de supervivencia de pacientes tratados y no tratados.

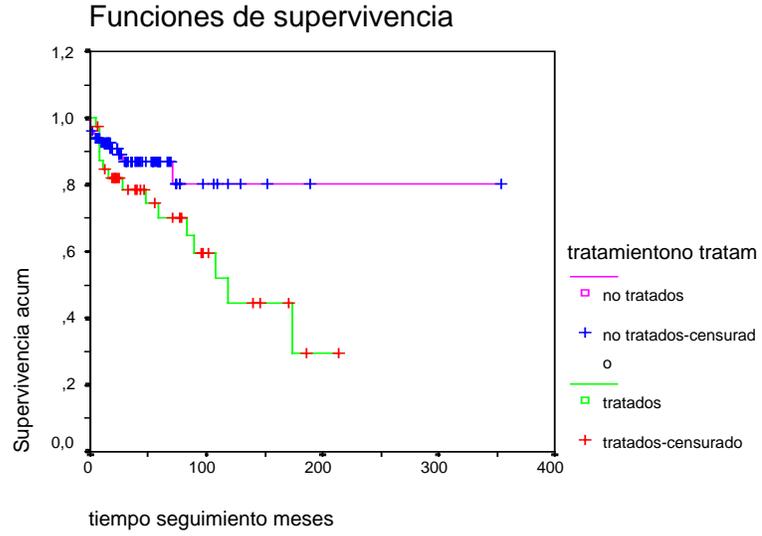


Figura 4: Tablas de supervivencia según los Estadios de Binet, Rai y Ann-Arbor

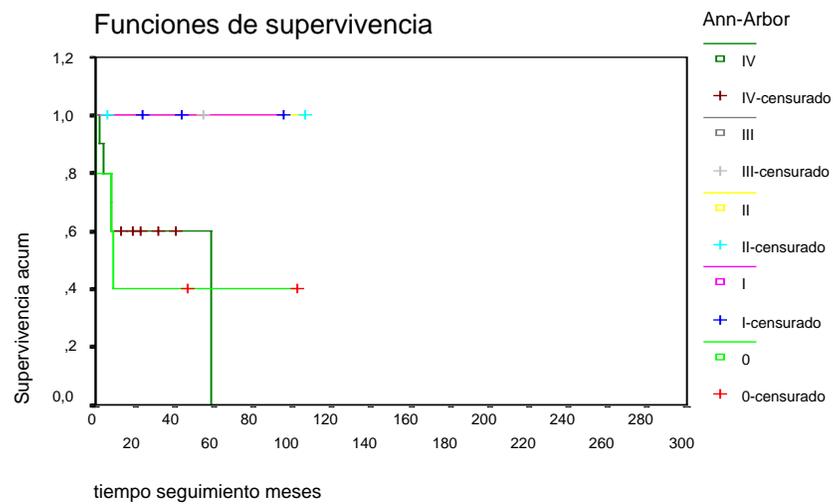
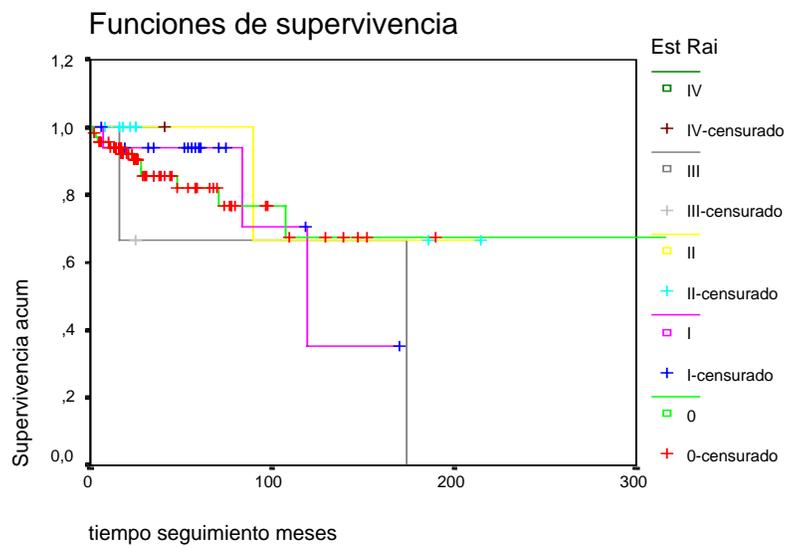
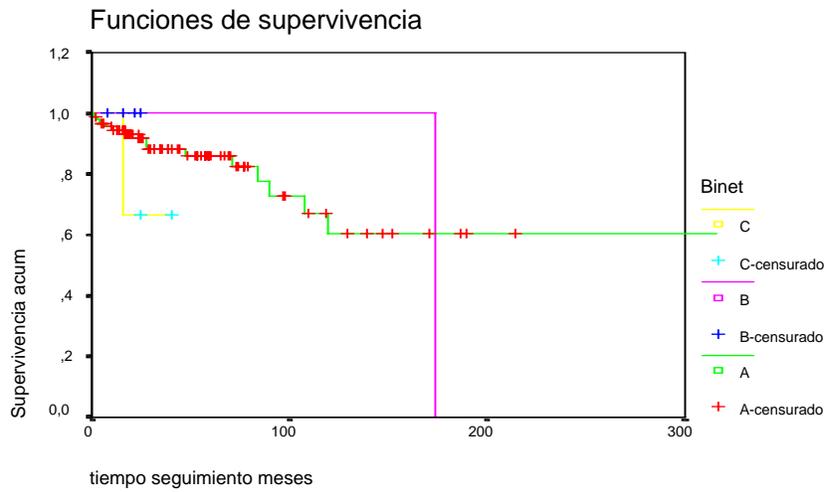


Figura 5: Curva de supervivencia según duplicación linfocitaria.

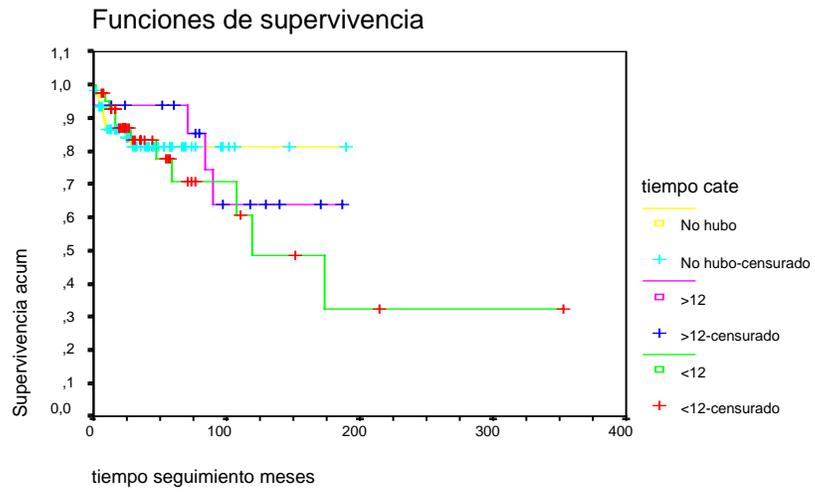
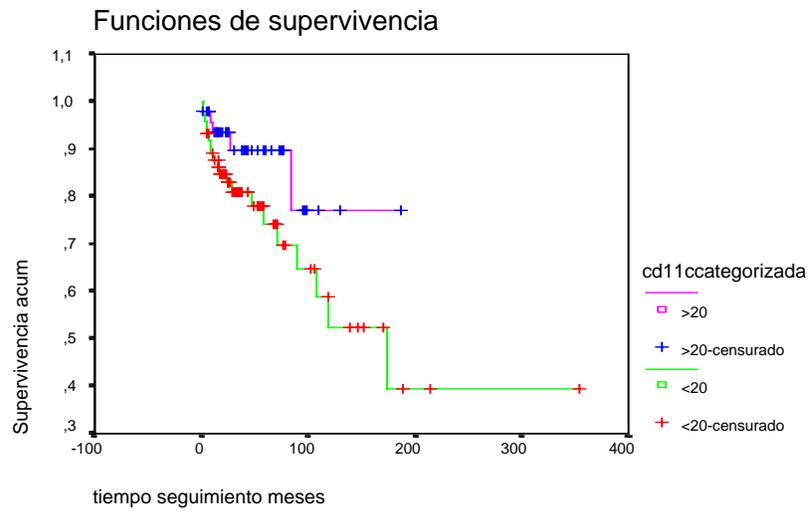


Figura 6: Curva de supervivencia según positividad de CD11c.



DISCUSIÓN

El empleo de los anticuerpos monoclonales y la determinación de las inmunoglobulinas de superficie en la CMF ha permitido la caracterización de los linfocitos malignos en los SLPC y han contribuido a su definición como de estirpe B.

Para realizar la estratificación clínica en los pacientes afectos de SLPC se han propuesto dos sistemas de estadiaje. Ambos recogen información referente a cifras de valores sanguíneos y signos físicos, como la presencia de linfadenopatías y visceromegalias. Estos sistemas de estadiaje proporcionan una guía para determinar la supervivencia media, pero son incapaces de identificar aquellos pacientes en estadios iniciales cuya enfermedad es probable que permanezca quiescente, y que, por lo tanto, no serían subsidiarios de una intervención terapéutica temprana. Tampoco definen aquellos sujetos en los que el riesgo de progresión de la enfermedad es mayor así como la probabilidad de respuesta al tratamiento.

Las MA están directamente implicadas en numerosos procesos orgánicos, entre ellos los fenómenos de recirculación y homing linfocitario y, por tanto, su patrón parece influir entre otros aspectos en la patogénesis de la diseminación de las células neoplásicas.

En este trabajo estudiamos la expresión de las MA y su relación con factores pronósticos ya aceptados, como son estadios clínicos, tiempo de duplicación linfocitaria o masa tumoral; todo ello para conocer el posible papel que juegan las MA en la progresión de la enfermedad, que pueda ayudar en la futura evolución de los pacientes y en la aplicación de terapéuticas individualizadas.

1. EXPRESIÓN DE LAS MA Y LAS DIFERENTES ENTIDADES (DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL).

La expresión de los diferentes anticuerpos por CMF puede suministrar una útil información para la caracterización y diagnóstico de los SLPC, así como también podrían utilizarse para la detección de enfermedad mínima residual.

Nosotros hemos observado en general una baja expresión de las $\beta 1$ y $\beta 2$ integrinas en los SLPC. Las $\beta 2$ -integrinas presentan una baja incidencia en los SLPC. Por lo que respecta al CD11a suele tener una baja expresión en la LLC en comparación con el resto de SLPC, como se refleja en la revisión realizada por Baldini L et al (1992), Csanaky G et al (1997) y Lucio PJM et al (1998). Igual sucede con el CD11b cuya baja incidencia en estas patologías es demostrada por Plate JM et al (2000), y cuya positividad esta relacionada con la presencia de esplenomegalia y linfadenopatías, proponiendo estos autores al CD11b por su baja positividad como una característica de la LLC. También apuntan que dicha MA podría actuar como posible marcador distintivo de otros SLPC, como por ejemplo en el diagnóstico diferencial con el Lin donde siempre es positivo.

Por otro lado, el CD11c también presenta una baja incidencia en los SLPC en general, siendo utilizado como marcador único de la TL cuando se coexpresa con el CD22, pudiendo distinguirse la LLC y TL por su intensidad ya que en el caso de la TL su expresión es 30 veces más intensa que en la LLC. En la serie presentada por Marotta G et al (2000) en la que han realizado un estudio evaluando la positividad global y la intensidad de fluorescencia de CD11c en una serie de 155 pacientes, el 100% de las TL mostraban positividad para dicha MA frente al 49% de LLC y el 57% de los LNH, apoyando que pudiera ser un parámetro útil en el diagnóstico diferencial de SLPC.

Asimismo otros autores como Matutes E et al (1994) y Gotic M et al (2000) proponen CD11c como marcador útil en el diagnóstico diferencial de la TL, ya que por ejemplo en la serie estudiada por Gotic el 100% de los casos de TL coexpresaban CD19+/CD11c, así como en la serie estudiada por Robbins BA et al (1993) el 100% de las TL y el 74% de las LLC coexpresaban CD19/CD11c, a diferencia del resto de SLPC donde la expresión es escasa.

Por último, al igual que las anteriores β 2-integrinas, la incidencia de positividad del CD18 es baja en los SLPC, expresándose en una amplia variedad de líneas celulares hematopoyéticas, incluyendo células progenitoras. En nuestro estudio los pacientes con mayor expresión en fue en el grupo de SLPC no-LLC ($p=0.022$) o lo que es lo mismo, la menor expresión de CD18 ($p=0.004$) corresponde a pacientes con scores de Matutes más altos (diagnóstico de LLC).

En resumen, aun a pesar de presentar una baja incidencia en nuestra serie, observamos que las β 2-integrinas presentaban mayor incidencia en el grupo de las LLC respecto al grupo de SLPC no-LLC excepto para CD18, que es menor, siendo explicada la presencia de marcadores CD11 en algunas LLC como un estado de activación en el que los linfocitos adquieren características de linfocitos en estadios más maduros, como sugiere Hanson CA et al (1990), mostrando este subtipo de LLC características de comportamiento diferentes.

Respecto a las β 1-integrinas prácticamente están ausentes en nuestra serie, al igual que en la bibliografía revisada, siendo negativas en la mayoría de los SLPC, salvo la CD49d en que obtuvimos una escasa representación, ya que tan solo en 11 casos obtuvimos positividad para dicha MA. Al igual que en las series revisadas de Eksioglu-Demiralp E et al (1996), y de Csanaky G et al (1997) los pacientes presentaron una mayor expresión de

CD49d en el grupo de los SLPC no-LLC y una menor expresión en el grupo de las LLC. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0.002$).

Respecto a la superfamilia de las inmunoglobulinas, obtuvimos una alta expresión de CD50, de forma similar a la serie de Molica S et al (1996) en la que los 23 pacientes diagnosticados de LLC expresan dicha molécula, a diferencia de otros SLPC, donde la incidencia de dicha MA esta disminuida. Por ejemplo, en la serie de Terol MJ et al (1996) en el estudio realizado a 101 pacientes diagnosticados de LNH, 26 de EH y 38 con tumores sólidos se demuestra una tendencia a hacerse negativo en los LNH de alto grado, siendo siempre negativo en todos los subtipos histológicos de EH. Aunque nosotros no hemos podido establecer diferencias en nuestra serie entre la expresión de CD50 en el grupo de LLC y otros SLPC no-LLC, proponemos continuar estudios de dicha molécula con el fin de poder utilizarla en el diagnóstico diferencial.

Respecto al CD54, se ha podido demostrar que conforme avanza el grado de diferenciación celular se observa un mayor grado de positividad del CD54, por lo que la relación obtenida en nuestra serie entre valores altos de CD54 y scores más altos podría ser explicado por la existencia de una población de LLC con mayor grado de diferenciación celular, como han apuntado ya otros autores. Además, la baja expresión de CD54 en nuestros pacientes, al igual que en otras series como la de Csanaky G et al (1997) y De Rossi G (1993) puede reflejar un estado de activación celular inducido por citoquinas producidas por las células malignas B u otro tipo de células; propuesta que apoyamos dada la baja incidencia de positividad en nuestra serie y confirmada por los resultados obtenidos con las $\beta 2$ -integrinas. Por otro lado la relación obtenida ($p=0.048$) entre el número de enfermos positivos para CD54 en el grupo de otros SLPC no-LLC frente al grupo de LLC,

viene explicada por el mayor grado de diferenciación de la celularidad del resto de SLPC no-LLC, como son la TL o el Linfoma de la zona marginal.

Acerca de las selectinas, obtuvimos mayor proporción de pacientes que expresaban el CD62 en LLC, o lo que es lo mismo, estaba expresada también en pacientes con scores altos de forma estadísticamente significativa, resultado que puede estar relacionado con la capacidad de migrar a la circulación y diseminarse de los linfocitos. De forma similar que en la serie de Spertini O et al (1991), de los 118 pacientes con hemopatías malignas obtuvieron una mayor frecuencia de positividad en los LLC que en el grupo de otros SLPC, demostrando similares resultados en la serie de Csanaky G et al (1997) y Lucio PJM et al (1998). Por otro lado, la baja incidencia de CD62 en los otros SLPC la explican Gu B et al (2001) como que viene determinada por un secuestro de los linfocitos en el espacio vascular, y por lo tanto, parece ser un factor que contribuye al aumento del recuento celular en ausencia de organomegalias. Los trabajos de por Lucio PJM et al (1998) apoyan esta teoría ya que también afirma que la positividad para CD62 parece independiente de la masa tumoral y del diagnóstico, pudiendo reflejar una anormalidad en la circulación de linfocitos B neoplásicos relacionada con un papel de la molécula en la capacidad de adhesión a las células endoteliales como parte del proceso de migración.

Por último, encontramos que el CD44 se expresaba en todos los casos, de forma similar a lo referido en la literatura, donde se expresa en casi todas las LLC, sin poder establecer una asociación con la supervivencia o el pronóstico, pudiendo ello demostrar que la expresión de dicha MA en nuestra serie es sólo indicativo de un mayor grado de diferenciación de los linfocitos en las LLC y la expresión se pierde en las neoplasias linfoides de diferenciación intermedia.

Por lo tanto y dados los resultados obtenidos, podríamos proponer la utilización del CD18, CD49d y CD54 como marcadores de SLPC no-LLC frente a LLC, a diferencia del CD62 que sería mejor de LLC, pero dada la baja incidencia total de dichas moléculas en los SLPC en general, parecen poco adecuados para su utilización como marcadores diagnósticos.

2. CORRELACIÓN ENTRE LAS MA Y LOS ESTADIOS CLÍNICOS.

Realizamos estudio entre las diferentes MA y los estadios de la enfermedad al diagnóstico, ya que el estadio al diagnóstico es un parámetro pronóstico clásico e interesaba conocer si existían diferencias entre MA y estadios para intentar dilucidar si podíamos identificar aquellos pacientes que aun siendo diagnosticados en estadios precoces iban a progresar con rapidez.

Respecto a las β 2-integrinas, no hemos podido en nuestra serie obtener correlación con estadios de la enfermedad al diagnóstico, a pesar de que en la bibliografía se obtienen en algunas series un valor pronóstico para el CD11a. Rabionowitz R et al (1991), Domingo A et al (1997), y Drillenburger P y Steven (2000), comentan la posibilidad de atribuirle valor pronóstico a CD11a, ya que esta MA suele ser negativa en estadios avanzados de la enfermedad, y a la vez otros autores la relacionan con una baja probabilidad de diseminación hematológica Pinto A et al (1993) y Lucio PJM et al (1998). Igual ocurre con el CD11c, en que autores como Eistere W et al (1996) y Marotta G et al (2000), han encontrado correlación entre la negatividad de dicha MA y estadios avanzados de enfermedad, así como para el CD18 (Domingo A et al (1997)). Estos autores correlacionan la baja o falta de expresión de CD18 con estadios avanzados de la enfermedad, a diferencia

de la serie estudiada por Csanaky G et al (1997), en 56 pacientes con SLPC en la que no pudo establecer dicha relación. Por otro lado respecto al CD11b, las células neoplásicas muestran una baja incidencia de positividad para la misma, a diferencia de la intensa expresión que presenta en células normales, sin que se pueda establecer relación estadísticamente significativa con los distintos estadios clínicos (Lucio PJM et al, 1998).

Por lo que respecta a las β 1-integrinas, el CD49d es la β 1-integrina que más constantemente se expresa en los SLPC. No hemos podido establecer relación con estadios de enfermedad al igual que Baldini L et al (1992), mientras que Lucio PJM et al (1998) sí pudieron establecer relación entre la expresión de la MA y la masa tumoral o lo que es lo mismo estadios avanzados de la enfermedad.

Tan solo obtuvimos relación entre estadios avanzados de enfermedad y CD54, al igual que la mayoría de las series de la bibliografía como la de Christiansen I et al (1994), Domingo A et al (1997), Lucio PJM et al (1998), Kamper E et al (1999) y Molica S et al (1995) en cuya serie comparó un grupo de 95 pacientes con LLC y un grupo de control de 25 sanos, mostrando altos niveles de CD54 (por determinación en suero por inmunoanálisis) en los pacientes con estadios avanzados de la enfermedad. Christiansen y Lucio sugieren que el CD54 puede jugar un papel en el tropismo de los linfocitos neoplásicos a los tejidos linfoides, relacionando la expresión del CD54 con la masa tumoral, proponiéndolo como un marcador de masa tumoral e indicador pronóstico en la progresión de enfermedad.

A diferencia de las anteriores MA, el CD62 presenta mayor incidencia de positividad en estadios iniciales de la enfermedad según refleja la serie estudiada por Csanaky G et al (1997) y la de Angelopoulou MK et al (1999), en la que la relacionan con linfocitosis sin linfadenopatías o visceromegalias, es decir estadios precoces de la

enfermedad. Nosotros no hemos podido demostrar relación estadísticamente significativa del CD62 con estadio clínico, linfocitosis o masa tumoral, al igual que lo publicado por Lucio PJM et al (1998). Sin embargo, en el estudio multivariante CD62 actúa como marcador independiente de buen pronóstico, mostrando los pacientes con positividad a esta molécula una mayor supervivencia. Es también un factor implicado en las necesidades terapéuticas. Así, la población con positividad para CD62 tiene un menor riesgo de requerir tratamiento. Es por tanto en su conjunto un buen indicador de enfermedad poco agresiva.

Y por último respecto al CD44, en los LNH los niveles altos séricos de CD44 al diagnóstico están asociados a estadios avanzados, a una peor respuesta al tratamiento y constituye un factor pronóstico independiente y desfavorable para la supervivencia como se refleja en las series de Eistere W et al (1996) y Ristamäki R et al (1998). En la revisión realizada por Drillenburg P y Pals TS (2000) sugieren que la expresión del CD44 tiene un importante papel en el comportamiento biológico de los LNH y muestran que puede ser un marcador predictivo de la enfermedad, respecto a la supervivencia libre de enfermedad y a la supervivencia global. Ristamäki R et al (1998) en el estudio de 123 pacientes diagnosticados de LNH demostró asociación entre niveles altos de CD44 y peor supervivencia global, valores altos de LDH y grados histológicos altos, no pudiendo en el estudio multivariante establecer al CD44 como factor pronóstico independiente. Eistere W et al (1996) establecen al CD44 como factor pronóstico independiente para la supervivencia global en el análisis multivariante. Así además son capaces de establecer un grupo de pacientes distinguidos porque presentan CD44+ y CD11c-, asociados a enfermedad avanzada y peor pronóstico, los cuales presentaban una forma más agresiva de enfermedad. Algunos autores como Matutes E y Polliack A (2000) afirman que la fuerte expresión del

CD44 esta asociado con estadios avanzados y peor pronóstico. En nuestras manos, CD44 es expresado de forma universal, sin obtener diferencias significativas en cuanto al pronóstico.

Respecto a los resultados obtenidos en nuestra serie, observamos que existe una expresión ligada al CD11a con las siguientes MA: CD49d, CD11b y CD54. Todas ellas relacionan su positividad con estadios avanzados de la enfermedad y por lo tanto con alta masa tumoral. La relación podría explicarse ya que son moléculas relacionadas entre sí en los procesos inflamatorios: de entre los factores liberados en la inflamación (IL-1 y factor necrótico tumoral TNF), la IL-1 aumenta la expresión del CD106 presente en el endotelio vascular activado, siendo éste el mediador en la unión de los linfocitos y monocitos con el CD49d. Por otro lado, el TNF aumenta el CD106 y también el CD54, el cual se expresa en el endotelio vascular activado siendo el mediador para el CD11a (Bevilacqua MP 1993). También se ha visto que, a través de la unión con su ligando, el CD54 facilita la extravasación de los linfocitos y por lo tanto tiene un papel coestimulador en la activación de los linfocitos T, por lo que su pérdida supondría un escape del sistema de inmunovigilancia, lo cual conduciría a la diseminación, según López-Guillermo A y Cobo F (1999), lo que llevaría a estadios avanzados de la enfermedad y a un peor pronóstico.

3. MA Y FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS.

Una vez conocidos los factores pronóstico clásicos, hemos podido constatar según la bibliografía revisada, que las diferentes MA y el patrón difuso de infiltración medular en general están relacionadas.

Ahora bien, a pesar de la baja incidencia de positividad del CD11a en nuestra serie, sí hemos podido observar una tendencia entre el patrón nodular de infiltración y la presencia

de dicha MA, relación establecida entre ambas variables en los LNH de bajo grado en la revisión realizada por Pinto A et al (1993) y Angelopoulou MK et al (1999). Dicha relación podría ser explicada porque la positividad del CD11a parece influir en el comportamiento no leucémico de las neoplasias linfoides de bajo grado, afirmando que el CD11a mantendría la arquitectura de la médula ósea, de manera que los linfocitos neoplásicos que carecen de la misma no pueden interaccionar y, por lo tanto, tienen más tendencia al crecimiento difuso, teoría apoyada por Domingo A et al (1997) en cuya serie establece la negatividad de CD11a y el patrón de infiltración difuso.

Así otros autores como Pinto A et al (1991) relacionan el patrón difuso de infiltración con la negatividad para CD11b y CD11c, y Sembries S et al (1999) pudo establecer relación solo entre la expresión de CD11c y el patrón difuso de infiltración, a diferencia de Molica S et al (1994) en cuya serie de 99 pacientes no pudo demostrar relación entre dichas MA y el patrón de infiltración.

Así mismo Domingo A et al (1997) correlaciona la baja o falta de expresión del CD18 con patrón de infiltración difusa.

Por otro lado autores como Molica A et al (1995) y Kamper E et al (1999), han demostrado correlación entre la expresión del CD54 y el patrón difuso de infiltración, así como De Rossi G (1993), que diferencio tres grupos de pacientes positivos para CD44 (altos, medios y bajos valores) mostrando que aquellos pacientes con valores mayores presentaban mayor incidencia de patrón difuso de infiltración. Nosotros no hemos podido demostrar en nuestras series este tipo de correlación.

Respecto a otro factor pronóstico ampliamente conocido como es el tiempo de duplicación linfocitaria, Domingo A et al (1997) en cuya serie pudo establecer relación entre tiempos de duplicación cortos y la falta o baja expresión del CD18, así como con la

positividad del CD54. Nosotros sí obtuvimos en el caso del CD44 relación entre tiempos de duplicación linfocitarias mayores de 12 meses o la no existencia de duplicación, con valores altos de esta MA, a diferencia de Angeloupolou MK et al (1999) que estableció relación entre tiempo de duplicación linfocitaria cortos y valores más altos de células positivas. La relación establecida en nuestra serie entre tiempos largos o la no duplicación y la expresión del CD44, podría ser explicada por la presencia en nuestra serie de un grupo homogéneo de pacientes en estadios precoces de la enfermedad, con poca agresividad de la enfermedad y ser esta MA en esta serie tan solo reflejo de un mayor grado de diferenciación linfocitaria, sin poder conferirle valor pronóstico dada la homogeneidad del grupo estudiado.

Otro factor pronóstico clásico es el recuento leucocitario en sangre periférica. En nuestra serie hemos podido establecer relación entre la alta positividad de CD11b y recuentos bajos de linfocitos. Existen otros estudios como el realizado por Coxon et al (1996) en donde se ha implicado al CD11b como inhibidor de apoptosis leucocitaria, posibilitando que deficiencias en ciertos SLPC puedan interferir en la inducción de apoptosis en estos desordenes. Esto viene confirmado porque niveles altos de CD11b se correlaciona además con tiempos de duplicación largos.

En nuestra serie pudimos establecer relación entre un alto recuento de valores absolutos de linfocitos (o lo que es un símil, recuentos altos leucocitario, criterio clásico de mal pronóstico) y expresión alta de CD44, cuya relación ha sido también establecida por Angelopoulou MK et al (1999), no estando los tiempos de duplicación aumentados. Dado que en la LLC existe un bloqueo de la apoptosis (etiopatogenia ya demostrada en la LLC) lo que determina una acumulación de linfocitos, y por otro lado mi grupo presenta tiempos de duplicación largos que apoyarían la teoría de que la población estudiada por nosotros, es

un grupo homogéneo de pacientes en estadios precoces de la enfermedad, por lo que no existiría un aumento de proliferación explicando así los tiempos largos de duplicación linfocitaria y los altos recuentos.

4. PROGRESIÓN.

En los SLPC hemos podido observar que existen pacientes en estadios precoces de la enfermedad al diagnóstico que rápidamente progresan a estadios superiores precisando tratamiento y es de gran importancia para nosotros los clínicos el poder distinguir entre enfermedades indolentes y agresivas.

Los resultados obtenidos en nuestra serie en el estudio univariante muestran que los pacientes con niveles elevados de CD50, CD49e y CD18 tienen una mayor posibilidad de progresar que los que presentan valores inferiores.

Por otro lado, Takashi R et al (1998) plantea por los resultados obtenidos en su estudio que CD18 regula el crecimiento y la diferenciación de algunas poblaciones celulares hematopoyéticas y que las células leucémicas sufren un anormal crecimiento a través de la sobreexpresión y/o mutación del CD18. Behr SI et al (1998) observa que en su serie los pacientes diagnosticados de LLC con expresión positiva para el CD18, presentan peor pronóstico, afirmación que hemos podido corroborar ya que en nuestro estudio existe significación estadística entre pacientes que progresaron y valores altos para dicha MA. Sin embargo, Becheter O et al (1999) sobre 27 pacientes diagnosticados de LF identificó al

CD18 como factor pronóstico independiente en pacientes con LF avanzado, mostrando los pacientes con débil o falta de la expresión de dicha molécula una supervivencia media más corta que los pacientes que la expresaban.

Respecto al CD50, obtuvimos que los pacientes con valores más altos estaban relacionados con la progresión de enfermedad, pudiendo explicar dichos resultados según la teoría de que el CD50 está implicado en la regulación de la migración y el tráfico de linfocitos a los ganglios linfoides, con lo que favorecería la diseminación de enfermedad, con presencia de linfadenopatías.

En las series de Molica S et al (1995) (1997) concluyen que el CD54 es un parámetro pronóstico cuyo valor es independiente del estadio clínico, proponiéndolo como mejor valor predictivo de progresión que el de estadio clínico avanzado, afirmación que corroboran Behr SI et al (1998) así como Matutes E y Polliack A (2000). Christiansen I et al (1994) monitorizó niveles de CD54 durante la enfermedad en SLPC (progresión y control de la enfermedad con tratamiento citoreductor), corroborando la idea de que el CD54, puede ser considerado un marcador tumoral de la enfermedad. Por otro lado Horts E et al (1991) lo relacionan con el crecimiento local tumoral, activación celular, peor respuesta a tratamiento y diseminación por bloqueo del sistema de inmunovigilancia. También nosotros encontramos que la positividad para CD54 es un factor independiente que implica requerimientos terapéuticos, lo que indica de forma indirecta que se trata de formas más agresivas de SLPC.

5. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LAS MA, LA NECESIDAD DE TRATAMIENTO Y LA SUPERVIVENCIA.

En el análisis multivariante entre el riesgo de precisar tratamiento y la expresión de las diferentes MA hemos observado que la positividad del CD54 y CD49d predecían la

necesidad de tratamiento mientras la positividad para CD62 disminuye la posibilidad de precisar tratamiento.

También Terol MJ et al (1999) obtuvieron resultados similares, observando que la negatividad o débil expresión de CD49d tiene un valor predictivo favorable para la supervivencia global y libre de enfermedad y que valores altos de CD49d se correlaciona con estadios avanzados de la enfermedad. Resultados acordes con los de nuestra serie, en donde obtuvimos en el estudio multivariante que la presencia de dicha MA aumentaba el riesgo de requerir tratamiento; por lo que con la expresión de dicha MA podríamos identificar una población que aunque al diagnóstico esté en estadios iniciales debe ser estrechamente controlada ya que pueden requerir tratamiento incluso antes que pacientes con estadios más avanzados al diagnóstico.

Por otro lado respecto al CD54, ya hemos comentado la relación entre su expresión y la progresión de enfermedad, que viene avalada por múltiples estudios, concluyendo que el CD54 es un parámetro pronóstico cuyo valor es independiente del estadio clínico (Molica et al 1997). En nuestra serie no hemos podido establecer la relación con la progresión de enfermedad, pero sí en el estudio multivariante hemos podido demostrar que existe relación entre la necesidad de precisar tratamiento y la positividad de dicha MA, siendo parámetros similares, ya que la progresión de enfermedad condiciona la necesidad del tratamiento.

A la vista de los resultados obtenidos por nosotros y la bibliografía revisada, aunque no hemos podido establecer al CD54 como factor pronóstico independiente, nos atrevemos a proponer que el grupo de pacientes positivos para dicha MA al diagnóstico, puede ser identificado como pacientes que aun estando en estadios precoces de la enfermedad, dado

que tienen una alta probabilidad de precisar tratamiento son pacientes que requieren un seguimiento más cercano frente a pacientes en igual estadio y que carecen de dicha MA.

Además en el estudio multivariante también demostramos que el CD11c y CD62 pueden ser consideradas variables independientes con valor pronóstico ya que su positividad demuestra una mayor supervivencia. En nuestro estudio hemos demostrado que los pacientes que expresan el CD62 tienen una mayor supervivencia independientemente de otros factores, frente a los que no la tienen; al igual que hemos observado que su expresión disminuye el riesgo de requerir tratamiento, datos que no hemos podido contrastar con otras series. Existe un estudio de LLC realizado por Prystas EM et al (1993) en el que estudia la expresión del CD62 en LLC e individuos sanos, por CMF y Western blot, en cuyo estudio demuestra diferencias cuantitativas entre los dos grupos mediante Western, indicando que la diferencia no está en la estructura primaria de dicha MA, sino en que los linfocitos de la LLC presentan una glicosilación aberrante comparada con los linfocitos del grupo de sujetos sanos, proponiendo que dicha MA determinaría en los pacientes que la poseen un comportamiento de los linfocitos similar al de población general sana, por lo que apoya el mejor comportamiento de nuestros pacientes que la poseen a diferencia de los que carecen de la misma.

Ahora bien, en el estudio multivariante realizado para dicha molécula y su correlación con exitus/vivo observamos que existe una clara significación estadística ($p=0.009$) entre los pacientes que han fallecido por la enfermedad y la negatividad de la CD11c, por lo que planteamos que la expresión de dicha molécula puede ser utilizada como un valor independiente de buen pronóstico, lo cual nos sería de una gran utilidad a la hora de valorar al diagnóstico a los grupos de enfermos que se van a mantener durante un tiempo más prolongado en estadios precoces, a diferencia de aquellos en que la evolución de la

enfermedad puede ser más agresiva y precisan por lo tanto un control más estrecho por parte del clínico. Respecto a los estudios previos realizados existe controversia con los resultados, ya que en unos casos se asocia la positividad de dicha molécula con un curso agresivo de la enfermedad, como en la serie estudiada por De Rossi G et al (1993) y en otros casos con un curso indolente de la enfermedad, como la referida por Domingo A et al (1997) o nuestro caso. También existe otro estudio realizado por Eistere W et al (1996) que demuestra una mayor supervivencia en los pacientes que expresan CD11c, proponiéndolo como factor pronóstico independiente. En este último estudio el análisis multivariante también confirmó al CD11c como factor pronóstico independiente, pudiendo separar entre los pacientes CD44+ grupos pronóstico diferentes con significación estadística, cuyos resultados afirman que los pacientes que presentaban el CD44+ y el CD11c- están asociados con enfermedad avanzada y peor pronóstico, por lo que parecen representar una forma más agresiva de enfermedad. Los resultados globales obtenidos en nuestra serie apoyan totalmente esta última teoría ya que hemos encontrado una significación estadística entre la negatividad de dicha MA y los pacientes fallecidos. Además hemos visto que existe una tendencia entre los valores altos de positividad y la no progresión de la enfermedad, por lo que parece que dicha MA podría utilizarse como factor pronóstico en la LLC.

A pesar de los múltiples autores que le confieren al CD44 la categoría de un marcador predictivo de la enfermedad, respecto a la supervivencia libre de enfermedad y a la supervivencia global según la revisión realizada por Drillenbug P y Pals S (2000), o como Matutes E y Polliack A (2000) que afirman que la fuerte expresión del CD44 está asociada con peor pronóstico, nosotros no hemos podido establecer asociación a la supervivencia o al pronóstico, pudiendo ello demostrar que la expresión de dicha MA es

paralela al grado de diferenciación de los linfocitos (LLC), cuya expresión se pierde en las neoplasias linfoides de diferenciación intermedia.

CONCLUSIONES

1.-La expresión de las MA en los SLPC de nuestra serie es similar a lo que se describe en la literatura, observándose un distinto patrón de expresiones en SLPC no-LLC y LLC. Así, las LLC expresan con mayor frecuencia CD62 y los otros SLPC característicamente expresaron con mayor frecuencia CD49d, CD18 y CD54, siendo útil este patrón en el diagnóstico diferencial de estas entidades.

2.- El CD44, MA expresada con alta intensidad en el 90% de los casos y que ha sido relacionada por varios autores con un valor pronóstico desfavorable, en nuestras manos sólo se relaciona con un tiempo de duplicación linfocitaria mayor de 12 meses, pero no ha podido ser reconocido como factor de mal pronóstico o de riesgo para tratamiento en el estudio multivariante.

3.- CD54, MA poco expresada en las LLC, aparece relacionada con estadios avanzados de la enfermedad, mientras que CD62 es un marcador pronóstico independiente, apareciendo esta molécula más expresada en los pacientes con supervivencia prolongada. También la expresión de CD11c actúa como factor protector, incluyendo al paciente como de bajo riesgo de mortalidad.

4.- En cuanto a las necesidades terapéuticas, hemos observado que la presencia de CD54 y CD49d son factores independientes que implican indirectamente una mayor agresividad de la enfermedad, con requerimiento de tratamiento citoreductor, mientras la presencia de CD62 actúa como factor protector, indicando enfermedad menos agresiva (sin necesidades terapéuticas).

BIBLIOGRAFÍA

- Alvaro T, Font LL (1999): Seminarios de correlación clínico-patológica. VI Curso de Hematopatología. Tortosa. p. 39.
- Angelopoulou MK, Kapisiris E, Kourtis J et al (1997): The adhesion molecule profile of mantle cell lymphoma (MCL) vs B-chronic lymphocytic leukemia B-CLL). *Blood* 90: 522.
- Angelopoulou MK, Kontopidou FN, Pagalis GA (1999): Adhesion molecules in B-Chronic lymphoproliferative disorders. *Seminars in Hematology* vol 36 (2): 178.
- Armitage JO, Weisenburger D (1998): New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: Clinical features of the major histologic subtypes. *J Clin Oncol* 16: 2780.
- Arnaout MA(1990): Structure and function of the leukocyte adhesion molecule CD11/CD18. *Blood* 75: 1037.
- Bain BJ, Catovsky D (1995): The leukaemic phase of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol* 48: 189.
- Baldini L, Cro L, Calori R et al (1992): Differential expression of very late activation antigen-3 (VLA-3) /VLA-4 in B-cell non-hodgkin lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 10:2688.
- Banks P, Chan J, Cleary M et al (1992): Mantle cell lymphoma: a proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol* 16: 637.
- Bartl R, Frisch B, Hill W et al (1983): Bone marrow histology in hairy cell leukemia. Identification of subtypes and their prognostic significance. *Am J Clin Pathol* 79:531.
- Battifora H, Trowbridge IS (1983): A monoclonal antibody useful for the differential diagnosis between malignant lymphoma and nonhematopoietic neoplasms. *Cancer*;51:816-21.
- Becheter O, Wolfgrang E, Stefan D et al (1999): Expression of LFA-1 identifies different prognostic subgroups in patients with advanced follicle center lymphoma (FCL). *Leuk Res* 23:483.
- Behr SI, Korinith D, Schriever (1998): Differential adhesion pattern of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 12;71.
- Beljaards R, Van Beek P, Willemze R (1997): Relation between expression of adhesion molecules and clinical behavior in cutaneous follicle center cell lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 37:34.
- Besses C, Woessner S, Sans-Sabrafen (1994): Linfomas malignos no Hodgkinianos. Clasificación y descripción de sus distintas variedades. *Hematología clínica*. 3ªE 365-386.
- Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL et al (1987): Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9238.
- Bevilacqua MP (1993): Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 11:767.
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G et al (1981): A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48: 198.
- Binet JL, Catovsky D, Chandra M, et al. (Writing Committee of the International Workshop on CLL)(1981): Chronic lymphocytic leukemia: proposal for a revised staging system. *Br J Haematol*; 48:365.
- Bonfanti R, Furie B, Wagner DD (1989): PADGEM (GMP-140) is a component of Weibel-Palade of human endothelial cells. *Blood* 73: 1109.
- Borche L, Lozano F, Vilella R, Vives J (1987): CD43 monoclonal antibodies recognize the large sialoglycoprotein of human leukocytes. *Eur J Immunol*;17:1523-6.
- Bosch F, López-Guillermo A, Campos E, Ribera J et al (1998): Mantle cell lymphoma. *Cancer* 82: 567.
- Bookman MA, Laderli P, Jaffe ES et al (1990): Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation : morphologic, immunophenotypic and prognostic factors. *J Natl Cancer Inst* 82:742.
- Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA (1958): Leukemic reticuloendotheliosis. *Blood* 13: 609.

- Brouwer RE, Hoefnagel J, Borger van Der Burg B, et al (2001): Expression of co-stimulatory and adhesion molecules and chemokine or apoptosis receptors on acute myeloid leukaemia: high CD40 and CD11a expression correlates with poor prognosis. *Br J Haematol* 115(2) 298.
- Buck CA (1992): Immunoglobulin superfamily: structure, function and relationship to other receptor molecules. *Semin Cell Biol* 3: 179.
- Burke JS (1978): The value of the bone-marrow biopsy in the diagnosis of hairy cell leukemia. *Am J Clin Pathol* 70:876.
- Burke JS, Rappaport H (1984): The diagnosis and differential diagnosis hairy cell leukemia in bone marrow and spleen. *Semin Oncol* 11: 334.
- Butcher EC y Picker LJ (1996): Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272.
- Caligaris-Cappio F, Bergui L, Schena M, et al (1989): Cell-cell and cell-matrix adhesion structures may influence the growth pattern of chronic lymphoid malignancies. *Leukemia* 3:167.
- Campana D, Janossy G, Bofill M et al (1985): Human B cell development. I. Phenotypic differences of B lymphocytes in the bone marrow and peripheral lymphoid tissue. *J Immunol*;134:1524-30.
- Campo E, Jaffe ES: Biology of Marginal Zone B-cell Lymphomas. *Annals of Oncology* 13: 6, 2002. Sup 2.
- Catovsky D, Cherchi M, Brooks D et al (1981): Heterogeneity of B-cell leukemias demonstrated by the monoclonal antibody FMC7. *Blood*;58: 406-8.
- Catovsky D. (1996): Chronic lymphocytic leukaemia and other leukaemias of mature B and T cells. En: Weatherall, DJ., *Oxford textbook of medicine*. 3^a ed, Oxford, Oxford University Press, Vol. III, p. 3419.
- Catovsky D, Fooks J, Richards S, (1989): Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex, and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 Trial. MCR Working Party on Leukaemia in adults. *Br J Haematology* 72: 141.
- Catovsky D, Matute E (1999): Splenic lymphoma with circulating villous lymphocytes/splenic marginal-zone lymphoma. *Seminars in Hematology*, vol 36 (2) 148.
- Cawley JC, Burns GF, Hayhoe FJ (1980): A chronic lymphoproliferative disorder with distinctive features: a distinct variant of hairy cell leukemia. *Leuk Res* 4: 547.
- Cawley JC, Burthem J (1992): Hairy cell leukemia, in Whittaker JA (ed): *Leukemia* Oxford, UK, Blackwell Scientific, p 495.
- Cepek KL, Wong DA, Brenner MB, Springer TA (1995): CD103 cluster report. In: Schlossman SF et al., eds. *Leucocyte Typing V. White Cell Differentiation Antigens*. Oxford-New York-Tokyo: Oxford University Press; 1666-7.
- Cheson BD, Bennett JM, Rai KR et al (1988): Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia (CLL): recommendations of the NCI-Sponsored Working Group. *Am J Hematol* 29: 152.
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M et al (1996): National Cancer Institute-sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 87: 4990.
- Cheson BD et al (1999): Report of an international Workshop to Standardize Response Criteria for Non-Hodgkin Lymphomas. *J Clin Oncol* 17:1244.
- Christiansen I, Gidlöf C, Wallgren A et al (1994): Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule 1 are increased in chronic B-lymphocytic leukemia and correlate with clinical stage and prognostic markers. *Blood* 84:3010.
- Coiffier B (1998): Which treatment for mantle cell lymphoma in 1998?. *J Clin Oncol* 16: 3.
- Collins T, Williams A, Johnston GI et al (1991): Structure and chromosomal localisation of gene for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1. *J Biol Chem* 266: 2466.

- Conley CL, Misiti J, Laster AJ (1980): Genetic factors predisposing to chronic lymphocytic leukemia and to auto-immune disease. *Medicine* 5: 323.
- Cordell JL, Pulford K, Turley et al (1994): Cellular distribution of human leucocyte adhesion molecule ICAM-3. *J Clin Pathol* 47:143-7.
- Cordonnier C, Farcet JP, Desforges L et al (1984): Legionnaires disease and hairy cell leukemia: an unfortuitous association. *Arch Intern Med* 144: 2373.
- Coxon A, Rieu P, Barkalow FJ, et al (1996): A novel role for the β 2-integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity* 5:653.
- Criel A, Verhoef G, Vlietinck R, et al (1997): Further characterization of morphologically defined typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study on 390 cases. *Br J Haematol* 97: 383.
- Csanaky G, Matutes E, Vass JA, et al (1997): Adhesion receptors on peripheral blood leukemic B-cells. A comparative study on B-cell chronic lymphocytic leukemia and related lymphomas/leukemias. *Leukemia* 11: 408.
- D'Angelo G, Crovetto G, Grizzetti N et al (1994): Biclinal component in lymphoplasmocytic/lymphoplasmocytoid non-Hodgkin lymphoma. *Recenti Prog Med*;85:104-7.
- De Rie MA, Schumacher TNM, Van Schijndel GMW et al (1989): Regulatory role of CD19 molecules in B-cell activation and differentiation. *Cell Immunol* ;118:368-81.
- De Rossi G, Zarcone D, Mauro F, et al (1993): Adhesion molecule expression on B-cell lymphocytic leukemia cells: Malignant cell phenotypes define distinct disease subsets. *Blood* 81: 2679.
- Drillenburg P, Pals TS (2000): Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood* 95: 1900.
- Domingo A (1999): Citometría de flujo en el estudio de los síndromes linfoproliferativos. VI Curso de Hematopatología. Tortosa. 121.
- Domingo A, Gonzalez-Barca E, Castellsague X, et al (1997): Expression of adhesion molecules in 113 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: Relationship with clinico-prognostic features. *Leuk Res* 21: 67.
- Domingo-Claros A, Larriba I, Alonso E et al (2000): Utilidad del inmunofenotipo en el diagnóstico diferencial de linfomas y leucemias con morfología centrocítica. *Haematologica* 85: 242.
- Drillenburg P, Wielenga VJ, Kramer MH, et al (1999): CD44 expression predicts disease outcome in localized large B-cell lymphoma. *Leukemia* 13:1448.
- Drillenburg P, Pals ST (2000): Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood* 95:1900.
- Eisterer W, Hilbe W, Stauder R, et al (1996): An aggressive subtype of B-CLL is characterized by strong CD44 expression and lack of CD11c. *Br J Haematol* 93:661.
- Eksioglu-Demiralp E, Alpdogan O, Aktan M, et al (1996): Variable expression of CD49d antigen in B-cell chronic lymphocytic leukemia is related to disease stages. *Leukemia* 10:1331.
- Engel P, Wagner N, Tedder TF (1995): B23. CD79 workshop report. In: Schlossman SF et al., eds. *Leucocyte Typing V. White Cell Differentiation Antigens*. Oxford-New York-Tokyo: Oxford University Press. 667.
- Erber WN, Mynheer LC, Mason DY (1986): APAAP labelling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia. *Lancet*; i:761.
- Erber WN, Mason DY (1988): Expression of the interleukin-2 receptor (Tac antigen/CD25) in hematologic neoplasms. *Am J Clin Pathol*; 89:645.
- Falini B, Pulford K, Erber WN et al (1986): Use of a panel of monoclonal antibodies for the diagnosis of hairy cell leukaemia. An immunocytochemical study of 36 cases. *Histopathology*;10:671.

- Flandrin G, Sigaux F, Sebahoun G et al (1984): Hairy cell leukemia: clinical presentation and follow-up in 221 patients. *Semin Oncol* 11:58.
- Ferro LM, Zola H (1990): Modulation of expression of the antigen identified by FMC7 upon human B-lymphocyte activation: evidence for differences between activation *in vivo* and *in vitro*. *Immunology*; 69:373.
- Foran Jm, Rohatiner AZS, Cunningham D et al (2000): European phase II study of Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol* 18: 317.
- Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE, et al (1986): Follicular lymphoma: Prognostic factors for survival and relapse. *J Clin Oncol* 4: 1470.
- Galton DAG (1966): The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *CMAJ* 94: 1005.
- García-Conde J, Benet I (1998): La clasificación de los linfomas. La biología como aproximación entre la anatomía patológica y la clínica. Biblioteca oncológica Roche. 7.
- García-Conde J, Cabanillas F (1996): Mantle cell lymphoma: a lymphoproliferative disorder associated with aberrant function of the cell cycle. *Leukemia* 10: S78-S83.
- Geisler CH, Larsen JK, Hansen NE et al (1991): Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 78: 1795.
- Gotic M, Kraguljac N, Rolovic Z, et al (2000): Immunophenotyping of leukemic cells in the diagnosis of hairy cell leukemia. *Srp Arh Celok Lek* 128:157.
- Greaves MF, Hariri G, Newman RA et al (1983): Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood*;61:628.
- Grever M, Kopecky K, Foucar MK, et al (1995): Randomized comparison of pentostatin versus interferon alfa-2a in previously untreated patients with hairy cell leukemia : an intergroup study. *J Clin Oncol* 13: 974.
- Gu B, Dao L, Wiley J (2001): Impaired transendothelial migration of B-cell lymphocytes: a defect linked to low L-selectin expression. *Leukemia lymphoma* 42:5.
- Guerin JM, Meyer P, Habib Y (1987): *Listeria monocytogenes* infection and hairy leukemia. *Am J Med* 83: 188.
- Hallek M, Kuhn-Hallek I, Emmerich (1997): Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 11(2): 4.
- Hanson CA, Harris NL, Jaffe ES et al (1999): World health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia. November 1997. *J Clin Oncol* 1999;17: 3835.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International lymphoma Study Group. *Blood* 84: 1361.
- Hernández JM, Mecucci C, Criel A, et al (1995): Cytogenetic analysis of B cell chronic lymphoid leukemias classified according to morphologic and immunophenotypic criteria. *Leukemia* 9: 2140.
- Hoffman MA, Janson D, Rose E, Rai KR (1997): Treatment of hairy-cell leukemia with cladribine: response, toxicity, and long-term follow-up. *J Clin Oncol* 15: 1138.
- Horning SJ (1993): Natural history of and therapy for the indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Semin Oncol* 20(5): 75.
- Horst E, Meijer CJLM, Radaszkiewicz T, et al (1990): Expression of a human homing receptor (CD44) in lymphoid malignancies and related stages of lymphoid development. *Leukemia* 4: 383.
- Horst E, Meijer CJLM, Radaszkiewicz T, et al (1990): Adhesion molecules in the prognosis of diffuse large cell lymphoma: expression of a lymphocyte homing receptor CD44, LFA-1 (CD11a/18) and ICAM(CD54). *Leukemia* 4:595.

- Horst E, Radaszkiewicz T, Hoofman-den otter A, et al (1991): Expression of the leukocyte integrin LFA-1 (CD11a/CD18) and its ligand ICAM-1 (CD54) in lymphoid malignancies is related to lineage derivation and stage of differentiation but not to tumor grade. *Leukemia* 5: 848.
- Huet S, Groux H, Caillou B et al (1989): CD44 contributes to T cell activation. *J Immunol* 143:798.
- Hynes RO (1992): Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11.
- International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (1989): Recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. *Ann intern Med* 110: 236.
- Isaacson PG. The current status of lymphoma classification (2000). *Br J Haematol* 109: 258.
- Isaacson PG, Matutes E, Burke M, Catovsky D (1994): The histopathology of splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood* 84: 3828.
- Jackson DG, Bell JI (1990): Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *J Immunol*;144:2811-5.
- Jalkanen S, Joensuu H, Söderström KO, Klemi P (1991): Lymphocyte Homing and clinical behaviour of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Invest* ;87:1835.
- Jarque I, Bosch F(1998). *Progresos biológicos y terapéuticos: LLC y otros SLPC con expresión leucémica*. Biblioteca oncológica Roche: Leucemias. 159.
- Jones M, Cordell JL, Beyers AD et al (1993): Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive antipeptide antibodies. *J Immunol* 150:5429.
- Kamper E, Papaphilis A, Angelopoulou M, et al (1999): Serum levels of tetranectin, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 in B-chronic lymphocytic leukemia. *Clin Biochem* 32:639.
- Kersey J, Goldman A, Abramson C et al (1982): Clinical usefulness of monoclonal-antibody phenotyping in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2:1419.
- Kipps TJ (1997): Signal transduction pathways and mechanisms of apoptosis in CLL-B lymphocytes: their role in CLL pathogenesis. *Hematol Cell Ther* 39(1): 517.
- Knecht H, Rhyner K, Streuli RA (1986): Toxoplasmosis in hairy cell leukemia. *Br J H aematol* 62: 65.
- Kouri IF, Romaguera J, Kantarjian H et al, (1998): Hyper-CVAD and high-dose methotrexate/cytarabine followed stem-cell transplantation: an active regimen for aggressive mantle-cell lymphoma. *Jclin Oncol* 16: 3803.
- Kroft SH, Finn WG, Peterson L (1995): The pathology of the chronic lymphoid leukaemias. *Blood* 9: 234.
- Labouyrie E, Mrit G, Vial JP et al (1997): Intrasinusoidal bone marrow involvement by splenic lymphoma with villous lymphocytes: a helpful immunohistologic feature. *Mod Pathol* 10: 1015.
- Landau NR, Schatz PG, Rosa M, Baltimore D (1987): Increased frequency of N-region insertion in a murine pre-B cell line infected with a terminal deoxynucleotidyl transferase retroviral expression vector. *Mol Cell Biol* 7: 3237.
- Lewisohn DM, Bargatze RF, Butcher EC (1987): Leukocyte-endothelial cell recognition: Evidence of a common molecular mechanism share by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. *J Immunol* 138: 4313.
- López-Guillermo A, Cobo F (1999): Factores pronósticos en los linfomas. *Biología de los linfomas*. Biblioteca Roche 221.
- Lucio PJM, Dias Faria MTS, Pinto AMC, et al (1998): Expression of adhesion molecules in chronic B-cell lymphoproliferative disorders. *Haematology* 83: 104.
- Majlis A, Pugh WC, Rodríguez MA, et al (1997): Mantle cell lymphoma: correlation of clinical outcome and biologic features with three histologic variants. *J Clin Oncol* 15: 1664.

- Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K et al (1994): The immunophenotype of hairy cell leukemia. Proposals for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma* 14(1): 57.
- Marotta G, Rasparodi D, Sestigiani C et al (2000): Expression of the CD11c in B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Leukemia lymphoma* 37(1):145.
- Matutes (1988): Marcadores inmunológicos en el diagnóstico hematológico. En Vives JL. *Técnicas de laboratorio en Hematología*. Salvat editores .Barcelona.
- Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K et al (1994): The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood* 83: 1558.
- Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al (1994): The immunologic profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*, 8: 1640.
- Matutes E (1999): Tricoleucemia. Síndromes linfoproliferativos. Pag 152.
- Matutes E (1999): Linfoma esplénico de células vellosas/marginal. Síndromes linfoproliferativos 145.
- Matutes E, Polliack A (2000): Morphology and phenotype of LLC. *Rev Clin Exp Hematol* 4: 22.
- McIntyre BW, et al (1991): Integrins: Cell adhesion receptors in health and disease. *Cancer Bull*; 43:51.
- Melo JV, Hegde U, Parreira A, et al (1987): Splenic B-cell lymphoma with circulating villous lymphocytes: Differential diagnosis of B-cell leukaemias with large spleens. *J Clin Pathol* 40: 642.
- Meral B, Muthu A, Hamdi A et al (2000): Circulating CD44 and intercellular adhesion molecule-1 levels in low grade non-hodgkin lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia patients during interferon-alpha-2a treatment. *Cancer* 89:1474.
- Molica S, Dttilo A, Mannella A (1993): CD11c expresión in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 81:2466.
- Molica S, Dttilo A, Mannella A, Levato D,(1994): Cd11c expresión in B-cell Chronic lymphocytic leukemia. A comparison of results obtained with different monoclonal antibodies. *Haematologica* 79(5):452.
- Molica S, Dttilo A, Mannella A et al (1995): Expresión on leukemic cells and serum circulating level of intercellular adhesión molecule-1 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: implications for prognosis. *Leukemia Res* 19:573.
- Molica S, Dttilo A, Mannella A, Levato D (1995): Soluble intercellular adhesion molecule 1 correlates with markers of disease activity in B-cell Chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 85:2280.
- Molica S, Dttilo A, Mannella A, Levato D (1996): Intercellular adhesión molecules (ICAMs) 2 and 3 are frequently expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 10:907.
- Molica S, Levato D, Dell'Olio M et al (1997): Clinico-prognostic implications of increased levels of soluble CD54 in the serum of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. Results of a multivariate survival analysis. *Haematologica* 82:148.
- Möller P, Mielke B, Moldenhauer G (1990): Monoclonal antibody HML-1, a marker for intraepithelial T-cells and lymphomas derived thereof, also recognizes hairy cell leukemia and some B-cell lymphomas. *Am J Pathol* 136:509.
- Montserrat E (1997): Significación biológica y marcadores pronósticos de la LLC y entidades relacionadas. IV Curso de Hematopatología, Tortosa. 127.
- Montserrat E, Bosch F, Lopez-Guillermo A et al (1996): CNS involvement in mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 14: 941.
- Montserrat E, Rozman C (1993): Chronic lymphocytic leukaemia: pronostic factors and natural history. *Baillieres Clin Haematol* 6:849.
- Montserrat E (2001): Leucemia linfática crónica: presente y futuro. *Hematológica* (86) 79.

- Morabito F, Prasthofer EF, Dunlap NE et al (1987): Expression of myelomonocytic antigens on chronic lymphocytic leukemia B cells correlates with their ability to produce interleukin-1. *Blood* 70:1750.
- Moreau E, Matutes E, (1997): Improvement of the Chronic Lymphocytic Leukemia Scoring System with the Monoclonal Antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*, 108: 378.
- Mustjoki S, Alitalo R, Elonen E (2001): Intercellular adhesion molecule-1 in extravasation of normal mononuclear and leukemia cells. *Br J Haematol* 115:235.
- Naor D, Vogt Sionov R, Ish-Shalom D (1997): CD44: structure, function and association with the malignant process. *Adv Cancer Res*;71:241.
- Ngan B, Chen -Levy Z, Weiss L et al (1988): Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14,18) chromosomal translocation. *N Engl J Med* 318: 1638.
- Ohmori K, Yoneda T, Ishihara G, Shigeta K, Hirashima K, Kanai M, Itai S, Sasaoki T, Aril H, Hannagi R (1989): Sialyl SSEA-1 antigen as a carbohydrate marker on human natural killer cells and immature lymphoid cells. *Blood* 74: 255.
- Oscier DG, Matutes E, Copplestone A, Pickering RM, Chapman R, Gillingham R, et al (1997): Atypical lymphocytic morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol* 98: 934.
- Parls ST, Horst E, Ossekoppele GJ, et al (1989): Expression of lymphocyte homing receptor as a mechanism of dissemination in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 73: 885.
- Perri RT, Royston I, Lebien TW, Kay NE (1983): Chronic lymphocytic leukemia progenitor cells carry the antigens T65, BA-1, and Ia. *Blood*; 61:871.
- Philips ML, Nudelman E, Gaeta FCA et al (1990): ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* 250: 1130.
- Pinto A, Del Vecchio L, Carbone A (1991): Expression of myelomonocytic antigens is associated with unfavourable clinicoprognostic factors in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol* Feb;2:107.
- Pinto A, Carbone A, Gloghini A, et al (1993): Differential expression of cell adhesion molecules in B-zone small lymphocytic lymphoma and other well-differentiated lymphocytic disorders. *Cancer* 72:894.
- Plate JM, Long BW, Kelkar SB (2000): Role of beta-2 integrins in the prevention of apoptosis induction in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 14 (1);34.
- Prieto J, Beatty PG, Clark EA, Patarroyo M (1988). Molecules mediating adhesion of T and B cells, monocytes and granulocytes to vascular endothelial cells. *Immunology* 63:631.
- Prystas EM, Parker CJ, Holguin MH (1993): Aberrant glycosylation of L-selectin on the lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 7:1355.
- Pugh WC, McBride JA (2000): The pathologic basis for the classification of non-Hodgkin lymphomas. *Hematology. Basic Principles and Practice* 3rdEd: 1263.
- Rabinowitz R, Polliack A, Leizerowitz R, et al (1991): Expression of CD11a (LFA-1) on B-chronic lymphocytic leukemia and lymphoma cells: Correlation with cell surface immunoglobulin intensity and CD58 (LFA-3) expression. *Leuk Lymphoma* 5: 59.
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46: 219.
- Rai KR, Patel DV (2000): Chronic lymphocytic Leukemia. *Hematology. Basic Principles and Practice* 3rd Ed.1350
- Ristamäki R, Joensuu H, Hargberg H et al (1997): Elevated serum CD44 levels is associated with unfavorable outcome in non-hodgkin's lymphoma. *Boold* 90:4039.
- Ristamäki R, Joensuu H, Hargberg H et al (1998): Clinical significance of circulating CD44 in non-hodgkin's pymphoma. *Int J Cancer* 79:221.

- Robbins BA, Ellison DJ, Spinosa JC et al (1993): Diagnostic application of two-color flow cytometry in 161 cases of hairy cell leukemia. *Blood* 82: 1277.
- Robertson LE, Pugh W, O'Brien S, et al (1993): Richter's syndrome : a report on 39 patients. *J Clin Oncol* 11: 1985.
- Romaguera JE, Khouri IF, Kantarjian HM et al (2000): Untreated aggressive mantle cell lymphoma: results with intensive chemotherapy without stem cell transplant in elderly patients. *Leuk Lymphoma* 39: 77.
- Rothe G, Schmitz (1996): Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia* 10:877.
- Rozman C, Bragues R, Montserrat E (1997): About the pronostic value of bone marrow histopathological patterns in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol.*59: 61.
- Rozman C, Montserrat E (1995): Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 333: 1052.
- Sarfati M (1997): BC7. CD23 Workshop Panel report. In: Kishimoto T, et al., eds. *Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens*. New York & London: Garland Publishing, Inc:144.
- Sainati L, Matutes E, Mulligan S, et al (1990): A variant of hairy cell leukemia resistant to alpha-interferon: clinical and phenotypic characteristics of 17 patients. *Blood* 76: 157.
- Sanchez-Madrid F, Nagy JA, Robbins E et al (1983): A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J Exp Med*;158:1785.
- Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF (1992): Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol* 119: 229.
- Sembries S, Pahl H, Stilgenbauer S et al (1999): Reduced expression of adhesion molecules and cell signaling receptors by chronic lymphocytic leukemia cells with 11q deletion. *Blood* 93: 624.
- Solal-Celigny P (2001): Rituximab as first-line monotherapy in low-grade follicular lymphoma with a low tumor burden. *Anticancer Drugs* 12: S11.
- Spertini O, Freedman AS, Belvin MP et al (1991): Regulation of leukocyte adhesion molecule-1 (TQ1, Leu-8) expression and shedding by normal and malignant cells. *Leukemia* 5:300.
- Spertini O, Kansas GS, Munro JM, Griffin JD, Tedder TF (1991): Regulation of leukocyte migration by activation of the leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1) selectin. *Nature*;349:691.
- Springer SJ (1992): Intercellular communication and cell-cell adhesion. *Science*; 255:1671
- Staunton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, Barton R, Marlin SD, Springer TA (1989): A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell*;56:849.
- Stein H, Dallenbach F (1992): Diffuse large cell lymphomas of B and T cell type. In Knowles DM (ed): *Neoplastic Hematopathology* . Williams & Wilkins, Baltimore 675.
- Stetler-Stevenson M, Braylan RC (2001): Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol* 38(2):1113.
- Stockinger H, Gadd SJ, Eher R et al (1990): Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J Immunol* 145: 3889.
- Tallman MS, Hakiman D, Peterson LC (2000): Hairy Cell Leukemia. *Hematology* 3rd Ed.1363.
- Tassies D, Montserrat F, Reverter JC, et al (1995): Myelomonocytic antigens in chronic lymphocytic leukemia. *Kleuk Res* 19:841.

- Terol MJ, Cid MC, Lopez-Cuillermo A et al (1996): Expression of intercellular adhesion molecule-3 (ICAM/CD50) in malignant lymphoproliferative disorders and solid tumors. *Tissue Antigens* 48:271.
- Terol MJ, Lopez-Cuillermo A, Bosch F, et al (1998): Expression of the adhesion molecule ICAM-1 in non-Hodgkin's lymphoma: Relationship with tumor dissemination and prognostic importance. *J Clin Oncol* 16: 35.
- Terol MJ, Prosper F (1998): Bases inmunológicas y moléculas de adhesión en linfomas. *Biología de los linfomas. Biblioteca oncológica Roche*. 143.
- Timothy M, Harlan J.M (1994): Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules. *Blood* 84: 2068.
- Tolksdorf G, Stein H, Lennert K (1980): Morphological and immunological definition of a malignant lymphoma derived from germinal centre cells with cleave nuclei (centrocytes). *Br J Cancer* 41: 168.
- Trauth BC, et al (1989): Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*; 245:301
- Travis LB, Curtis RE, Hankey BF, Fraumeni JF (1992): Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 84: 1422.
- Türk, W. (1903): Ein system der Lymphomatosen. *Wein Klin Wochenschr*, 16: 1073.
- Uckun FM, Jaszcz W, Ambrus JL et al (1988): Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. *Blood*; 71:13.
- Verfaillie CM, Prosper F, Liu J et al (1998): Función de las integrinas en la hematopoyesis. *Hematológica* 3:257.
- Weisenburger D, Armitage JO (1996): Mantle cell lymphoma: an entity comes of age. *Blood* 87: 4483.
- Williams AF, Barclay AN (1988): The immunoglobulin superfamily. *Annu Rev Immunol* 6: 381.
- Woessner S, Florensa L (2000): Síndromes linfoproliferativos crónicos. Linfomas no Hodgkin. Clasificación de sus distintas variedades. *Linfoma de Hodgkin. La citología óptica en el diagnóstico hematológico*. 4ª Ed 431.
- Yam LT, Li CY, Lam KW (1971): Tartrate-resistant and phosphatase isoenzyme in the reticulum cells of leukemic reticuloendotheliosis. *N Engl J Med* 284: 357.
- Yang WI, Zukerberg LR, Mokotura I et al (1994): Cyclin D1 (BCL-1, PRAD1) protein expression in low grade B-cell lymphomas and reactive hyperplasia. *Am J Pathol* 145(1): 86.
- Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV et al (2002): Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev* 22:146.
- Zizani PL, Magagnoli M, Moretti L, De Renzo A, et al (2000): Randomized trial of fludarabine versus fludarabina and idarubicin as frontline treatment in patients with indolent or mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 18: 773.
- Zola H, Neoh SH, Potter A, Melo JV, De Oliveria MSP, Catovsky D (1987): Markers of differentiated B cell leukaemia: CD22 antibodies and FMC7 react with different molecules. *Disease Markers*;5:227.
- Zomas A, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Matutes E, Seon BK, Catovsky D (1994): SN8 antibody can help differentiate CLL from other chronic B-cell disorders. *Blood* ;84:725a.
- Zwiebel JA, Cheson BD (1998). Chronic lymphocytic leukemia: Staging and Prognostic factors. *Seminar in Oncology* 25,1: 42.