

HOSPITAL LA FÉ.VALENCIA.

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA.

"LINFOMAS NO HODGKINIANOS Y MIELOMAS:  
ESTUDIO CLÍNICO-PATOLÓGICO  
Y CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA"

VICENTE SABATER MARCO.

MAYO 1987.

FACULTAD DE MEDICINA.

UNIVERSIDAD LITERARIA DE VALENCIA.

UMI Number: U607454

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607454

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

TITULO DE LA TESIS: " Linfomas no hodgkinianos y mielomas:  
Estudio clínico-patológico y caracte-  
rización inmunológica ".

AUTOR: Vicente Sabater Marco.

DIRECTOR: Prof.Dr.D.Javier García-Conde Brú.

TRIBUNAL: Prof. Dr. D. Antonio Llombart Bosch.  
Prof. Dr. D. Jaime Prat y Diaz de Losada.  
Prof. Dr. D. Vicente Alberola Candel.  
Prof. Dr. D. Salvador Rivas Rodero.  
Prof. Dr. D. Félix Carbonell

FECHA DE LA LECTURA: 10 de Julio de 1987.

CALIFICACION OBTENIDA: Apto " Cum Laude ".



D.JAVIER GARCÍA-CONDE BRÚ, CATEDRÁTICO DE PATOLOGÍA  
GENERAL Y PROPEDEÚTICA CLÍNICA DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD LITERARIA DE VALENCIA

CERTIFICA: que la presente TESIS DOCTORAL titulada  
"LINFOMAS NO HODGKINIANOS Y MIELOMAS: ESTUDIO CLÍNICO-  
PATOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA", ha sido  
realizada bajo mi dirección por el licenciado en  
Medicina y Cirugía D. Vicente Sabater Marco.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, se  
extiende la presente certificación, en el lugar y  
fecha indicados.

Valencia, 12 de Mayo de 1987.

Fdo.: Prof. D. J. García-Conde Brú.



DEDICATORIA:

A María Cristina.

AGRADECIMIENTOS:

Al Prof.Dr.J.García-Conde Brú por su interés, dirección y constante ayuda para la realización de esta tesis doctoral.

Al Dr.L.V.Tamarit Montesinos, sin cuya colaboración no hubiera sido posible la culminación de la presente tesis.

A todos los Jefes de Sección y Médicos Adjuntos del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital " La Fé " por su cooperación y amistad.

Al Dr.Félix Carbonell Ubanco, de la sección de inmunología del Banco de Sangre del Hospital " La Fé ", por su contribución al estudio inmunológico.

A las Dras.I.Benet Monforte e I.Marugán de la Concha, del laboratorio de Hematología del Hospital Clínico Universitario, por su ayuda y amabilidad.

A los miembros de las secciones de microscopía electrónica y técnicas histológicas, del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital " La Fé ", por su labor realizada.

ÍNDICE:

I.- INTRODUCCIÓN.	pag.7
1.1.- Concepto, evolución histórica, clasificación y sistemas de estadiaje de los LNH.	pag.8
1.2.- El sistema celular linfoide. Modulación y transformación citofuncional de los sistemas linfocitarios B y T.	pag.16
1.3.- Aspectos técnicos y desarrollo de métodos inmunológicos para el reconocimiento de marcadores celulares.	pag.23
1.4.- Marcadores inmunológicos y estadios de diferenciación celular. Aplicación de marcadores linfocitarios al estudio de los LNH.	pag.28
II.- OBJETIVOS.	pag.44
III.- MATERIAL Y MÉTODOS.	pag.47
3.1.- Material:	pag.48
3.1.1.- Biopsias y muestras de sangre.	pag.48
3.1.2.- Pacientes.	pag.49
3.1.3.- Material de laboratorio.	pag.57
3.2.- Métodos:	pag.60
3.2.1.- Muestras sanguíneas.	pag.60
3.2.2.- Biopsias.	pag.62
3.2.3.- Técnicas de tinción.	pag.65
3.2.4.- Procedimientos de inmunoperoxidasa.	pag.68
3.2.5.- Estudios realizados.	pag.71
3.2.6.- Método estadístico.	pag.74



IV.- RESULTADOS.	pag.75
4.1.- Resultados del estudio de las características clínicas de los pacientes con linfomas no hodgkinianos y mielomas.	pag.76
4.2.- Resultados de la caracterización citohistológica y ultraestructural de los linfomas no hodgkinianos y mielomas.	pag.91
4.3.- Resultados de la caracterización histológica e inmunológica de los órganos linfoides.	pag.95
4.4.- Resultados de la caracterización inmunológica de los LNH y mielomas.	pag.98
4.4.1.- En sangre periférica.	pag.99
4.4.2.- En tejido incluido en parafina.	pag.100
4.4.3.- En tejido congelado.	pag.105
4.5.- Resultados de la caracterización de la población y subpoblaciones de linfocitos T, en los órganos linfoides, linfomas no hodgkinianos y mielomas.	pag.111
4.6.- Resultados del estudio del fenotipo inmunológico y expresión monoclonal de cadenas ligeras en relación con el sistema de clasificación de los LNH.	pag.115
V.- DISCUSIÓN.	pag.168
VI.- CONCLUSIONES.	pag.205
VII.- BIBLIOGRAFÍA.	pag.212

I.- INTRODUCCIÓN.

### 1.1.- CONCEPTO, EVOLUCIÓN HISTÓRICA, CLASIFICACIÓN Y SISTEMAS DE ESTADIAJE DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS.

Los linfomas constituyen, en general, un grupo de tumores que se originan primariamente en el tejido linfático y su carácter maligno se demuestra por la capacidad de invadir todos los sistemas orgánicos, motivo por el cual, se adjetivizan como linfomas malignos. Uno de los avances más importantes en los últimos 20 años, ha sido el separar por un lado el linfogranuloma de Hodgkin y por otro los linfomas no hodgkinianos.

Los linfomas no hodgkinianos representan un grupo heterogéneo de neoplasias que se originan a partir de células de estirpe linfática y cuyo estudio anatomopatológico no revela la existencia de células gigantes de Reed-Sternberg ni su contexto histológico granulomatoso (108).

Las células de estirpe linfática constituyen la base celular del sistema inmune y dada su amplia distribución y heterogeneidad funcional, los linfomas no hodgkinianos pueden originarse tanto en los ganglios linfáticos como en diversos órganos, que presentan habitualmente células de origen linfático.

Según el tipo celular que origina el tumor y su forma de crecimiento en los ganglios linfáticos se pueden distinguir diversos tipos anatomopatológicos

de linfomas no hodgkinianos, condicionando un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde una evolución extremadamente lenta a otros casos de rápida progresión fatal.

El concepto actual de neoplasia linfoide tiene su comienzo en 1832, cuando Thomas Hodgkin (55) describe una enfermedad tumoral propia de los ganglios linfáticos. Durante esa época, la histopatología era casi desconocida, pero fué Roulet (116) en 1930 quién logró clasificar, por primera vez, los linfomas malignos en linfosarcoma, enfermedad de Hodgkin y sarcoma de células reticulares.

En 1942, Gall y Mallory (36), reconociendo la escasa correlación entre hallazgos clínicos e histológicos, proponen una clasificación puramente histológica, en la que el linfosarcoma es dividido en linfomas, linfocítico y linfoblástico, y el sarcoma de células reticulares en linfomas, de célula primitiva y clasmatócítico. Además, reconocen como entidad propia al linfoma folicular. Posteriormente, surgen dos nuevos conceptos para clasificar los linfomas no hodgkinianos. Por un lado, Lennert (78) considera al linfoma folicular como una entidad citológicamente definida de neoplasias linfocitarias y reticulares y distingue dos grados de malignidad entre los linfomas. Por otro, Rappaport (104) señala que todos los tipos citológicos

de linfomas pueden ser nodulares y difusos. Así, surge la clasificación de Rappaport (cuadro I), que se basa fundamentalmente en criterios citológicos y distingue linfomas linfocíticos bien y escasamente diferenciados, mixtos (linfocítico-histiocítico), histiocíticos e indiferenciados, los cuales pueden ser, a su vez, nodulares o difusos. Esta clasificación que ha sido y es ampliamente utilizada tiene una buena reproductibilidad y correlación clínico-patológica. Sin embargo, también ha sido criticada por contener términos, considerados actualmente incorrectos, como los de linfoma nodular e histiocítico.

Numerosos investigadores (1,64,85,123) han reconocido nuevos tipos de neoplasias linfoides aplicando métodos inmunológicos, lo que ha permitido a Lukes y Collins (84) y Lennert y cols (79) desarrollar clasificaciones basadas en la existencia de sistemas celulares B y T y transformación linfocitaria. La clasificación de Lukes y Collins se apoya en la identificación morfológica e inmunológica de las células linfoides y en ella se introducen los términos de células centrofoliculares hendidas y no hendidas. Mediante esta clasificación, Lukes y cols (83) en un estudio de 425 linfomas no hodgkinianos encuentran un 74,8% de origen B, 19,5% de origen T, 4,5% indiferenciados y 0,2% histiocíticos, lo

que junto a otros estudios (127,145) pone de manifiesto que la mayoría de los linfomas no hodgkinianos son de origen B.

En 1974, el Club Europeo de linfomas discute en Kiel la clasificación propuesta por Lennert y cols (79) basada en aspectos citológicos e inmunológicos (cuadro II). En ella, las características estructurales como formación de folículos y tendencia a la fibrosis son aspectos secundarios y se distingue los linfomas de bajo grado de malignidad, compuestos de células pequeñas y ocasionalmente grandes, y los linfomas de alto grado de malignidad, constituidos por una población principalmente de grandes células blásticas.

Casi al mismo tiempo aparecen las clasificaciones de Dorfman (26) y de Bennet y cols (5) en las que la mayoría de los términos histogenéticos desacreditados son reemplazados por otros que indican el tamaño de las células linfoides, convirtiéndose éste, en el criterio principal para clasificar los linfomas.

En 1976, Mathé y cols (87) publican la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO) que reintroduce términos previamente abandonados y separa los tumores de la leucemia linfocítica crónica y otros síndromes linfoproliferativos, por lo que se considera una clasificación poco apropiada.

Los linfomas de bajo grado de malignidad constituyen un grupo heterogéneo cuando se comparan con la uniformidad de los de alto grado de malignidad y como consecuencia de que el grado de malignidad es mayor a medida que aumenta el número de blastos linfoides se propuso establecer un grado intermedio de malignidad. Por otro lado, al existir más similitudes que diferencias entre las distintas clasificaciones de uso habitual, Nathwani (92) sugirió la posibilidad de formular una clasificación unificada. Este intento se ha llevado a cabo por el " National Cancer Institute ", que merced a un grupo de expertos, ha elaborado la clasificación de la Formulación Internacional de Trabajo (94). Esta clasificación (cuadro III) incorpora conceptos y términos de las principales clasificaciones propuestas. Es además, el resultado de un estudio de 1175 linfomas no hodgkinianos basado en correlaciones clínicas, especialmente curvas de supervivencia, edad, sexo, lugares de presentación y estadio de enfermedad, prescindiendo de métodos inmunológicos. Los términos de bajo, intermedio y alto grado se emplean para definir tres grupos de malignidad según sea la supervivencia, relativamente favorable, intermedia y desfavorable, respectivamente. Para formar cada uno de los grupos se han utilizado criterios morfológicos, como tamaño de las células

linfoides y morfología nuclear, existencia o no de figuras de mitosis, patrón cromatínico y características nucleolares. Además de utilizar el término de folicular en vez de nodular para indicar el patrón arquitectural, en cada uno de los grupos se han establecido subgrupos atendiendo a la presencia de áreas difusas, esclerosis y células epitelioides. De esta manera se han obtenido 10 grupos principales de linfomas agrupados en tres categorías de malignidad y un grupo de miscelánea. Una conclusión interesante de éste estudio, en el que todos los linfomas se han revisado de acuerdo con las seis clasificaciones más importantes, ha sido la ausencia de notables diferencias en predecir la supervivencia de los pacientes, por lo que indistintamente de la clasificación utilizada, el pronóstico es, en general, comparable. La introducción del tamaño de las células linfoides y morfología nuclear en la nomenclatura y clasificación de los linfomas no hodgkinianos, así como su división en tres grados de malignidad, son las ventajas más importantes de esta clasificación, además de ofrecer un medio de traslación de la terminología de una clasificación a otra.

Recientemente, se ha establecido una correspondencia entre las clasificaciones de la Formulación Internacional de Trabajo y de Kiel (cuadro IV), lo



que ha modificado ligeramente la clasificación propuesta por el " National Cancer Institute ".Uno de los aspectos más importantes es que los linfomas foliculares según estén constituidos por un número de centroblastos inferior al 5%,entre 6 y 15%,entre 15 y 50% o superior al 50% se clasifican como linfomas foliculares de célula pequeña hendida,mixtos,de célula grande y linfomas difusos de célula grande.Por otro lado,para clasificar un linfoma folicular como tal,es necesario que al menos el 25% de su superficie sea folicular.Los inmunocitomas polimorfos de la clasificación de Kiel se incluyen dentro de los linfomas difusos mixtos de célula grande y pequeña,y los centroblásticos puros y polimorfos,además de los foliculares con más de un 50% de centroblastos y linfomas de núcleo multilobulado,se incluyen dentro de los linfomas difusos de célula grande en la clasificación de la Formulación Internacional de Trabajo.

Las diferentes afectaciones y localizaciones anatomoclínicas de los linfomas no hodgkinianos tienen su significación,especialmente,en cuanto al pronóstico.Esto quiere decir que conocer la extensión de la enfermedad y su distribución orgánica,en un paciente con linfoma,es tan importante como identificar el tipo histológico,entre otras cosas,porque puede proporcionar datos importantes en cuanto al

pronóstico y tratamiento. Por lo tanto, todo paciente con diagnóstico de linfoma no hodgkiniano debe ser encuadrado dentro de un sistema de clasificación anatomoclínica que indique su estadio o situación evolutiva.

Siguiendo los avances conseguidos en la enfermedad de Hodgkin se pretendió emplear en los linfomas no hodgkinianos los mismos métodos de estudio que habían dado un resultado eficaz. En la misma Conferencia de Ann Arbor (18), en 1971, se estableció que los estadios aceptados para la enfermedad de Hodgkin fueran también empleados en los linfomas no hodgkinianos. Los estadios clínico-patológicos que permiten conocer la extensión de la enfermedad (cuadro V) son los siguientes: Estadio I, cuando se afecta una sola región ganglionar; Estadio II, cuando se hallan afectas dos o más regiones ganglionares todas ellas por encima o por debajo del diafragma; Estadio III, cuando se hallan afectas varias regiones ganglionares por encima y por debajo del diafragma y Estadio IV, cuando se hallan afectos de forma difusa órganos parenquimatosos nobles como pueden ser hígado, pulmones, sistema nervioso central o médula ósea. Para clasificar a un paciente en estadio IV la afectación parenquimatosa debe ser difusa y toda afectación local se considera como extralinfática y se coloca

una " E " detrás del estadio que le corresponda. En todos los estadios se determina, además, si existen o no síntomas generalizados dando la calificación de A cuando éstos no existan y de B cuando éstos existan. Los síntomas generalizados, sistémicos o constitucionales son: adelgazamiento de más del 10% del peso corporal en menos de 6 meses, sudores nocturnos o fiebre de origen no infeccioso superior a 38°C.

Otras clasificaciones han sido propuestas para determinar el estadio de extensión de grupos bien establecidos de linfomas no hodgkinianos. Este es el caso de las leucemias linfocíticas crónicas y de los linfomas primarios gastrointestinales. Para los pacientes con LLC se ha propuesto, por un lado el sistema de estadiaje de Rai y cols (103) basado en datos clínicos y hematológicos, y por otro la clasificación de la " International Workshop " (11) que distingue los estadios clínicos A, B y C (cuadro VI). En los pacientes con linfoma 1º gastrointestinal se han empleado las clasificaciones de Ann Arbor modificada por Musshoff (142) y de Blackledge modificada (91) que establece 5 estadios diferentes (cuadro VII).

1.2.- EL SISTEMA CELULAR LINFOIDE. MODULACIÓN Y TRANS-  
FORMACIÓN CITOFUNCIONAL DE LOS SISTEMAS LINFOCITARIOS  
B Y T.

Merced a las observaciones de Hansen, Good y Finstad (41,44), en pacientes con inmunodeficiencia, hoy se sabe que el sistema celular linfoide está constituido por un compartimiento linfoide 1º o central, integrado en los mamíferos por la médula ósea y el timo, y un compartimiento linfoide 2º o periférico formado por los ganglios linfáticos, bazo, y organizaciones linfoides del tracto digestivo.

El sistema celular linfoide central carece en condiciones normales, de estructuras foliculares y adopta en el timo y equivalente bursal una disposición arquitectural con una estrecha relación linfo-epitelial. De ésta manera, las células epiteliales embrionarias de éstos órganos, a los que llegan durante la vida fetal, linfocitos indiferenciados procedentes del saco vitelino, hígado y posteriormente de la médula ósea, van a jugar un papel importante en el condicionamiento de los linfocitos B y T.

El sistema celular linfoide periférico está dotado de estructuras foliculares en el seno de una arquitectura linfohistiocitaria y en él se va a realizar la modulación citofuncional y proliferación antígeno-dependiente de la población celular linfoide, siendo el órgano efector de las reacciones inmunes.

Uno de los grandes avances de la inmunología

ha sido el descubrimiento de dos poblaciones linfocitarias, diferentes en cuanto a su origen, distribución anatómica, evolución madurativa y función (119).

Por un lado, se encuentra la población linfocitaria B de origen medular (equivalente bursal) desde donde siembran los territorios linfáticos periféricos, asentándose en la arquitectura de soporte retículo-histiocitaria. Tiene una localización preferentemente tisular, en las estructuras foliculares de los órganos linfoides periféricos y cordones medulares, ya que sólo el 20% de los linfocitos circulantes son B, siendo en su mayoría elementos de vida corta, días o semanas. Un linfocito que se origina de la población linfoide germinal de localización medular, antes de ser condicionado para convertirse en linfocito B, es una célula vírgen sin apenas marcadores biológicos de identificación. En algún momento de su evolución ontogénica se va a poner en contacto, por primera vez, con un determinante antigénico específico que es capaz de seleccionarlo para una respuesta inmune adecuada. En este contacto antígeno-linfocito es probable que intervenga el sistema mononuclear-fagocítico y la célula reticular dendrítica de las estructuras foliculares. Así, el linfocito B antígeno-estimulado encuentra en el folículo linfático un ambiente adecuado para su modulación y transformación citofuncional. El

concepto de transformación fué propuesto por Lukes y cols (83) al describir en los centros foliculares normales las células centrofoliculares hendidas y no hendidas, los macrófagos y las células reticulares dendríticas. Este concepto abarca una secuencia de transformación, desde el linfocito B pequeño del manto folicular a la célula centrofolicular grande no hendida y supone que el antígeno atrapado en el centro del folículo, sobre la membrana de las células reticulares dendríticas, induce al linfocito a sufrir transformación. En un primer estadio el linfocito pequeño cambia a célula centrofolicular pequeña hendida que, al aumentar gradualmente de tamaño y adquirir una pequeña proporción de citoplasma, alcanza el estadio de célula centrofolicular grande hendida. En el tercer estadio aparece la célula centrofolicular pequeña no hendida caracterizada por un citoplasma pironinófilo y núcleo redondo de cromatina dispersa y con un pequeño nucleolo. En el 4º estadio, la célula centrofolicular grande no hendida tiene un citoplasma amplio y acidófilo y muestra de 1 a 3 nucleolos situados sobre la membrana nuclear. Las células hendidas del centro folicular son, en su mayoría, células que no se dividen, mientras que las no hendidas forman parte de una población proliferante. La inmunoglobulina citoplásmica aparece en pequeña

cantidad, primero en la célula grande hendida y aumenta progresivamente en los estadios de célula pequeña y grande no hendidas (134). Por el contrario, la inmunoglobulina de superficie se visualiza en las células centrofoliculares pequeñas hendidas y en los linfocitos pequeños. La célula centrofolicular grande no hendida emigra desde el centro del folículo linfoide a la zona interfolicular, donde pasa a denominarse inmunoblasto B, que dotado de un complejo polirribosómico y retículo rugoso va a sintetizar de forma activa inmunoglobulinas. La última fase de la modulación linfocitaria se realiza fuera de los centros foliculares y finaliza con la formación de linfocitos B secretores, que son los elementos efectores de las reacciones inmunológicas de carácter humoral, al producir y secretar diferentes tipos de inmunoglobulinas. La respuesta inmune a un primer contacto antigénico se realiza habitualmente con anticuerpos de tipo IgM por células linfoplasmocitoides y aquellas que no se consumen en esta reacción inmune pasan a formar parte del "pool" de linfocitos B de memoria. Un nuevo contacto del mismo antígeno con un linfocito B de memoria origina una rápida proliferación de células plasmáticas con formación de anticuerpos específicos de tipo IgG e IgA (80,84). Esta secuencia de transformación es paralela a la evolución observada en los

linfomas de células centrofoliculares (83) y explicaría el porqué un linfoma que inicialmente es de célula pequeña hendida con escasa agresividad, se convierte mas tarde en un linfoma de célula grande no hendida con mayor agresividad. El concepto de célula centrofolicular permite relacionar los diferentes tipos citológicos de neoplasias centrofoliculares con sus contrapartes normales y comprender la evolución del proceso neoplásico en el sistema celular B.

Por otro lado, se encuentra la población linfocitaria T formada por elementos celulares emigrados, en épocas tempranas del desarrollo fetal, desde la población linfoide germinal hasta el esbozo epitelial del timo, donde son condicionados para ser linfocitos T. Se encuentra distribuida en las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos, regiones perivasculares del bazo y en pequeños focos en el tracto gastrointestinal, donde van a sufrir su modulación y proliferación antígeno-dependiente para convertirse en las distintas subpoblaciones de linfocitos T inmunológicamente efectores. La modulación citofuncional de la población linfoide T no es tan bien conocida como la de la población linfoide B. Se acepta que aquéllos elementos linfoides indiferenciados, que emigraron al esbozo epitelial del timo, van a ser condicionados para convertirse en timocitos y después



en linfocitos T periféricos. Tanto los timocitos como una parte de las células germinales medulares presentan actividad enzimática en TdT (deoxinucleotidil transferasa terminal) y poseen una amplia capacidad proliferativa antígeno-independiente. Un linfocito T dotado de todos sus marcadores biológicos pero sin actividad en TdT es una población celular pequeña, vírgen de todo contacto antigénico. En su estimulación parece colaborar el sistema mononuclear-fagocítico e incluso la célula reticular interdigitante, de manera que el linfocito T antígeno-estimulado, al carecer de la facultad de penetrar en el centro del folículo linfoide se sitúa en el espacio interfolicular o área T-dependiente. Allí, consigue transformarse y modularse en grandes elementos linfoides o inmunoblastos T, a través de los cuales se llega al estadio de linfocito T sensibilizado. Según los tipos de respuesta inmunológica que son capaces de originar se han identificado subpoblaciones de linfocitos T, como los efectores de diferentes reacciones de hipersensibilidad y los inmunoreguladores que pueden ser colaboradores o supresores de reacciones inmunes. Por último, aquéllos elementos linfoides que no se han consumido durante este primer contacto antigénico, quedan inmunológicamente marcados como linfocitos T de memoria, a la espera de un nuevo contacto antigé-

nico. La población linfoide T es una población celular muy viajera y a ella pertenecen más del 70% de los linfocitos circulantes, siendo además, elementos de vida larga, meses o años. Esta población está implicada en funciones de inmunidad celular que realiza a través de la secreción de sustancias llamadas linfoquinas.

### 1.3.- ASPECTOS TÉCNICOS Y DESARROLLO DE MÉTODOS INMUNOLÓGICOS PARA EL RECONOCIMIENTO DE MARCADORES CELULARES.

Diferentes técnicas se han desarrollado para identificar marcadores celulares facilitando así, el reconocimiento de las células linfoides. Entre ellas, las que permiten identificar marcadores de superficie linfocitarios en suspensión y las técnicas de inmunohistoquímica son las más importantes (65).

Los estudios con marcadores de superficie en suspensión han sido ampliamente utilizados y pueden aplicarse tanto a linfocitos sanguíneos como a células linfoides aisladas de los ganglios linfáticos. La caracterización de inmunoglobulina de superficie (SIg) mediante el marcaje de anticuerpos constituye un método aceptable para identificar células B y, en base a su monoclonalidad, separar poblaciones de células linfoides neoplásicas de reactivas. Las células T y subgrupos también pueden ser reconocidas por anticuerpos contra antígenos de superficie.

Uno de los mayores inconvenientes cuando se estudian suspensiones celulares obtenidas de una biopsia ganglionar es que no se puede asegurar un correcto aislamiento de las células linfoides. Esto puede ser debido a una mayor fragilidad de los elementos celulares o a su adherencia a una trama reticulínica, lo cual hace difícil su obtención. También es difícil la interpretación de los resultados ya que sólo a veces, una pequeña fracción de las células son realmente neoplásicas (86). Por el contrario, pequeños grupos de linfocitos neoplásicos pueden ser fácilmente detectados cuando se utilizan técnicas de marcaje inmunohistoquímicas. Además, al conservarse la arquitectura tisular permite establecer una relación topográfica entre las células neoplásicas y reactivas.

Mediante técnicas de marcaje inmunohistoquímicas se pueden estudiar tanto secciones criostáticas como secciones fijadas e incluidas en parafina. En secciones criostáticas mediante anticuerpos contra cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas se puede detectar la presencia de SIg y mediante anticuerpos monoclonales, dirigidos principalmente contra células B y T, se puede identificar antígenos de diferenciación linfocitarios. Por el contrario, en secciones incluidas en parafina sólo es posible determinar la presencia de inmunoglobulinas intracito-

plasmáticas. El tejido congelado tiene la ventaja de conservar los antígenos y receptores de superficie membránica, pero la valoración morfológica del tejido no es buena, su manejo y almacenamiento es algo complicado y los antígenos solubles tanto intracelulares como extracelulares pueden difundir de sus lugares originales. El tejido incluido en parafina ofrece como ventaja una óptima conservación de la morfología tisular, pero uno de los mayores inconvenientes es la desnaturalización de la mayoría de los antígenos, principalmente extracelulares (86). El tejido antes de ser incluido en parafina tiene que ser fijado y de la elección del fijador va a depender el posterior resultado inmunológico. El formol tiene un efecto deletéreo sobre muchos antígenos y también sobre la inmunoglobulina celular (38). Por ello, distintos autores (2,135) han empleado fijadores como el B5, formalina tamponada, fijador de Zencker y de Bouin, con resultados variables.

Un aspecto interesante es el tratamiento de las secciones tisulares incluidas en parafina con enzimas proteolíticas del tipo tripsina, pronasa y pepsina, con el fin de restaurar la reactividad antigénica que ha sido enmascarada por la fijación, además de disminuir la tinción de fondo de las secciones tisulares (50,54).

Desde los primeros trabajos de Jaffé y cols (60,61) que utilizan secciones criostáticas, muchos otros han adoptado este método con resultados satisfactorios. Sin embargo, también hay métodos que permiten identificar antígenos de superficie linfocitarios en material fijado e incluido en parafina (12, 133). Desgraciadamente, los tiempos de incubación son excesivamente largos y los reactivos no siempre están al alcance de todos los laboratorios.

Los procedimientos de marcaje inmunohistoquímicos abarcan desde métodos de inmunofluorescencia hasta métodos inmunoenzimáticos (86).

El marcaje con inmunofluorescencia ha sido muy utilizado para demostrar la monoclonalidad de las neoplasias linfoides B (81,138), pero ha sido desplazado por la técnica de marcaje inmunoenzimática. En este sentido, fué Sternberger (129) quién describió por primera vez la técnica de PAP o peroxidasa-anti-peroxidasa, que ofrece una serie de ventajas sobre la técnica de inmunofluorescencia. En primer lugar, permite una valoración citológica y arquitectural adecuadas merced al contraste con hematoxilina, y en segundo lugar posibilita el guardar indefinidamente el material para estudios retrospectivos.

Las posibilidades de marcaje con peroxidasa incluyen un procedimiento de inmunoperoxidasa indirecta

con uno o dos puentes, permitiendo dos puntos diferentes de reacción de la peroxidasa con el substrato, y un procedimiento de peroxidasa-antiperoxidasa con un puente previo conejo anti-ratón. Recientemente, Hsu y cols (57) han empleado un método basado en la interacción de la avidina, una glicoproteína, con la biotina, una vitamina, constituyendo un método sencillo y sensible para localizar antígenos, tanto en tejido congelado como incluido en parafina. Este método o técnica ABC, merced a la unión irreversible del complejo peroxidasa avidina-biotina con la biotina asociada al 2º anticuerpo, da como resultado una elevada intensidad de tinción.

Todas estas técnicas inmunológicas tienen una serie de limitaciones y problemas en su aplicación que no siempre son reconocidas. Unas veces se deben a la defectuosa congelación del material y posterior almacenamiento y otras a los antisueros utilizados. Por ello, siempre es necesario utilizar preparaciones de control en cada estudio con el fin de evitar errores en la interpretación de los resultados. Estos pueden ser debidos a la variación en la distribución de las proteínas plasmáticas, a la mala conservación de la inmunoreactividad tisular con algunos fijadores y a la unión inespecífica de los antisueros (2).

Warnke y Rouse (137) han indicado la necesi-

dad de integrar los resultados inmunológicos con los datos clínicos y hallazgos histológicos y lo que es más importante, que un diagnóstico histológico correcto siempre tiene preferencia sobre los hallazgos inmunológicos.

#### 1.4.-MARCADORES INMUNOLÓGICOS Y ESTADÍOS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR. APLICACIÓN DE MARCADORES LINFOCITARIOS AL ESTUDIO DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS.

En la población linfoide total hay subgrupos de linfocitos con diferentes capacidades funcionales que pueden ser distinguidos por métodos enzimáticos y criterios morfológicos (42). Sin embargo, el método más práctico y preciso consiste en identificar marcadores de superficie y citoplásmicos.

La población linfoide B adquiere a lo largo de su evolución ontogénica una serie de estructuras antigénicas y funcionales que se comportan como marcadores biológicos de identificación. Los primeros marcadores adquiridos por los linfocitos pre-B son la estructura antigénica HLA-Dr y la síntesis de CIgM (39). Los antígenos Ia o inmune-relacionados son glicoproteínas compuestas de una cadena pesada y ligera de 35000 y 27000 daltons, respectivamente (8,58). Inicialmente se creía que los antígenos Ia se encontraban sólo en los linfocitos B, pero hoy se sabe que también están presentes en monocitos

(9), células mieloides inmaduras y posiblemente eritroides (22,147), linfocitos T activados (30), una subpoblación de linfocitos T periféricos sanguíneos (35) y algunas células no hematopoyéticas, como las células epidérmicas. Parece existir una estrecha relación entre los antígenos Ia y los genes del locus HLA-D, por eso el término HLA-Dr es, con frecuencia, utilizado para señalar los antígenos Ia sobre las células humanas. La presencia de SIg en la membrana celular, principalmente IgM asociada a IgD, es el marcador más fidedigno para identificar un linfocito B (31). El receptor para el fragmento Fc de diferentes inmunoglobulinas, el receptor capaz de formar rosetas con hematíes murinos (rosetas M) y los receptores para diversas piezas del complemento, fundamentalmente para C3 (115), son también considerados como marcadores que permiten el reconocimiento de los linfocitos B. En las células plasmáticas desaparece la SIg y vuelve a aparecer en proporciones elevadas CIg de diferente naturaleza, que a diferencia de los linfocitos pre-B, incluye tanto cadenas pesadas como ligeras.

A lo largo de su evolución ontogénica los linfocitos T también adquieren una serie de estructuras antigénicas o marcadores biológicos de identidad, aunque aún no se conoce del todo su secuencia de aparición. Inicialmente se descubre



la actividad enzimática de una DNA-polimerasa, la deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) que parece compartida por otras poblaciones hematopoyéticas, entre las que se encuentran células progenitoras B. La presencia de un receptor específico de membrana capaz de formar rosetas espontáneamente con hematíes de carnero (rosetas E) es el marcador más característico de los linfocitos T, tanto tímicos como periféricos (13,76). Los linfocitos T pueden ser identificados por su reactividad con antisueros anti-T, obtenidos inmunizando conejos con timocitos humanos (126).

En condiciones normales existe una pequeña fracción de linfocitos sanguíneos que carecen de los marcadores de membrana más característicos de los linfocitos B y T circulantes, por lo que se denominan linfocitos no-B, no-T o linfocitos inmunológicamente nulos. Es probable que más de una tercera población celular se trate de un grupo funcionalmente heterogéneo formado por células germinales hematopoyéticas circulantes, células B y T inmaduras que aún no han adquirido receptores E o SIg y ciertos precursores mieloides y eritroides.

En 1975, Köhler y Milstein (69) consiguen obtener, por primera vez, anticuerpos monoclonales a partir de poblaciones celulares compuestas por células híbridas, que se obtienen mediante la fusión

de una célula productora de anticuerpos del bazo de un animal bien inmunizado con el antígeno en cuestión y una célula de mieloma no secretora de inmunoglobulinas. Su utilidad radica no sólo en separar poblaciones linfocitarias B y T, y dentro de ellas subgrupos funcionales, sino también en identificar la célula responsable de una proliferación leucémica o linfomatoso, así como conocer su estado de diferenciación.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales contra diferentes estructuras antigénicas de la población linfoide B (31) ha permitido identificar toda una serie de antígenos B con una secuencia de aparición cada vez mejor conocida, desde la "Stem Cell" o célula madre linfoide hasta la célula plasmática. Así, el antígeno definido por el anticuerpo B1 se encuentra en la mayoría de los linfocitos B, como en las células pre-pre-B, pre-B, B precoz, B intermedia, B madura y plasmocitoide y está ausente tanto en las células plasmáticas como en la "Stem Cell" linfoide. El antígeno B2 es expresado sólo por las células B intermedias y a veces por las células B maduras, mientras que el antígeno BA-1 está presente en la célula B precoz, intermedia y plasmocitoide, y en ocasiones en la célula madre linfoide, en la célula pre-pre-B, pre-B y célula B

madura. Por último, el antígeno CALLA está ausente en la célula madre linfóide y presente en la célula pre-pre-B, pre-B y B precoz.

Knowles y cols (66) también han definido los anticuerpos monoclonales de la serie OKB (Corporación Farmacéutica Ortho) en las células linfoides B, estableciendo diferentes estadios de diferenciación. De esta manera, la célula B dentro del hígado fetal expresa el anticuerpo OKB 2 y en la zona del manto folicular del tejido linfóide maduro los anticuerpos OKB 1, OKB 2 y OKB 7. En los folículos linfoides las células muestran reactividad con los anticuerpos OKB 1, OKB 2, OKB 4 y OKB 7, las células B interfoliculares expresan los anticuerpos OKB 1, OKB 2 y OKB 7 y finalmente las células plasmáticas carecen de anticuerpos OKB.

De la misma manera, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes estructuras antigénicas tímicas (29,107) han permitido la identificación de una serie de antígenos T con una determinada secuencia de aparición. Los 2 grupos de anticuerpos monoclonales anti-T más estudiados son los de la serie OKT (Corporación Farmacéutica Ortho) y Leu (Becton-Dickinson y Co). Los timocitos inmaduros se identifican merced a los anticuerpos OKT 10 y OKT 9 y el anticuerpo OKT 6 caracteriza a los timocitos

comunes. Los anticuerpos OKT4/Leu-3 permiten identificar subpoblaciones linfoides T inductoras/colaboradoras (55-65% de los linfocitos T circulantes), mientras que los anticuerpos OKT5/OKT8/Leu-2 reconocen subpoblaciones con actividad citotóxica/supresora (20-30% de los linfocitos T circulantes). Los anticuerpos OKT1/Leu-1 y OKT3/Leu-4 detectan linfocitos T maduros, e incluso la capacidad de formar rosetas E se encuentra ligada a un antígeno identificable por los anticuerpos OKT11/Leu-5 en todos los estadios madurativos.

Foon y cols (31) han establecido un esquema de diferenciación celular en el que el fenotipo de una célula linfoide normal en cada estadio de diferenciación es equiparable al fenotipo de su contraparte maligna.

La LLC constituye una proliferación monoclonal de linfocitos B con SIg membránica de tipo IgM asociada a IgD y una cadena ligera de inmunoglobulina, bien kappa o bien lambda. Las células linfoides se caracterizan por expresar los antígenos Ia, B1, BA-1, así como los anticuerpos OKB1, OKB2, OKB4 y OKB7. Las células de la leucemia prolinfocítica, probablemente una variante de LLC, muestran una mayor densidad de SIg que las células de la LLC y también expresan los antígenos Ia y B1.

Aproximadamente el 5% de las LLC y leucemias

prolinfocíticas son el resultado de una proliferación de células T que carecen de SIg (15) y presentan positividad con los anticuerpos monoclonales contra células T. Generalmente tienen un fenotipo inductor/co-laborador aunque también se han identificado algunos casos con fenotipo citotóxico/supresor(120). Los anticuerpos OKT1/Leu-1 con frecuencia están presentes en las células de la LLC B y leucemia prolinfocítica B, pero los anticuerpos que identifican subpoblaciones T, OKT4/Leu-3 y OKT5/OKT8/Leu-2 están ausentes en estas células.

Los linfomas foliculares representan proliferaciones de linfocitos B de origen centrofolicular y pueden, en ocasiones, tener expresión hemoperiférica. Las células centrofoliculares se caracterizan por tener una elevada densidad de SIg monoclonal y expresar los antígenos Ia, BA-1, B1 así como los anticuerpos OKB1, OKB2, OKB4 y OKB7 en la mayoría de los casos. Pueden tener el antígeno B2 y casi siempre expresan el anticuerpo monoclonal CALLA, que identifica el antígeno presente en las células de la leucemia linfoblástica aguda común.

Una gran proporción de los linfomas difusos son linfomas B y tienen fenotipos similares a los observados en los linfomas foliculares. Del 50 al 60% de los linfomas difusos de célula grande tienen

un fenotipo B, aproximadamente el 15% tienen marcadores T y del 15 al 25% son inmunológicamente nulos, es decir, no-B, no-T (93).

Los linfomas T-periféricos se caracterizan desde el punto de vista morfológico por presentar linfocitos T junto a histiocitos epitelioides, células plasmáticas, eosinófilos y una importante proliferación vascular. Todos ellos exhiben un fenotipo de célula T madura, bien con características inductoras/colaboradoras (OKT4/Leu-3) o citotóxicas/supresoras (OKT8/Leu-2). De la misma manera que algunas leucemias y linfomas B presentan reactividad con los anticuerpos anti-T (OKT1/Leu-1) algunos de los linfomas T-periféricos expresan el anticuerpo monoclonal OKB1 (66).

Los linfomas linfoblásticos representan el 33% de los linfomas no hodgkinianos en la infancia y el 5% en los adultos, tienen una predilección por el sexo masculino y clínicamente se caracterizan por presentar masa mediastínica. La fase leucémica de algunos de ellos es morfológicamente indistinguible de la LLA-T y son linfomas constituidos por células T. Estudios con anticuerpos monoclonales han demostrado que la mayoría de los linfomas linfoblásticos tienen fenotipos de timocito común (OKT10, OKT6, OKT4/Leu-3 y OKT5/OKT8/Leu-2) y de timocito maduro (OKT1/Leu-1, OKT11/Leu-5, OKT10, OKT4/Leu-3, OKT5/OKT8/Leu-2 y

OKT3/Leu-4), lo que indica un origen tímico (107). Por el contrario, las células de la LLA-T normalmente tienen un fenotipo de timocito inmaduro (OKT10, OKT9, OKT1/Leu-1 y OKT11/Leu-5) (6). El antígeno CALLA se encuentra con mayor frecuencia en los linfomas linfoblásticos que en las LLA-T (110).

Las células del linfoma de Burkitt además de expresar los antígenos Ia y CALLA muestran SIg de tipo IgM y el antígeno B1 pero no el antígeno B2, lo cual sugiere un origen a partir de una célula centrofolicular menos inmadura.

Las células linfoides que componen los linfomas plasmocitoides y mielomas se encuentran en el estadio final de la maduración celular B. Las células de los linfomas plasmocitoides muestran S y CIg, y expresan los antígenos Ia, B1, OKB1, OKB2, OKB4 y OKB7. Las células plasmáticas y su contraparte maligna, la célula del mieloma, son los linfocitos B más diferenciados, sintetizan grandes cantidades de CIg, carecen de SIg, así como de los antígenos B1, B2, Ia, CALLA y antígenos de la serie OKB. Sólo en algunos casos se ha observado positividad de éstas con el anticuerpo OKT10 (7).

Las micosis fungoides representan proliferaciones malignas de linfocitos T, tienen un fenotipo de célula T madura (OKT1/Leu-1, OKT11/Leu-5 y OKT3/Leu-

4) y la mayoría expresan un fenotipo inductor/colaborador (OKT4/Leu-3) (51,72).

La leucemia de células peludas o reticuloendoteliosis leucémica, caracterizada por la invasión de la médula ósea y del bazo por células mononucleares con pequeñas proyecciones citoplásmicas, tiene un fenotipo de célula B madura. La presencia de SIg y antígenos Ia y B1 pone de manifiesto su naturaleza B (19,40).

Como han señalado Warnke y Link (139) el estudio inmunológico con marcadores celulares no sólo tiene un significado biológico sino también diagnóstico y pronóstico. En primer lugar, los marcadores celulares permiten establecer el origen de las diferentes neoplasias linfoides, conocer su estadio de diferenciación y obtener datos para su correlación con parámetros clínicos y biológicos. En segundo lugar, juegan un papel importante en el diagnóstico ya que en los linfomas foliculares y proliferaciones linfocíticas pequeñas extralinfáticas, la monoclonalidad demostrada mediante la tipificación con cadenas ligeras de inmunoglobulinas, permite el diagnóstico de linfoma. Además, su utilidad ha quedado demostrada al resolver situaciones de diagnóstico diferencial como las planteadas entre linfomas de alto grado de malignidad y carcinomas indiferenciados (73,74,100).



Por último, la relación entre los marcadores inmunológicos y el pronóstico ha sido establecida por Lauder y cols (75) demostrando una escasa respuesta al tratamiento en pacientes cuyos linfomas expresan monoclonalidad para cadenas ligeras lambda.

CUADRO I.- CLASIFICACIÓN DE RAPPAPORT DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS (1966).

NODULAR	DIFUSO
L.Linfocítico bien diferenciado L.Linfocítico pobremente diferenciado. L.Mixto (linfocítico-histiocítico). L.Histiocítico. L.Indiferenciado.	

CUADRO II.- CLASIFICACIÓN DE KIEL DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS (1974).

BAJO GRADO DE MALIGNIDAD
L.Linfocítico. LLC B. LLC T. L.Zona T. Tricoleucemia. Micosis fungoide. Inmunocitoma (L.Linfoplasmocítico/citoide). L.Centrocítico. L.Centroblástico/centrocítico (con o sin esclerosis) Folicular. Folicular y difuso. Difuso.
ALTO GRADO DE MALIGNIDAD
L.Centroblástico. L.Linfoblástico. Tipo Burkitt. Tipo células giriformes. Otros. L.Imunoblástico.

CUADRO III.- CLASIFICACIÓN DE LA FORMULACIÓN INTERNACIONAL DE TRABAJO DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS 1981.

BAJO GRADO DE MALIGNIDAD	
A.- L.M.LINFOCÍTICO PEQUEÑO:	. LLC Plasmocitoide
B.- L.M.FOLICULAR DE CÉLULA PEQUEÑA HENDIDA:	Con áreas difusas Con esclerosis
C.- L.M.FOLICULAR MIXTO DE CÉLULA PEQUEÑA HENDIDA Y GRANDE:	Con áreas difusas Con esclerosis
GRADO INTERMEDIO DE MALIGNIDAD	
D.- L.M.FOLICULAR DE CÉLULA GRANDE:	Con áreas difusas Con esclerosis
E.- L.M.DIFUSO DE CELULA PEQUEÑA HENDIDA:	Con esclerosis
F.- L.M.DIFUSO MIXTO DE CÉLULA PEQUEÑA Y GRANDE:	Con esclerosis Con células epitelioides
G.- L.M.DIFUSO DE CELULA GRANDE:	Con células hendidas Con células no hendidas Con esclerosis
ALTO GRADO DE MALIGNIDAD	
H.- L.M.DE CÉLULA GRANDE INMUNOBLÁSTICO:	Plasmocitoide Con células claras Polimorfo Con células epitelioides
I.- L.M.LINFOBLÁSTICO:	De células giriformes De células no giriformes
J.- L.M.DE CÉLULA PEQUEÑA NO HENDIDA:	Tipo Burkitt Con áreas foliculares
MISCELANEA	
L.M.Compuesto. Micosis Fungoides. L.M.Histiocítico. Plasmocitoma extramedular. Inclasificables. Otros.	

CUADRO IV.- CORRELACIÓN ENTRE LAS CLASIFICACIONES DE KIEL Y DE LA FORMULACIÓN INTERNACIONAL DE TRABAJO.

KIEL	F.I.T.
LLC	A
Inmunocitoma (cítico/citoide)	A
Folicular centroblástico/centrocítico:menos del 5% de centroblastos	B
Folicular centroblástico/centrocítico:entre el 6 y 15% de centroblastos	C
Folicular centroblástico/centrocítico:más del 15% de centroblastos	D
Foliculares y difusos (25% de aspecto folicular) son clasificados en función del N° de centroblastos en	B,C o D
Centrocíticos difusos	E
Centroblástico/centrocítico difuso	F
Inmunocitoma polimorfo	F
Centroblástico:Folicular con más de 50% de centro- blastos	G
Difuso	G
Pleomórfico	G
De núcleo multilobulado	G
Primario o secundario	G
Inmunoblástico:Puro	H
Con diferenciación plasmocitoide	H
Linfoblástico B o T	I
Burkitt	J

CUADRO V.- CLASIFICACIÓN DE ANN ARBOR PARA EL ESTADIAJE DE LA ENFERMEDAD DE HODGKIN Y DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS (1971).

ESTADÍO I:Afectación de una sola región ganglionar (I) o una sola localización u órgano extralinfático (Ie).

ESTADÍO II:Afectación de 2 o más regiones ganglionares al mismo lado del diafragma (II) o afectación localizada de un órgano o localización extralinfática y una o más regiones ganglionares al mismo lado del diafragma (IIe).

ESTADÍO III:Afectación de regiones ganglionares a ambos lados del diafragma (III) las cuales pueden acompañarse de afectación localizada de un órgano o localización extralinfática (IIIe),o del bazo (IIIIs) o ambas (IIIse).

ESTADÍO IV:Afectación difusa o diseminada de uno o más tejidos u órganos extralinfáticos con o sin afectación de regiones ganglionares.

CUADRO VI.-CLASIFICACIÓN DE LA "INTERNATIONAL WORKSHOP" PARA EL ESTADIAJE DE LAS LLC (1981).

ESTADÍO CLÍNICO A:Ausencia de anemia y trombocitopenia y menos de 3 áreas linfoides afectadas.

ESTADÍO CLÍNICO B:Ausencia de anemia y trombocitopenia con 3 o más áreas afectadas.

ESTADÍO CLÍNICO C:Presencia de anemia y/o trombocitopenia independientemente del número de áreas linfoides afectadas.

#### ÁREAS DE AFECTACIÓN

Ganglios linfáticos axilares  
 Ganglios linfáticos cervicales  
 Ganglios linfáticos inguinales  
 Hígado  
 Bazo

CUADRO VII.- CLASIFICACIÓN DE BLACKLEDGE MODIFICADA  
PARA EL ESTADIAJE DE LOS LINFOMAS GASTROINTESTINALES  
(1985).

ESTADÍO I

Tumor confinado al tracto gastrointestinal

ESTADÍO II

Tumor con afectación ganglionar local  
(Ganglios linfáticos mesentéricos)

ESTADÍO III

Tumor con perforación y/o peritonitis

ESTADÍO IV

Tumor con afectación ganglionar diseminada  
(Ganglios para-aórticos o más lejanos)

ESTADÍO V

Tumor con enfermedad diseminada extraganglionar

II.- OBJETIVOS.

1º.-Valoración de la frecuencia y distribución de los diferentes tipos de linfomas no hodgkinianos y mielomas, estudiados en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital "La Fé" entre los meses de Noviembre de 1984 a 1986, así como de los parámetros clínicos edad, sexo y estadio clínico-patológico en cada uno de ellos.

2º.-Reconocimiento de los linfomas no hodgkinianos y mielomas mediante criterios cito-histológicos y ultraestructurales. Clasificación de los linfomas no hodgkinianos según el sistema de la Formulación Internacional de Trabajo.

3º.-Caracterización inmunológica de los órganos linfoides, linfomas no hodgkinianos y mielomas mediante un procedimiento de inmunoperoxidasa en tejido congelado e incluido en parafina y de inmunofluorescencia en células en suspensión de la sangre periférica, con la finalidad de:

- \* Conocer la inmunomorfología de los órganos linfoides (tejido linfoide ganglionar, esplénico y tímico).
- \* Determinar el fenotipo inmunológico y estadio de diferenciación de los linfomas no hodgkinianos y mielomas detectando S y CIg y antígenos de diferenciación linfocitarios.
- \* Valorar la utilidad de los marcadores inmunológicos en el diagnóstico general de los linfomas no



hodgkinianos y en el diagnóstico diferencial entre hiperplasia folicular y linfoma folicular.

- \* Estudiar la población y subpoblaciones de linfocitos T en las hiperplasias foliculares, linfomas no hodgkinianos y mielomas.
- \* Analizar la relación entre la expresión monoclonal de cadenas ligeras por los linfomas y su clasificación en tres categorías de malignidad.

III.- MATERIAL Y METODOS.

### 3.1.- MATERIAL.

#### 3.1.1.- BIOPSIAS Y MUESTRAS DE SANGRE.

De un total de 23712 biopsias registradas durante un periodo de 2 años, entre los meses de Noviembre de 1984 a 1986, hemos estudiado 278 biopsias y distribuido de la siguiente manera:

- 14 biopsias corresponden a pacientes con diagnóstico histológico de hiperplasia folicular reactiva y proceden de biopsia ganglionar (9 casos), de bazo (3 casos), de amígdala faríngea (1 caso) y de timo (1 caso).

- 106 biopsias corresponden a pacientes con diagnóstico histológico de linfoma no hodgkiniano y proceden de biopsia ganglionar (50 casos), de médula ósea (28 casos), de bazo (9 casos), de estómago (7 casos), de intestino delgado (4 casos), de hueso y partes blandas (2 casos), de pulmón (2 casos), de cerebro (1 caso), de intestino grueso (1 caso), de pleura (1 caso) y de piel (1 caso).

- 20 biopsias corresponden a pacientes con diagnóstico histológico de mieloma y proceden de biopsia ósea (10 casos), de médula ósea (8 casos), de hígado (1 caso) y de tumor bronquial (1 caso).

- 139 biopsias son complementarias, se realizaron en pacientes con linfoma y mieloma para determinar la extensión del proceso neoplásico y proceden de

biopsia de médula ósea (90 casos), de hígado (19 casos), de ganglios linfáticos (10 casos), de piel (9 casos), de bazo (3 casos), de glándula parótida (3 casos), de pleura (2 casos), de amígdala (2 casos) y de mucosa oral (1 caso).

En fresco se remitieron 42 biopsias y en formaldehído 98, además de las biopsias complementarias. También hemos estudiado el material necrótico de 6 pacientes que fallecieron por diseminación de su linfoma.

Por otro lado, hemos estudiado 23 muestras de sangre periférica correspondientes a 20 pacientes con LLC, a 2 pacientes con linfoma folicular de célula pequeña hendida y a un paciente con linfoma linfoblástico. Todas las muestras sanguíneas presentaban un recuento de linfocitos superior a  $4 \times 10^9 / l$ , fueron extraídas en el Servicio de Hematología y Hemoterapia y enviadas al banco de sangre para su estudio inmunológico.

### 3.1.2.- PACIENTES.

Los pacientes que hemos estudiado se han clasificado en los siguientes grupos:

#### A.- ÓRGANOS LINFOIDES.

Hemos incluido 14 pacientes, entre 10 y 58 años, de los que 9 eran hombres y 5 mujeres. De ellos, 9 fueron sometidos a exéresis de ganglios

linfáticos por crecimiento de una o varias adenopatías y 3 fueron esplenectomizados, 2 por púrpura trombocitopénica idiopática y 1 para estudio de extensión de su linfoma. Un paciente fué amigdalectomizado por un proceso infeccioso y otro fué sometido a timectomía por Miastenia grave. En todos los casos se ha demostrado histológicamente una hiperplasia folicular inespecífica.

#### B.- LINFOMAS NO HODGKINIANOS.

Aquí hemos incluido 106 pacientes con diagnóstico histológico de linfoma no hodgkiniano. En todos se ha determinado el estadio clínico-patológico de extensión de la enfermedad según el sistema de estadiaje de Ann Arbor (18). Además, en los pacientes con linfoma 1º gastrointestinal hemos utilizado el sistema de Blackledge modificado (91) y con la LLC la clasificación de la "International Workshop" (11). Los linfomas se han agrupado según la clasificación de la Formulación Internacional de Trabajo (94) en los siguientes grupos:

##### LINFOMAS DE BAJO GRADO DE MALIGNIDAD.

a).-LINFOMA LINFOCÍTICO PEQUEÑO: Hemos incluido 26 LLC, 16 linfomas plasmocitoides y 1 linfoma T-periférico. La edad de los pacientes con LLC oscila entre 43 y 87 años, 11 son hombres y 15 mujeres y todos tienen un recuento de linfocitos en sangre periférica

superior a  $4 \times 10^9$  /l e invasión de la médula ósea. El patrón histológico de invasión medular es nodular en 5 casos, intersticial en 9, mixto en 7 y difuso en 5. En estadio A se encuentran 17 pacientes, en estadio B 5 y en estadio C 4, según la clasificación de la "International Workshop" (11). Un paciente falleció y en el estudio necrópsico se demostró enfermedad diseminada.

Las edades de los pacientes con linfoma plasmocitoide están comprendidas entre 17 y 82 años, 9 son hombres y 7 mujeres y 3 muestran un número de linfocitos en sangre periférica de 20,10 y 15,5  $\times 10^9$  /l, respectivamente. Un paciente se encuentra en estadio I, 2 en estadio II, 3 en estadio III y 10 en estadio IV, éstos además con invasión de la médula ósea. Los linfomas de localización ganglionar son 13 y extraganglionar 3 (1 en cerebro, 1 en estómago y 1 en bazo). Ocho pacientes presentan gammapatía monoclonal en suero, 4 IgM/lambda, 2 IgM/kappa, 1 IgG/lambda y 1 IgG/kappa. Dos de ellos tienen proteinuria de Bence-Jones kappa y lambda, respectivamente. Un paciente con LLC de 5 años de evolución falleció y en la autopsia se puso de manifiesto un linfoma plasmocitoide diseminado.

Un hombre de 68 años con un linfoma T-periférico de localización ganglionar se encuentra

en estadio IV y presenta además, afectación cutánea, invasión de la médula ósea e hipergammaglobulinemia sérica policlonal.

b).- LINFOMA FOLICULAR DE CÉLULA PEQUEÑA HENDIDA: Aquí hemos estudiado 9 pacientes, entre 36 y 78 años, de los que 6 son hombres y 3 mujeres. Tres de ellos presentan  $5,2$  ,  $15$  y  $29 \times 10^9/l$  linfocitos en sangre periférica, respectivamente. Un paciente se encuentra en estadio I, 1 en estadio II, 2 en estadio III y 5 en estadio IV, 4 de ellos con invasión de la médula ósea. Los linfomas de localización ganglionar son 5 y extraganglionar 4 (2 en bazo, 1 en pulmón y 1 en estómago).

c).- LINFOMA FOLICULAR MIXTO DE CÉLULA GRANDE Y PEQUEÑA HENDIDA: Hemos incluido 6 pacientes entre 49 y 68 años, 3 hombres y 3 mujeres y uno de ellos con  $10,5 \times 10^9/l$  linfocitos en sangre periférica. Un paciente está en estadio II, uno en estadio III y 4 en estadio IV, además con invasión de la médula ósea. Cuatro linfomas son de localización ganglionar y 2 extraganglionar (en bazo).

#### LINFOMAS DE GRADO INTERMEDIO DE MALIGNIDAD

d).- LINFOMA FOLICULAR DE CÉLULA GRANDE: Cuatro pacientes, 2 hombres y 2 mujeres, entre 36 y 57 años y uno de ellos con  $122 \times 10^9/l$  linfocitos en sangre periférica, se han incluido en este grupo. Un paciente se encuentra

en estadio I,1 en estadio II,1 en estadio III y 1 en estadio IV, con invasión de la médula ósea. Tres linfomas son de localización ganglionar y 1 extraganglionar (en estómago).

e).- LINFOMA DIFUSO DE CÉLULA PEQUEÑA HENDIDA: Aquí hemos incluido 4 pacientes, entre 46 y 70 años, 2 hombres y 2 mujeres y 2 de ellos con  $7,5$  y  $8,5 \times 10^9$ /l linfocitos en sangre periférica, respectivamente. Los pacientes se encuentran 1 en estadio III y 3 en estadio IV, 2 de ellos con invasión de la médula ósea. Los linfomas de localización ganglionar son 3 y extraganglionar 1 (en intestino delgado).

f).- LINFOMA DIFUSO MIXTO DE CÉLULA GRANDE Y PEQUEÑA: En este grupo hemos estudiado 8 pacientes, 2 hombres y 6 mujeres, entre 30 y 81 años. Dos pacientes están en estadio I, 1 en estadio II, 1 en estadio III y 4 en estadio IV, 2 de ellos con invasión de la médula ósea. Cinco linfomas son de localización ganglionar y 3 extraganglionar (1 en pulmón, 1 en estómago y 1 en intestino delgado). Un paciente falleció y en el examen postmortem se puso de manifiesto enfermedad diseminada.

g).- LINFOMA DIFUSO DE CÉLULA GRANDE: Aquí hemos incluido 12 pacientes, 8 hombres y 4 mujeres, entre 14 y 81 años. Los pacientes se encuentran 5 en estadio I, 3 en estadio II, 2 en estadio III y 2 en estadio



IV, con invasión de la médula ósea. Ocho linfomas son de localización ganglionar y 4 extraganglionar (3 en estómago y 1 en intestino delgado).

#### LINFOMAS DE ALTO GRADO DE MALIGNIDAD

h).- LINFOMA DE CÉLULA GRANDE INMUNOBLÁSTICO: Hemos incluido 6 pacientes, 5 hombres y 1 mujer, entre 50 y 84 años, 5 con linfomas de localización ganglionar y 1 extraganglionar (en intestino grueso). Dos pacientes están en estadio I, 2 en estadio II, 1 en estadio III y 1 en estadio IV, además con invasión de la médula ósea. Un paciente está afecto de síndrome de Sjögren y otro con una LLC de 5 años de evolución falleció, demostrándose en la autopsia, un linfoma inmunoblástico.

i).- LINFOMA LINFOBLÁSTICO: Hemos estudiado 4 pacientes, 2 hombres y 2 mujeres, con edades comprendidas entre 7 y 24 años y 2 de ellos con  $11,6$  y  $15 \times 10^9/l$  linfoblastos en sangre periférica. Todos los pacientes tienen masa mediastínica, 2 están en estadio II y 2 en estadio IV, éstos con invasión de la médula ósea.

j).- LINFOMA DE CÉLULA PEQUEÑA NO HENDIDA: Aquí hemos incluido 4 pacientes, hombres, entre 5 y 23 años, 3 con linfomas de localización ganglionar y 1 extraganglionar (en intestino delgado). Un paciente se encuentra en estadio I, 1 en estadio II y 2 en estadio IV, con

invasión de la médula ósea. Dos pacientes fallecieron, uno de ellos con un síndrome de inmunodeficiencia adquirida, encontrando en la autopsia una criptococosis diseminada y ausencia de linfoma. En el otro paciente se demostró masiva infiltración del sistema nervioso central.

#### MISCELÁNEA

En este grupo hemos estudiado 6 pacientes, 3 con micosis fungoide y 3 con tricoleucemia. Las edades de 1 hombre y 2 mujeres con micosis fungoide oscilan entre 39 y 60 años. Los 3 presentan afectación cutánea y uno de ellos, además, afectación ganglionar. Dos pacientes están en estadio I y 1 en estadio II. Ninguno tiene invasión de la médula ósea. Las edades de 2 hombres y 1 mujer con tricoleucemia oscilan entre 40 y 53 años, los 3 tienen afectación esplénica y un porcentaje de tricoleucocitos en sangre periférica de 3,7 y 10%, respectivamente. Los 3 pacientes se encuentran en estadio IV y tienen invasión de la médula ósea.

#### C.- MIELOMAS.

Aquí hemos estudiado 20 pacientes, 7 con mieloma solitario, 11 con mieloma múltiple, 1 con un plasmocitoma extramedular bronquial y 1 con una leucemia de células plasmáticas. Siete pacientes con mieloma solitario, 5 hombres y 2 mujeres, entre

34 y 71 años, presentan lesiones osteolíticas únicas (3 en vértebras, 2 en fémur, 1 en húmero y 1 en costilla) y ausencia de invasión de la médula ósea. Dos de 5 pacientes tienen gammapatía monoclonal sérica de tipo IgG/kappa y ninguno proteinuria de Bence-Jones. Once pacientes con mieloma múltiple, 8 hombres y 3 mujeres, entre 40 y 71 años, presentan múltiples lesiones osteolíticas y 10 de ellos invasión de la médula ósea (en 1 paciente no se practicó biopsia medular y sí biopsia hepática). Ocho pacientes tienen gammapatía monoclonal sérica, 3 IgG/lambda, 1 IgG/kappa, 1 IgA/lambda, 1 IgA/kappa y 2 IgD/lambda. Cinco pacientes tienen proteinuria de Bence-Jones, 4 kappa y 1 lambda. Siete pacientes se encuentran en estadio II y 4 en estadio III, 3 de ellos con alteración de la función renal (creatinina sérica superior a 2 mg/100 ml), de acuerdo con la clasificación de Durie y Salmon (27). Además, hemos estudiado un hombre de 51 años con un plasmocitoma extramedular bronquial que tiene gammapatía monoclonal sérica de tipo IgA/kappa y ausencia de invasión de la médula ósea. Un hombre de 68 años presenta una leucemia de células plasmáticas asociada a una leucemia mielomonocítica crónica, M4 de la clasificación FAB (4). En este paciente el recuento de leucocitos en sangre periférica es de  $97 \times 10^9/l$ , con  $25 \times 10^9/l$  monocitos y  $13,5 \times 10^9$

/1 plasmocitos. La médula ósea muestra infiltración por la doble neoplasia y no existe gammapatía monoclonal sérica.

### 3.1.3.- MATERIAL DE LABORATORIO.

\* Pipetas Pasteur, tubos de plástico de 5 ml, pipetas graduadas de 0,01; 5 y 10 ml, micropipetas de 1 a 50  $\mu$ l y 100  $\mu$ l, cámaras de incubación, portaobjetos y cubres, agua destilada, suero fisiológico y agua amoniacal, Ficoll-metrizate (lymphoprep, densidad 1077 gr/l) (Winthrop), medio de cultivo RPMI 1640.

\* Fijadores: B5 y formaldehído al 10%.

\* Tampones: Tampón fosfato salino pH 7,2; tampón veronal acetato pH 7,6; tampón cacodilato sódico 0,1 M; tampón Sorensen pH 7,03 y tampón McIlvaine.

\* Colorantes: Solución de Giemsa, solución de May-Grunwald (Merck), solución de hematoxilina de Harris y de Meyer, solución de eosina, reactivo de Schiff, pironina GS, verde metilo GA, azul de metileno y azul de toluidina.

\* Productos químicos: Alcohol etílico, metílico, xilol, ClH 0,01 N, sulfato de cobre, ácido tartárico, ácido periódico, hexazonio de pararosanilina, pararosanilina libre de acridina, nitrito sódico, ácido acético, naftol AS BI-fosfato, dimetil formamida, pepsina, cloruro cálcico, hiposulfito sódico, ioduro de lugol, alfa-naftil acetato, 3,3, diaminobencidina tetrahidroclorido, acetona, acetato de uranilo, ácido fosfotúngstico, óxido

de propileno, citrato de plomo, permanganato potásico, metabisulfito potásico, alumbre férrico-amónico, nitrato de plata, hidróxido potásico y cloruro de oro amarillo.

\* Medios de inclusión: Parafina (punto de fusión 57° C) (Difco). Epon I (Epon 812, anhídrido dodecenil succínico, anhídrido nonemil nádico), Epon II (Epon I, tridimetil aminometil fenol).

\* Medios de montaje: Medio sintético Eukitt y glicerina.

\* Anticuerpos:

Anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina humana polivalente marcado con FITC (Behring).

Anticuerpo de cabra anti-cadena ligera kappa marcado con FITC (Behring).

Anticuerpo de cabra anti-cadena ligera lambda marcado con FITC (Behring).

Anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina de ratón marcado con FITC (Behring).

Anticuerpos específicos policlonales contra cadenas pesadas IgM, IgD, IgG, IgA y cadenas ligeras kappa y lambda (Biomeda).

IgG anti-ratón conjugada con biotina (Vector).

Anticuerpo monoclonal contra células B (Biomeda): Identifica células B humanas y granulocitos.

Anticuerpo monoclonal contra células T (Biomeda): Identifica células T maduras.

Leu-1 (Becton-Dickinson): Identifica células T.

B1 (Coulter Clone):Identifica linfocitos B.

OKB2 (Ortho):Identifica células B y granulocitos.

OKB7 (Ortho):Identifica células B humanas.

OKIa1 (Ortho):Identifica el complejo antigénico DR humano expresado en células B,células T activadas y monocitos.

OKT4 (Ortho):Identifica el subgrupo de linfocitos T humanos inductores/colaboradores.

OKT6 (Ortho):Identifica timocitos humanos.

OKT8 (Ortho):Identifica el subgrupo de linfocitos T humanos supresores/citotóxicos.

OKT9 (Ortho):Identifica el receptor de la transferrina humana.

OKT10 (Ortho):Identifica timocitos,células nulas,linfocitos activados y células precursoras.

OKT11 (Ortho):Identifica linfocitos humanos T que expresan el antígeno celular de superficie responsable de la captación de los eritrocitos de carnero.

CALLA (Ortho):Identifica el antígeno de superficie expresado por las células de la leucemia linfoblástica aguda común.

OKM1 (Ortho):Identifica monocitos y granulocitos.

OKM5 (Ortho):Identifica monocitos y plaquetas.

\* Kits de tinción:

Lymphoscan (Biomeda):Anticuerpos específicos correspondientes.Reactivo de peroxidasa,15 ml.Tampón cromógeno,

2 ml.Cromógeno concentrado,2 ml.Peróxido de hidrógeno al 2%,1 ml.Hematoxilina de Mayer,15 ml.Reactivo bloqueante,2 ml.Agua amoniacal,15 ml.Reactivo cromógeno de trabajo (5 ml de agua destilada + 90 lambdas de tampón cromógeno + 45 lambdas de cromógeno concentrado,3-amino-9 etil carbazol + 45 lambdas de peróxido de hidrógeno al 2%).

Kit ABC Vectastain (Vector):Suero normal de caballo,3 ml.IgG anti-ratón conjugada con biotina,1 ml.Avidina DH,2 ml.Peroxidasa de caballo conjugada con biotina,2 ml.Diluciones de trabajo (90 lambdas de suero normal de caballo + 10 ml de PBS.45 lambdas de IgG anti-ratón conjugada con biotina + 10 ml de PBS.90 lambdas de avidina DH + 10 ml de PBS + 90 lambdas de peroxidasa de caballo conjugada con biotina).

\* Instrumentos:Microscopio Zeiss equipado con epifluorescencia.Microscopio Olympus BH-2 equipado con sistema de microfotografía.Microscopio electrónico Philips EM 400.Ultramicrotomo MT 2-B (Sorvall).Criostato (Damon/IEC division).Microtomo.

### 3.2.- MÉTODOS.

#### 3.2.1.- MUESTRAS SANGUÍNEAS.

El estudio inmunológico de las muestras de sangre periférica se ha realizado en el banco de sangre del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital "La Fé".Todas las muestras sanguíneas (10 ml) se han recogido sobre heparina (20 unidades/ml)

como anticoagulante. Las células mononucleares se han aislado en un gradiente de densidad con Ficoll-Metriozone (lymphoprep) por centrifugación a 600 g, 30 minutos. Previamente, éste se diluyó 1/1, V/V con medio de cultivo RPMI 1640. A continuación las células mononucleares se lavan 3 veces con PBS pH 7,2.

Las inmunoglobulinas de superficie se han determinado mediante una técnica de inmunofluorescencia directa para lo cual se ajustan las células mononucleares a  $1 \times 10^7$  células/ml en medio de cultivo RPMI 1640. Después, se incuban con un anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina humana marcado con FITC, durante 30 minutos a 4° C y se lavan 3 veces con PBS. Por último se identifica la presencia de cadenas pesadas con un anticuerpo polivalente y de cadenas ligeras kappa y lambda.

Los antígenos de diferenciación de linfocitos B y T y monocitos se han determinado mediante una técnica de inmunofluorescencia indirecta. Una vez ajustadas las células mononucleares se incuban con 5 lmbdas de la dilución adecuada de cada anticuerpo monoclonal, durante 30 minutos a 4° C y se lavan 3 veces con PBS. A continuación se incuban con el anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina de ratón marcado con FITC, durante 30 minutos a 4° C y se



lavan 3 veces con PBS. Los anticuerpos monoclonales que hemos utilizado son Leu-1 (Becton-Dickinson), OKT11, OKT4, OKT8, OKIa1, CALLA, OKT6, OKM1 (Ortho) y B1 (Coulter clone). El recuento celular se ha efectuado en un microscopio Zeiss equipado con epifluorescencia, contando 200 células como mínimo por cada determinación.

### 3.2.2.- BIOPSIAS.

Con las biopsias de tejido ganglionar o de otros órganos remitidas en fresco hemos procedido de la siguiente manera:

A.- Efectuamos 10 improntas para estudio citológico y citoquímico. Estas se han teñido con May-Grunwald-Giemsa y las técnicas de citoquímica utilizadas incluyen fosfatasas ácidas, tanto inhibidas como sin inhibir con ácido L<sup>+</sup>tartárico y esterases ácidas.

B.- Congelamos y almacenamos en nitrógeno líquido una sección de tejido de 1x1 cm para estudio inmunológico. Del tejido congelado se realizan secciones de 6 a 8 micras en un criostato, se colocan sobre portaobjetos previamente bañados con gelatina, se fijan en acetona a 4° C durante 10 minutos y se dejan secar a temperatura ambiente 1 hora. A continuación determinamos las SIg mediante una técnica de inmunoperoxidasa en 2 tiempos utilizando antisueros policlonales, preparados comercialmente, contra cadenas pesadas (IgM, IgD, IgG e IgA) y ligeras (kappa y lambda)

de las inmunoglobulinas. Los antígenos de diferenciación de linfocitos B, T y monocitos se han determinado mediante un procedimiento de inmunoperoxidasa en 3 tiempos utilizando los anticuerpos monoclonales contra células B y T (Biomeda, Leu-1 (Becton-Dickinson), OKB2, OKB7, OKIa1, OKT4, OKT6, OKT8, OKT9, OKT11, CALLA, OKM1 y OKM5 (Ortho)).

C.- Preparamos pequeños fragmentos de tejido de 1x1 mm para estudio ultraestructural. Estos se fijan de 2 a 4 horas y a 4° C en una solución de glutaraldehído al 2% en tampón Sorensen, se lavan y mantienen 2 horas más, se introducen en ácido ósmico al 1% 2 horas a 4° C y se lavan en tampón Sorensen 2 horas a 4° C. Después los fragmentos se pasan por acetona al 30 y 50% durante 30 minutos, por acetona al 70% con acetato de uranilo a saturación con ácido fosfotúngstico al 2,5% durante 5 horas, se lavan en acetona al 70 y 90% 30 minutos y se mantienen en acetona al 100% con sulfato de cobre deshidratado durante 30 minutos. A continuación, los fragmentos se colocan en óxido de propileno y Epon I en proporciones de 3:1, 3:3 y 1:3 durante 1, 2 y 5 horas, respectivamente, se incluyen en Epon I durante 24 horas y se confeccionan los bloques en Epon II durante 48 horas a 60-70°C. Los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina se seleccionan y del bloque deseado se obtienen, en

un ultramicrotomo, cortes ultrafinos. Estos se tiñen con citrato de plomo al 1% en agua destilada durante 7 minutos y se examinan en un microscopio electrónico "Philips EM 400".

D.- Fijamos el tejido restante en B5 y sobre éste y el tejido remitido en formaldehído realizamos el estudio histopatológico e inmunológico tras su inclusión en parafina. Secciones del tejido remitido en fresco se fijan en B5 de 60 a 90 minutos, se deshidratan en alcohol de 70º entre 24 y 48 horas y se pasan directamente a la inclusión automática habitual en parafina. Para eliminar los cristales de mercurio, después del desparafinado e hidratación, las secciones tisulares se someten a un baño de lugol 5 minutos, posteriormente se blanquean con hiposulfito sódico al 5% 3 minutos y se aclaran con agua destilada. El tejido remitido en formaldehído al 10%, tras un periodo de tiempo no superior a 24 horas, se procesa en un Shandon 2LE y se incluye en parafina. Secciones de 5 a 6 micras de espesor, obtenidas de los bloques de parafina, se tiñen con hematoxilina eosina, giemsa, ácido periódico de Schiff (PAS), reticulina de Gomori y verde metilo pironina. Sobre las secciones del tejido incluido en parafina se aplica una técnica de inmunoperoxidasa en 2 tiempos para identificar inmunoglobulinas intracitoplasmáticas (CIg).

### 3.2.3.- TÉCNICAS DE TINCIÓN.

#### A.- IMPRONTAS.

##### TINCIÓN DE MAY-GRUNWALD-GIEMSA

Solución de trabajo May-Grunwald: Reactivo de May-Grunwald 2/3 + etanol 1/3.

Solución de trabajo Giemsa: Reactivo de Giemsa 1/6 + agua destilada 5/6.

Procedimiento: Solución de May-Grunwald 8 minutos. Lavar con agua. Solución de Giemsa 10 minutos. Lavar con agua. Dejar secar y montar con Eukitt.

##### REACCIÓN DE FOSFATASAS ÁCIDAS

Solución A: Mezclar 6 gotas de solución de pararosanilina al 4% con 6 gotas de solución de nitrito sódico al 4%. Una hora después se disuelven en 30 cc de tampón veronal-acetato ph 7,6. Después se ajusta el ph a 5,1.

Solución B: Disolver 10 mg de Naftol-As-Bi-fosfato en 1 cc de dimetil-formamida.

Procedimiento: Mezclar y filtrar las soluciones A y B. Para efectuar las fosfatasas ácidas inhibidas se añade a la mezcla de incubación 75 mg de ácido tartárico por cada 10 ml. Incubar de 4 a 10 horas. Lavar con agua corriente. Colorear con una solución de hemalumbre durante 10 minutos y diferenciar en agua corriente. Montar con glicerina. La actividad enzimática se detecta por un precipitado rojo intenso en el

citoplasma de las células.

#### REACCION DE ESTERASAS ACIDAS

Las preparaciones se fijan durante 4 minutos en una solución de formaldehído al 4% con tampón cacodilato sódico 0,1 M y se dejan secar al aire.

Solución A: Disolver 2 gr de pararosanilina libre de acridina en 50 cc de HCl 2 N.

Solución B: Solución de nitrito sódico al 4%.

Mezclar 1 cc de ambas soluciones.

Solución del substrato: Disolver 10 mg de alfa-naftil acetato en 0,4 cc de acetona. La solución de pararosanilina nitrificada y tamponada se añade a la solución del substrato y se equilibra el ph a 5,8.

Procedimiento: Incubar 2 horas a temperatura ambiente. Colorear con una solución de hemalumbre durante 10 minutos. Lavar con agua corriente. Montar con glicerina. La actividad enzimática se detecta por una coloración rojo parda en el citoplasma de las células.

B.- CORTES EN PARAFINA.

#### TINCIÓN CON HEMATOXILINA EOSINA

Desparafinar e hidratar en agua destilada. Teñir con hematoxilina de Harris durante 5 a 10 minutos. Lavar con agua corriente. Diferenciar rápidamente en una solución de alcohol clorhídrico. Lavar con agua corriente. Pasar por agua amónica. Lavar con agua corriente. Teñir con eosina durante 3 a 5 minutos. Pasar por alcohol de 96°, alcohol absoluto y xilol. Montar con Eukitt.

## TINCIÓN DE GIEMSA

Desparafinar e hidratar en agua destilada. Teñir durante 1 hora con una solución de 100 cc de agua destilada y 20 cc de giemsa. Lavar los cortes en una solución de 100 cc de agua destilada a la que se le ha añadido 5 gotas de ácido acético, durante 5 segundos. Diferenciar en alcohol de 96° hasta conseguir la coloración adecuada. Frenar la diferenciación en isopropanol durante 5 minutos. Pasar los cortes por xilol. Montar con Eukitt.

## TINCIÓN DE PAS

Desparafinar e hidratar en agua destilada. Introducir los cortes en ácido periódico al 1% durante 30 minutos. Lavar en agua corriente 10 minutos. Lavar en agua destilada. Teñir con el reactivo de Schiff a 37° C hasta que los cortes adquieran una coloración sonrosada. Lavar en agua corriente 15 minutos. Teñir con hematoxilina de Harris diluida 1/3 en agua destilada durante 3 minutos. Deshidratar en alcoholes, aclarar en xilol y montar con Eukitt.

## TINCIÓN DE RETICULINA DE GOMORI

Desparafinar e hidratar los cortes en agua destilada. Oxidar mediante permanganato potásico al 1%, 2 minutos. Aclarar en agua corriente. Decolorar mediante metabisulfito potásico al 2%, 1 minuto. Lavar en agua corriente, 5 minutos. Introducir los cortes en alumbre férrico-

amónico al 2% 1 minuto. Lavar en agua corriente 2 minutos. Impregnar con una solución de hidróxido potásico-plata amoniacal 1 minuto (nitrato de plata al 10% + hidróxido potásico al 10% + agua amoniacal al 28% + agua destilada). Lavar en agua destilada. Reducir con una solución de formol al 2% 3 minutos. Pasar por cloruro de oro amarillo al 1% durante 10 minutos. Lavar con agua destilada. Pasar por metabisulfito potásico al 2% 1 minuto. Fijar con una solución de hiposulfito sódico al 5% 1 minuto. Lavar en agua corriente. Deshidratar en alcohol de 96°, alcohol absoluto y aclarar en xilol. Montar con Eukitt.

#### TINCIÓN DE VERDE METILO PIRONINA

Desparafinar e hidratar en agua destilada. Teñir con la solución de trabajo de verde metilo pironina 15 minutos (pironina G.S. 2 ml + verde metilo G.A. 4 ml + tampón McIlvaine 50 ml + agua destilada 50 ml). Lavar en agua destilada. Diferenciar en acetona. Introducir en una solución de xilol y acetona al 50% 2 minutos. Aclarar con xilol y montar con Eukitt.

#### 3.2.4.- PROCEDIMIENTOS DE INMUNOPEROXIDASA.

##### A.- CORTES EN CONGELACIÓN.

##### PROCEDIMIENTO DE INMUNOPEROXIDASA EN 2 TIEMPOS

Hidratar las secciones de tejido en PBS 3 minutos. Incubar con 90 nl del antisuero policlonal específico (IgM, IgD, IgG, IgA, kappa y lambda) 20 minutos. Lavar

con PBS 3 minutos. Incubar con 90 nl del reactivo de peroxidasa 10 minutos. Lavar con PBS 3 minutos. Incubar con 180 nl del reactivo cromógeno de 10 a 20 minutos. Lavar con agua destilada. Teñir con 90 nl de hematoxilina de Mayer 6 minutos. Lavar con agua destilada. Contrastar con 90 nl de agua amoniacal. Aclarar con agua destilada. Montar con glicerina.

Para cada grupo de determinaciones hemos realizado un control negativo y un control positivo. En el control negativo incubamos con PBS en lugar del antisuero específico con el fin de conocer si existe tinción inespecífica de la peroxidasa o actividad tisular endógena de tipo .peroxidasa. Como control positivo hemos utilizado una sección de tejido que contiene el antígeno sometido a estudio, procesándola de forma paralela, para verificar si la tinción es favorable.

#### PROCEDIMIENTO DE INMUNOPEROXIDASA EN 3 TIEMPOS

Hidratar las secciones de tejido en PBS 3 minutos. Incubar con 90 nl del suero normal de caballo 15 minutos. Incubar con 20 nl del anticuerpo monoclonal correspondiente 30 minutos. Lavar 3 minutos con PBS. Incubar con 90 nl de IgG anti-ratón conjugada con biotina 30 minutos. Lavar 3 minutos con PBS. Incubar con 180 nl del complejo de avidina y peroxidasa de caballo conjugada con biotina 30 minutos. Lavar 2 veces con



PBS 3 minutos. Incubar con el substrato 5 minutos (solución de 1 a 3 mg/ml de 3,3 diaminobencidina en 0,01% de agua oxigenada en PBS). También se puede utilizar como substrato el 3-amino-9-etil carbazol. Lavar 2 veces con PBS 3 minutos. Lavar con agua destilada. Colorear con una solución de sulfato de cobre 5 minutos (0,5% de sulfato de cobre en suero fisiológico). Aclarar con PBS. Lavar con agua destilada. Teñir con azul de metileno 5 minutos (1% en agua destilada). Aclarar con alcohol etílico absoluto y luego con xilol. Montar con un medio sintético (Eukitt). Si se emplea el 3-amino-9-etil carbazol como substrato se tiñe con hematoxilina de Mayer y se monta con glicerina.

En cada grupo de determinaciones el control negativo se obtiene incubando una sección tisular con PBS en lugar del anticuerpo monoclonal y una tinción densa e inespecífica aparece en los mastocitos, leucocitos neutrófilos y eosinófilos. Interpretamos como tinción de superficie la presencia de un anillo periférico de color rojo o marrón oro sobre la membrana celular y como tinción citoplásmica la presencia de un precipitado rojo granular en el interior del citoplasma celular.

#### B.- CORTES EN PARAFINA.

El procedimiento de inmunoperoxidasa en 2 tiempos

es idéntico al que se aplica en el tejido congelado excepto 2 etapas que se realizan antes de la incubación con el antisuero específico. En primer lugar se somete el tejido a la acción de una solución de pepsina (0,1% de pepsina + 0,1% de cloruro cálcico en PBS), durante 30 minutos a 37° C. En segundo lugar se incuba con 90 nl del reactivo bloqueante de la peroxidasa endógena (1 ml de metanol + 90 nl del reactivo bloqueante), durante 3 minutos.

En cada grupo de determinaciones efectuamos también un control negativo y un control positivo. La inmunoglobulina intracitoplasmática se identifica por una tinción granular densa de color rojo en el interior del citoplasma de las células.

### 3.2.5.- ESTUDIOS REALIZADOS.

#### A.- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON LINFOMAS NO HODGKINIANOS Y MIELOMAS.

Hemos analizado la frecuencia y distribución de 106 linfomas no hodgkinianos agrupados según la clasificación de la Formulación Internacional de Trabajo (94). Además, hemos efectuado un análisis estadístico de los parámetros edad, sexo y estadio clínico-patológico de los pacientes con linfomas no hodgkinianos y mielomas, estudiando por separado los linfomas primarios gastrointestinales y los mielomas múltiples y solitarios.

El exámen de los patrones histológicos de invasión medular en 26 LLC nos ha permitido estudiar la relación entre éstos y los estadios clínicos de la "International Workshop" (11).

#### B.- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOLÓGICO.

##### CARACTERIZACIÓN CITO-HISTOLÓGICA Y ULTRAESTRUCTURAL DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS Y MIELOMAS.

Hemos estudiado las características histológicas de 106 linfomas no hodgkinianos y 20 mielomas, realizando además, un estudio citológico y citoquímico en improntas así como ultraestructural, en los casos en los que la muestra de tejido fué recibida en óptimas condiciones.

##### CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA E INMUNOLÓGICA DE LOS ÓRGANOS LINFOIDES.

Aquí hemos estudiado las características histológicas, organización inmunológica y el patrón de tinción con SIg y anticuerpos monoclonales de 14 órganos linfoides con hiperplasia folicular inespecífica, correspondientes a 9 ganglios linfáticos, una amígdala, 3 bazos y 1 timo.

##### CARACTERIZACIÓN INMUNOLOGICA DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS Y MIELOMAS.

Hemos determinado el fenotipo inmunológico de 100 linfomas no hodgkinianos y 20 mielomas. En 82 linfomas incluidos en parafina, identificando

CIg y en 27 muestras de tejido congelado y 23 muestras de sangre periférica detectando SIg y antígenos de diferenciación linfocitarios. En los linfomas foliculares también hemos estudiado el patrón de tinción con inmunoglobulinas del manto folicular que rodea a las células centrofoliculares. En 20 mielomas, incluidos en parafina, identificando CIg y en 1 muestra de tejido congelado detectando SIg y antígenos de diferenciación linfocitarios.

#### CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN LOS ÓRGANOS LINFOIDES, LINFOMAS NO HODGKINIANOS Y MIELOMAS.

En los órganos linfoides con hiperplasia folicular inespecífica, exceptuando el timo, en 25 linfomas no hodgkinianos y en 1 mieloma hemos estudiado la población y subpoblaciones de linfocitos T, efectuando un recuento de 100 células por campo microscópico a 400 x y registrando el número de células positivas con los anticuerpos monoclonales OKT11, OKT4 y OKT8. En todos los casos el recuento se ha efectuado en 3 áreas diferentes calculando las medias y desviaciones standard correspondientes a cada área. En las hiperplasias y linfomas foliculares el recuento se ha efectuado en 3 áreas foliculares e interfoliculares distintas. Esto nos ha permitido realizar un análisis diferencial de la población y subpoblaciones de linfocitos T

entre las hiperplasias foliculares reactivas y linfomas foliculares y también en los linfomas difusos y mielomas.

#### ESTUDIO DEL FENOTIPO INMUNOLÓGICO Y EXPRESIÓN MONOCLONAL DE CADENAS LIGERAS EN RELACIÓN CON EL SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS.

Hemos analizado el fenotipo B o T y la monoclonalidad de cadenas ligeras kappa o lambda de 100 linfomas no hodgkinianos agrupados en 3 categorías de malignidad según la clasificación de la Formulación Internacional de Trabajo (94).

#### 3.2.6.- MÉTODO ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico se ha utilizado un ordenador programable tipo "Hewlet Packard" y el lenguaje con el que hemos trabajado ha sido el "Basic". De esta manera hemos podido calcular una serie de datos como la media, desviación standard (D.S), distintos porcentajes y ratios (H/M y OKT4/OKT8), así como los niveles de significación según el test "t de Student" (102). En cuanto a los niveles de significación se considera que hay diferencia estadísticamente significativa cuando  $p$  es inferior a 0,05 (102).

IV.- RESULTADOS.

4.1.- RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON LINFOMAS NO HODGKINIANOS Y MIELOMAS.

En la figura 1 se presenta la frecuencia y distribución de 106 linfomas agrupados según la clasificación de la Formulación Internacional de Trabajo (94). Como se puede ver, el linfoma más frecuente en nuestro estudio es el linfocítico pequeño con 43 casos (40,5%), correspondiendo 26 casos (24,5%) a LLC, 16 casos (15%) a linfomas plasmocitoides y 1 caso (0,9%) a linfomas T-periféricos. Los linfomas foliculares, en conjunto, son 19 casos (17,9%), correspondiendo 9 casos (8,5%) a linfomas de célula pequeña hendida, 6 casos (5,6%) a linfomas mixtos y 4 casos (3,8%) a linfomas de célula grande. 24 (22,6%) linfomas son difusos de grado intermedio de malignidad, 4 (3,8%) de célula pequeña hendida, 8 (7,5%) mixtos y 12 (11,3%) de célula grande. En el grupo de linfomas de alto grado de malignidad, 6 (5,6%) son linfomas inmunoblásticos y 4 (3,8%) cada uno linfomas linfoblástico y de célula pequeña no hendida. En el grupo de miscelánea, 3 (2,8%) son micosis fungoides y 3 (2,8%) tricoleucemias.

Las edades medias, desviaciones standard e intervalos de edad de 106 pacientes en los diferentes grupos de linfomas, junto al número de casos y relación

entre hombres y mujeres, aparecen en el cuadro VIII. Como se puede apreciar no hay diferencias estadísticamente significativas entre las edades medias de los pacientes con linfomas linfocítico pequeño, folicular y difuso de grado intermedio de malignidad, que corresponden a  $61,2 \pm 14,6$  años (17-87),  $56,1 \pm 11,2$  años (36-78) y  $59,0 \pm 16,1$  años (14-81), respectivamente. Por el contrario, sí hay diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre la edad media de los pacientes con linfoma inmunoblástico que es  $67,8 \pm 11,7$  años (50-84) y la edad media de los pacientes con linfoma folicular que es  $56,1 \pm 11,2$  años (36-78). Dentro de los linfomas linfocíticos pequeños hemos incluido a las LLC y linfomas plasmocitoides, sin observar diferencias significativas entre las edades medias de estos pacientes que son  $63,9 \pm 11,8$  años y  $56,4 \pm 17,5$  años, respectivamente. El intervalo de los pacientes con LLC está entre 43 y 87 años, mientras que en los pacientes con linfoma plasmocitoide éste se sitúa entre 17 y 82 años. Una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) se ha puesto de manifiesto entre la edad media de los pacientes con linfomas, linfoblástico y de célula pequeña no hendida, que es  $16,0 \pm 7,1$  años (7-24) y  $15,7 \pm 6,8$  años (5-23), respectivamente y la de los pacientes en los demás grupos de linfomas. La edad media de los pacientes con micosis



fungoide es  $51,0 \pm 8,8$  años (39-60) y de los pacientes con tricoleucemia de  $46,6 \pm 5,3$  años (40-53).

El estudio de la relación entre hombres y mujeres (ratio H/M) ha revelado un ligero predominio de los hombres sobre las mujeres en los grupos de linfoma folicular y tricoleucemia, y viceversa en el grupo de micosis fungoides. La ratio H/M es de 1 en los grupos de linfoma linfocítico pequeño, linfoma difuso de grado intermedio de malignidad y linfoma linfoblástico. Dentro de los linfomas linfocíticos pequeños, en el grupo de LLC hay un ligero predominio de las mujeres sobre los hombres (Ratio H/M:0,7), mientras que en el grupo de linfomas plasmocitoides ocurre lo contrario (ratio H/M:1,2). En los grupos de linfomas inmunoblástico y de célula pequeña no hendida hay un claro predominio de los hombres sobre las mujeres.

En las figuras 2,3 y 4 se presentan los estadios clínicos según la clasificación de Ann Arbor (18) de 32 pacientes con linfomas de bajo grado, 28 con linfomas de grado intermedio y 14 con linfomas de alto grado de malignidad, respectivamente. Como se puede ver 20 (62,5%) de los pacientes con linfomas de bajo grado de malignidad se encuentran, en el momento del diagnóstico, en estadio IV y de ellos 19 (95%) presentan invasión de la médula ósea. En

este grupo ,2 (6,2%) pacientes estan en estadio I,4 (12,5%) en estadio II y 6 (18,7%) en estadio III.10 (35,7%) de los pacientes con linfomas de grado intermedio de malignidad estan en estadio IV y de ellos 7 (70%) tienen invasión de la médula ósea.Además,8 (28,5%),5 (17,8%) y 5 (17,8%) de los pacientes en este grupo se encuentran en estadio I,II y III,respectivamente.En el grupo de linfomas de alto grado de malignidad 5 (35,7%) pacientes estan en estadio IV y todos presentan invasión de la médula ósea.Aquí,3 (21,4%) pacientes estan en estadio I,5 (35,7%) en estadio II y 1 (7,1%) en estadio III.

En las figuras 5 y 6 aparecen los estadios clínicos de 6 pacientes con linfoma inmunoblástico y de 8 pacientes con linfomas,linfoblástico y de célula pequeña no hendida,respectivamente.En el grupo de linfomas inmunoblásticos,2 (33,3%) pacientes estan en estadio I,2 (33,3%) en estadio II,1 (16,6%) en estadio III y sólo 1 (16,6%) en estadio IV,con invasión de la médula ósea.Sin embargo,en el grupo de linfomas,linfoblástico y de célula pequeña no hendida,4 (50%) pacientes estan en estadio IV y todos tienen invasión de la médula ósea,1 (12,5%) paciente está en estadio I y 3 (37,5%) en estadio II.En estadio III no hemos encontrado ningún paciente.

En las figuras 7 y 8 se muestran los estadios

clínicos de 3 pacientes con micosis fungoide y de 3 pacientes con tricoleucemia, respectivamente. Mientras que en el grupo de micosis fungoides, 2 (66,6%) pacientes están en estadio I y 1 (33,3%) en estadio II, en el grupo de tricoleucemias los 3 pacientes se encuentran en estadio IV y con invasión de la médula ósea.

Una estrecha relación entre los patrones histológicos de invasión medular y los estadios clínicos de la "International Workshop" (11) se ha puesto de manifiesto en 26 LLC, tal y como se muestra en la figura 9. En estadio A, 5 (29%) pacientes tienen un patrón nodular de invasión medular, 6 (35%) un patrón intersticial, 5 (29%) un patrón mixto y 1 (6%) un patrón difuso. En estadio B, 3 (60%) pacientes tienen un patrón intersticial, 1 (20%) un patrón mixto y 1 (20%) un patrón difuso. Entre los pacientes en estadio C, 1 (25%) tiene un patrón mixto y 3 (75%) un patrón difuso.

En el cuadro IX se presenta la edad media e intervalo y ratio H/M de 12 pacientes con linfoma 1º gastrointestinal, junto al número de casos y localización de los mismos. Estos suponen el 11,3% de los linfomas no hodgkinianos y la edad media de presentación de los pacientes es  $51,6 \pm 21,9$  años (15-84). Hay un ligero predominio de los hombres sobre las mujeres, ya que la ratio H/M es 1,4 y con respecto a la locali-

zación, 7 (58%) linfomas se encuentran en el estómago, 4 (33%) en el intestino delgado y 1 (8%) en el intestino grueso.

En la figura 10 aparece la distribución y porcentajes de los diferentes tipos histológicos de linfoma 1º gastrointestinal. Como se puede apreciar 10 (83,3%) linfomas son difusos y 2 (16,6%) linfomas foliculares. De los primeros, 4 (33,3%) y 2 (16,6%) linfomas son de célula grande y mixtos, respectivamente, mientras que los linfomas, de célula pequeña hendida, inmunoblástico, de célula pequeña no hendida y plasmocitoide representan el 8,3% (1 linfoma) cada uno de ellos. De los segundos, los linfomas foliculares de célula pequeña hendida y de célula grande corresponden a un 8,3% (1 linfoma) cada uno de ellos.

Como se puede ver en la figura 11 y mediante el sistema de estadiaje de Blackledge modificado (91), 2 (16,6%) pacientes con linfoma 1º gastrointestinal están en estadio I, 3 (25%) en estadio II, 3 (25%) en estadio III y 4 (33,3%) en estadio IV, de los que 2 (50%) presentan invasión de la médula ósea. El porcentaje de pacientes en estadio IV es similar al observado en los pacientes con linfomas de grado intermedio de malignidad, si bien en éstos el porcentaje de invasión de la médula ósea es superior (70%) al de los pacientes con linfoma gastrointestinal

(50%).

En el cuadro X figuran las características clínicas de 20 pacientes con mieloma. Once (55%) mielomas son múltiples y 7 (35%) solitarios. Un plasmocitoma extramedular bronquial y una leucemia de células plasmáticas constituyen el 10%. No se observa diferencia significativa entre la edad media de los pacientes con mieloma múltiple que es  $52,0 \pm 13,7$  años (40-71) y mieloma solitario que es  $57,5 \pm 7,8$  años (34-71) y en ambos grupos hay un claro predominio de los hombres sobre las mujeres. De acuerdo con la clasificación de Durie y Salmon (27), 7 (64%) pacientes con mieloma múltiple se encuentran en estadio II y 4 (36%) en estadio III. De éstos, 3 (75%) pacientes tienen alteración de la función renal y por lo tanto se clasifican en el subgrupo B. Por otro lado, 2 de 5 (40%) pacientes con mieloma solitario, 8 (73%) con mieloma múltiple y 1 con plasmocitoma extramedular tienen gammapatía monoclonal sérica. Sólo 5 (45%) pacientes con mieloma múltiple tienen proteinuria de Bence-Jones.

En el cuadro XI figuran los tipos de inmunoglobulinas detectadas mediante inmunoelectroforésis, en los pacientes con mieloma. IgG/kappa son la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina encontrada en 2 de 5 pacientes con mieloma solitario. En los pacientes

con mieloma múltiple, IgG/lambda son las cadenas de inmunoglobulina detectadas con mayor frecuencia. En el paciente con plasmocitoma extramedular se ha detectado IgA/kappa. Es interesante comentar la existencia de 2 mielomas múltiples IgD/lambda y la negatividad de 3 mielomas múltiples, 3 mielomas solitarios y 1 leucemia de células plasmáticas.

#### 4.2.- RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN CITO-HISTOLÓGICA Y ULTRAESTRUCTURAL DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS Y MIELOMAS.

Las LLC se caracterizan por una proliferación monomorfa de linfocitos pequeños con escaso citoplasma y núcleo redondo (figura 12) que en improntas, debido a su fragilidad, se fragmentan con frecuencia dejando un resto nuclear libre o "sombra de Gumprecht". En la médula ósea se disponen en un patrón nodular, intersticial, mixto o difuso y en los ganglios linfáticos alterando difusamente la arquitectura con presencia de centros de proliferación. Es en éstos, donde se observan prolinfocitos y parainmunoblastos. Desde el punto de vista ultraestructural, los linfocitos pequeños, de 5 a 8 micras, tienen un núcleo redondo con heterocromatina central y marginal y un pequeño nucleolo. El escaso citoplasma contiene aisladas mitocondrias, retículo endoplásmico y ribosomas libres junto a alguna figura de mielina.

En la leucemia prolinfocítica, las células linfoides, que se disponen difusamente en el tejido esplénico, a veces con un patrón pseudofolicular, son de pequeño tamaño y tienen un núcleo redondo e hiper-cromático con un nucleolo central y escaso citoplasma. El estudio mediante microscopía electrónica ha demostrado en las células linfoides, un contorno nuclear regular, un pequeño nucleolo central y una polarización de los orgánulos citoplásmicos, principalmente, numerosas mitocondrias.

La característica más importante del linfoma T-periférico es la expansión de la zona paracortical por una proliferación de linfocitos pequeños con núcleo irregular, hiper-cromático y escaso citoplasma, que comprime folículos linfoides residuales. En estas áreas, las células presentan un halo claro periférico y positividad puntiforme de localización centrosómica paranuclear en su citoplasma con fosfatasas y esterases ácidas. También se observa numerosas vénulas de pared epitelioides y células plasmáticas de localización perivascular.

Los linfomas plasmocitoides se caracterizan por una proliferación de linfocitos pequeños, células con diferenciación plasmocitoide y plasmáticas (figura 13) junto a aislados inmunoblastos, que se disponen de forma difusa alterando la arquitectura ganglionar

habitual. Las células con diferenciación plasmocitoide y plasmáticas tienen núcleos redondos y excéntricos, así como citoplasmas basófilos con la tinción de giemsa, que además son PAS y verde metilo pironina positivos. En 8 (50%) linfomas hemos demostrado inclusiones intracitoplásmicas PAS positivas de inmunoglobulina y en 5 (31%) inclusiones intranucleares. Un material hialino PAS positivo en el interior de los vasos y un elevado número de mastocitos son otras características de éstos linfomas. Ultraestructuralmente, las células linfoplasmocitoides presentan un núcleo de mayor tamaño que el de los linfocitos, una reducción de la cromatina marginal y un nucleolo. El citoplasma contiene mitocondrias dispersas, abundante retículo rugoso, ribosomas libres y un aparato de golgi bien desarrollado (figura 14). En el interior del núcleo, citoplasma y a veces en el intersticio aparecen inclusiones únicas o múltiples de inmunoglobulina.

Los linfomas foliculares se definen histológicamente por presentar, en al menos el 25% de su superficie, un patrón de crecimiento folicular, tal y como puede observarse en la figura 15. Los folículos neoplásicos son de tamaño y morfología uniformes, se disponen difusamente en el tejido ganglionar o esplénico y se encuentran rodeados, en 11 de nuestros 19 linfomas, por un manto de linfocitos pequeños. Las áreas T entre los folículos se encuentran parcialmente



conservadas y contienen estructuras vasculares, linfocitos y células plasmáticas.

En el linfoma folicular de célula pequeña hendida, los folículos están constituidos, principalmente, por células pequeñas con núcleos hendidos e irregulares, sin evidentes nucleolos y escaso citoplasma, junto a una proporción de células grandes de aspecto centroblástico no superior al 5%. Estas tienen un núcleo redondo u oval con varios nucleolos adosados a la membrana nuclear y un citoplasma moderadamente amplio y basófilo. Las figuras de mitosis son poco numerosas.

En el linfoma folicular mixto se observa junto a células pequeñas una proporción de células grandes entre el 6 y 15% (figura 16). Estas presentan un núcleo vesicular, redondo u oval, con o sin hendiduras y un citoplasma escaso y basófilo. Las células grandes no hendidas muestran de 1 a 3 nucleolos adosados a la membrana nuclear. Las figuras de mitosis son más frecuentes.

En el linfoma folicular de célula grande, además de células pequeñas hendidas, hay una proporción de células grandes, generalmente no hendidas y con citoplasma basófilo, que oscila entre el 15 y 50%. En este grupo la actividad mitótica es más elevada.

Por otro lado, hemos observado bandas de esclerosis en 6 de 9 linfomas de célula pequeña

hendida, en 3 de 6 linfomas mixtos y en 3 de 4 linfomas de célula grande. En 5 linfomas de célula pequeña hendida, en 4 mixtos y en 3 de célula grande hemos encontrado áreas difusas.

El estudio mediante microscopía electrónica ha puesto de manifiesto células de pequeño a mediano tamaño, entre 6 y 10 micras, con núcleos de contornos irregulares, angulados y hendidos, con heterocromatina central y sobre todo marginal y un nucleolo pequeño (figura 17). El citoplasma moderadamente amplio alberga mitocondrias, ribosomas y poliribosomas, retículo endoplásmico y aislados lisosomas. Las células grandes con un tamaño de 12 a 14 micras presentan núcleos redondos u ovals, a veces con invaginaciones, con cromatina difusa y múltiples nucleolos de localización marginal. Algunos orgánulos y numerosos ribosomas están presentes en un citoplasma amplio. Junto a esta celularidad linfoide se identifican células de morfología estrellada y triangular con largas prolongaciones citoplásmicas y a veces uniones desmosómicas, correspondientes a células reticulares dendríticas (figura 18).

En la categoría de grado intermedio de malignidad, los linfomas de célula pequeña hendida, mixtos y de célula grande se caracterizan por un patrón de crecimiento difuso.

El linfoma difuso de célula pequeña hendida que representa la contraparte difusa del linfoma folicular de célula pequeña hendida tiene idénticas características citológicas y ultraestructurales a éste. Con frecuencia se observan grupos de células plasmáticas perivasculares, una notable actividad mitótica y en 2 de nuestros casos, finas bandas de esclerosis.

Los linfomas difusos mixtos de célula grande y pequeña constituyen un grupo heterogéneo. Dos de nuestros casos representan la contraparte difusa del linfoma folicular mixto, al presentar numerosas células pequeñas hendidas, 5 son linfomas linfoplasmocitoides polimorfos y 1 es un linfoma T-periférico.

Los linfomas linfoplasmocitoides polimorfos están compuestos por una población de células de hábito plasmocitoide, escasas células plasmáticas y numerosas células grandes no hendidas e inmunoblastos. En 3 de nuestros casos hemos demostrado inclusiones PAS positivas de inmunoglobulina, intranucleares e intracitoplásmicas, esclerosis y un patrón de crecimiento pseudofolicular. En 2 casos, abundantes células epitelioides se han identificado entre las células tumorales. Con el microscopio electrónico, la celularidad es similar a la observada en los linfomas plasmocitoides pero con una importante proporción de células

grandes con núcleo ovalado, nucleolo grande central, escasa cromatina y amplio citoplasma con retículo rugoso bien desarrollado y a veces de disposición concéntrica.

Una proliferación de células linfoides pequeñas y grandes junto a una hiperplasia de vénulas con paredes epitelioides, aisladas células plasmáticas e importante fibrosis reticulínica definen histológicamente al linfoma T-periférico (figura 19). Los linfocitos pequeños con núcleos irregulares e hipercromáticos y escaso citoplasma, se entremezclan con células grandes de núcleos giriformes, de aspecto vesicular, con uno o varios nucleolos y amplio citoplasma basófilo. La naturaleza T de esta proliferación linfoide se pone de manifiesto al demostrar positividad focal citoplásmica con fosfatasas y esterases ácidas y contornos nucleares irregulares en las células linfoides, ultraestructuralmente (figura 20).

Los linfomas difusos de célula grande están constituidos por una población de células de gran tamaño con y sin hendiduras nucleares y variable cantidad de citoplasma, que exhiben una elevada actividad mitótica. En 7 linfomas, las células que predominan tienen hendiduras nucleares, pequeños nucleolos y escaso citoplasma. En 4 linfomas, las células tienen núcleos redondos u ovals, sin hendidu-

ras, con varios nucleolos marginales y un citoplasma amplio, basófilo y pironinófilo. En este grupo un patrón folicular de crecimiento con más de un 50% de centroblastos en los folículos, se ha observado en 3 linfomas. Además, en 8 de nuestros linfomas hemos observado focos de necrosis tumoral y en 3, bandas de esclerosis y una proporción elevada de inmunoblastos.

La presencia de células con núcleos multilobulados, profundas indentaciones, varios nucleolos y citoplasmas amplios y basófilos (figura 21) caracteriza al linfoma de célula grande de núcleo multilobulado. Desde el punto de vista ultraestructural, las células linfoides muestran núcleos complejos, a veces fragmentados y con múltiples lobulaciones.

Un linfoma folicular con más de un 50% de centroblastos presenta, ultraestructuralmente, células de 12 a 15 micras con núcleos grandes y ovals, con aisladas hendiduras, escasa heterocromatina y múltiples nucleolos de situación marginal. Una cantidad moderada de citoplasma contiene mitocondrias dispersas, escaso retículo rugoso y ribosomas libres.

En la categoría de alto grado de malignidad, el linfoma inmunoblástico se compone de una proliferación difusa de células grandes, con núcleo redondo u oval, vesicular y con uno o varios nucleolos prominen-

tes de situación central (figura 22). Además, el amplio citoplasma es intensamente basofílico y pironinófilo. En 5 de los 6 casos estudiados, hemos observado diferenciación plasmocitoide y en todos necrosis tumoral y elevada actividad mitótica. Mediante microscopía electrónica, los inmunoblastos aparecen como células grandes, de 16 a 18 micras, con núcleo ovalado, cromatina difusa y nucleolo central hiperplásico. El citoplasma es abundante y contiene cisternas de retículo rugoso y a veces, un aparato de golgi prominente.

En el linfoma inmunoblástico, variedad polimorfa, las células grandes tienen un núcleo irregular y un citoplasma basófilo pero sin pironinofilia. Entre las células grandes también se observan numerosos histiocitos epitelioides. El estudio citoquímico ha revelado intensa positividad citoplásmica con fosfatasas ácidas y débil con esterases ácidas en algunas células neoplásicas.

Los linfomas linfoblásticos se caracterizan por una proliferación monomorfa y difusa de blastos linfoides de mediano a gran tamaño. Estos muestran núcleos redondos y giriformes con cromatina difusa y nucleolos poco evidentes. El citoplasma es escaso y basófilo y las figuras de mitosis numerosas. Entre las células tumorales se identifican macrófagos cargados de restos celulares dando un aspecto de

cielo estrellado. El estudio citoquímico ha puesto de manifiesto una positividad focal citoplásmica con fosfatasas ácidas (figura 23) en los 4 linfomas estudiados, demostrando así, su naturaleza T. Por el contrario, los blastos linfoides no muestran actividad citoplásmica con estererasas ácidas.

Los linfomas de célula pequeña no hendida engloban a los linfomas tipo Burkitt y no Burkitt. En el linfoma tipo Burkitt, se observa una proliferación uniforme y monótona de células de mediano tamaño que se disponen difusamente entre macrófagos cargados de detritus celulares, dando una imagen en cielo estrellado. Las células tienen un núcleo redondo con cromatina difusa y de 2 a 5 pequeños nucleolos. El citoplasma es moderadamente amplio, intensamente basofílico y pironinófilo. En improntas se identifica con mayor facilidad numerosas vacuolas lipídicas en el citoplasma (figura 24) que por otro lado son positivas con la tinción oil red O. Las figuras de mitosis son muy numerosas. El estudio ultraestructural demuestra blastos linfoides de 8 a 10 micras, con núcleos redondos u ovales, cromatina difusa y varios nucleolos hiperplásicos. El citoplasma contiene abundantes poliribosomas, escasos orgánulos y vacuolas de grasa (figura 25).

Los linfomas tipo no Burkitt presentan las mismas

características que los linfomas tipo Burkitt y sólo un mayor pleomorfismo celular y una menor basofilia citoplasmática en los primeros permite su diferenciación.

Las lesiones cutáneas de la micosis fungoide están definidas por un infiltrado polimorfo de células linfoides pequeñas y ocasionalmente grandes con núcleos cerebriformes y escaso citoplasma, junto a eosinófilos, que se sitúa en la dermis superficial. Las células linfoides debido a su epidermotropismo invaden la epidermis y originan microabscesos de Pautrier. En los ganglios linfáticos, inicialmente el infiltrado polimorfo se sitúa a nivel paracortical, extendiéndose progresivamente hasta sustituir todo el tejido ganglionar. En los 3 casos estudiados hemos demostrado en el citoplasma de las células tumorales una positividad puntiforme paranuclear con fosfatasas y estererasas ácidas. Ultraestructuralmente, las células linfoides presentan núcleos cerebriformes con heterocromatina marginal y un pequeño nucleolo (figura 26). El citoplasma es escaso y contiene pocos orgánulos, algunos ribosomas y ocasionales lisosomas. Entre ellas aparecen algunas células de morfología estrellada correspondientes a células reticulares interdigitantes.

Las 3 tricoleucemias que hemos estudiado se caracterizan por una proliferación sinusal esplénica



de linfocitos de mediano tamaño con núcleo redondo, ligeramente excéntrico y citoplasma moderadamente amplio (figura 27). En improntas, las prolongaciones citoplásmicas se distinguen con dificultad y citoquímicamente se demuestra positividad citoplásmica granular con fosfatasas ácidas. Esta es tartrato-resistente en 2 de nuestros casos y con esterases ácidas la positividad es débil y heterogénea. La microscopía electrónica demuestra células de 10 micras de tamaño, con núcleos de contorno regular, cromatina marginal y difusa y un nucleolo. El citoplasma, que emite pequeñas prolongaciones, contiene mitocondrias, numerosos ribosomas libres y poliribosomas, retículo rugoso y en uno de los casos, complejos ribosómicos lamelares.

Los mielomas están constituidos por una proliferación de células plasmáticas desde formas bien y medianamente diferenciadas hasta mal diferenciadas. Estas se disponen en la médula ósea o en los ganglios linfáticos, bien de forma difusa o infiltrando parcialmente su arquitectura. En 8 casos, las células plasmáticas están bien diferenciadas y muestran un núcleo excéntrico con cromatina en "rueda de carro" y un citoplasma amplio, fuertemente basófilo, pironinófilo y positivo con el PAS (figura 28). En ocasiones, también se identifica células binucleadas.

En 3 casos las células plasmáticas están

mal diferenciadas y presentan escaso citoplasma, un núcleo con cromatina inmadura y un nucleolo. Con frecuencia se observa figuras de mitosis y células bi o trinucleadas. En 9 casos, las células plasmáticas muestran una diferenciación intermedia y son reconocidas con cierta facilidad. En 2 mielomas bien diferenciados se ha identificado inclusiones PAS positivas de inmunoglobulina intracitoplásmicas e intranucleares. En el estudio ultraestructural, las células plasmáticas más diferenciadas tienen un núcleo redondo, excéntrico, con heterocromatina marginal y a veces un nucleolo. En el amplio citoplasma se observa numerosas cisternas dilatadas de retículo endoplásmico rugoso y escasos orgánulos.

#### 4.3.- RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA E INMUNOLÓGICA DE LOS ÓRGANOS LINFOIDES.

El parénquima ganglionar reactivo está constituido por una cortical con folículos linfoides secundarios, una zona T o interfolicular y una medular con el sistema sinusal. Los folículos linfoides secundarios están compuestos de un centro claro germinal y de un manto folicular. El componente linfoide de la amígdala es semejante al del ganglio linfático observando con frecuencia en los centros germinales, una zona clara con células pequeñas hendidas y reticulares dendríticas y una zona densa con células grandes

y del sistema histiocito-macrófago. Además, el manto folicular se dispone de forma incompleta de manera que sólo las 2/3 partes del centro germinal están cubiertas por linfocitos. El epitelio amigdalario se sitúa entre los folículos linfoides y la zona interfolicular está reducida con respecto a la del ganglio.

El parénquima esplénico está formado por un componente linfoide que corresponde a la pulpa blanca y por los cordones de Billroth que delimitan los sinusoides, constituyendo la pulpa roja esplénica. La pulpa blanca se compone de áreas T periarteriolas y de zonas B, alrededor o cerca de las áreas T, que están constituidas por un folículo linfoide en "diana".

En el timo se observa una corteza y una médula con timocitos y células epiteliales. En la corteza, los timocitos subcapsulares son grandes y exhiben frecuentes figuras de mitosis, mientras que en la médula aparecen los corpúsculos de Hassall y folículos linfoides con centros germinales.

En el cuadro XII se presentan los resultados del estudio inmunológico de los órganos linfoides. En el tejido linfoide ganglionar, amigdalario y esplénico, identificando SIg hemos demostrado un patrón de tinción policlonal con cadenas ligeras. El complejo folicular (centro germinal y manto folicular) muestra tinción con cadenas pesadas IgM (figura 29), IgG

e IgA y con cadenas ligeras kappa y lambda. Sin embargo, el manto folicular en el tejido ganglionar y la zona intermedia de éste en el tejido esplénico muestran tinción sólo con IgD (figura 30). En el centro germinal algunas células tienen CIg de tipo IgM, IgG e IgA así como cadenas ligeras kappa y lambda, observando también un material extracelular que presenta tinción con todas las inmunoglobulinas, excepto IgD. En el área interfolicular se encuentran aisladas células linfoides con SIg de tipo IgM, IgD, IgG e IgA y cadenas ligeras kappa y lambda. Estas se encuentran también en el citoplasma de las células plasmáticas.

El complejo folicular se tiñe con los anticuerpos monoclonales contra células B, OKB2, OKB7 y OKIa1. El centro folicular muestra tinción con OKT9 y CALLA. Los folículos linfoides son funcionalmente áreas B, sin embargo con los anticuerpos contra células T y OKT11, se identifican linfocitos T en el centro germinal y manto folicular. La mayoría de éstas son OKT4 + (figura 31) y en menor proporción OKT8 +. Las células reticulares dendríticas del centro germinal y manto folicular, responsables de la presentación antigénica para la transformación de los linfocitos B, son OKM1 y OKM5 positivos.

Las zonas interfolicular y periarteriolar presentan positividad con los anticuerpos monoclonales

contra células T, OKT11, OKT4 y OKT8, superando en número las células OKT4 + a las OKT8 +. En estas áreas también se identifican aisladas células B positivas principalmente con OKB7. Las células endoteliales de las vénulas postcapilares se tiñen con OKIa1, OKM1 y OKM5, y las células reticulares interdigitantes con OKT6, OKT9 y OKIa1. En la zona T amigdalara se observan escasas células reticulares interdigitantes OKT6 + y es en el epitelio de la cripta amigdalara, cuyas células son + con OKB2, OKB7, anticuerpo monoclonal contra células B, OKIa1 y OKT9, donde se identifican algunas células con múltiples prolongaciones dendríticas OKT6 +. En el parénquima esplénico, las células reticulares interdigitantes OKT6 y OKIa1 +, se sitúan principalmente alrededor de las vainas linfoides periarteriolas. Las células de revestimiento del sistema sinusal son OKIa1 + y las células del sistema histiocito-macrófago, OKM1 y OKM5 +.

En el tejido linfoide tímico, los timocitos corticales muestran predominantemente tinción con OKT10, OKT6 y CALLA (figura 32), los timocitos medulares con el anticuerpo monoclonal contra células T y ambos con OKT4, OKT8 y OKT11. Por último, los timocitos subcapsulares y escasos corticales son OKT9 +.

#### 4.4.- RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE LOS LINFOMAS NO HODGKINIANOS Y MIELOMAS.

#### 4.4.1.-RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN SANGRE PERIFÉRICA.

En el cuadro XIII se presentan los resultados del estudio inmunológico en sangre periférica de 19 LLC B,1 leucemia prolinfocítica B,2 linfomas foliculares de célula pequeña hendida y 1 linfoma linfoblástico T.

Todas las LLC B muestran SIg polivalente,13 expresan cadenas ligeras kappa y 6 lambda, con carácter monoclonal. El porcentaje medio de células con SIg polivalente es de 76,3% con un intervalo de 27 a 94%, con cadenas ligeras kappa de 76,3% con un intervalo de 30 a 90% y con cadenas ligeras lambda de 70,3% con un intervalo de 27 a 90%. El porcentaje medio de células Leu-1 +, en 7 casos estudiados, es de 47,6% con un amplio intervalo entre 5 y 90%. Sólo en 3 de ellos, más del 50% de las células son +. El porcentaje medio de células OKT11 y OKM1 + es de 5,1% con un intervalo de 0 a 24% y 2% con un intervalo de 0 a 12%, respectivamente. El porcentaje medio de células OKIa1 + es de 82,3% y su intervalo de 44 a 96%. El porcentaje medio de células B1 + es de 56,9% y de 10 a 95% el intervalo.

El 68% de las células de una leucemia prolinfocítica son Leu-1 + y el 20% OKT11 +. El 15%, muestran positividad con OKT4 y por lo tanto son células inductoras/colaboradoras y el 5% son OKT8

positivas. Del 76% de las células con SIg polivalente, el 40% tienen un patrón de tinción monoclonal con cadenas ligeras kappa. Además, un 75,2 y 78% de las células expresan los anticuerpos monoclonales B1, OKM1 y OKIa1, respectivamente.

En 2 linfomas foliculares de célula pequeña hendida se ha demostrado monoclonalidad para cadenas ligeras kappa con un porcentaje medio e intervalo de células positivas de 78% y de 66 a 90%. El porcentaje medio de células con SIg polivalente es del 84% y el intervalo de 78 a 90%, de células B1 + 60% y el intervalo de 30 a 90% y de células OKIa1 + 74% y el intervalo de 58 a 90%. Los porcentajes medios de células OKM1 y OKT11 + son bajos, 4% con un intervalo de 1 a 7% y 19% con un intervalo de 9 a 29%, respectivamente. En ellos, no se han detectado células positivas con los anticuerpos monoclonales OKT4, OKT8 y CALLA.

El 90% de las células de un linfoma linfoblástico T son OKT11 y OKT6 +, no se observan células con SIg polivalente, cadenas ligeras kappa y lambda y con los anticuerpos monoclonales B1, OKIa1, OKM1 y CALLA no se detectan células +.

#### 4.4.2.-RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN TEJIDO INCLUIDO EN PARAFINA.

Los resultados del estudio inmunológico en parafina de 20 linfomas linfocíticos pequeños

y 18 linfomas foliculares se presentan en el cuadro XIV.

En 3 LLC B, una de ellas prolinfocítica, y en 1 linfoma T-periférico no se ha identificado CIg en las células tumorales. Sólo las células plasmáticas T-asociadas que aparecen en el linfoma T y se disponen alrededor de estructuras vasculares, contienen CIg principalmente IgM e IgG y muestran un patrón de tinción policlonal con cadenas ligeras kappa y lambda.

En 16 linfomas plasmocitoides hemos demostrado abundante CIg y expresión monoclonal de cadenas ligeras (figura 33), kappa en 7 y lambda en 9. De ellos, 11 tienen IgM como cadena pesada, 4 IgG y 1 IgM+IgD.

De 18 linfomas foliculares estudiados en parafina hemos podido determinar el fenotipo inmunológico en 10. En 8 linfomas foliculares, 7 de célula pequeña hendida y 1 de célula grande, no se ha identificado CIg. En 2 linfomas foliculares de célula pequeña hendida la escasa CIg detectada es de tipo IgM e IgG, respectivamente, con monoclonalidad para cadenas ligeras lambda. En 5 linfomas foliculares mixtos, la CIg es de tipo IgM en 2 e IgG en 3 y el patrón monotípico de tinción con cadenas ligeras es, en 4 lambda y en 1 kappa. En 3 de 4 linfomas folicu-



lares de célula grande, la CIg identificada es IgM y el patrón de tinción monoclonal con cadenas ligeras es, en 2 kappa y en 1 lambda.

En el cuadro XV aparecen los resultados del estudio inmunológico en parafina de 38 linfomas difusos de grado intermedio de malignidad.

Los 4 linfomas difusos de célula pequeña hendida presentan escasa CIg de tipo IgM, así como cadenas ligeras, kappa en 2 y lambda en 2, con un patrón de tinción monoclonal. En ellos, grupos perivasculares de células plasmáticas muestran CIg, principalmente de tipo IgG e IgA y un patrón de tinción policlonal con cadenas ligeras kappa y lambda, demostrándose así, su naturaleza reactiva y no neoplásica.

De 8 linfomas difusos mixtos de célula grande y pequeña, se ha demostrado CIg en 5 linfomas linfoplasmocitoides polimorfos y en 2 linfomas difusos mixtos representantes de la contraparte difusa del linfoma folicular mixto. Los linfomas linfoplasmocitoides polimorfos constituyen un grupo homogéneo en cuanto a la expresión de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, ya que los 5 presentan abundante CIg de tipo IgM/kappa. En 2 linfomas difusos mixtos de célula grande y pequeña hendida, la CIg es de tipo IgM e IgG, respectivamente con monoclonalidad para cadenas ligeras kappa en uno y lambda en otro.

En el citoplasma de las células plasmáticas y no en el de las células neoplásicas, presentes en el linfoma T-periférico estudiado en este grupo, se ha demostrado inmunoglobulina de tipo IgM e IgG y un patrón de tinción policlonal con cadenas ligeras.

En 3 de 5 linfomas difusos con predominio de células grandes hendidas hemos demostrado CIg con expresión monoclonal de cadenas ligeras lambda. Las cadenas pesadas son de tipo IgM en 2 e IgM+IgG en 1. Como se puede ver, 2 linfomas no tienen fenotipo inmunológico porque las células linfoides carecen de CIg. En 1 de 3 linfomas difusos de célula grande no hendida, no hemos identificado CIg y en 2, IgG en uno e IgM+IgA en otro, son las cadenas pesadas de inmunoglobulina detectadas en el citoplasma de las células linfoides. Además, en ambos hay un patrón de tinción monoclonal con cadenas ligeras, kappa en uno y lambda en otro. El linfoma difuso de célula grande con núcleo multilobulado, presenta abundante CIg de doble cadena pesada, IgM+IgG y restricción de cadenas ligeras lambda. Incluidos en el grupo de linfomas difusos de célula grande, 2 de 3 linfomas foliculares con más de un 50% de centroblastos, muestran CIg de tipo IgM e IgG, respectivamente y además, un patrón de tinción monotípico con cadenas ligeras kappa.

Los resultados del estudio inmunológico en parafina de 14 linfomas difusos de alto grado de malignidad, 3 micosis fungoides y 3 tricoleucemias figuran en el cuadro XVI.

En el grupo de linfomas de alto grado de malignidad, 5 linfomas inmunoblásticos con diferenciación plasmocitoide presentan CIg de tipo IgM y cadenas ligeras lambda en 4 y kappa en 1, con carácter monoclonal. El origen T de un linfoma inmunoblástico polimorfo y de 4 linfomas linfoblásticos se ha puesto de manifiesto al demostrar ausencia de CIg en los blastos linfoides. En algunos casos, grupos de células plasmáticas reactivas se han identificado entre las células tumorales merced a su patrón de tinción policlonal con cadenas ligeras. En 2 linfomas de célula pequeña no hendida tipo Burkitt la CIg está ausente, mientras que en los 2 linfomas tipo no Burkitt, IgG es la cadena pesada de inmunoglobulina detectada en el citoplasma. Ambos tienen un patrón de tinción monoclonal con cadenas ligeras, uno expresa kappa y otro lambda.

En 3 micosis fungoides no se ha detectado CIg y en 3 tricoleucemias ésta es abundante, de tipo IgG y monoclonal para cadenas ligeras lambda.

Los resultados del estudio inmunológico en parafina de 20 mielomas aparecen en el cuadro

XVII. En los mielomas solitarios y múltiples, plasmocitoma extramedular bronquial y leucemia de células plasmáticas hemos detectado abundante CIg y demostrado el carácter monoclonal de la proliferación neoplásica.

De los 7 mielomas solitarios, 4 son IgG y 2 IgA, 4 expresan cadenas ligeras kappa y 2 lambda. De éstos hemos encontrado 1 mieloma kappa sin cadenas pesadas y otro IgG sin cadenas ligeras.

De los 11 mielomas múltiples, 6 son IgG, 3 IgA, 2 IgD, 5 muestran un patrón de tinción monoclonal con cadenas ligeras kappa y 6 con cadenas ligeras lambda (figura 34). El plasmocitoma extramedular bronquial es IgA/kappa y la leucemia de células plasmáticas IgA/lambda.

#### 4.4.3.- RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN TEJIDO CONGELADO.

En el cuadro XVIII figuran los resultados del estudio inmunológico en congelación de 7 linfomas linfocíticos pequeños y 7 linfomas foliculares.

En 2 LLC B hemos identificado SIg, IgM asociada a IgD y demostrado la monoclonalidad para cadenas ligeras kappa. En una de ellas, las células linfoides son positivas con los anticuerpos monoclonales contra células B, OKB2, OKB7 y OKIa1, así como con OKT9 a nivel de los centros de proliferación. Por otro lado, las células linfoides son CALLA negativas

y con los anticuerpos monoclonales contra células T, OKT11, OKT4 y OKT8 se identifican un número variable de células T entre las células B neoplásicas, la mayoría OKT4 +.

En la pieza de esplenectomía, las células de hábito prolinfocítico de una leucemia prolinfocítica B, muestran SIgM y monoclonalidad para cadenas ligeras kappa, positividad con los anticuerpos contra células B, OKB2, OKIa1 y Leu-1 y negatividad con OKB7, CALLA, OKT9, OKT6, OKT11, OKT4, OKT8 y anticuerpo monoclonal contra células T. La mayoría de las células T identificadas con OKT11 se localizan en torno a estructuras pseudofoliculares de células neoplásicas y tienen un fenotipo inductor/colaborador ya que son OKT4 +. Un menor número de ellas son OKT8 +.

El linfoma T-periférico se caracteriza inmunológicamente por ausencia de SIg, positividad con el anticuerpo monoclonal contra células T, OKT11 y OKT4, y negatividad con OKIa1, OKT8 y anticuerpo monoclonal contra células B. Con OKT8 se demuestran aisladas células + y las estructuras foliculares residuales se ponen de manifiesto con los anticuerpos monoclonales contra células B y OKIa1, muestran SIg y policlonalidad con cadenas ligeras.

Los 3 linfomas plasmocitoides presentan escasa SIg, 2 de tipo IgM y 1 IgG, y expresan cadenas

ligeras lambda. Las células linfoplasmocitoides son positivas con los anticuerpos contra células B, OKB2, OKB7 y OKIa1 y negativas con CALLA. En uno de ellos, éstas son OKT9 negativas. Aisladas células T son identificadas con los anticuerpos contra células T, OKT11, OKT4 y OKT8.

En 7 linfomas foliculares hemos detectado SIg de tipo IgM y demostrado un patrón de tinción monoclonal con cadenas ligeras (figura 35), con una mayor densidad de inmunoglobulina a la observada en las LLC B y linfomas plasmocitoides. De 4 linfomas foliculares de célula pequeña hendida, 2 muestran tinción exclusivamente con cadenas ligeras kappa y 2 con cadenas ligeras lambda. Un linfoma folicular mixto tiene un patrón de tinción monoclonal con cadenas ligeras lambda y 2 linfomas foliculares de célula grande con cadenas ligeras kappa.

Las células centrofoliculares de los 7 linfomas foliculares estudiados muestran tinción con los anticuerpos contra células B, OKB2, OKB7 (figura 36), OKIa1, CALLA y OKT9. La tinción observada en las células centrofoliculares con OKB2 es menos intensa que con OKB7. En las áreas interfoliculares hemos observado numerosas células linfoides con idéntica SIg que las células centrofoliculares, la mayoría positivas con OKB7 y en menor número con OKB2. También

en esta área con OKT6 se identifican aisladas células reticulares interdigitantes y con los anticuerpos contra células T, OKT11, OKT4 y OKT8 se hacen patentes numerosas células T. Con frecuencia éstas se encuentran en el interior de los folículos y, a veces, en la periferia de los mismos.

De 18 linfomas foliculares caracterizados inmunológicamente, 11 presentan un manto de células linfoides pequeñas alrededor de las células centrofoli-culares y los resultados de su estudio con inmunoglobulinas, 7 en congelación y 4 en parafina, se presentan en el cuadro XIX.

En todos hemos demostrado SIg con diversidad de cadenas pesadas y un patrón de tinción policlonal con cadenas ligeras en las células linfoides del manto (figura 37). Estas expresan como cadenas pesadas, en 1 linfoma IgM, en 3 IgM+IgD, en 2 IgM+IgG, en 2 IgG y en 3 IgG+IgA. El patrón de tinción policlonal observado con cadenas ligeras indica su naturaleza reactiva y no neoplásica. Además, las células del manto, en los 7 casos estudiados en congelación, muestran positividad con los anticuerpos contra células B, OKB2, OKB7 y OKIa1.

En el cuadro XX se presentan los resultados del estudio inmunológico en congelación de 4 linfomas difusos de grado intermedio de malignidad.

Los 2 linfomas difusos de célula pequeña hendida tienen SIgM y expresan cadenas ligeras kappa y lambda con carácter monoclonal, respectivamente. Las células pequeñas hendidas son positivas con los anticuerpos contra células B, OKB2, OKB7 y OKIa1, y negativas con CALLA.

El linfoma T-periférico, clasificado como linfoma difuso mixto, se caracteriza por presentar ausencia de SIg, negatividad con OKT6 y positividad con los anticuerpos contra células T y OKT11. Una proporción importante de éstas son OKT4 + (figura 38) y un menor número de ellas OKT8 +.

En el linfoma difuso de célula grande con núcleo multilobulado se demuestra SIg de doble cadena pesada, IgM + IgG, y un patrón de tinción monotípico con cadenas ligeras lambda. El origen B de este linfoma también se pone de manifiesto por la positividad con los anticuerpos contra células B, OKB2, OKB7, OKIa1 y CALLA.

Al igual que en los linfomas foliculares, en los linfomas difusos B se identifican un número variable de células T con los anticuerpos monoclonales contra células T y OKT11, correspondiendo la mayoría a células OKT4 + y en menor proporción a células OKT8 +. En el linfoma T-periférico, con los anticuerpos monoclonales contra células B, OKB2, OKB7 y OKIa1, se



detectan aisladas células B entre las células T neoplásicas.

Los resultados del estudio inmunológico en congelación de 3 linfomas de alto grado de malignidad, 3 micosis fungoides, 3 tricoleucemias y 1 mieloma múltiple aparecen en el cuadro XXI.

Las células de 1 linfoma inmunoblástico con diferenciación plasmocitoide tienen escasa SIg de tipo IgM y expresan monoclonalidad con cadenas ligeras kappa, positividad con los anticuerpos contra células B, OKB2, OKB7, OKIa1 y OKT9, y negatividad con CALLA.

Dos linfomas de célula pequeña no hendida tipo Burkitt presentan SIg, IgM/lambda y positividad con el anticuerpo monoclonal contra células B. Los blastos linfoides de uno de ellos, muestran reactividad con OKB2, OKB7, OKIa1, OKT9 y CALLA. Tanto en el linfoma inmunoblástico como en el de célula pequeña no hendida tipo Burkitt se identifican células T en proporciones variables, con los anticuerpos monoclonales contra células T, OKT11, OKT4 y OKT8.

En el grupo de miscelánea, las células de 3 micosis fungoides carecen de SIg, presentan reactividad con los anticuerpos monoclonales contra células T y OKT11 y tienen un fenotipo inductor/colaborador, al ser OKT4 + (figura 39). Una menor proporción

de células son OKT8 + y con los anticuerpos monoclonales contra células B y OKIa1 se identifican estructuras foliculares residuales. Estas con inmunoglobulinas tienen un patrón de tinción idéntico al observado en las hiperplasias foliculares reactivas. Las células reticulares interdigitantes, entre las células T neoplásicas, son OKT6 +.

Las 3 tricoleucemias presentan abundante SIg de tipo IgG y expresan cadenas ligeras lambda con carácter monoclonal. Las células linfoides son positivas con los anticuerpos contra células B y OKIa1. En 1 caso, éstas son OKB7 +, CALLA -, OKM1 + y OKM5 -. Con los anticuerpos monoclonales contra células T y OKT11 se demuestra la presencia de algunas células T, en su mayoría OKT4 +.

Finalmente, en 1 mieloma múltiple, las células plasmáticas bien diferenciadas carecen tanto de SIg como de reactividad con los anticuerpos monoclonales contra células B, OKB2, OKB7, OKIa1 y CALLA. Además, entre las células plasmáticas, escasas células T son identificadas con los anticuerpos monoclonales contra células T, OKT11, OKT4 y OKT8.

#### 4.5.-RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN LOS ÓRGANOS LINFOIDES LINFOMAS NO HODGKINIANOS Y MIELOMAS.

En el cuadro XXII figuran los resultados

del estudio de la población y subpoblaciones de linfocitos T, detectados con los anticuerpos monoclonales OKT11, OKT4 y OKT8, en las áreas folicular e interfolicular de 7 linfomas foliculares y 13 hiperplasias foliculares.

El porcentaje medio de células OKT11 + en el área folicular de los linfomas e hiperplasias foliculares es  $24,9 \pm 5,8\%$  y  $22,5 \pm 5,4\%$ , respectivamente.

En los linfomas foliculares, el porcentaje medio de células OKT4 + es  $23,8 \pm 8,9\%$  y en las hiperplasias foliculares  $18,3 \pm 4,7\%$ .

El porcentaje medio de células OKT8 + en los linfomas foliculares es  $13,4 \pm 3,3\%$  y en las hiperplasias foliculares  $7,2 \pm 4,0\%$ .

Como se puede ver no existen diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes medios de células OKT11 y OKT4 +, en las áreas foliculares de los linfomas e hiperplasias foliculares. Sin embargo, hay una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre los porcentajes medios de células OKT8 +, en las áreas foliculares de los linfomas e hiperplasias foliculares. El porcentaje medio de células OKT8 + es mayor en los linfomas foliculares que en las hiperplasias foliculares.

El porcentaje medio de células OKT11 + en el área interfolicular de los linfomas e hiperplasias folicu-

lares es  $31,9 \pm 16,8\%$  y  $79,4 \pm 11,4\%$ , respectivamente.

El porcentaje medio de células OKT4 + en los linfomas foliculares es  $26,0 \pm 8,6\%$  y en las hiperplasias foliculares  $63,4 \pm 14,8\%$ .

El porcentaje medio de células OKT8 + en los linfomas foliculares es  $17,6 \pm 4,7\%$  y en las hiperplasias foliculares  $24,8 \pm 6,9\%$ .

Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) observadas entre los porcentajes medios de células OKT11, OKT4 y OKT8 + en las áreas interfoliculares de los linfomas e hiperplasias foliculares son debidas a una disminución de éstas en las áreas interfoliculares de los linfomas foliculares.

En el cuadro XXIII, figuran los resultados del estudio de la población y subpoblaciones de células T, en 5 linfomas T, 13 linfomas difusos B y 1 mieloma múltiple.

Los porcentajes medios de células OKT11 + en 2 linfomas T-periféricos y 3 micosis fungoides son  $78,6 \pm 10\%$  y  $80,7 \pm 7,0\%$ , respectivamente. Estos porcentajes medios, similares entre sí, se encuentran notablemente elevados con respecto a los observados en los linfomas difusos B y son el resultado de la proliferación celular T que caracteriza a estos linfomas.

La relación entre células OKT4 y OKT8

+ (ratio OKT4/OKT8) es 7,4 en 2 linfomas T-periféricos y 4,6 en 3 micosis fungoides. Como se puede apreciar hay un predominio de células OKT4 + y por lo tanto, con fenotipo inductor/colaborador.

Globalmente, los porcentajes medios de células OKT11 + en 13 linfomas difusos B y 1 mieloma múltiple, son variables. En 1 LLC B es  $17,0 \pm 3,5\%$ , en 1 leucemia prolinfocítica B  $21,0 \pm 2,8\%$ , en 3 linfomas plasmocitoides  $10,6 \pm 2,4\%$ , en 2 linfomas difusos de célula pequeña hendida  $13,6 \pm 2,6\%$ , en 1 linfoma difuso de célula grande de núcleo multilobulado  $22,0 \pm 3,5\%$ , en 1 linfoma inmunoblástico  $7,0 \pm 2,1\%$ , en 1 linfoma de célula pequeña no hendida  $23,6 \pm 5,3\%$ , en 3 tricoleucemias  $18,1 \pm 2,7\%$  y en 1 mieloma múltiple  $7,3 \pm 2,0\%$ .

El valor de la ratio OKT4/OKT8 es de 1,25 en 1 LLC B y 1 leucemia prolinfocítica, 1,24 en 3 linfomas plasmocitoides, 1,17 en 2 linfomas difusos de célula pequeña hendida, 1,43 en 1 linfoma difuso de célula grande de núcleo multilobulado, 1,5 en 1 linfoma inmunoblástico, 0,4 en 1 linfoma de célula pequeña no hendida, 1,35 en 3 tricoleucemias y 3,5 en 1 mieloma múltiple.

Como se puede ver, en todos los linfomas difusos B y en el mieloma múltiple, existe un predominio de células OKT4 + excepto en el linfoma de célula pequeña no hendida tipo Burkitt, procedente de un

paciente afecto de un síndrome de inmunodeficiencia adquirida. En este linfoma hay una inversión de la ratio OKT4/OKT8 a favor de las células OKT8 +, con fenotipo citotóxico/supresor.

#### 4.6.-RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL FENOTIPO INMUNOLÓGICO Y EXPRESIÓN MONOCLONAL DE CADENAS LIGERAS EN RELACIÓN CON EL SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE LOS LINFOMAS NO HODGKI- NIANOS.

Como se puede observar en el cuadro XXIV, hemos caracterizado inmunológicamente 100 linfomas no hodgkinianos, de los que el 82% son linfomas B, el 10% linfomas T y el 8% corresponden a linfomas aparentemente sin fenotipo inmunológico.

Los linfomas T se distribuyen, 1 en la categoría de bajo grado, 1 en la de grado intermedio y 5 en la de alto grado de malignidad. En los grupos de linfomas, linfocítico pequeño y difuso mixto, hemos clasificado 2 linfomas T-periféricos, uno en cada grupo, respectivamente. Un linfoma T se ha clasificado en el grupo de linfomas inmunoblásticos y 4 en el grupo de linfomas linfoblásticos. En el grupo de miscelánea hay 3 micosis fungoides.

Los linfomas B se distribuyen, 48 en la categoría de bajo grado de malignidad, de los que 37 son linfomas linfocíticos pequeños y 11 linfomas foliculares. En la categoría de grado intermedio

de malignidad hay 22 linfomas, 3 foliculares de célula grande y 19 difusos, de los que 4 son de célula pequeña hendida, 7 son mixtos y 8 son de célula grande. En la categoría de alto grado de malignidad hay 9 linfomas, 5 inmunoblásticos y 4 de célula pequeña no hendida. En el grupo de miscelánea hay 3 tricoleucemias.

El 8% de los linfomas no hodgkinianos carecen de fenotipo inmunológico debido a que éste se ha determinado exclusivamente en tejido incluido en parafina y no hemos detectado CIg. Sin embargo, 5 de ellos son linfomas foliculares, 3 de célula pequeña hendida y 1 de célula grande, y se consideran linfomas B. Por el contrario, entre los 3 linfomas difusos de célula grande no se puede descartar que exista alguno inmunológicamente T.

En la categoría de bajo grado de malignidad, 25 linfomas expresan cadenas ligeras kappa y 23 lambda. En la categoría de grado intermedio de malignidad 13 linfomas expresan cadenas ligeras kappa y 9 lambda. Por último, en la categoría de alto grado de malignidad, 2 linfomas expresan cadenas ligeras kappa y 7 lambda.

Como se puede ver, existe una relación entre la expresión monoclonal de cadenas ligeras por los linfomas y su clasificación en categorías de malignidad. En la categoría de alto grado de maligni-

dad hay un predominio de linfomas con expresión monoclonal de cadenas ligeras lambda, mientras que en las categorías de bajo y grado intermedio de malignidad hay un equilibrio entre los linfomas con expresión monoclonal de cadenas ligeras kappa y lambda, si bien hay un ligero predominio de kappa sobre lambda.



CUADROS Y FIGURAS.

CUADRO VIII.- EDADES MEDIAS, DESVIACIONES STANDARD E INTERVALOS DE EDAD DE 106 PACIENTES CON DIFERENTES LINFOMAS NO HODGKINIANOS, JUNTO AL N° DE CASOS Y RATIO H/M EN CADA UNO DE ELLOS.

PARAMETROS	LLP*	LF	LDGI	LI	LL	LNH	MF	TCL
N° CASOS	43	19	24	6	4	4	3	3
EDAD MEDIA	61,2	56,1	59,0	67,8	16,0	15,7	51,0	46,6
D.S.	14,6	11,2	16,1	11,7	7,1	6,8	8,8	5,3
INTERVALO	17-87	36-78	14-81	50-84	7-24	5-23	39-60	40-53
RATIO H/M	1	1,3	1	5	1	4/0	0,5	2

\* LLP:LLC;  $63,9 \pm 11,8$  (43-87). Ratio H/M:0,7.

L.Plasmocitoide;  $56,4 \pm 17,5$  (17-82). Ratio H/M:1,2.

$p < 0,05$  entre LF y LI.  $p < 0,05$  entre LL, LNH y demás grupos de linfomas no hodgkinianos.

---

Abreviaturas: LLP, linfoma linfocítico pequeño; LF, linfoma folicular; LDGI, linfoma difuso de grado intermedio de malignidad; LI, linfoma inmunoblástico; LL, linfoma linfoblástico; LNH, linfoma de célula pequeña no hendida; MF, micosis fungoide; TCL, tricoleucemia.

CUADRO IX.- EDAD MEDIA, INTERVALO Y RATIO H/M DE 12 PACIENTES CON LINFOMA 1º GASTROINTESTINAL, JUNTO AL Nº DE CASOS Y LOCALIZACIÓN DE LOS MISMOS.

PARAMETROS	RESULTADOS
Nº DE CASOS	12 (11,3%)
EDAD MEDIA $\pm$ D.S.	51,6 $\pm$ 21,9
INTERVALO	(15-84)
RATIO H/M	1,4
LOCALIZACIÓN	
- Estómago.	7 casos (58%)
- I.Delgado.	4 casos (33%)
- I.Grueso.	1 caso (8%)

CUADRO X.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE 20 PACIENTES CON MIELOMA.

PARAMETROS	M.SOLITARIOS	M.MÚLTIPLES	P.EXTRAMEDULAR	L.C.P
Nº CASOS	7 (35%)	11 (55%)	1 (5%)	1 (5%)
$\bar{X}$ EDAD $\pm$ D.S	52,0 $\pm$ 13,7*	57,5 $\pm$ 7,8*	51	68
INTERVALO	(34-71)	(40-71)		
RATIO H/M	2,5	2,6	1/0	1/0
G.M.SÉRICA	2/5 (40%)	8 (73%)	1	0
P.B.Jones	0/5 (0%)	5 (45%)	0	0
E.CLÍNICOS				
I		0		
II		7(A)(64%)		
III		4(3B)(36%)		
* Diferencias no significativas.				

CUADRO XI.- INMUNOGLOBULINAS DETECTADAS MEDIANTE INMUNOELECTROFORÉISIS EN 20 PACIENTES CON MIELOMA.

MIELOMAS	Nº	CADENAS PESADAS					CADENAS LIGERAS			
		ND	∅	IgD	IgG	IgA	ND	∅	Kappa	Lambda
SOLITARIOS	7	2	3		2		2	3	2	
MÚLTIPLES	11		3	2	4	2		3	2	6
EXTRAME- DULARES	1					1			1	
L.CÉLULAS PLASMÁTICAS	1		1					1		

CUADRO XII.- RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO DE LOS ÓRGANOS LINFOIDES.

PARÁMETROS	G.LINFÁTICOS		
	Y AMÍGDALA	BAZO	TIMO
Nº CASOS	10	3	1
PATRÓN TINCIÓN SIg:			
- IgM, IgG e IgA	Complejo folicular	Complejo folicular	ND
- IgD	Manto folicular	Manto intermedio	ND
- Kappa y lambda	Complejo folicular	Complejo folicular	ND
PATRÓN TINCIÓN Ac.Mo:			
- CB, OKB2 y OKB7	Complejo folicular	Complejo folicular	ND
- OKIa1	Complejo folicular	Complejo folicular	ND
- CALLA	Centro germinal	Centro germinal	T.Corticales
- OKT11, OKT4 y OKT8	A. Interfolicular	A. Periarteriolar	T. Cort/med.
- CT	A. Interfolicular	A. Periarteriolar	T. Medulares.
- OKT6	C.R.I.	C.R.I.	T. Corticales
- OKT9	Centro germinal	Centro germinal.	T. Subcapsul.
- OKT10	ND	ND	T. Corticales
- OKM1 y OKM5	C.R.D. H-M.	C.R.D. H-M.	ND
Complejo folicular: Manto folicular y centro germinal. CRI: Célula reticular interdigitante. CRD: Célula reticular dendrítica. ND: No determinado.			

CUADRO XIII.- RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN SANGRE PERIFÉRICA DE 19 LLC-B,1 LEUCEMIA PROLINFOCÍTICA B,2 LINFOMAS FOLICULARES DE CÉLULA PEQUEÑA HENDIDA Y 1 LINFOMA LINFOBLÁSTICO T.

TIPOS	Nº	IgS			ANTICUERPOS MONOCLONALES									
		IgSP	K	L	B1	Ia1	M1	Leu1	T11	T4	T8	T6	CALLA	
<u>LLC-B</u>	19													
% medios		76,3	76,3	70,3	56,9	82,3	2	47,6*	5,1	ND	ND	ND	ND	
Intervalos		27 a 94	30 a 90	27 a 90	10 a 95	44 a 96	0 a 12	5 a 90	0 a 24					
Monoclonalidad			13	6										
<u>L.P-B</u>	1													
% células +		76	40	0	75	78	2	68	20	15	5	ND	ND	
<u>L.F.C.P.HENDIDA</u>	2													
% medios		84	78	0	60	74	4	ND	19	0	0	0	ND	
Intervalos		78 a 90	66 a 90		30 a 90	58 a 90	1 a 7		9 a 29					
Monoclonalidad			2	0										
<u>L.LINFOBLÁSTICO T</u>	1													
% células +		0	0	0	0	0	0	ND	90	ND	ND	90	0	
<p>IgSP:Inmunoglobulina de superficie polivalente.  * % medios de células + en 7 casos determinados.  ND:No determinados.</p>														

CUADRO XIV.- RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN PARAFINA DE 20 L.L.PEQUEÑOS Y 18 L.FOLICULARES.

TIPOS	Nº	INMUNOGLOBULINA CITOPLÁSMICA					
		Ø	KAPPA	LAMBDA	IgM	IgG	IgM+IgD
<u>L.L.PEQUEÑOS</u>	20						
- LLC-B	2	2					
- L.Prol-B	1	1					
- L.T-perif.	1	1					
- L.Plasmocit.	16		7	9	11	4	1
<u>L.FOLICULARES</u>	18						
- L.F.Pequeño	9	7		2	1	1	
- L.F.Mixto	5		1	4	2	3	
- L.F.Grande	4	1	2	1	3		

CUADRO XV.- RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN PARAFINA DE 38 L.DIFUSOS DE GRADO INTERMEDIO DE MALIGNIDAD.

TIPOS	Nº	INMUNOGLOBULINA CITOPLÁSMICA						
		Ø	KAPPA	LAMBDA	IgM	IgG	IgM+IgG	IgM+IgA
<u>L.D.PEQUEÑO</u>	4		2	2	4			
<u>L.D.MIXTO</u>	8							
- L.LP.Polimorfo	5		5		5			
- L.D.M.Hendida	2		1	1	1	1		
- L.T-periférico	1	1						
<u>L.D.GRANDE</u>	12							
- C.Hendida	5	2		3	2		1	
- C.No hendida	3	1	1	1		1		1
- N.Multilobulado	1			1		1		
- Folicular(>50%Cbl)	3	1	2		1	1		

CUADRO XVI.- RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN PARAFINA DE 14 L.DIFUSOS DE ALTO GRADO DE MALIGNIDAD 3 MICOSIS FUNGOIDES Y 3 TRICOLEUCEMIAS.

TIPOS	Nº	INMUNOGLOBULINA CITOPLÁSMICA				
		Ø	KAPPA	LAMBDA	IgM	IgG
<u>L. INMUNOBLÁSTICOS</u>	6					
- Plasmocitoides	5		1	4	5	
- Polimorfos	1	1				
<u>L. LINFOBLÁSTICOS T</u>	4	4				
<u>L.C.P. NO HENDIDAS</u>	4					
- Burkitt	2	2				
- No Burkitt	2		1	1		2
<u>MICOSIS FUNGOIDES</u>	3	3				
<u>TRICOLEUCEMIAS</u>	3			3		3

CUADRO XVII.- RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN PARAFINA DE 20 MIELOMAS.

TIPOS	Nº	INMUNOGLOBULINA CITOPLÁSMICA					
		Ø	KAPPA	LAMBDA	IgD	IgG	IgA
<u>M. SOLITARIO</u>	7	2	4*	2		4 <sup>\$</sup>	2
<u>M. MÚLTIPLE</u>	11		5	6	2	6	3
<u>P. EXTRAMEDULAR</u>	1		1				1
<u>L.C. PLASMÁTICAS</u>	1			1			1

\* 1 mieloma solitario kappa no tiene cadenas pesadas.  
<sup>\$</sup> 1 mieloma solitario IgG no tiene cadenas ligeras.

CUADRO XVIII.-RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN CONGELACIÓN DE 7 L.L.PEQUEÑOS Y 7 L.FOLICULARES.

TIPOS	Nº	SIg						ANTICUERPOS MONOCLONALES												
		Ø	K	L	M	G	M+D	CB	B2	B7	Ia1	CALLA	T9	CT	Ia1	T11	T4	T8	T6	
<u>L.L.PEQUEÑOS</u>	7																			
- LLC-B	2	2				2		1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	ND	0/1	0/1	0/1	ND	
- L.PL-B	1	1	1					1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
- L.T-P	1	1						0	ND	ND	0	ND	ND	1	ND	1	1	0	0	
- L.Plasm.	3		3	2	1			3	3	3	3	0	0/1	0	ND	0	0	0	ND	
<u>L.FOLICULARES</u>	7																			
- L.F.Pequeño	4	2	2	4				4	4	4	4	4	4	0	ND	0	0	0	0	
- L.F.Mixto	1		1	1				1	1	1	1	1	1	0	ND	0	0	0	0	
- L.F.Grande	2	2	2					2	2	2	2	2	2	0	ND	0	0	0	0	

CUADRO XIX.- RESULTADOS DEL ESTUDIO CON INMUNOGLOBULINAS, EN CONGELACIÓN Y PARAFINA, DEL MANTO FOLICULAR EN 11 LINFOMAS FOLICULARES.

TIPOS	Nº	M.FOLICULAR presente	INMUNOGLOBULINAS							
			K	L	KyL	IgM	IgM+D	IgM+G	IgG	IgG+A
L.F.PEQUEÑO	9	7	0	0	7	1	1	1	2	2
L.F.MIXTO	5	1	0	0	1		1			
L.F.GRANDE	4	3	0	0	3		1	1		1



CUADRO XX.- RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN CONGELACIÓN DE 4 L.DIFUSOS DE GRADO INTERMEDIO DE MALIGNIDAD.

TIPOS	Nº	Sig					ANTICUERPOS MONOCLONALES									
		Ø	K	L	M	M+G	CB	B2	B7	Ia1	CALA	CT	T11	T4	T8	T6
<u>L.D.PEQUEÑO</u>	2		1	1	2		2	2	2	2	0	0	0	0	0	ND
<u>L.D.MIXTO</u>	1															
- L.T-P	1	1					0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
<u>L.D.GRANDE</u>	1															
- N.Multilob.	1			1		1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	ND

CUADRO XXI.- RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOLÓGICO EN CONGELACIÓN DE 3 L.D.DE ALTO GRADO DE MALIGNIDAD,3 MICOSIS FUNGOIDES,3 TRICOLEUCEMIAS Y 1 MIELOMA MÚLTIPLE.

TIPOS	Nº	Sig					ANTICUERPOS MONOCLONALES												
		Ø	K	L	M	G	CB	B2	B7	Ia1	CALA	T9	CT	T11	T4	T8	T6	M1	M5
<u>L.IMMUNOBLÁSTICO</u>	1																		
- Plasmocitoide	1		1	1			1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	ND	ND	ND
<u>L.C.P.NO HENDIDA</u>	2																		
- Burkitt	2			2	2		2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	ND	ND
<u>MICOSIS FUNGOIDE</u>	3	3					0	ND	ND	0	ND	ND	3	3	3	0	0	ND	ND
<u>TRICOLEUCEMIA</u>	3		3	3			3	ND	1/1	3	0/1	ND	0	0	0	0	ND	1/1	0/1
<u>MIELOMAS</u>	1																		
- M.Múltiple	1	1					0	0	0	0	0	ND	0	0	0	0	ND	ND	ND

CUADRO XXII.- RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA POBLACIÓN Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T, EN LAS ÁREAS FOLICULAR E INTERFOLICULAR, DE 7 LINFOMAS Y 13 HIPERPLASIAS, FOLICULARES.

AC.MO	ÁREA FOLICULAR			ÁREA INTERFOLICULAR		
	LINFOMAS	HIPERPLASIAS	Signif.	LINFOMAS	HIPERPLASIAS	Signif.
OKT11	24,9 <sup>±</sup> 5,8* (18-35,3)	22,5 <sup>±</sup> 5,4 (8-30)	NS	31,9 <sup>±</sup> 16,8 (16,3-62,6)	79,4 <sup>±</sup> 11,4 (60,3-94,3)	p<0,05
OKT4	23,8 <sup>±</sup> 8,9 (13-42,3)	18,3 <sup>±</sup> 4,7 (5,3-24,6)	NS	26,0 <sup>±</sup> 8,6 (15,6-42,3)	63,4 <sup>±</sup> 14,8 (39,6-87,6)	p<0,05
OKT8	13,4 <sup>±</sup> 3,3 (9,3-18,6)	7,2 <sup>±</sup> 4,0 (4,6-10,8)	p<0,05	17,6 <sup>±</sup> 4,7 (12,3-27,3)	24,8 <sup>±</sup> 6,9 (17,0-45,3)	p<0,05

\* Medias y desviaciones standard de los porcentajes de células T contadas en 3 áreas, en cada uno de los 7 linfomas foliculares y 13 hiperplasias foliculares. Intervalos de las medias entre paréntesis.

CUADRO XXIII.- RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA POBLACIÓN Y SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS T EN 5 LINFOMAS T, 13 LINFOMAS DIFUSOS B Y 1 MIELOMA MÚLTIPLE.

TIPOS	Nº	OKT11 (%)	RATIO OKT4/OKT8
<u>LINFOMAS T</u>	5		
- L.T-Periférico	2	78,6 <sup>±</sup> 10,0*	7,4
- Micosis fungoides	3	80,7 <sup>±</sup> 7,0	4,6
<u>LINFOMAS B</u>	13		
- LLC-B	1	17,0 <sup>±</sup> 3,5	1,25
L.PL-B	1	21,0 <sup>±</sup> 2,8	1,25
- L.Plasmocitoide	3	10,6 <sup>±</sup> 2,4	1,24
- L.D.Pequeño	2	13,6 <sup>±</sup> 2,6	1,17
- L.D.G.Núcleo multilobulado	1	22,0 <sup>±</sup> 3,5	1,43
- L.Imunoblástico	1	7,0 <sup>±</sup> 2,1	1,50
- L.Burkitt	1	23,6 <sup>±</sup> 5,3	0,40
- Tricoleucemias	3	18,1 <sup>±</sup> 2,7	1,35
<u>MIELOMA MÚLTIPLE</u>	1	7,3 <sup>±</sup> 2,0	3,50

\* Medias y desviaciones standard de los porcentajes de células T.

CUADRO XXIV.- RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE FENOTIPO INMUNOLÓGICO, EXPRESIÓN MONOCLONAL DE CADENAS LIGERAS Y CLASIFICACIÓN DE 100 LINFOMAS NO HODGKINIANOS.

GRUPOS	Nº	CADENAS LIGERAS			FENOTIPO		
		Ø	KAPPA	LAMBDA	B	T	ND
<u>BAJO GRADO</u>	52	4	25	23	48	1	3
L.L.Pequeño	38	1	22	15	37	1	0
L.F.Pequeño	9	3	2	4	6	0	3
L.F.Mixto	5	0	1	4	5	0	0
<u>GRADO INTERMEDIO</u>	28	6	13	9	22	1	5
L.F.Grande	4	1	2	1	3	0	1
L.D.Pequeño	4	0	2	2	4	0	0
L.D.Mixto	8	1	6	1	7	1	0
L.D.Grande	12	4	3	5	8	0	4
<u>ALTO GRADO</u>	14	5	2	7	9	5	0
L.Irnmoblástico	6	1	1	4	5	1	0
L.Linfoblástico	4	4	0	0	0	4	0
L.C.P.No hendida	4	0	1	3	4	0	0
<u>MISCELÁNEA</u>	6	3	0	3	3	3	0
Micosis fungoide	3	3	0	0	0	3	0
Tricoleucemia	3	0	0	3	3	0	0
TOTAL .....	100	18	40	42	82	10	8

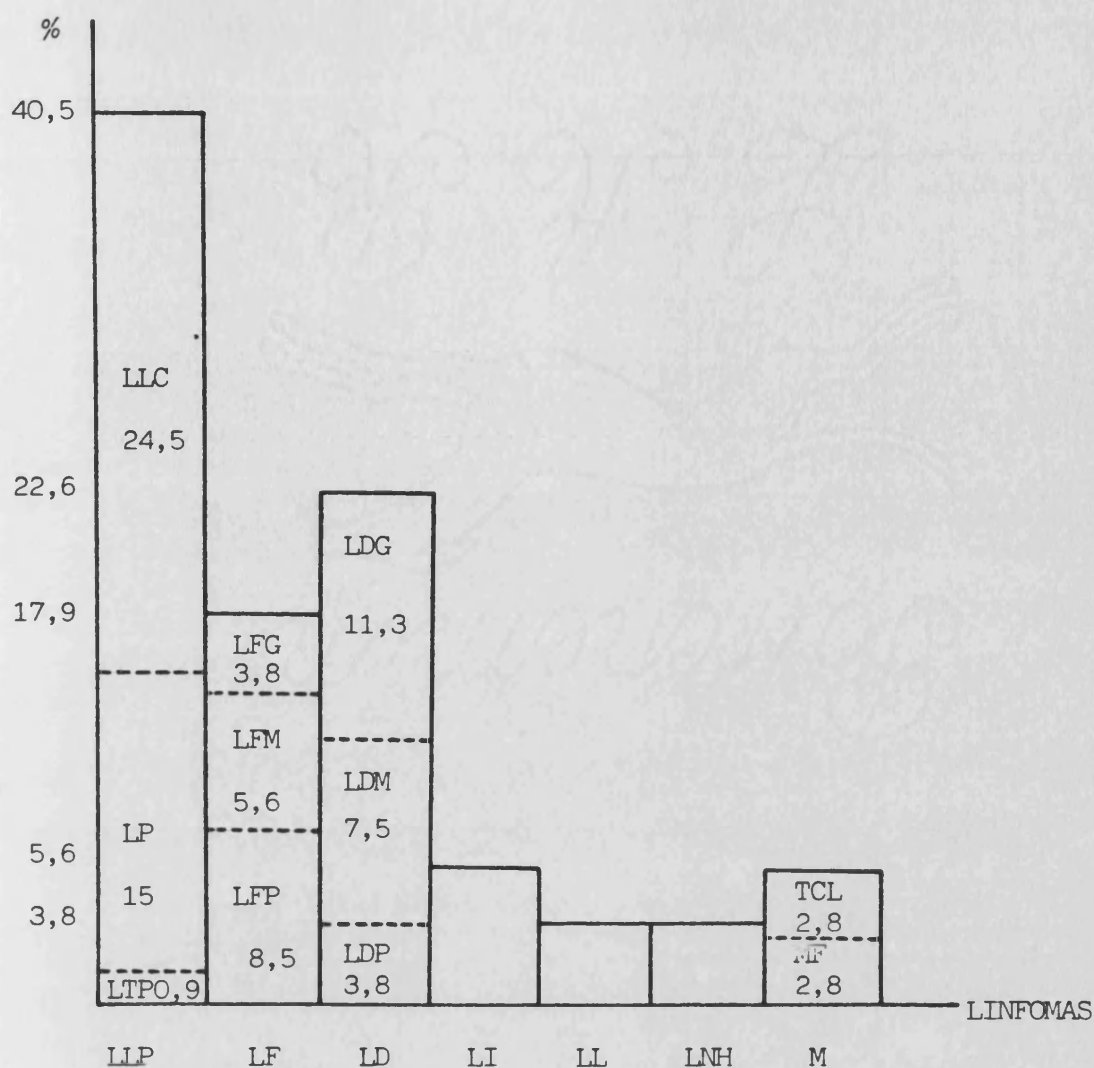


FIGURA 1.- Frecuencia y distribución de 106 linfomas no hodgkinianos agrupados según la clasificación de la Formulación Internacional de Trabajo.

LLP, linfoma linfocítico pequeño; LTP, linfoma T-periférico; LP, linfoma plasmocitoide; LLC, leucemia linfocítica crónica; LF, linfoma folicular; LFP, folicular de célula pequeña; LFM, folicular mixto; LFG, folicular de célula grande; LD, linfoma difuso; LDP, de célula pequeña; LDM, difuso mixto; LDG, difuso de célula grande; LI, linfoma inmunoblástico; LL, linfoma linfoblástico; LN, de célula pequeña no hendida; M, miscelánea; MF, micosis fungoide; TCL, tricoleucemia.

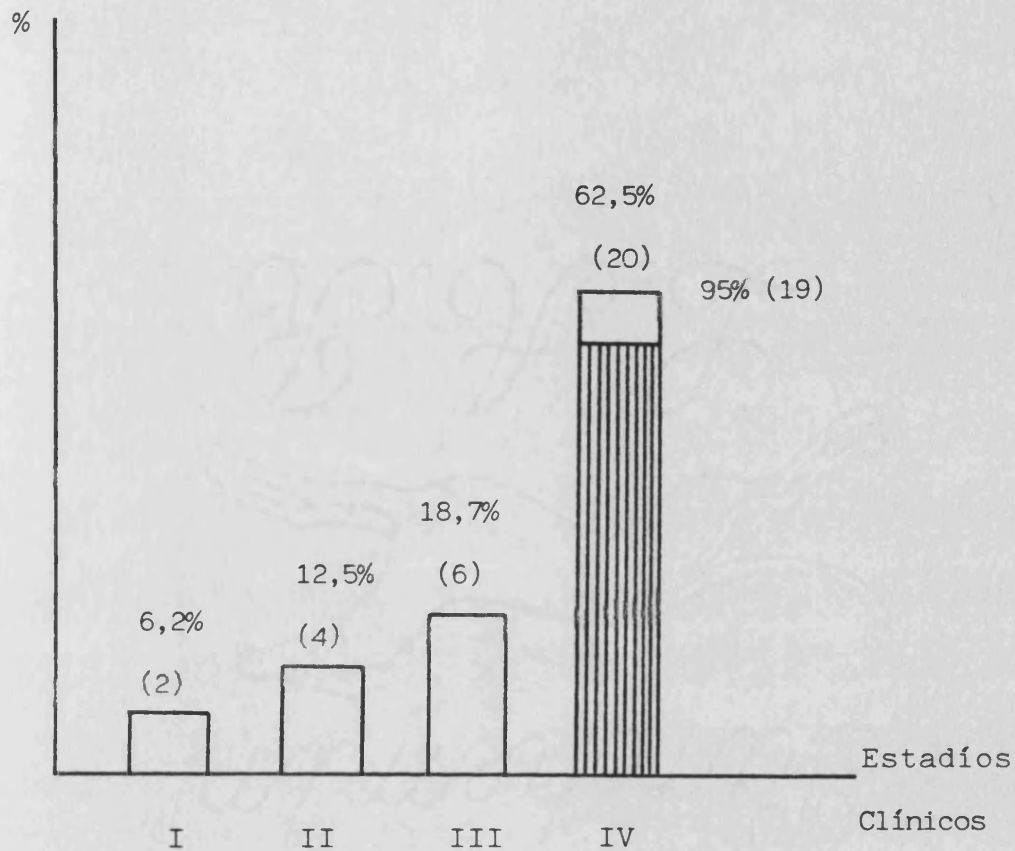



FIGURA 2.- Estadíos clínicos de 32 pacientes con linfomas de bajo grado de malignidad, según la clasificación de Ann Arbor.

\* 16 L.L.P. Plasmocitoides.

\* 9 L. Foliculares de célula pequeña hendida.

\* 6 L. Foliculares mixtos de célula grande y pequeña hendida.

\* 1 L. T-Periférico de célula pequeña.

 Invasión de la médula ósea.

Nº de casos entre paréntesis.

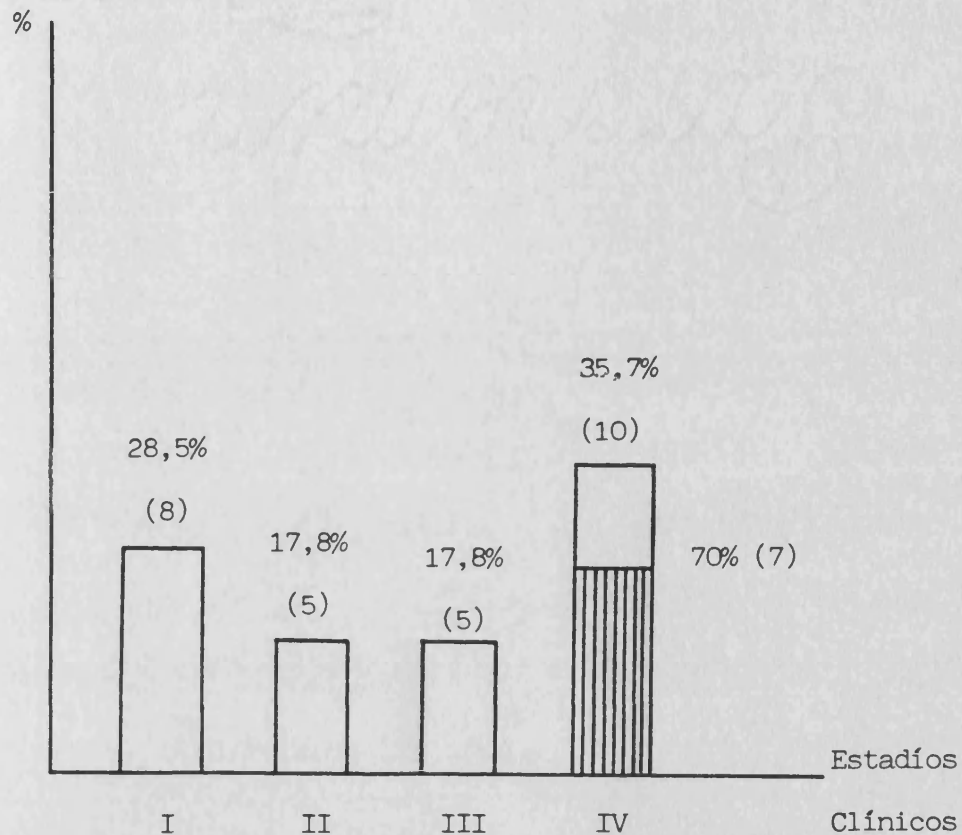



FIGURA 3.- Estadíos clínicos de 28 pacientes con linfomas de grado intermedio de malignidad, según la clasificación de Ann Arbor.

\* 4 L.Foliculares de célula grande.

\* 4 L.Difusos de célula pequeña hendida.

\* 8 L.Difusos mixtos de célula pequeña y grande.

\* 12 L.Difusos de célula grande.

 Invasión de la médula ósea.

Nº de casos entre paréntesis.

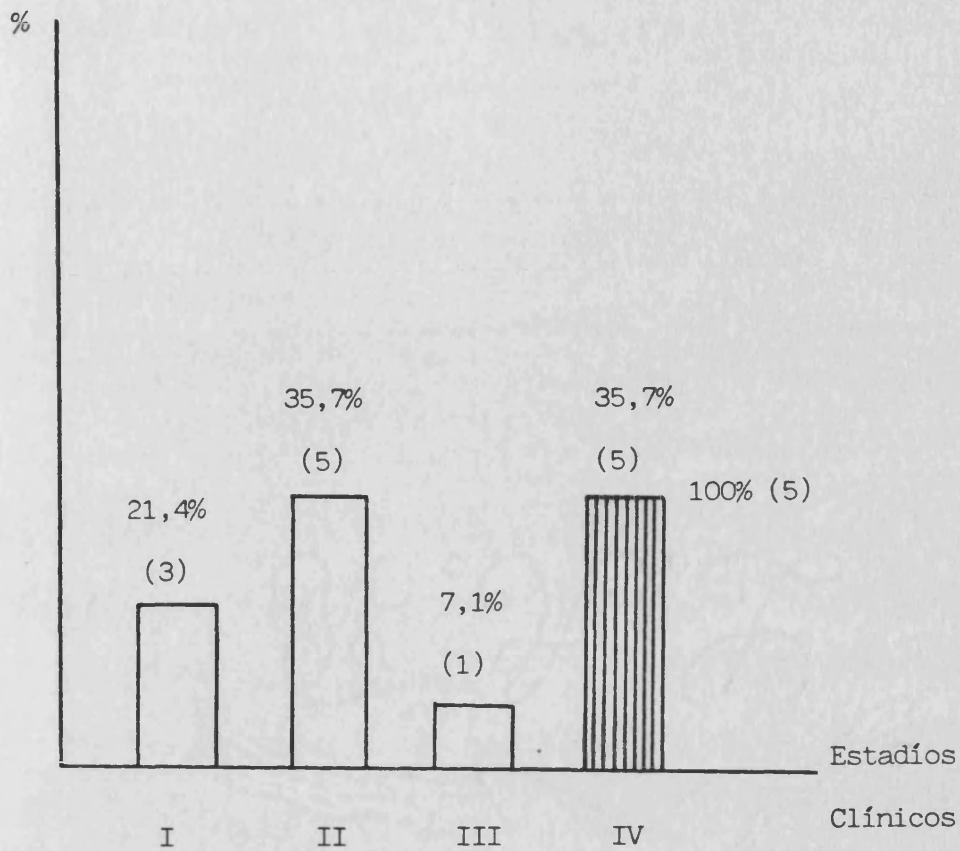



FIGURA 4.- Estadíos clínicos de 14 pacientes con linfomas de alto grado de malignidad, según la clasificación de Ann Arbor.

\* 6 L. Inmunoblásticos.

\* 4 L. Linfoblásticos.

\* 4 L. de célula pequeña no hendida.

 Invasión de la médula ósea.

Nº de casos entre paréntesis.

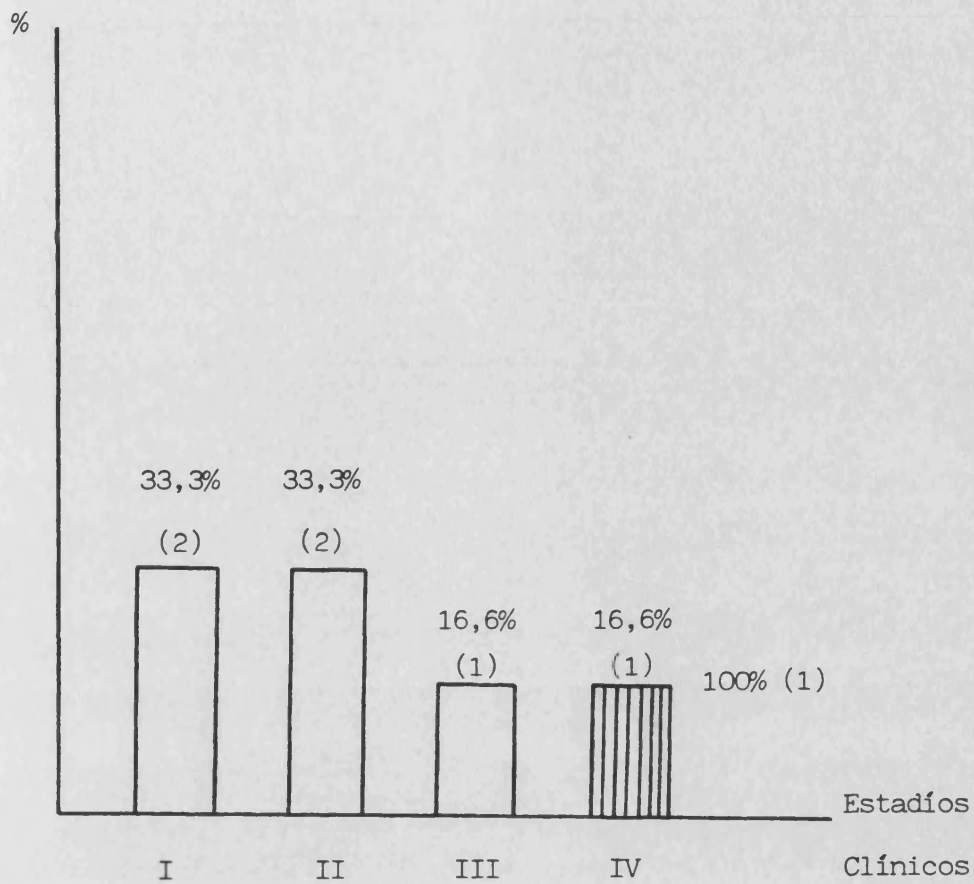



FIGURA 5.- Estadios clínicos de 6 pacientes con linfoma de célula grande inmunoblástico, según la clasificación de Ann Arbor.

 Invasión de la médula ósea.

Nº de casos entre paréntesis.



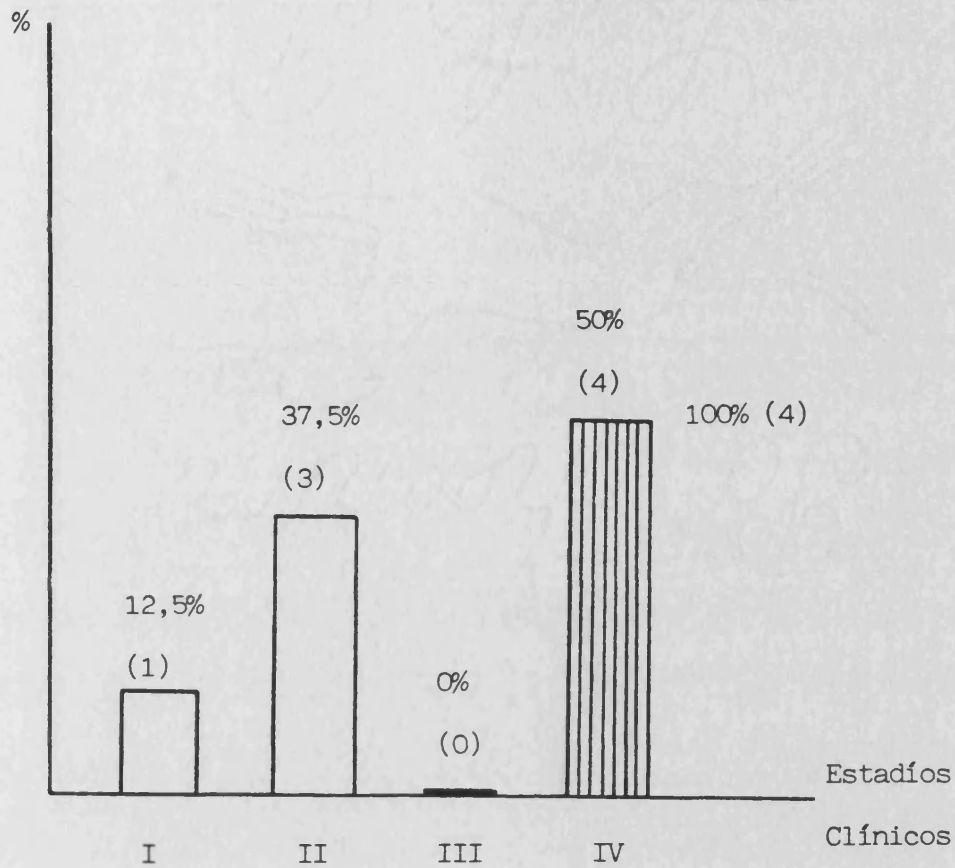



FIGURA 6.- Estadíos clínicos de 8 pacientes con linfomas, linfoblástico y de célula pequeña no hendida, según la clasificación de Ann Arbor.

\* 4 L. Linfoblásticos.

\* 4 L. de célula pequeña no hendida.

 Invasión de la médula ósea.

Nº de casos entre paréntesis.

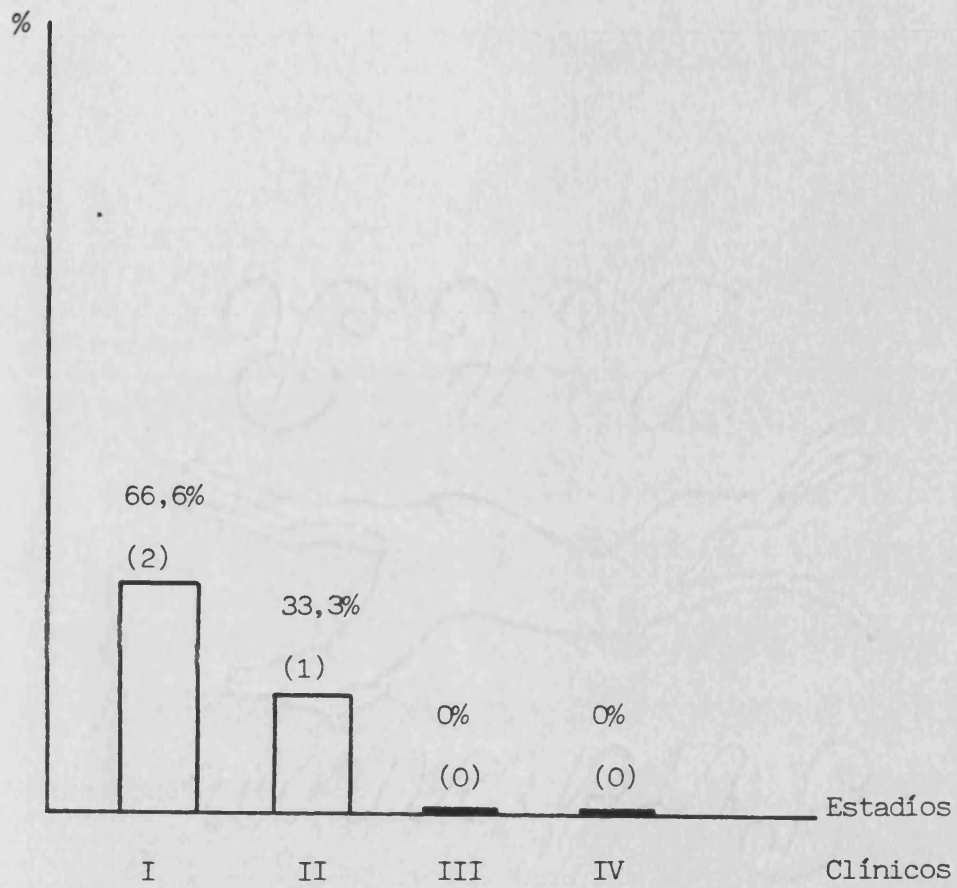


FIGURA 7.- Estadíos clínicos de 3 pacientes con micosis fungoide, según la clasificación de Ann Arbor.

Nº de casos entre paréntesis.

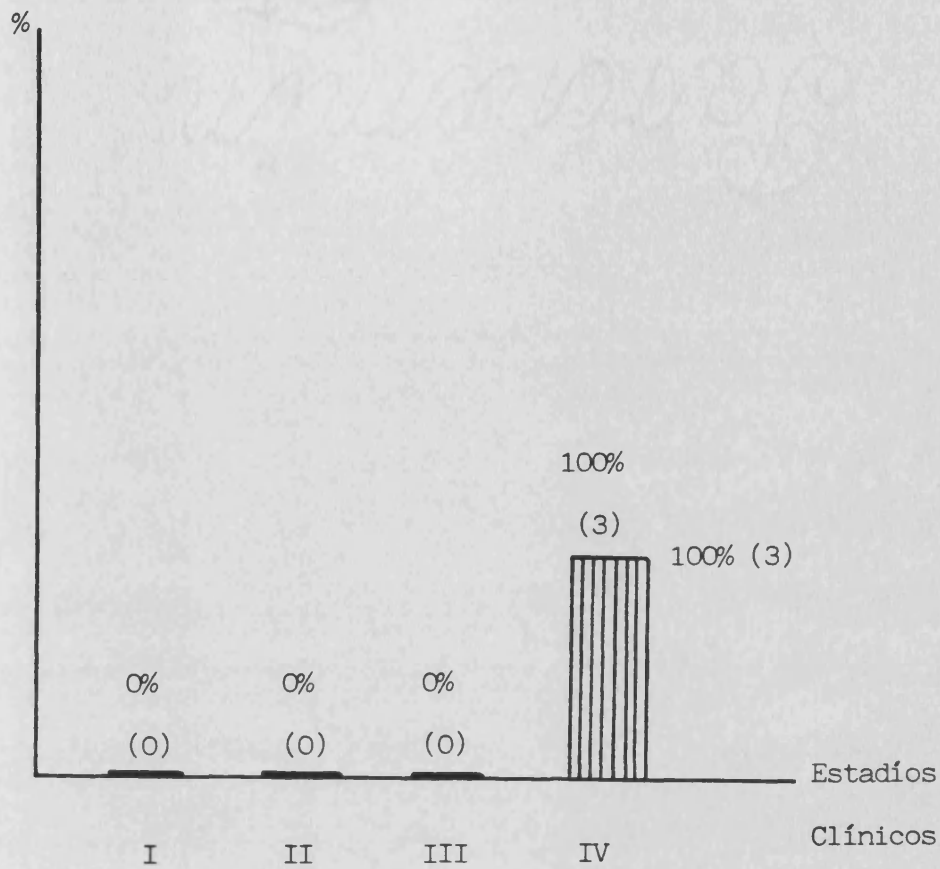



FIGURA 8.- Estadíos clínicos de 3 pacientes con tricoleucemia, según la clasificación de Ann Arbor.

 Invasión de la médula ósea.

Nº de casos entre paréntesis.

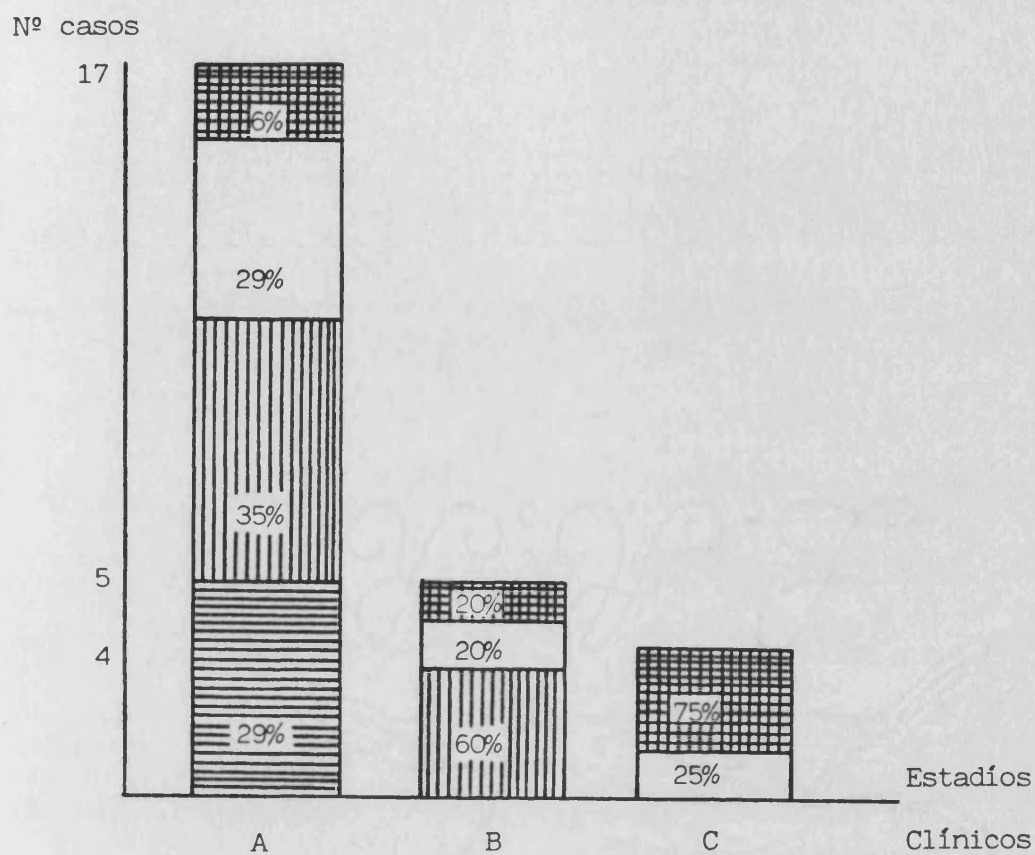






FIGURA 9.- Relación entre los patrones histológicos de invasión medular y estadios clínicos de la "International Workshop" en 26 LLC.

-  Patrón nodular.
-  Patrón intersticial.
-  Patrón mixto (nodular + intersticial).
-  Patrón difuso.

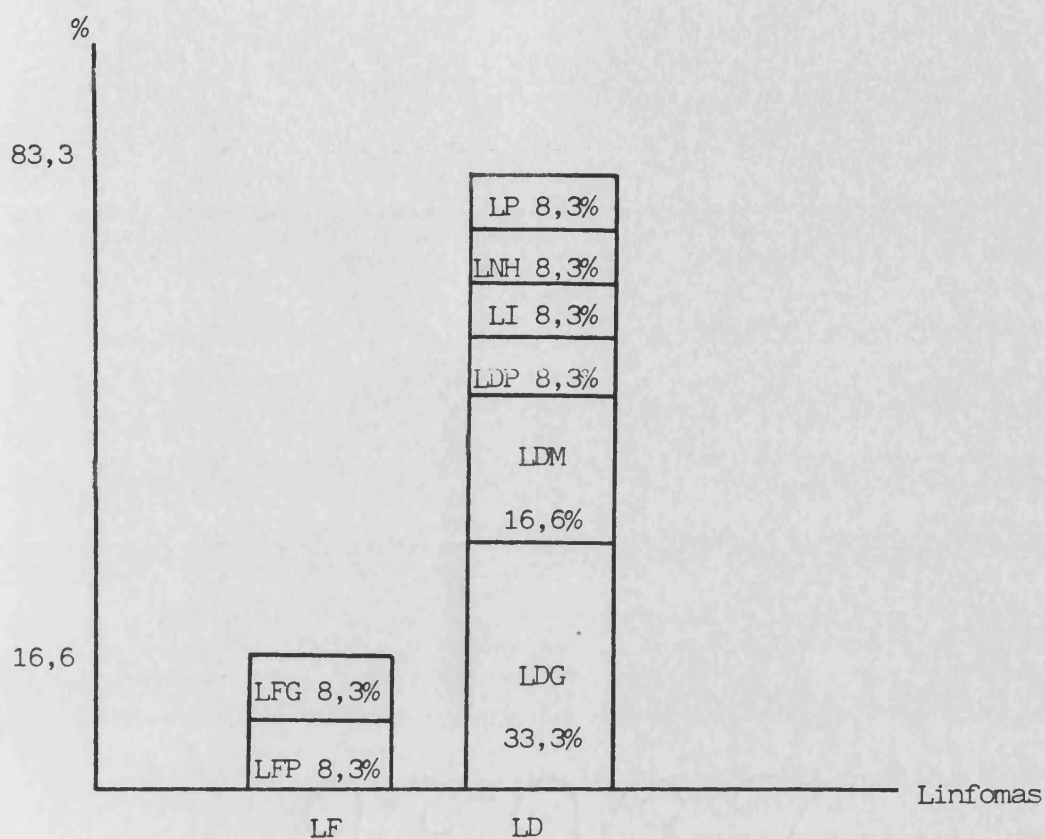


FIGURA 10.- Distribución de los tipos histológicos de linfoma primario gastrointestinal.

LF, linfoma folicular; LFP, linfoma folicular de célula pequeña hendida; LFG, linfoma folicular de célula grande; LD, linfoma difuso; LDG, linfoma difuso de célula grande; LDM, linfoma difuso mixto; LDP, linfoma difuso de célula pequeña hendida; LI, linfoma inmunoblástico; LNH, linfoma de célula pequeña no hendida; LP, linfoma plasmocitoide.

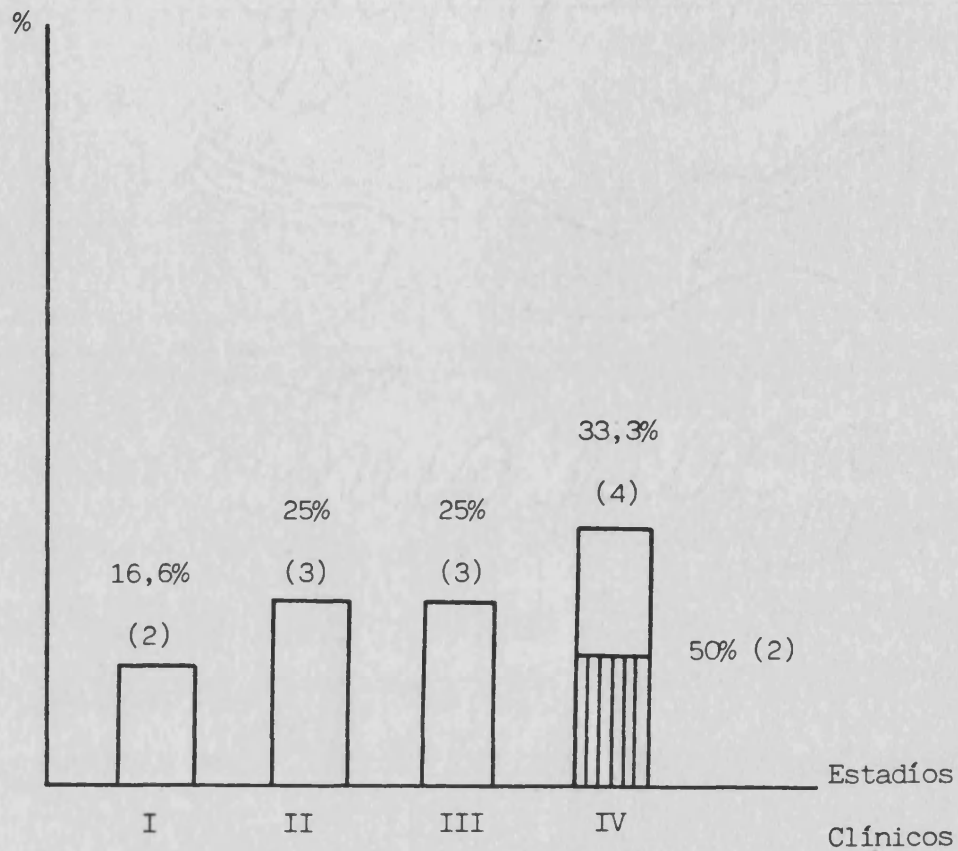



FIGURA 11.- Estadíos clínicos de 12 pacientes con linfoma 1º gastrointestinal, según la clasificación de Blackledge modificada.

 Invasión de la médula ósea.

Nº de casos entre paréntesis.

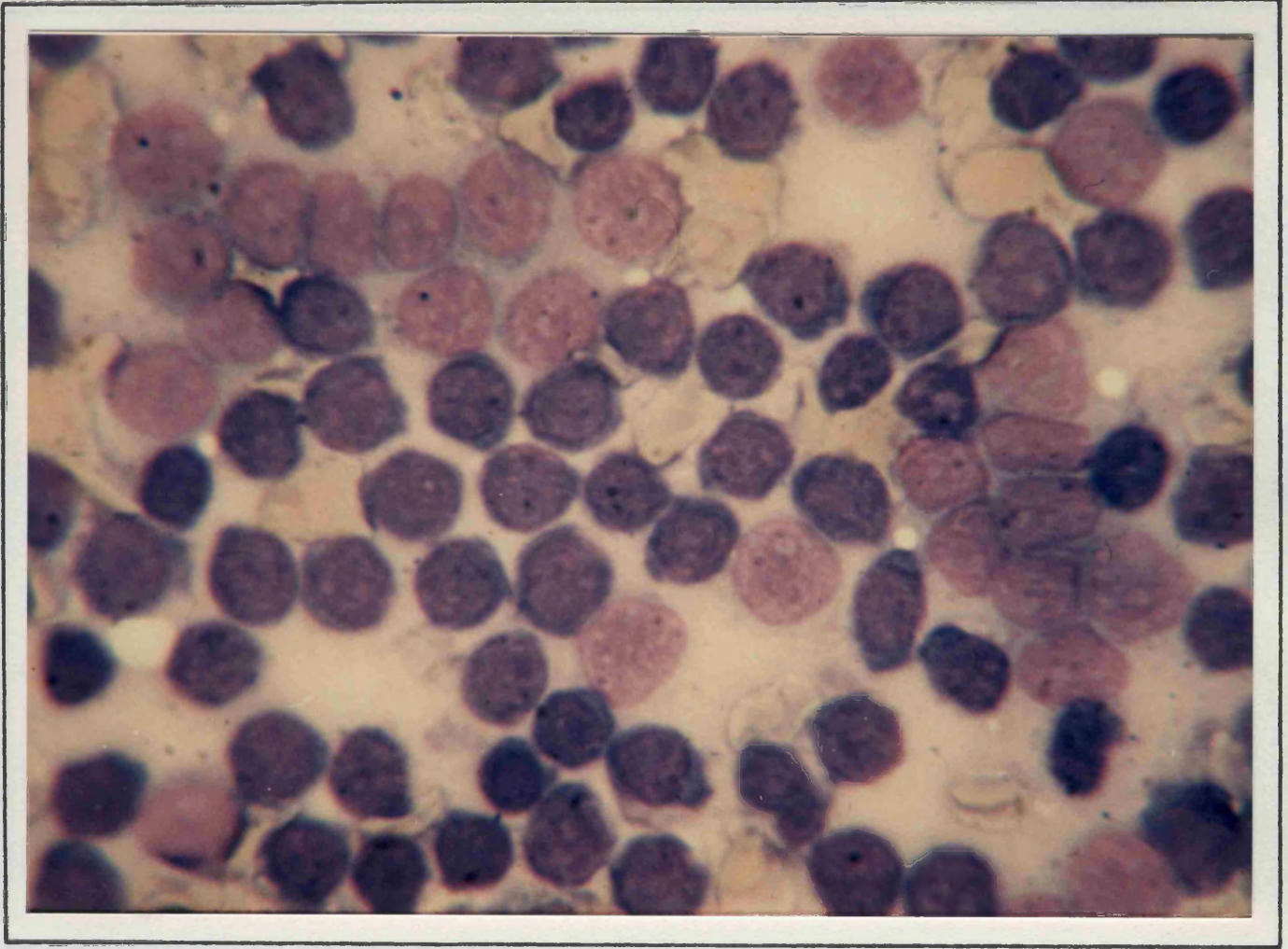


FIGURA 12.- Proliferación monomorfa de linfocitos pequeños con escaso citoplasma y núcleo redondo, junto a prolinfocitos en la impronta ganglionar de una LLC-B. May-Grunwald-Giemsa, X 1000.

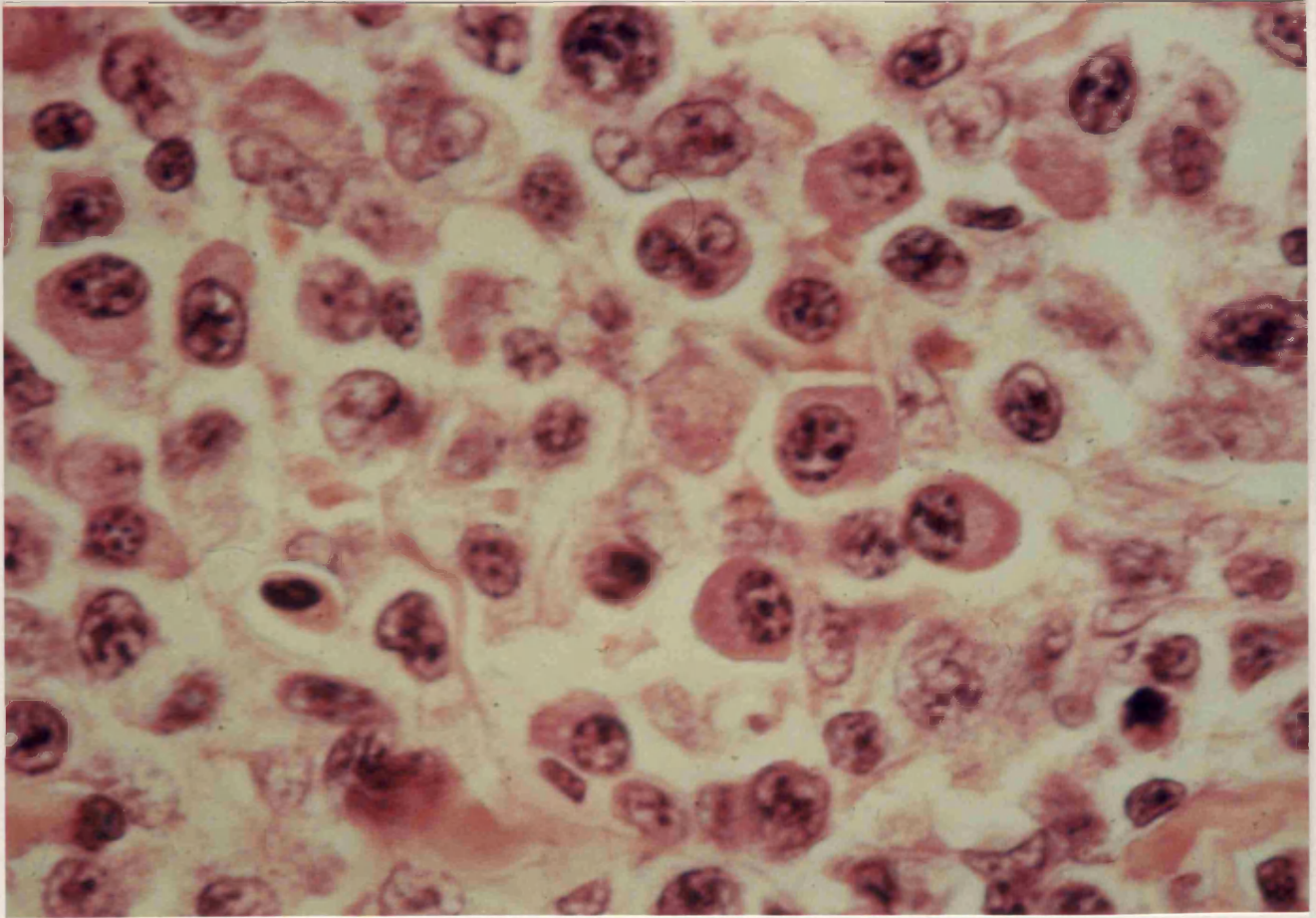


FIGURA 13.- Corte histológico de un linfoma linfocítico pequeño plasmocitoide. Linfocitos pequeños, células con diferenciación plasmocitoide y plasmáticas. Ganglio axilar. H.Eosina, X 1000.

dispersas y un aparato de gálgli bien desarrollado. X 500.



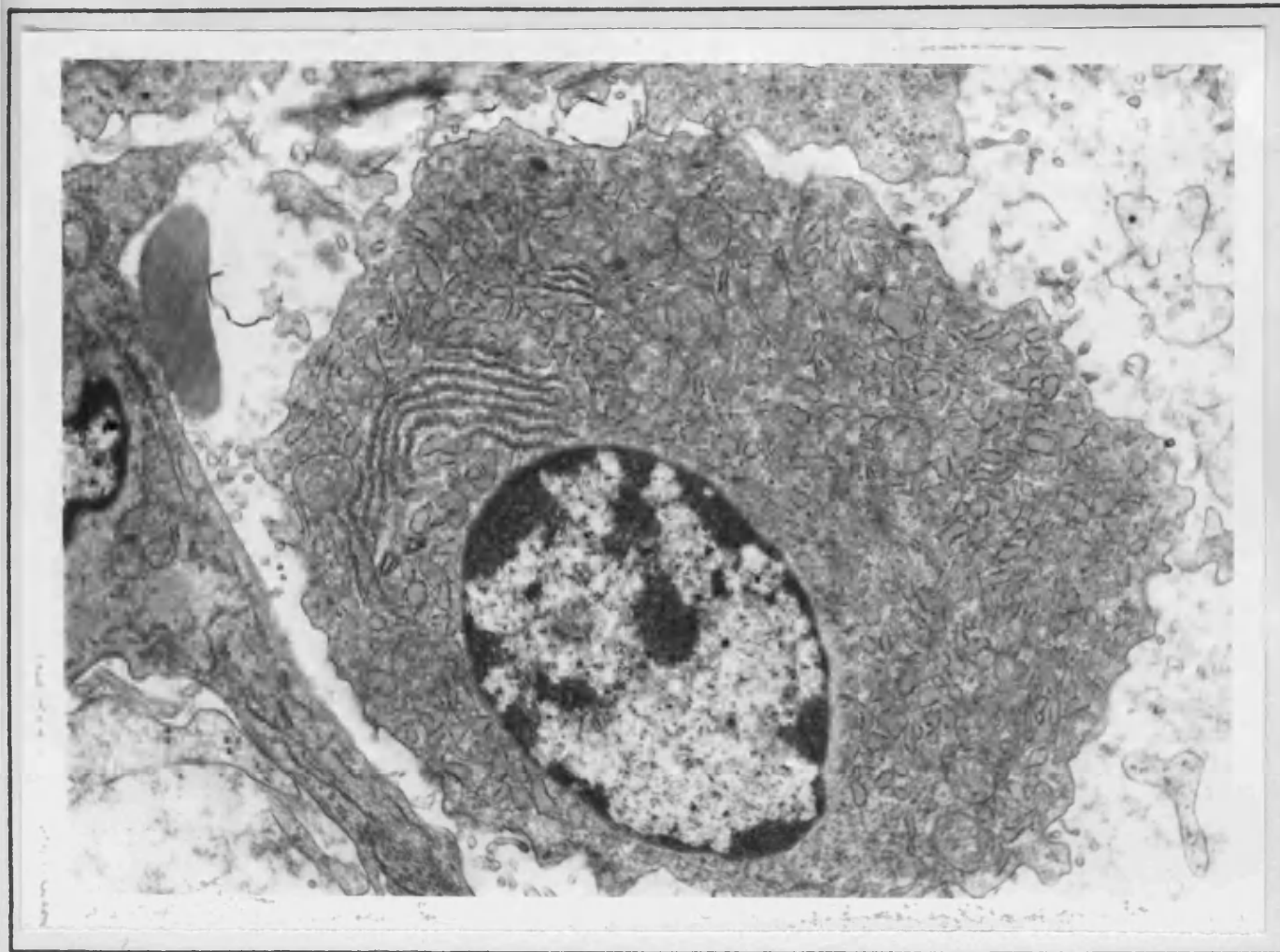


FIGURA 14.- L.L.P.Plasmocitoide.Ultraestructura de una célula plasmocitoide en la que se observa un núcleo excéntrico y amplio citoplasma,con numerosas cisternas dilatadas de RER,mitocondrias dispersas y un aparato de golgi bien desarrollado.X 5500.

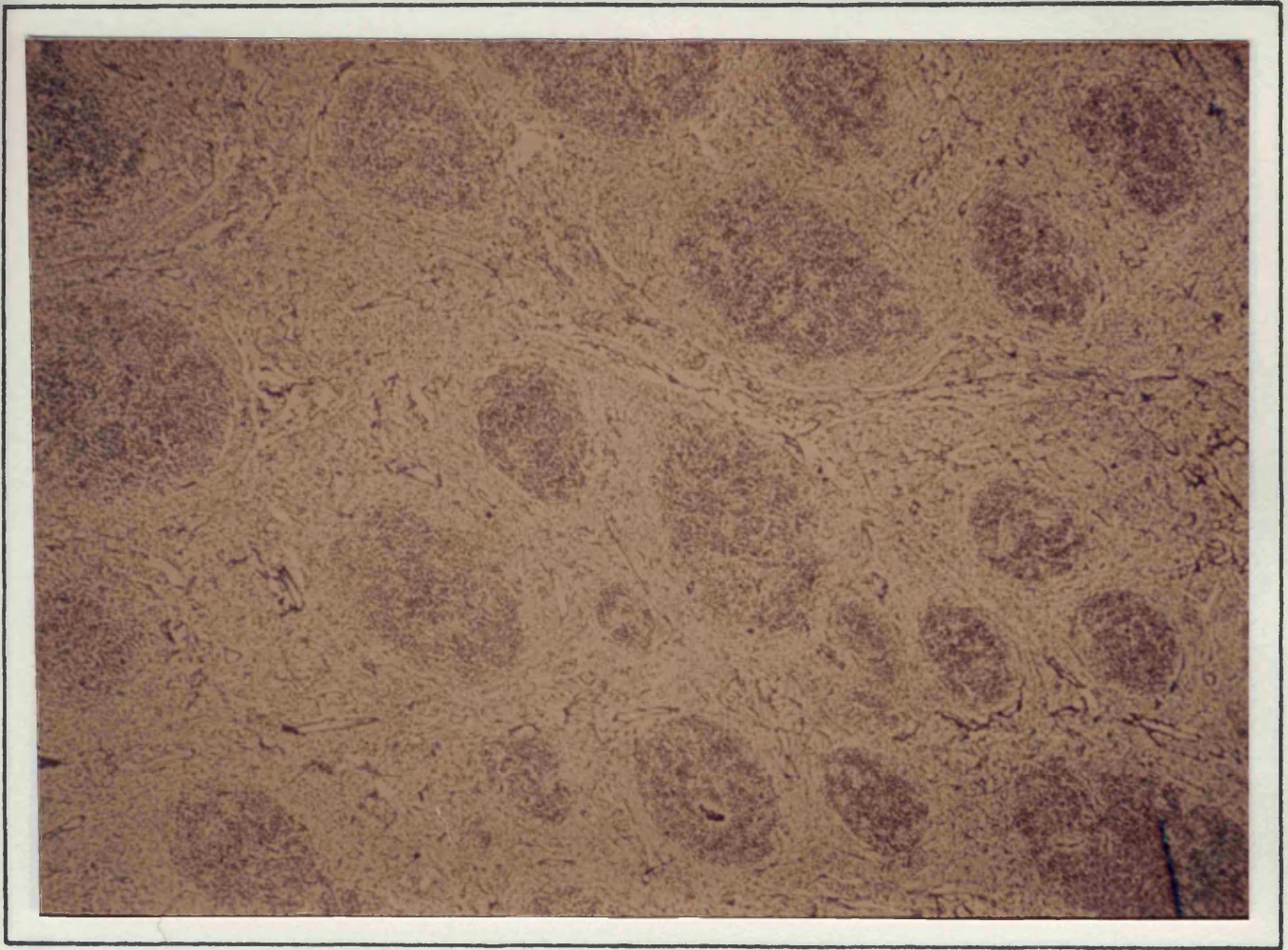


FIGURA 15.- Tinción argéntica que pone de manifiesto la nodularidad de un linfoma folicular, debido a la presencia de fibras de reticulina en áreas T perivenulares. Ganglio cervical. Reticulina de Gomori, X 250.

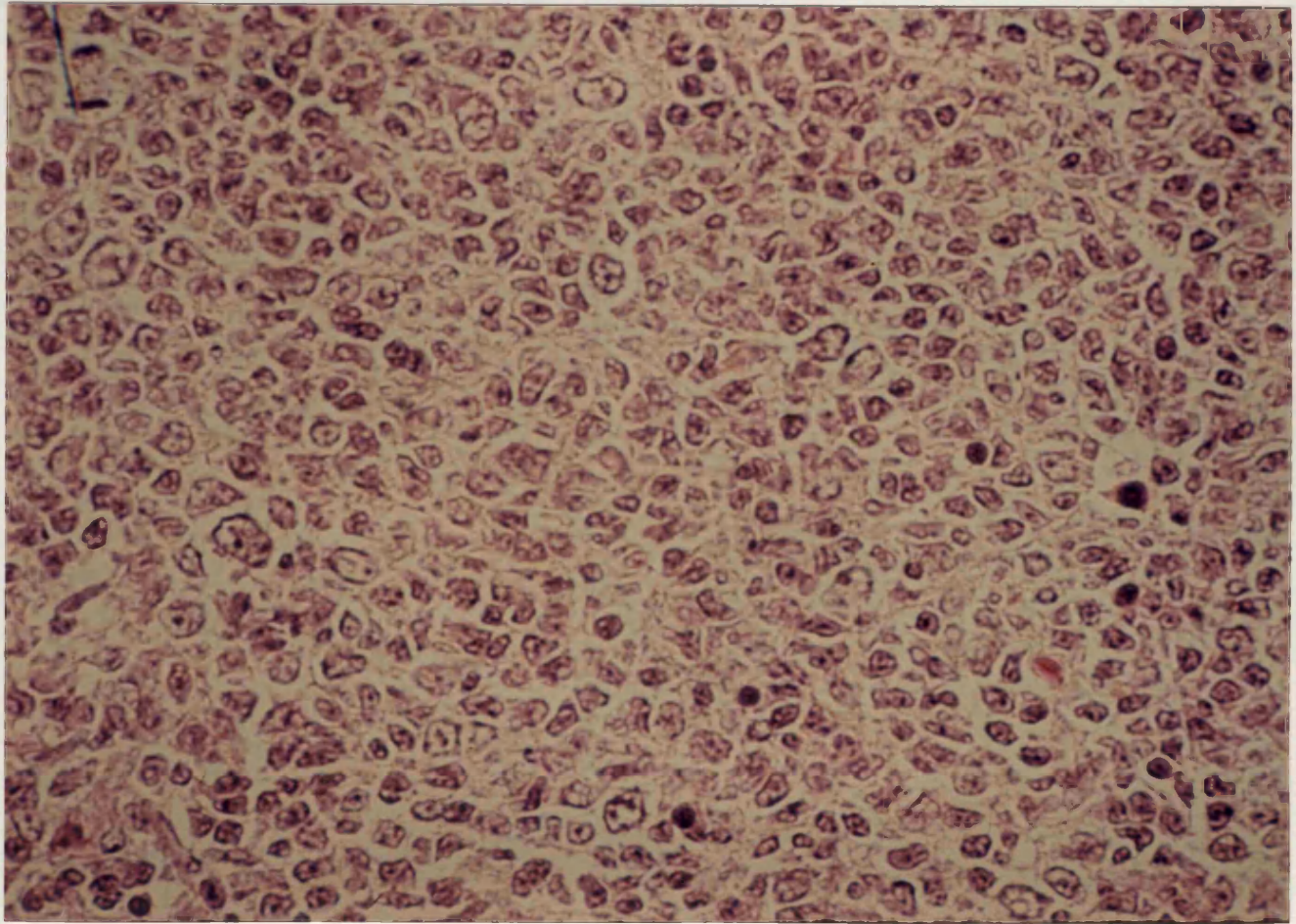


FIGURA 16.- Celularidad de un linfoma folicular mixto. Junto a numerosas células pequeñas hendidas se aprecian células grandes de aspecto centroblástico. Ganglio cervical. H. Eosina, X 200.

angulados y hendidos con heterocentria central y marginal y un nucleolo pequeño. Baró, X 1970.

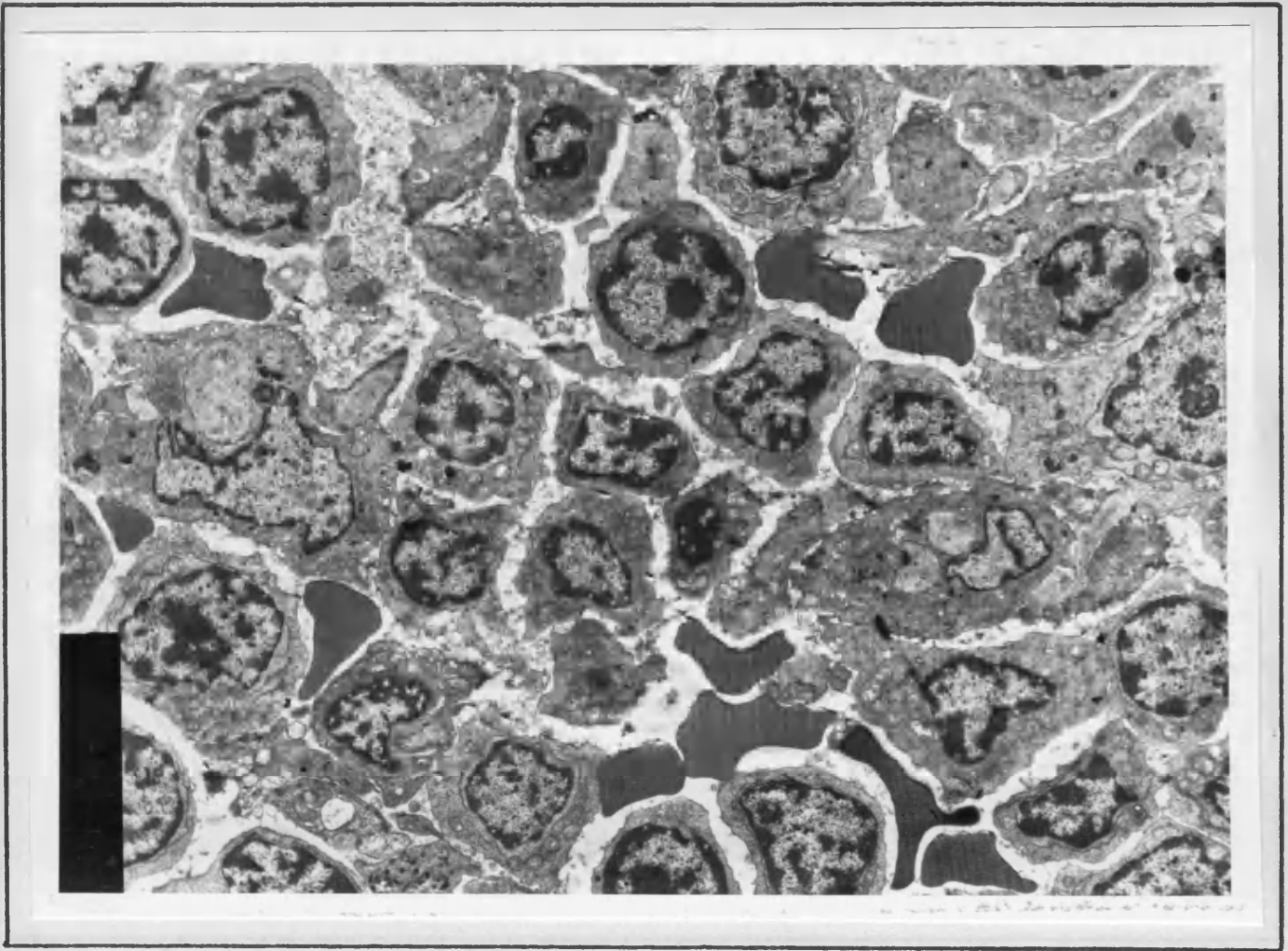


FIGURA 17.- Ultraestructura de un linfoma folicular de célula pequeña hendida. Células linfoides de pequeño a mediano tamaño, con moderado citoplasma y núcleos de contornos irregulares, angulados y hendidos con heterocromatina central y marginal y un nucleolo pequeño. Bazo. X 1950.



FIGURA 18.- Ultraestructura de una célula reticular dendrítica, de morfología estrellada y triangular, con largas prolongaciones citoplásmicas, entre la celularidad de un linfoma folicular. X 3300.

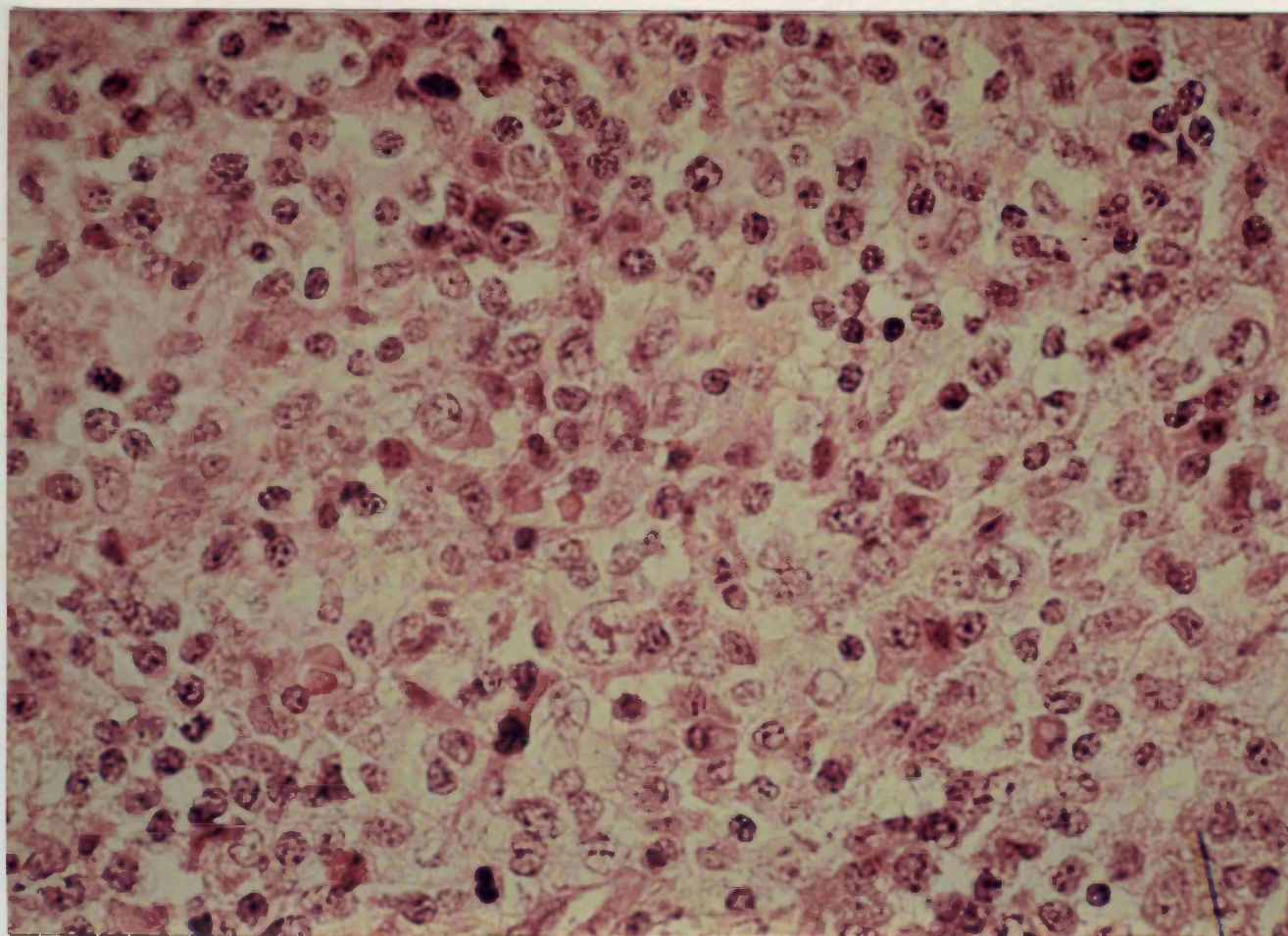


FIGURA 19.- Corte histológico de un linfoma difuso mixto (linfoma T-periférico), en el que se observa una celularidad polimorfa, células pequeñas y grandes con núcleos irregulares y células plasmáticas. Ganglio inguinal. H. Eosina, X 400.

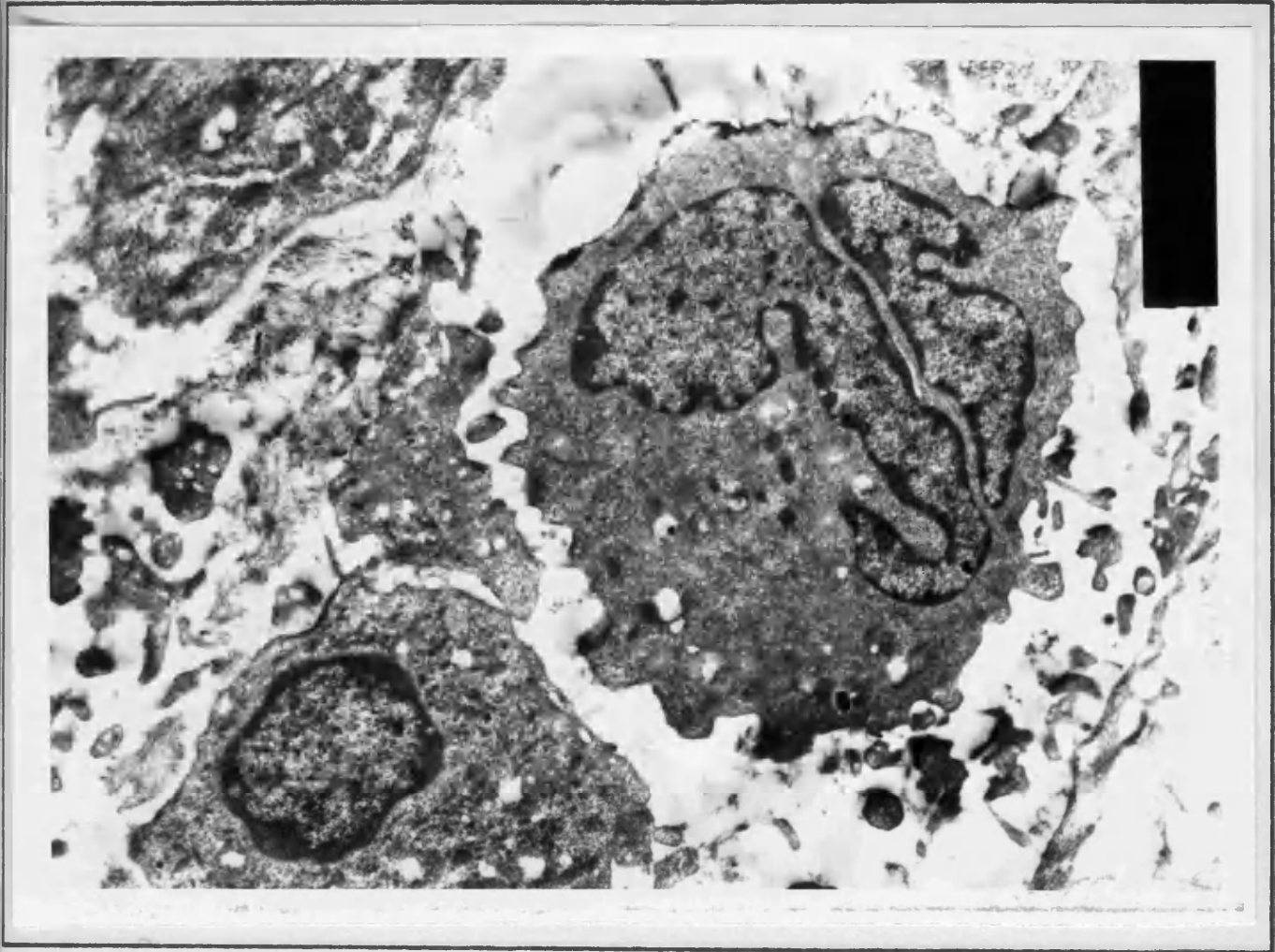


FIGURA 20.- Linfoma difuso mixto (linfoma T-periférico). Ultraestructura de un blasto linfoide que muestra un núcleo fragmentado, de contornos irregulares y un citoplasma amplio con lisosomas dispersos. X 5500.

X 3000.

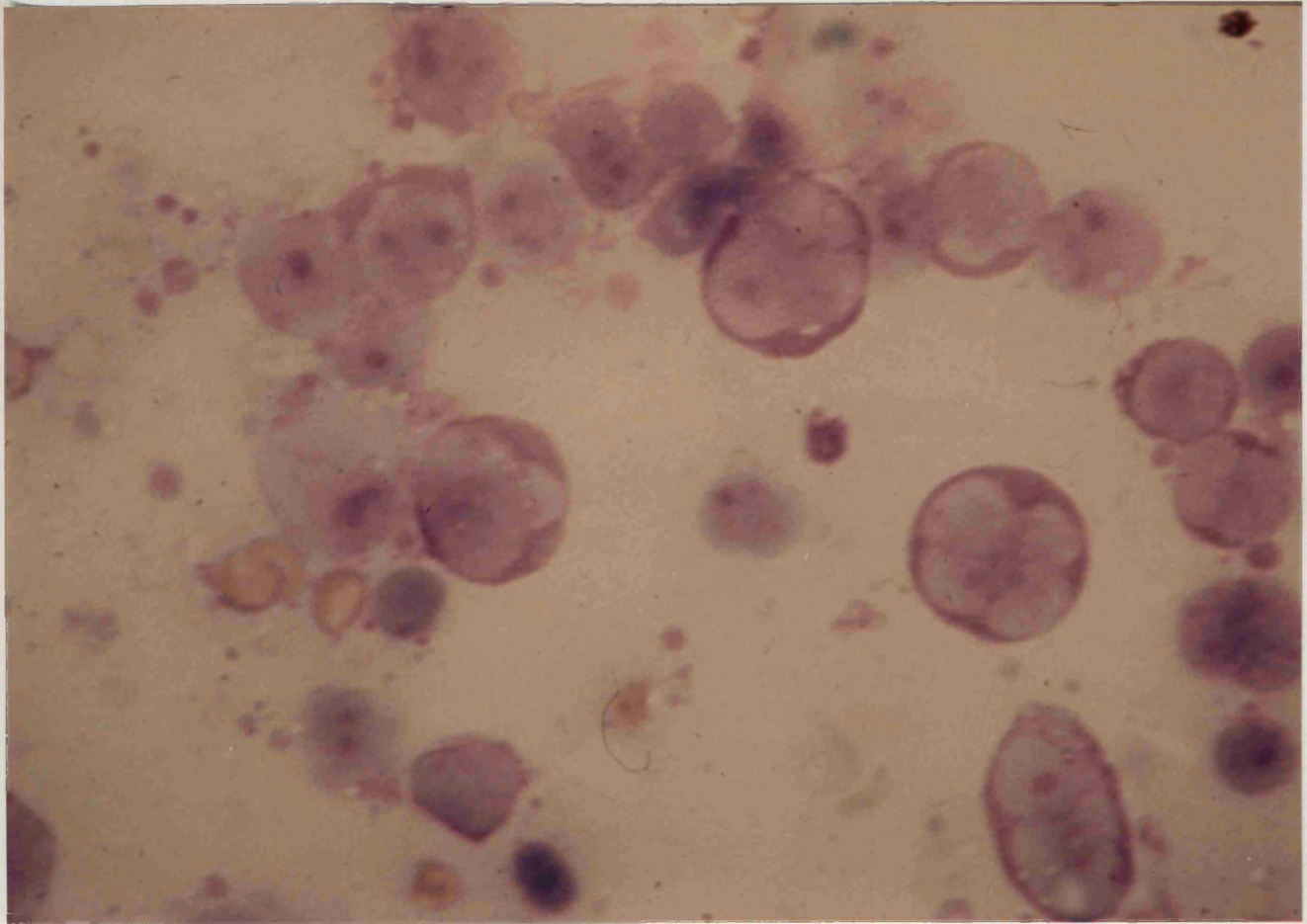


FIGURA 21.- Impronta ganglionar de un linfoma difuso de célula grande de núcleo multilobulado. Las grandes células linfoides presentan núcleos multilobulados con profundas indentaciones, varios nucleolos prominentes y citoplasmas basófilos. May-Grunwald-Giemsa, X 1000.



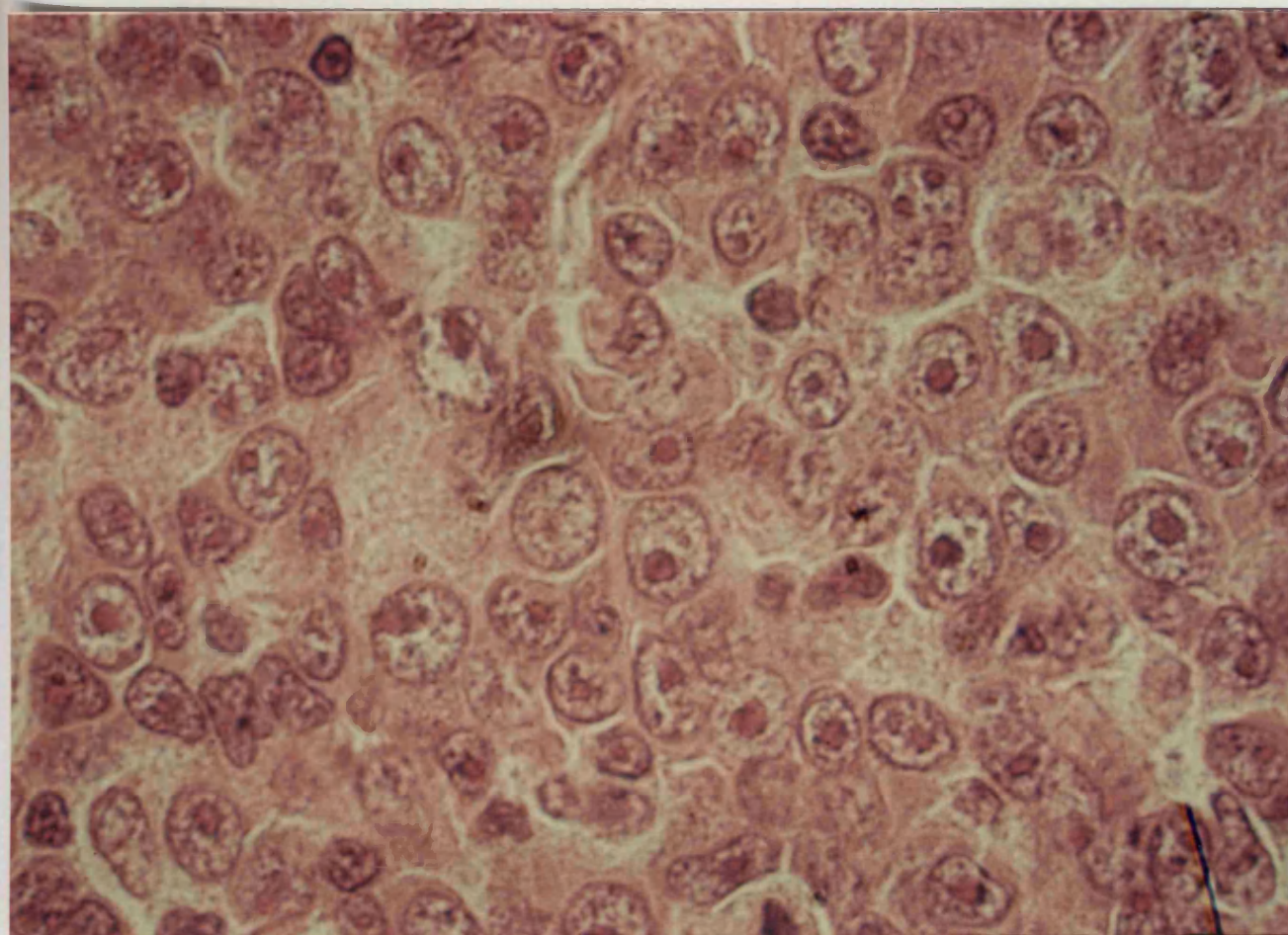


FIGURA 22.- Proliferación difusa de células grandes de amplio citoplasma, con núcleos redondos, vesiculares y nucleolos centrales hiperplásicos, características del linfoma inmunoblástico. Ganglio inguinal. H. Eosina, X 1000. Impronta ganglionar, X 1000.

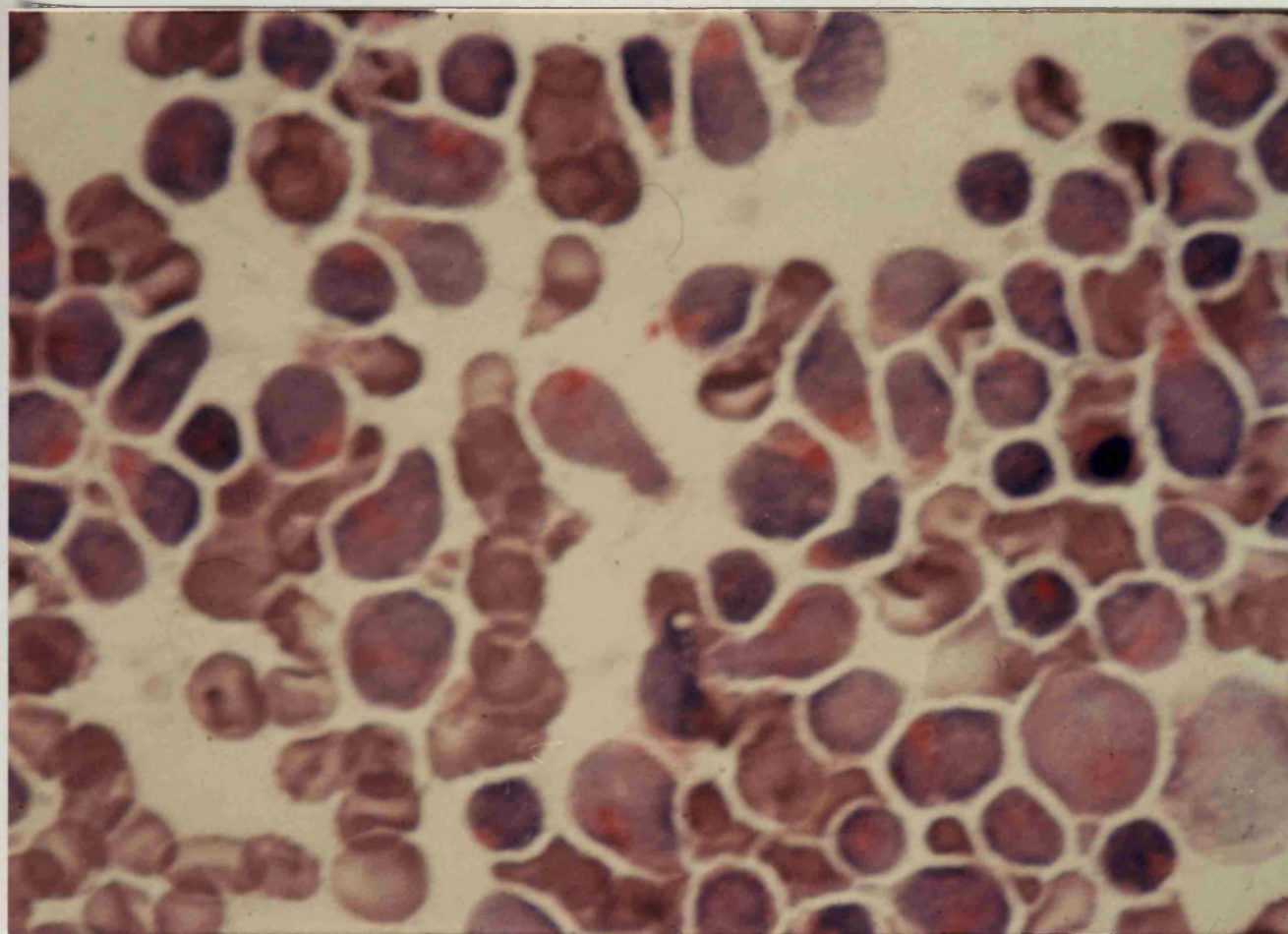


FIGURA 23.- Tinción con fosfatasa ácida de un linfoma linfoblástico T, en la que se pone de manifiesto una positividad citoplásmica, puntiforme, de localización centrosómica paranuclear en la mayoría de los blastos linfoides. Impronta ganglionar, X 1000.

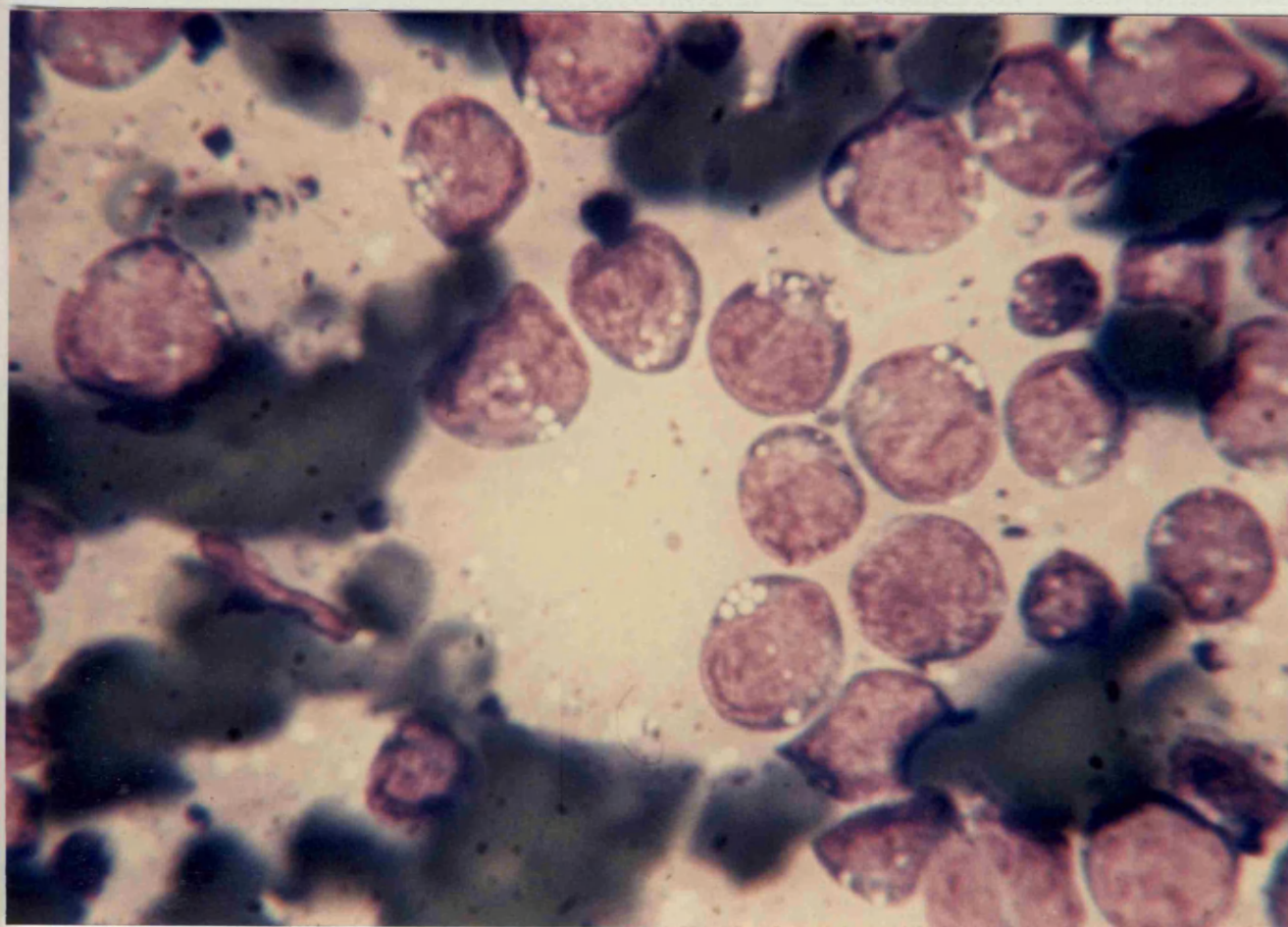


FIGURA 24.- Impronta ganglionar de un linfoma difuso de célula pequeña no hendida tipo Burkitt. El citoplasma basófilo de los blastos linfoides contiene vacuolas de lípidos. May-Grunwald-Giemsa, X 1000.

citoplasma se observan numerosos polirribosomas y vacuolas grasas. X 3300.

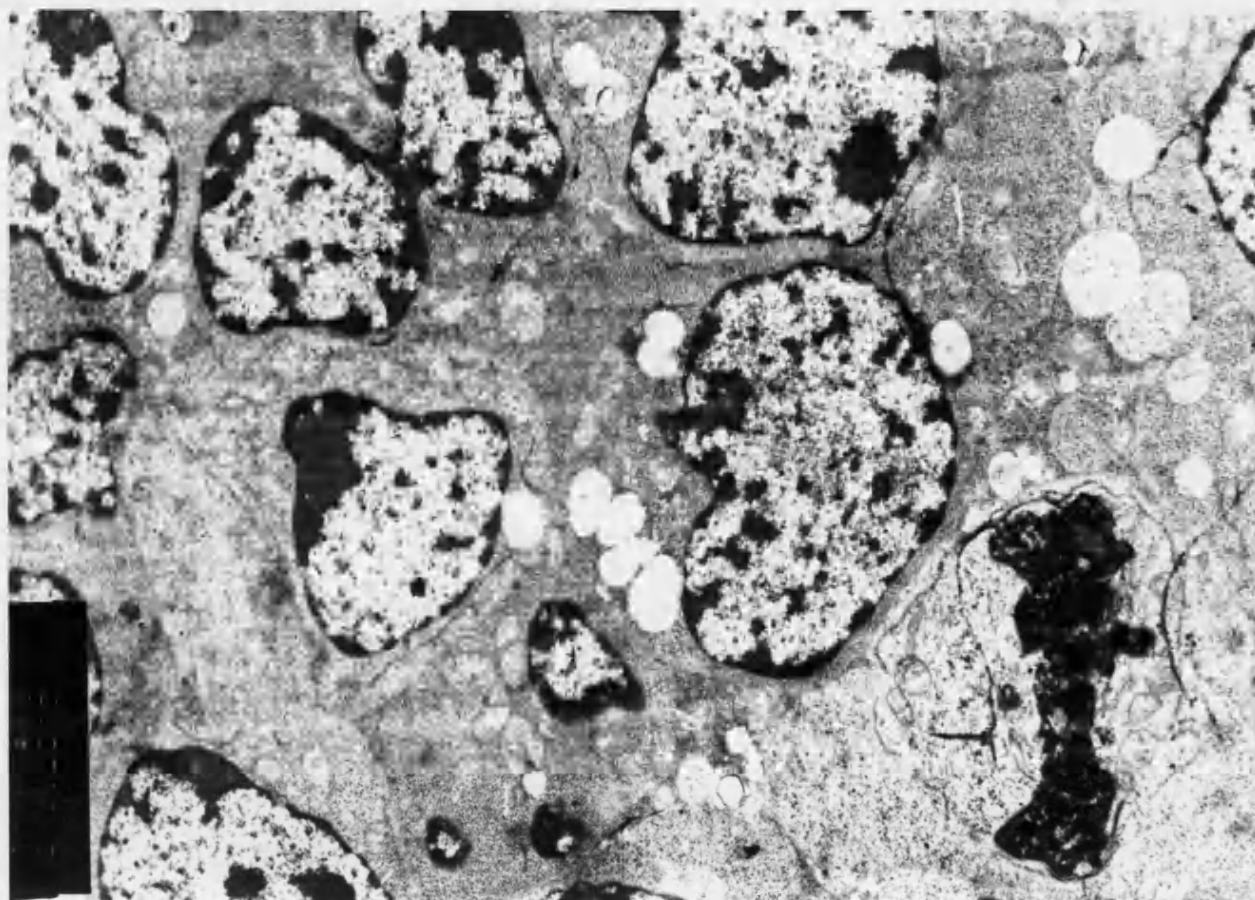


FIGURA 25.- Ultraestructura de un linfoma difuso de célula pequeña no hendida tipo Burkitt. Los blastos linfoides presentan núcleos redondos u ovals con cromatina en grumos y nucleolos hiperplásicos. En el citoplasma se observan numerosos polirribosomas y vacuolas grasas. X 3300.

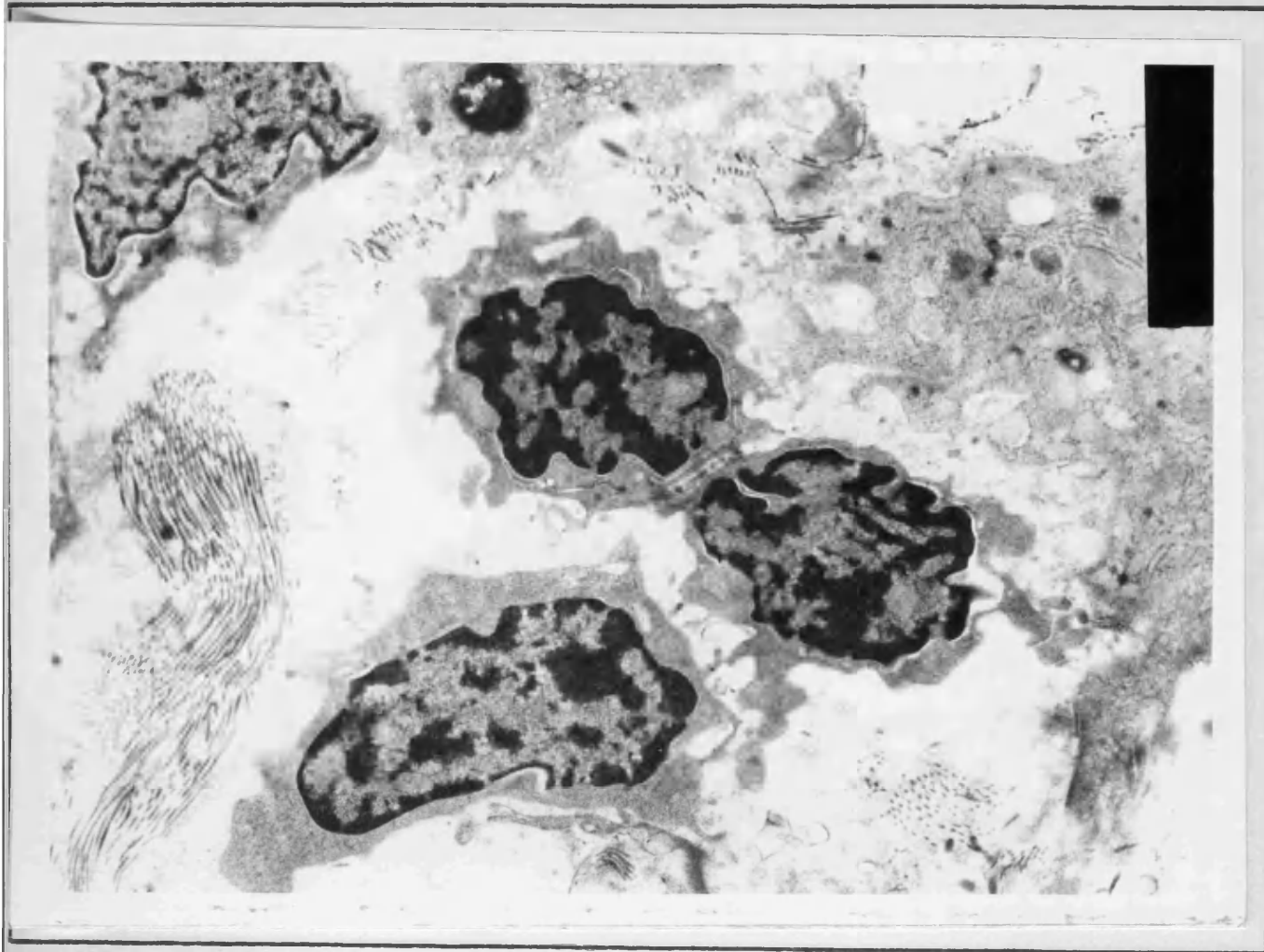


FIGURA 26.- Mucococcosis. Aspecto ultraestructural de 3 células linfoides con escaso citoplasma, núcleos cerebriformes con heterocromatina marginal y un pequeño nucleolo. Piel. X 5500.

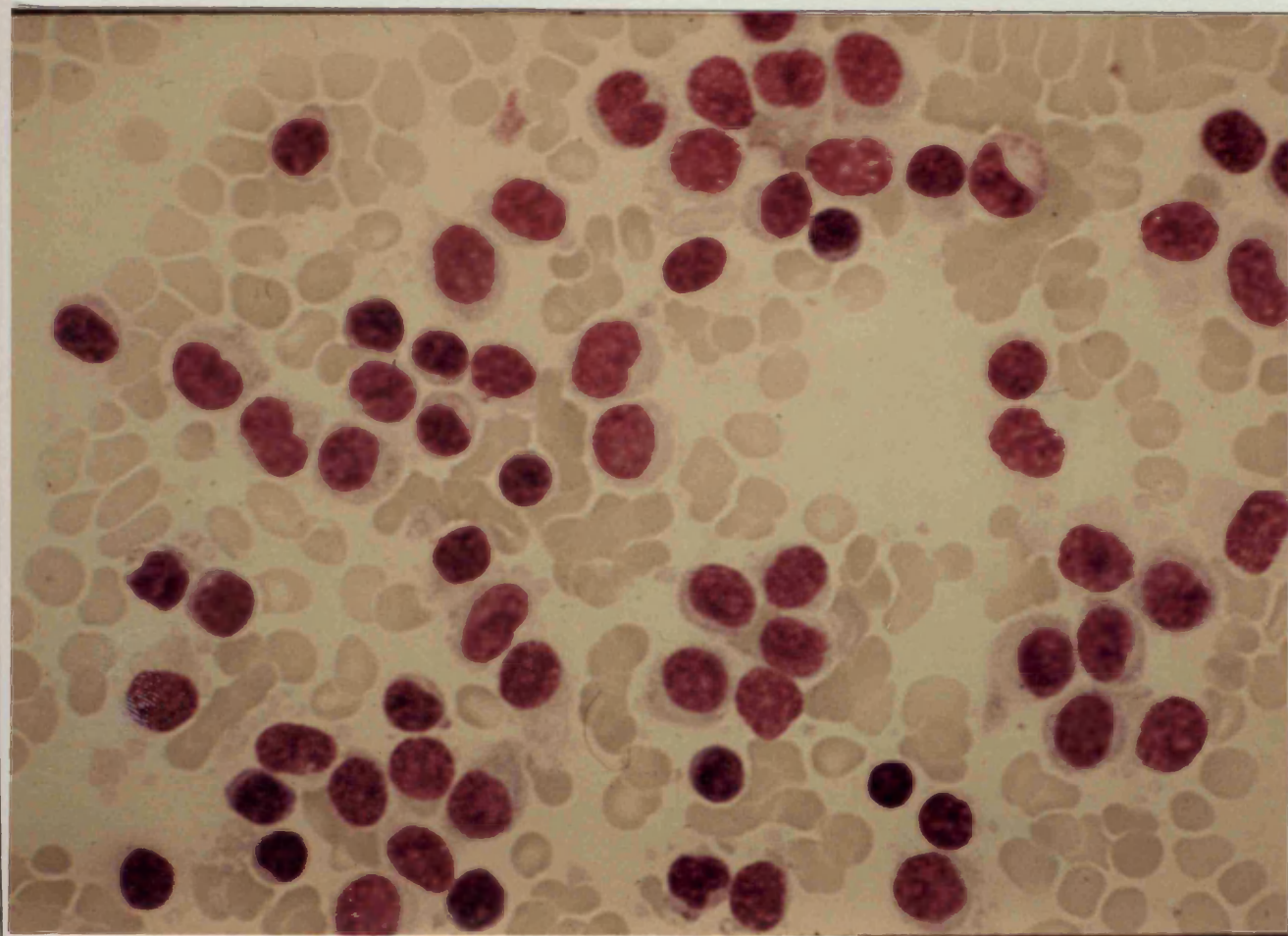


FIGURA 27.- Impronta esplénica de una tricoleucemia. Junto a numerosos hematies, se observan células linfoides de mediano tamaño y de aspecto monocitoide. May-Grunwald-Giemsa, X 400.

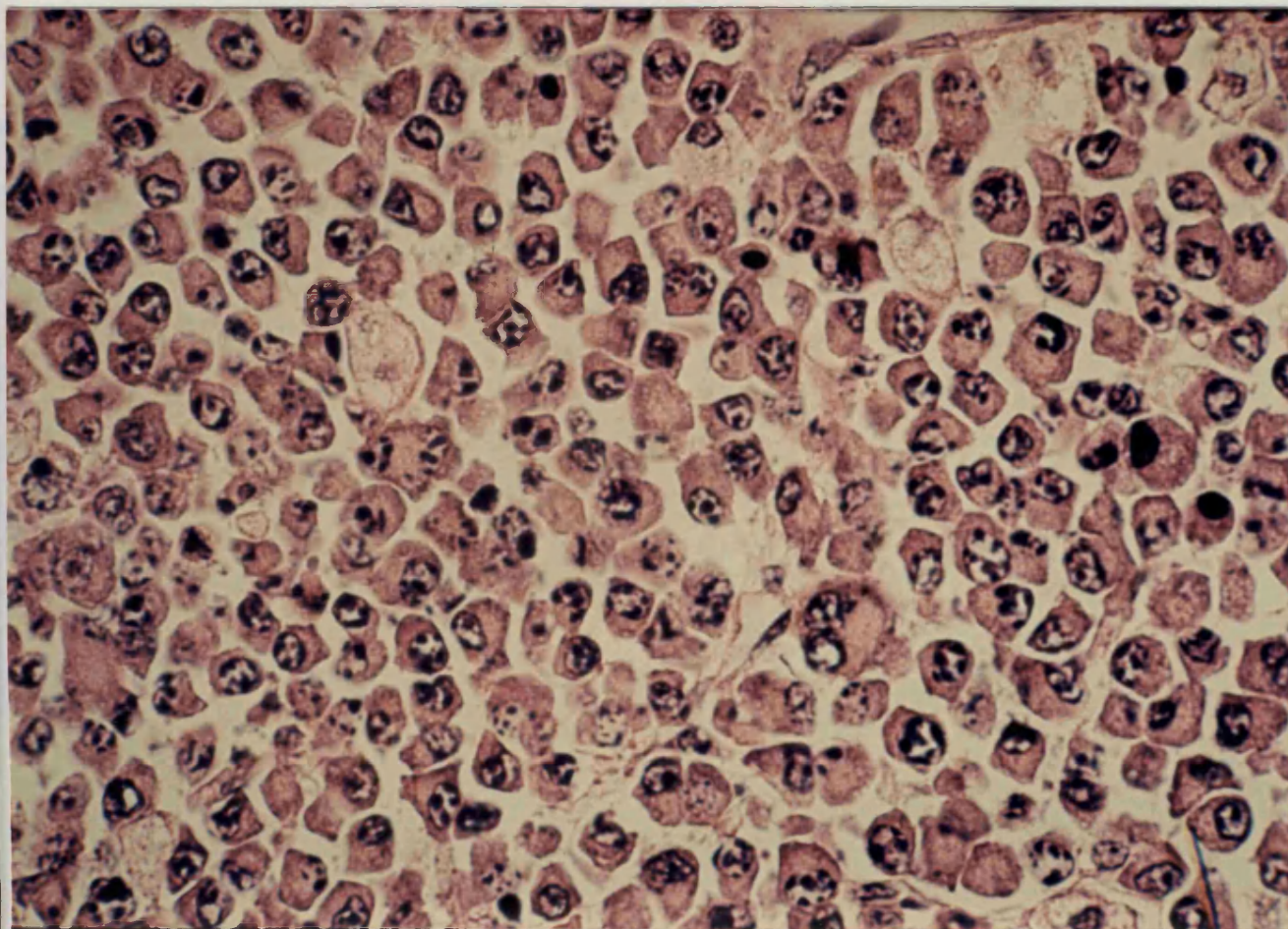


FIGURA 28.- Metástasis ganglionar de un mieloma múltiple. Las células plasmáticas bien diferenciadas presentan núcleos excéntricos con disposición de la cromatina en "rueda de carro" y amplios citoplasmas. Ganglio cervical. H. Eosina, X 400.

de inmunoperoxidasa en 2 tiempos, sistema avidina-biotina, X 200.

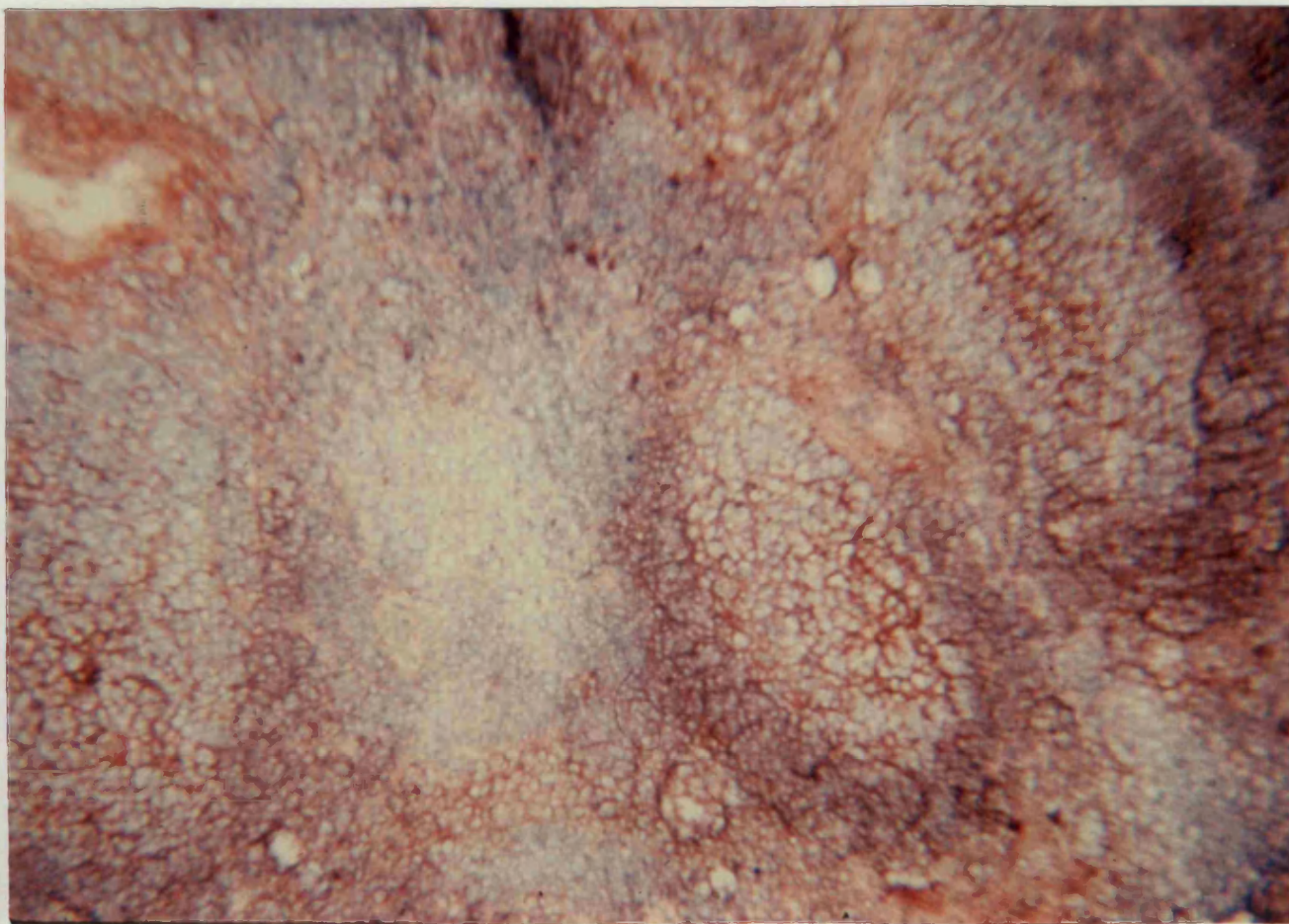


FIGURA 29.- Patrón de tinción en congelación con IgM de una hiperplasia folicular reactiva. Los linfocitos del centro germinal y manto folicular muestran SIgM, mientras que los linfocitos del área paracortical carecen de ella. Ganglio cervical. Procedimiento de inmunoperoxidasa en 2 tiempos, sistema avidina-biotina, X 200.



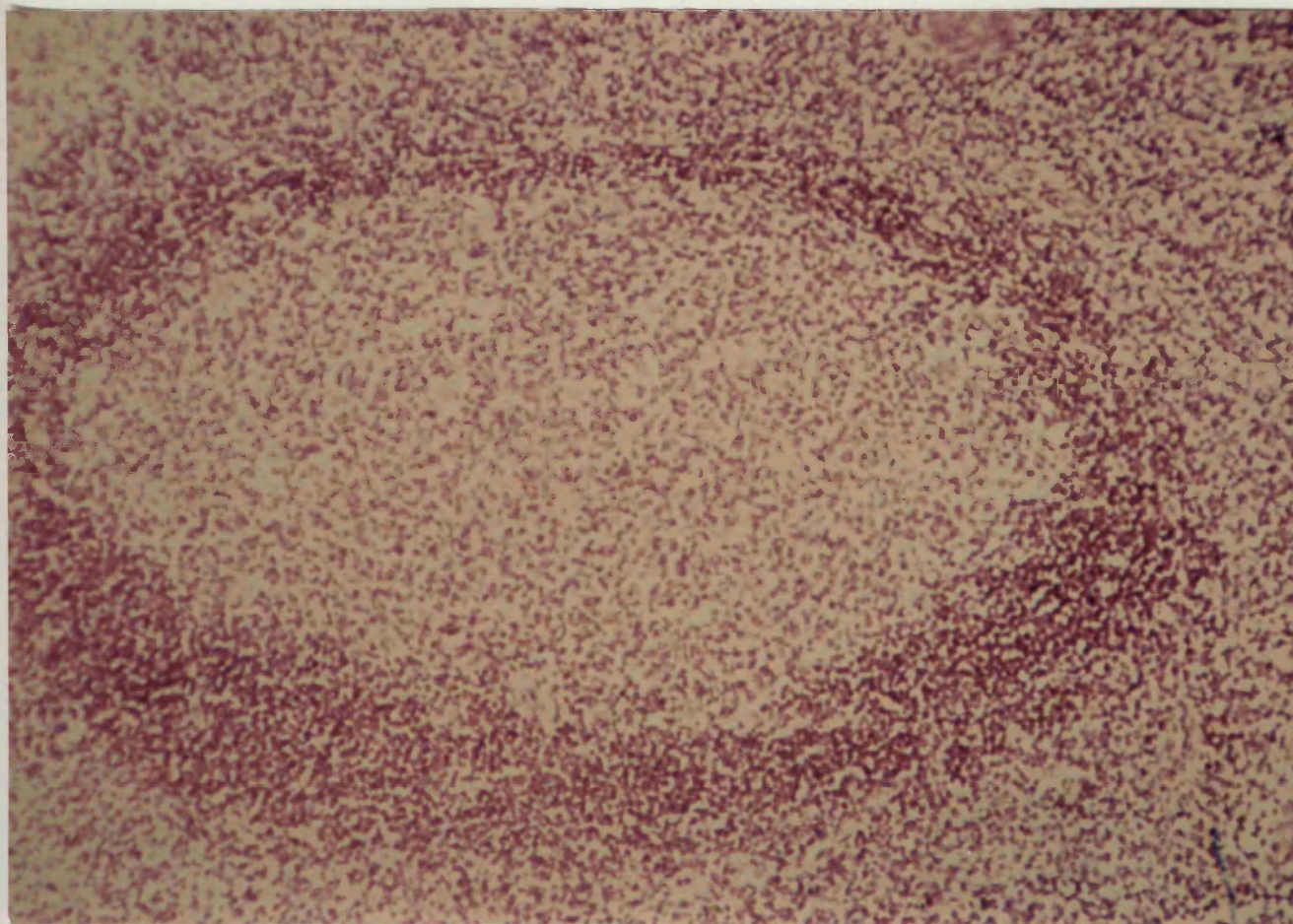


FIGURA 30.- Patrón de tinción en congelación con IgD de una hiperplasia folicular reactiva. Sólo los linfocitos del manto folicular presentan SIgD. Ganglio inguinal. Procedimiento de inmunoperoxidasa en 2 tiempos, sistema avidina-biotina, X 200.

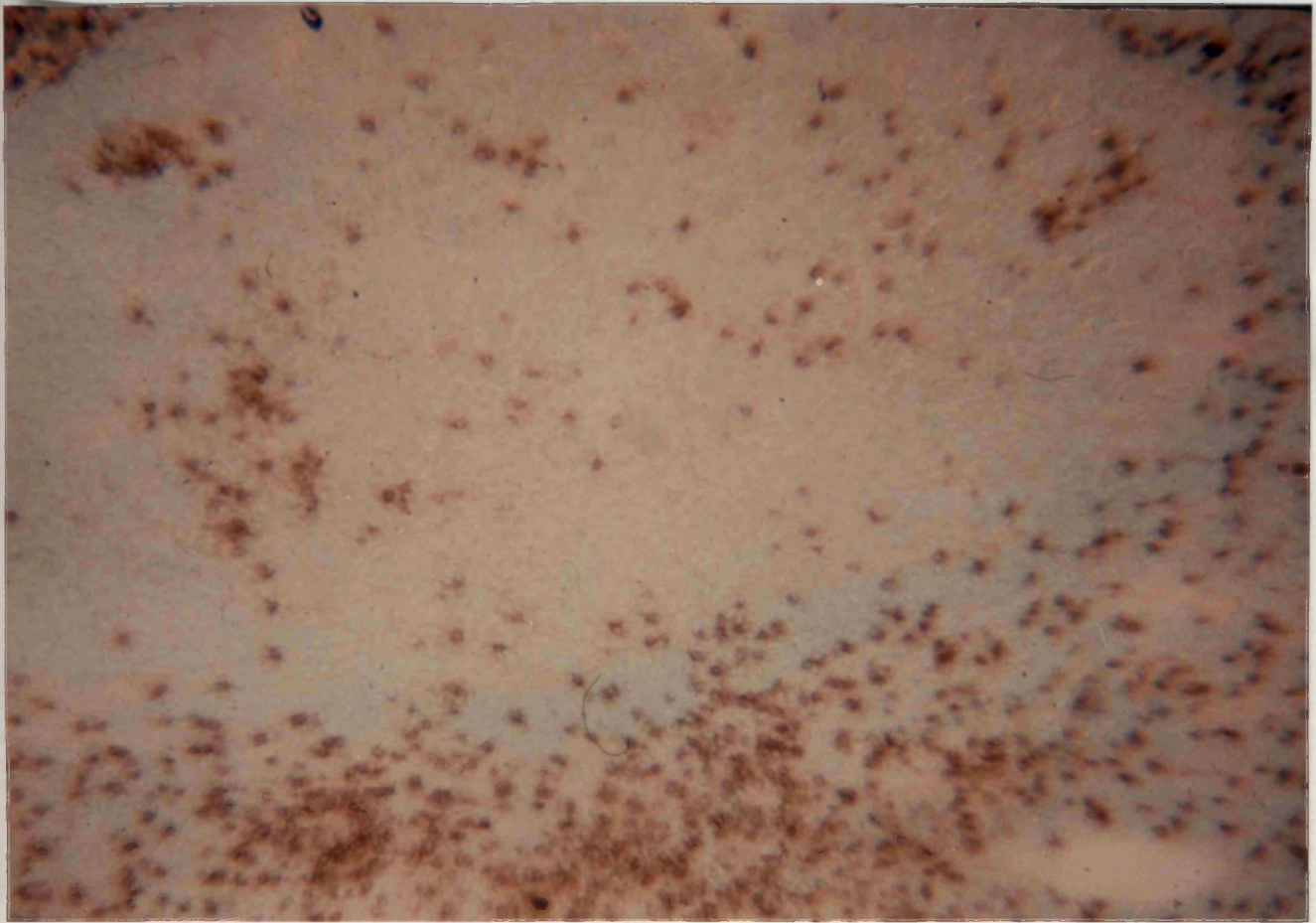


FIGURA 31.- Linfocitos T,OKT4 +,en el centro germinal y manto folicular de una hiperplasia folicular reactiva en congelación.Ganglio cervical.Procedimiento de inmunoperoxidasa en 3 tiempos,sistema avidina-biotina,X 400.

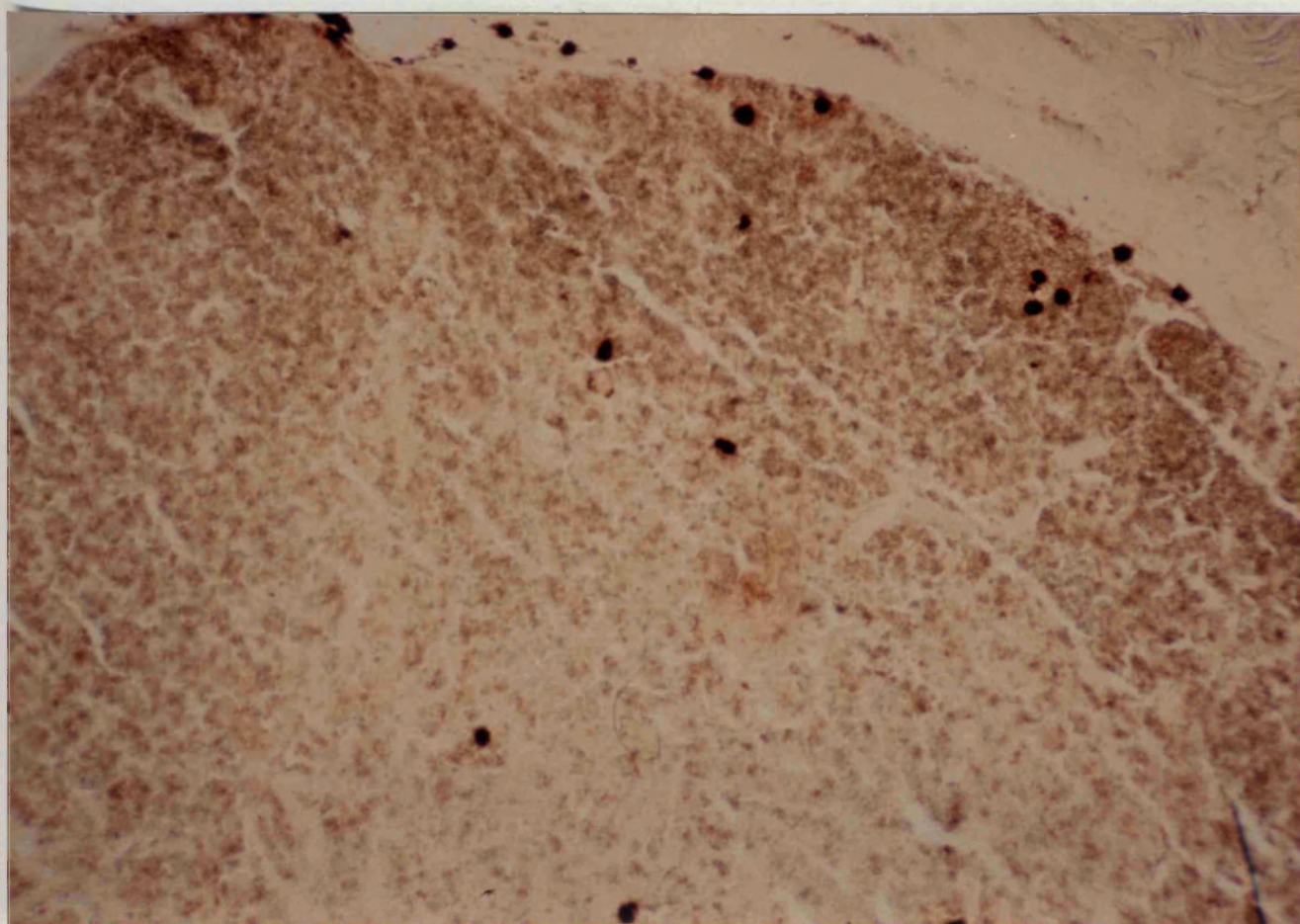


FIGURA 32.- Patrón de tinción en congelación de los timocitos corticales con el anticuerpo monoclonal CALLA. Timo. Procedimiento de inmunoperoxidasa en 3 tiempos, sistema avidina-biotina, X 200.

Presencia de tinción citoplásmica con kappa. Ganglio axilar. Procedimiento de inmunoperoxidasa en 2 tiempos, sistema avidina-biotina, X 200.

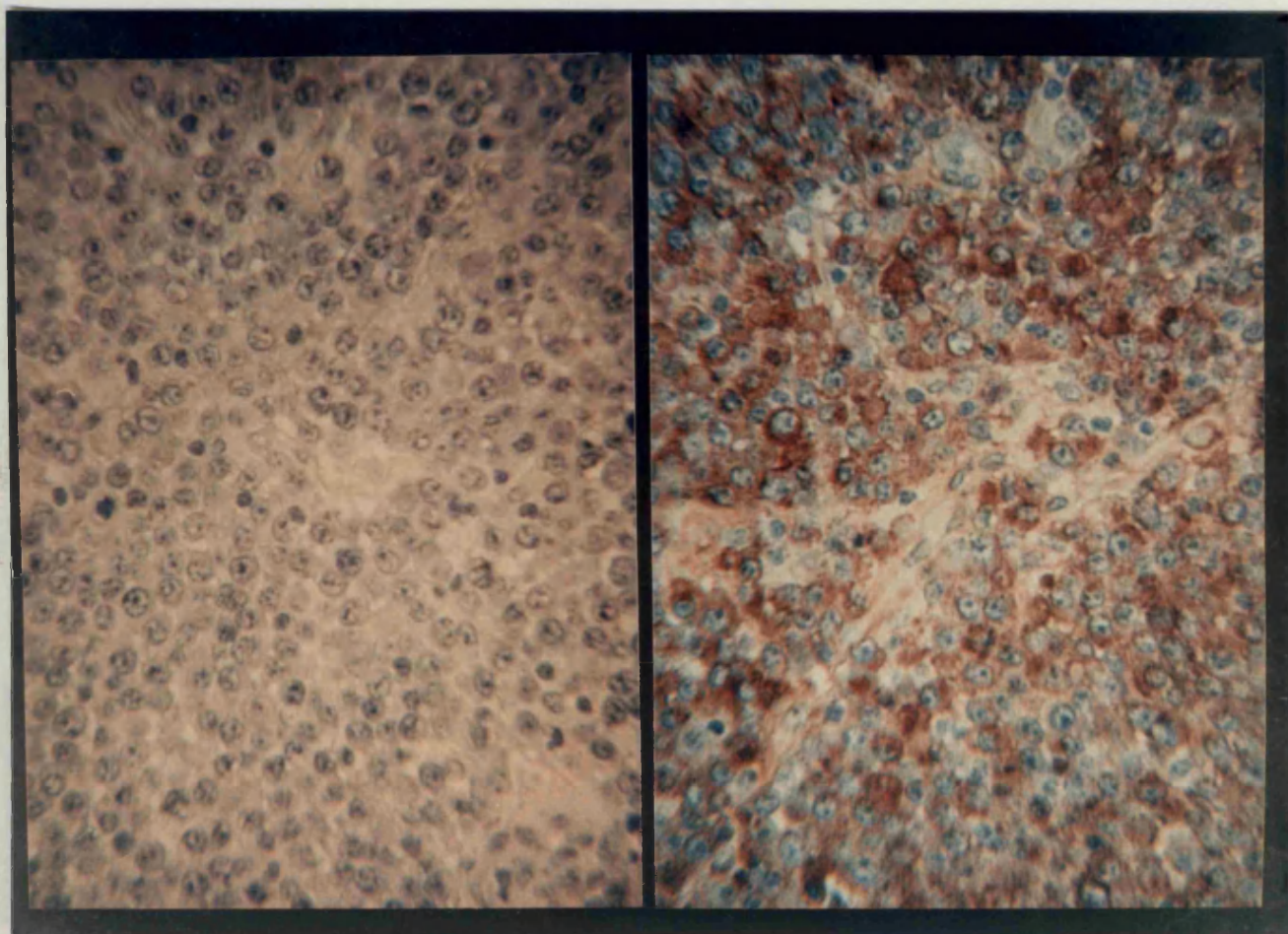


FIGURA 33.- Patrón de tinción monoclonal con cadenas ligeras de un linfoma linfocítico pequeño plasmocitoide, incluido en parafina. A la derecha; tinción citoplásmica con lambda. A la izquierda; ausencia de tinción citoplásmica con kappa. Ganglio axilar. Procedimiento de inmunoperoxidasa en 2 tiempos, sistema avidina-biotina, X 400.

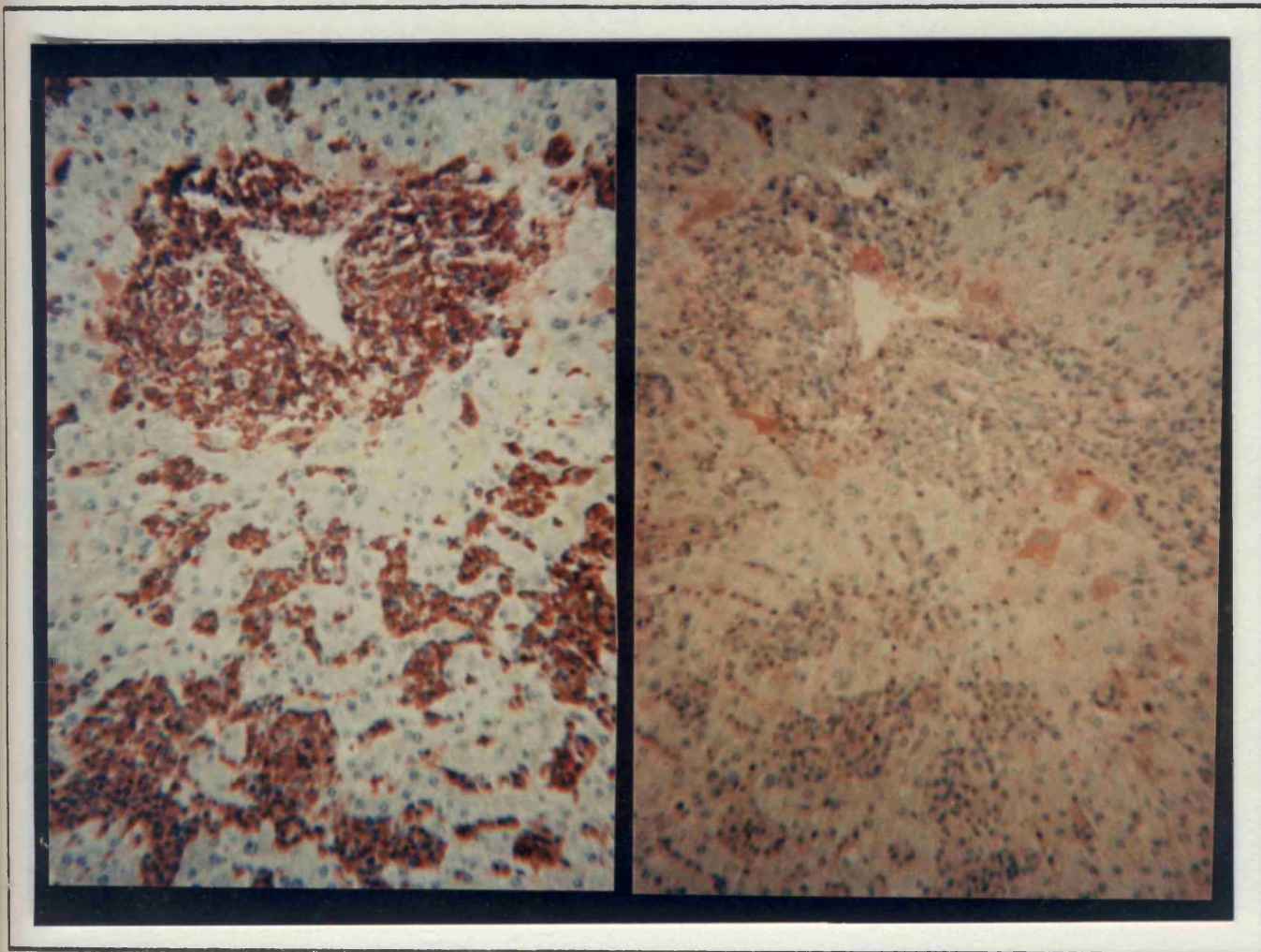


FIGURA 34.- Infiltración hepática por un mieloma múltiple. Patrón de tinción monoclonal con cadenas ligeras, en tejido incluido en parafina. A la derecha; ausencia de tinción citoplásmica con kappa. A la izquierda; tinción citoplásmica con lambda. Hígado. Procedimiento de inmunoperoxidasa en 2 tiempos, sistema avidina-biotina, X 200.

X 400.

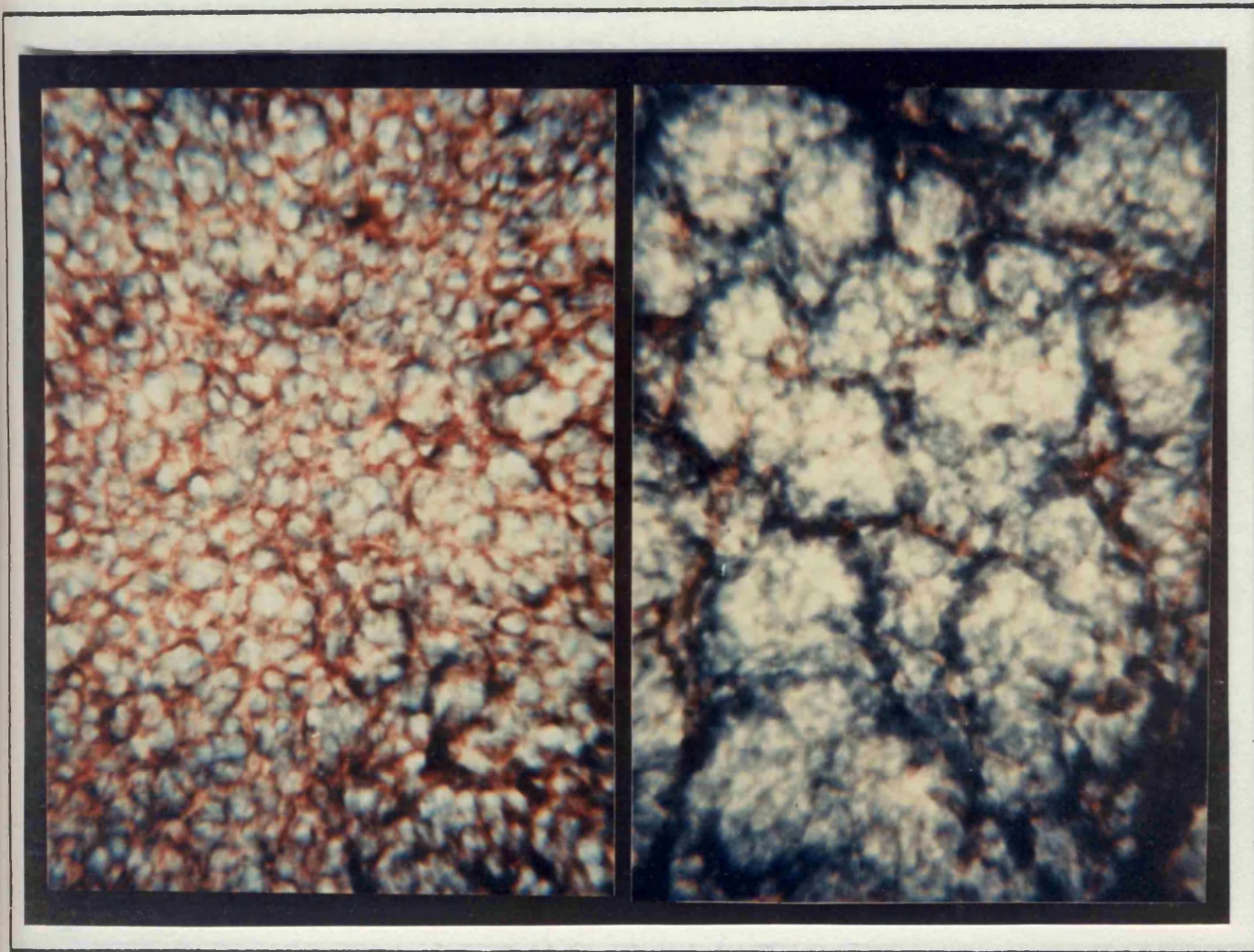


FIGURA 35.- Patrón de tinción monoclonal con cadenas ligeras en congelación de un linfoma folicular. A la derecha; ausencia de tinción de superficie con kappa en las células linfoides. Presencia de una malla de inmunoglobulina intercelular. A la izquierda; tinción de superficie con lambda en las células linfoides. Bazo. Procedimiento de inmunoperoxidasa en 2 tiempos, sistema avidina-biotina, X 400.

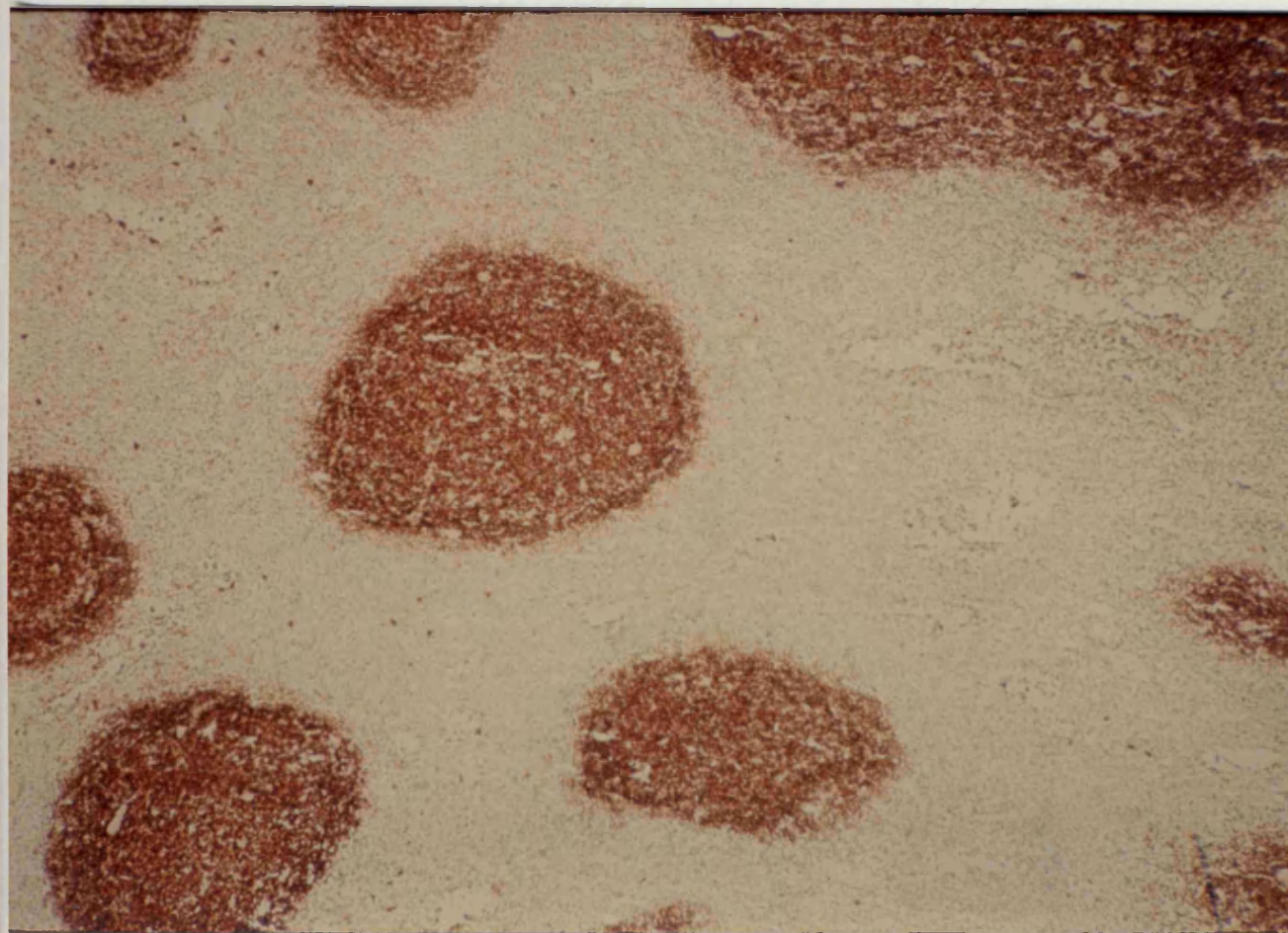


FIGURA 36.- Patrón de tinción con OKB7 de un linfoma folicular, en congelación. Ganglio retroperitoneal. Procedimiento de inmunoperoxidasa en 3 tiempos, sistema avidina-biotina, X 100.

A la derecha; ausencia de tinción de superficie en los linfocitos neoplásicos y tinción de superficie en los linfocitos del manto folicular con kappa. A la izquierda; tinción de superficie en los linfocitos neoplásicos y del manto folicular con lambda. Ganglio axilar. Procedimiento de inmunoperoxidasa en 2 tiempos, sistema avidina-biotina, X 100.

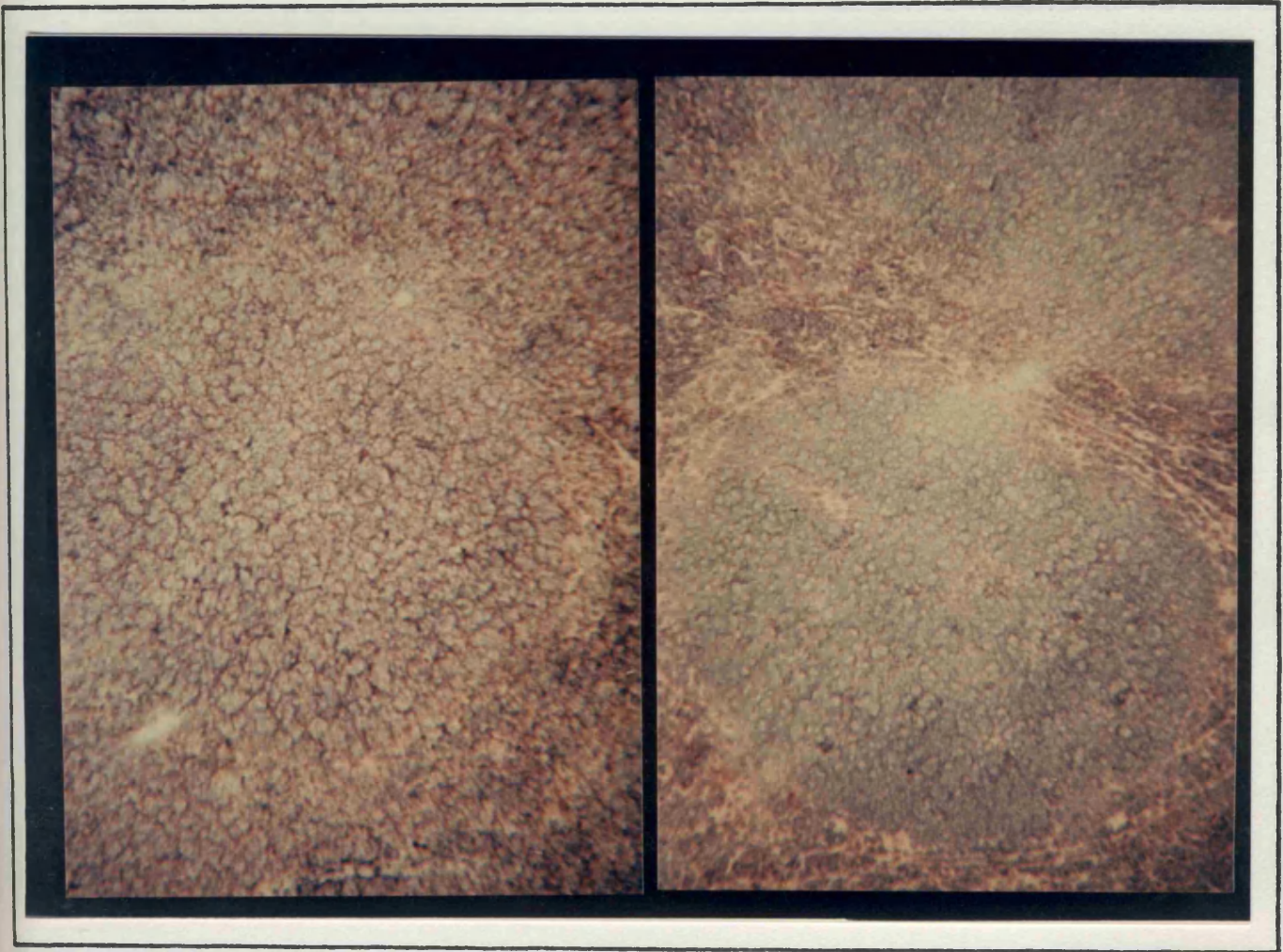


FIGURA 37.- Patrón de tinción en congelación con cadenas ligeras, monoclonal de los linfocitos neoplásicos y policlonal de los linfocitos del manto folicular, en un linfoma folicular. A la derecha; ausencia de tinción de superficie en los linfocitos neoplásicos y tinción de superficie en los linfocitos del manto folicular con kappa. A la izquierda; tinción de superficie en los linfocitos neoplásicos y del manto folicular con lambda. Ganglio axilar. Procedimiento de inmunoperoxidasa en 2 tiempos, sistema avidina-biotina, X 100.



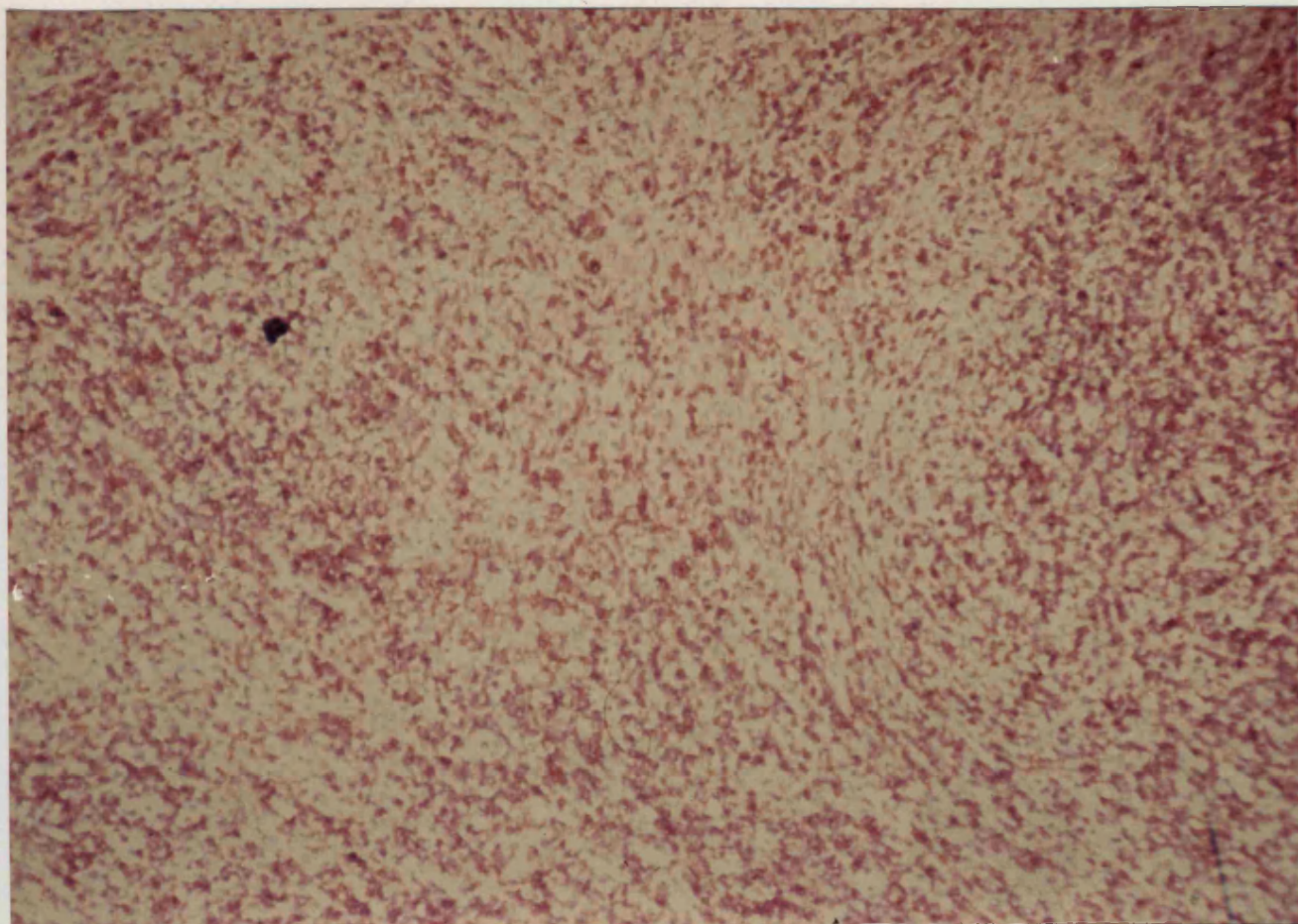


FIGURA 38.- Fenotipo inductor/colaborador de un linfoma difuso mixto (linfoma T-periférico), al demostrar en congelación, positividad con OKT4 en la mayoría de las células neoplásicas. Ganglio inguinal. Procedimiento de inmunoperoxidasa en 3 tiempos, sistema avidina-biotina, X 200.

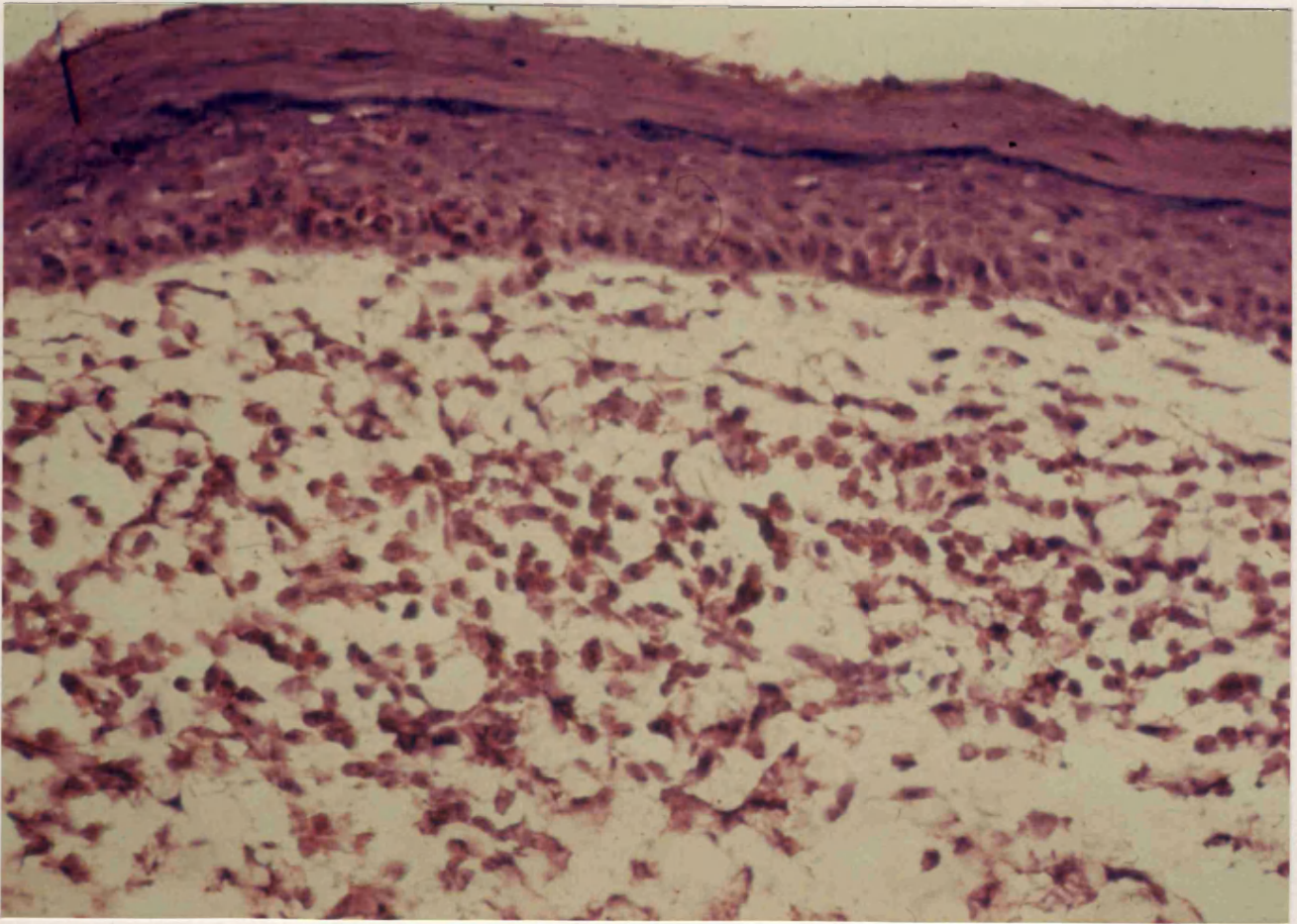


FIGURA 39.- Tinción con el anticuerpo monoclonal OKT4 de las células linfoides en la dermis superficial y epidermis de una micosis fungoide. Piel. Procedimiento de inmunoperoxidasa en 3 tiempos, sistema avidina-biotina, X 200.

V.- DISCUSIÓN.

Siguiendo los criterios de la clasificación de la Formulación Internacional de Trabajo (94) y aquéllos que permiten establecer una equivalencia entre ésta y la clasificación de Kiel (79) hemos clasificado 106 linfomas no hodgkinianos.

Nuestros resultados indican que el grupo de linfomas linfocíticos pequeños con un 40,5% es el más frecuente. Dentro de él, las LLC representan el 24,5%, los linfomas plasmocitoides el 15% y los linfomas T-periféricos el 0,9%. A continuación se encuentran los linfomas difusos de grado intermedio de malignidad con un 22,6% y los linfomas foliculares con un 17,9%.

Resultados bastante similares obtienen Lennert y Stein (77) en un estudio de 1997 linfomas no hodgkinianos procedentes del registro de ganglios linfáticos de Kiel. En él, si excluimos las micosis fungoides y tricoleucemias, el 37% de los linfomas no hodgkinianos son linfomas linfocíticos pequeños, de los que el 17,6, 17,8 y 1,3% corresponden a LLC, linfomas plasmocitoides y linfomas T-periféricos, respectivamente. Los linfomas foliculares (centroblásticos/centrocíticos) constituyen el 22,8%.

Merced al estudio clínico-patológico de 1175 linfomas no hodgkinianos por el "National Cancer Institute" surge la clasificación de la Formulación

Internacional de Trabajo (94), según la cual, los linfomas foliculares constituyen el 34%, los linfomas difusos de grado intermedio de malignidad el 33,3% y los linfomas linfocíticos pequeños el 3,6%.

Los diferentes porcentajes de linfomas linfocíticos pequeños, foliculares y difusos observados en nuestro estudio en comparación con los del "National Cancer Institute) son debidos, por un lado a una menor frecuencia de linfomas foliculares y difusos y por otro, a un notable incremento de linfomas linfocíticos pequeños. La mayor frecuencia de linfomas linfocíticos pequeños, principalmente de LLC, en nuestro estudio, es debida a una diferente práctica de biopsias en este grupo de linfomas. Debido a que los ganglios linfáticos de los pacientes con LLC rara vez se biopsian, éstas se han diagnosticado mediante biopsia de médula ósea y estudio en sangre periférica y las hemos clasificado en el grupo de linfomas linfocíticos pequeños.

Con respecto a la distribución etaria de los linfomas no hodgkinianos, los linfomas inmunoblásticos se presentan a una edad más avanzada que los linfomas linfocíticos pequeños, foliculares y difusos de grado intermedio de malignidad. Por el contrario, los linfomas, linfoblástico y de célula pequeña no hendida, lo hacen durante la infancia

y adolescencia, principalmente por debajo de los 25 años de edad. Por otro lado, mientras que las LLC aparecen a partir de los 40 años, los linfomas plasmocitoides y difusos de grado intermedio de malignidad pueden presentarse a una edad más temprana.

En nuestro estudio, el 1,8% de los pacientes con linfomas de bajo e intermedio grado de malignidad tienen menos de 20 años de edad y sólo el 0,9% son linfomas foliculares. Estos son extremadamente raros por debajo de los 20 años de edad, como han señalado Winberg y cols (146) y Frizzera y Murphy (33) que obtienen un 0,8 y un 2,5% respectivamente, de linfomas foliculares por debajo de esta edad.

Escasas diferencias entre hombres y mujeres hemos observado en la mayoría de los grupos de linfomas no hodgkinianos. Sólo un claro predominio de los hombres se ha puesto de manifiesto en los grupos de linfomas, inmunoblástico y de célula pequeña no hendida, sin confirmar el predominio de hombres sobre mujeres entre los pacientes con linfoma linfoblástico, observado por otros autores (77,94).

Para determinar el estadio clínico de extensión de los pacientes con linfoma se pueden utilizar diferentes clasificaciones, como la de Ann Arbor (18) que, además de ser la más utilizada, es en la que se ha demostrado una plena validez para

efectuar el estadiaje no sólo de la enfermedad de Hodgkin sino de los linfomas no hodgkinianos (114). Otras clasificaciones como la de Blackledge (91) y de Ann Arbor (142) modificadas, pueden ser empleadas para realizar el estadiaje de los pacientes con linfoma 1º gastrointestinal.

Mediante la clasificación de Ann Arbor (18) y excluyendo las LLC hemos puesto de manifiesto que el 62,5% de los pacientes con linfomas de bajo grado de malignidad están en estadio IV, mientras que el 36% con linfomas de alto e intermedio grado de malignidad respectivamente, se encuentran en éste estadio. Además, el 95,70 y 100% de los pacientes con linfomas de bajo, intermedio y alto grado de malignidad en estadio IV, tienen invasión de la médula ósea, respectivamente. Entre los linfomas de alto grado de malignidad es interesante destacar que la invasión de la médula ósea es más frecuente en los linfomas, linfoblástico y de célula pequeña no hendida que en los linfomas inmunoblásticos. Por otro lado, como en las LLC, los pacientes con tricoleucemia están en estadio IV y tienen invasión de la médula ósea, mientras que es raro encontrar pacientes con micosis fungoide en estadio IV y con invasión de la médula ósea.

El elevado porcentaje de pacientes con

linfomas de bajo grado de malignidad en estadio IV, en el momento del diagnóstico, puede ser debido a la lenta e insidiosa evolución de estos linfomas (114) o como han señalado Galton y cols (37) al diferente mecanismo de diseminación de los linfomas. En general, los linfomas de alto grado de malignidad se presentan como tumores localizados y con frecuencia de situación extraganglionar, desde donde se extienden infiltrando los tejidos adyacentes, en tanto que los linfomas de bajo grado de malignidad se diseminan por un proceso fisiológico de recirculación.

Las clasificaciones que se utilizan para determinar el estadio clínico de extensión de los pacientes con LLC son las propuestas por Rai (103) y por la "International Workshop" (11). En este sentido, hemos confirmado la relación existente entre los patrones histológicos de invasión medular y los estadios clínicos de los pacientes con LLC, demostrada también por diversos autores (10,17,52,53). Así, utilizando la clasificación de la "International Workshop" (11), hemos demostrado que el 64% de los pacientes en estadio A tienen un patrón de invasión medular nodular e intersticial, el 60% en estadio B tienen un patrón intersticial y el 75% en estadio C presentan un patrón difuso. Rozman y cols (117) han demostrado que los distintos patrones histológicos de invasión



medular presentan una curva de supervivencia diferente, con clara significación estadística, de ahí la importancia que tienen estas clasificaciones a la hora de evaluar a los pacientes con LLC.

Los linfomas 1º gastrointestinales suponen en nuestro estudio el 11,3% de los linfomas no hodgkinianos, afectan principalmente a los hombres y se localizan preferentemente en el estómago. El estadio III de la clasificación de Blackledge modificada (91) contempla la posibilidad de que un linfoma origine una perforación y peritonitis. Nosotros consideramos que esta posibilidad es más una complicación en la evolución de un linfoma que un estadio. Por tanto, el estadio III debe corresponder a la amplia afectación ganglionar, ganglios paraaórticos o más distantes, y el estadio IV a la enfermedad diseminada extraganglionar, desapareciendo así, el estadio V de la citada clasificación. De esta manera, el 33% de los pacientes se encuentran en estadio IV y el 50% de ellos tienen invasión de la médula ósea. Estos resultados se aproximan a los observados en los linfomas difusos de grado intermedio de malignidad, si bien en éstos el porcentaje de invasión de la médula ósea es mayor.

Los linfomas difusos son los que, con mayor frecuencia, afectan al tracto gastrointestinal y

dentro de ellos, en particular, el de célula grande supone el 33,3%. Esto concuerda con el 57 y 50% de linfomas histiocíticos difusos en la clasificación de Rappaport (104), obtenidos por Weingrad y cols (142) e Isaacson y cols (59), respectivamente.

Aunque el mieloma múltiple es más frecuente que el mieloma solitario, éste no es tan raro como señala Bataille (3), puesto que constituye el 35% de nuestros tumores de células plasmáticas. Los plasmocitomas extramedulares son bastante menos frecuentes, representan el 5% y suelen localizarse en el árbol respiratorio superior y cavidad oral (149). Más raro aún es la presentación simultánea, sin tratamiento quimioterápico previo, de una leucemia de células plasmáticas y una leucemia mielomonocítica crónica. Además del caso que presentamos, sólo 12 han sido descritos en la literatura (21).

Si bien los pacientes con mieloma solitario, en general, son más jóvenes que los pacientes con mieloma múltiple (88,148), no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las edades medias de ambos grupos de pacientes.

Mediante la clasificación de Durie y Salmon (27), que permite determinar el estadio clínico de los pacientes con mieloma múltiple, el 64% de ellos se encuentran en estadio II y el 36% en estadio

III y sólo el 75% de los pacientes en estadio III tienen alteración de la función renal. Woodruff y cols (148) han señalado que la presencia de una paraproteína en el suero u orina de un paciente no excluye el diagnóstico de mieloma solitario y además, ésta es importante porque permite el seguimiento de los pacientes con mieloma múltiple y solitario. En el 40% de los pacientes con mieloma solitario hemos detectado, mediante inmunolectroforésis sérica, gammapatía monoclonal de tipo IgG/kappa, mientras que ésta se ha encontrado en el 73% de los pacientes con mieloma múltiple, principalmente de tipo IgG/lambda. Sólo en el 45% de los pacientes con mieloma múltiple se ha demostrado una paraproteína en orina. Así pues, IgG es la cadena pesada de inmunoglobulina más frecuentemente detectada y kappa en los mielomas solitarios y lambda en los mielomas múltiples, las cadenas ligeras más frecuentes.

Desde el punto de vista cito-histológico, los linfomas linfocíticos pequeños están constituidos, principalmente, por células de pequeño tamaño e incluyen a las LLC, linfomas plasmocitoides y linfomas T-periféricos. Las LLC se identifican con facilidad no sólo por su frecuente expresión hemoperiférica sino también por su morfología. Los linfomas plasmocitoides se reconocen por su tendencia a la diferenciación plasmocitocitaria.

citoide y porque como hemos demostrado presentan inclusiones intracitoplásmicas e intranucleares de inmunoglobulina en el 50 y 31% de los casos, respectivamente. Además, el 50% de nuestros pacientes tienen gammapatía monoclonal sérica detectable.

El linfoma T-periférico (14) ha sido denominado sarcoma inmunoblástico T (23), linfoma ganglionar de células T (23), linfoma de zona T (77), linfoma pleomórfico (140), linfoma linfoepitelioide (77) y linfoma de célula T multilobulado (99). El amplio espectro morfológico de este tipo de linfomas ha sido demostrado, recientemente, por Weis y cols (143), señalando la dificultad de su inclusión en la clasificación de la Formulación Internacional de Trabajo (94), ya que ésta no los contempla en su totalidad. Estos autores (143) los agrupan en 4 categorías morfológicas con significación pronóstica y se corresponden con los linfomas, linfocítico pequeño, difuso mixto, de célula grande e inmunoblástico. Además, sugieren la posibilidad de que algunos casos considerados inicialmente como enfermedad de Hodgkin sean, en realidad, linfomas T-periféricos. El linfoma T-periférico que hemos estudiado, entre los linfomas de bajo grado de malignidad, morfológicamente se origina del área paracortical, está constituido por células de pequeño tamaño con núcleos de contornos irregulares y por

lo tanto debe ser clasificado en el grupo de linfomas linfocíticos pequeños.

Para que un linfoma folicular sea clasificado como tal, tiene que presentar al menos un 25% de su superficie un patrón de crecimiento folicular. Entonces si las células pequeñas hendidas predominan y el número de centroblastos es inferior al 5% se clasifica como linfoma folicular de célula pequeña hendida. Si se acompañan de un 6 a un 15% de centroblastos se clasifica como linfoma folicular mixto y si el número de éstos se encuentra entre un 15 y 50% se clasifica como linfoma folicular de célula grande. En cada uno de ellos se indicará la presencia de esclerosis y áreas difusas, ya que además del tipo celular, tienen significación pronóstica (94).

El linfoma difuso de célula pequeña hendida, que es la contraparte difusa del linfoma folicular de célula pequeña hendida, constituye uno de los grupos de la categoría de grado intermedio de malignidad.

El grupo más conflictivo y que más problemas plantea, en cuanto a la clasificación de un linfoma constituido por células pequeñas y grandes, es el de los linfomas difusos mixtos. Esto es debido, por un lado a su heterogeneidad y por otro, a la dificultad para reconocer los linfomas que lo componen y que

son el linfoma difuso de célula grande y pequeña hendida, el linfoma linfoplasmocitoide polimorfo y el linfoma T-periférico.

El linfoma difuso de célula grande y pequeña hendida es la contraparte difusa del linfoma folicular mixto. El linfoma linfoplasmocitoide polimorfo, que en la clasificación de Kiel (79) se encuentra en el grupo de inmunocitomas y por lo tanto en la categoría de bajo grado de malignidad, se caracteriza por presentar células grandes y pequeñas, algunas con diferenciación plasmocitoide y numerosos inmunoblastos. Esto unido al comportamiento clínico más agresivo determina su clasificación en el grupo de linfomas difusos mixtos en la categoría de grado intermedio de malignidad.

Frizzera y cols (34) han descrito un grupo de linfomas foliculares que presentan numerosas células plasmáticas con Clg de carácter monoclonal y composición celular mixta. Nosotros, también hemos observado un patrón de crecimiento pseudofolicular en 3 linfomas linfoplasmocitoides polimorfos, en 2 de ellos con células epitelioides, pero con escasas células plasmáticas. Estos linfomas, que creemos están relacionados, deben clasificarse como linfomas difusos mixtos, planteándose siempre el diagnóstico diferencial con la enfermedad de Hodgkin de predominio linfocítico

y linfomas foliculares. Finalmente, los linfomas T-periféricos, incluidos en este grupo, pueden ser reconocidos por su celularidad mixta y polimorfa con células de contornos nucleares irregulares junto a plasmocitos y eosinófilos, intensa vascularización y fibrosis reticulínica.

Los linfomas constituidos por células grandes hendidas y no hendidas se clasifican como linfomas difusos de célula grande. En este grupo, hemos incluido además, a los linfomas foliculares con más de un 50% de centroblastos que corresponden a los linfomas centroblásticos foliculares en la clasificación de Kiel (79), a los linfomas que presentan numerosos inmunoblastos que corresponden a los linfomas centroblásticos polimorfos en la clasificación de Kiel (79) y por último, al linfoma de célula grande de núcleo multilobulado.

Weinberg y Pinkus (141) han caracterizado al linfoma de célula grande con núcleo multilobulado como una variante de linfoma T, con una predilección por la afectación extralinfática y un pronóstico favorable. Sin embargo, Cerezo (20) y Parfrey y cols (98) han demostrado que este tipo de linfoma puede ser, también, una variante de linfoma B. En cualquier caso, por su morfología, debe ser incluido en el grupo de linfomas difusos de célula grande.

Los linfomas caracterizados por células grandes de núcleos redondos, con un nucleolo prominente central y amplio citoplasma se identifican y clasifican como linfomas inmunoblásticos. Estos pueden tener diferenciación plasmocitoide o bien corresponder a la variante polimorfa, que no es más que un linfoma T-periférico compuesto por células con contornos nucleares irregulares y células epitelioides. En la clasificación de la Formulación Internacional de Trabajo (94) también se distingue un linfoma inmunoblástico caracterizado por células claras.

Schneider y cols (121) demuestran que la mayoría de los linfomas inmunoblásticos B y T pueden ser distinguidos por criterios morfológicos. Jaffé y cols (62) son capaces de predecir, por la morfología, la naturaleza B o T de un grupo de linfomas difusos agresivos en el 61% de los casos. De esto se deduce que sólo el aspecto histológico no debe utilizarse como un indicador del fenotipo B o T en un linfoma determinado.

Los linfomas linfoblásticos T, constituidos por una población monomorfa y difusa de blastos linfoides de mediano a gran tamaño con presencia de núcleos giriformes, se clasifican en un grupo dentro de la categoría de alto grado de malignidad. También se incluyen en ella, los linfomas de célula



pequeña hendidura tipo Burkitt y no Burkitt. Los hallazgos morfológicos que permiten su diferenciación son la monotonía e hiperbasofilia citoplasmática de los blastos linfoides en el tipo Burkitt y el mayor pleomorfismo celular en el tipo no Burkitt.

En el grupo de miscelánea se encuentran las micosis fungoides y tricoleucemias, aunque su clasificación en este grupo es discutible. Los 2 procesos linfoproliferativos están constituidos principalmente por células de pequeño tamaño y por lo tanto quizá deberían ser clasificados dentro del grupo de linfomas linfocíticos pequeños. Entonces, el grupo de miscelánea quedaría reservado para los raros linfomas compuestos, histiocíticos, inclasificables y plasmocitomas.

Los marcadores enzimáticos lisosomiales, fosfatasas y esterases ácidas, permiten identificar inicialmente a aquéllos linfomas que por la morfología tienen características celulares T. Posteriormente, serán los métodos inmunológicos los que confirmen la verdadera naturaleza de la neoplasia. Así, hemos demostrado actividad citoplásmica de localización centrosómica paranuclear con fosfatasas ácidas en todos los linfomas T; 1 linfocítico pequeño, 1 difuso mixto, 1 inmunoblástico, 4 linfoblásticos y 3 micosis fungoides. En las tricoleucemias también hemos detectado actividad

citoplásmica granular con fosfatasas ácidas y en 2 de ellas se ha demostrado su resistencia a la acción del ácido tartárico, como han señalado otros autores (82).

Con esterases ácidas, la positividad ha sido observada en los linfomas T-periféricos, micosis fungoides y de forma heterogénea en las tricoleucemias. Sin embargo, las células de los linfomas linfoblásticos carecen de ella. Por lo tanto, en general, alfa-naftil acetato esterasa ácida es un marcador enzimático capaz de distinguir las células T maduras e inmaduras y por consiguiente los linfomas constituidos por estas células (71).

El estudio ultraestructural nos ha permitido reconocer con cierta exactitud el fenotipo B o T de los linfomas no hodgkinianos estudiados, merced a las características nucleares y citoplásmicas. La presencia de células linfoides con hendiduras nucleares junto a células reticulares dendríticas, características de los centros germinales (118), se relaciona con linfomas B de origen folicular. Por el contrario, la presencia de células linfoides con contornos nucleares irregulares, como hemos observado en las micosis fungoides y linfomas T-periféricos, define a los linfomas de origen T. A veces, la presencia de núcleos extremadamente complejos como en el linfoma de núcleo

multilobulado hace difícil su reconocimiento y será el estudio inmunológico el que determine su fenotipo.

Los hallazgos ultraestructurales citoplasmáticos que se relacionan con los linfomas secretores de inmunoglobulinas y por tanto de origen B, son la presencia de retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado con cisternas dilatadas conteniendo inmunoglobulinas, diferenciación plasmocitoide e inclusiones intracitoplásmicas e intranucleares de inmunoglobulinas.

La técnica de PAP o peroxidasa-antiperoxidasa fué descrita por Sternberger (129) y desde entonces las posibilidades de marcaje con peroxidasa han sido múltiples y variadas. Desde un procedimiento indirecto con 2 puntos diferentes de reacción de la peroxidasa con el substrato hasta un procedimiento en 2 o 3 tiempos, según se utilice o no un 2º anticuerpo, basado en la interacción de la avidina con la biotina (57). Este método denominado "ABC" es el que hemos utilizado para identificar SIg, CIg y antígenos de diferenciación linfocitarios, en tejido congelado e incluido en parafina. Para estudiar inmunológicamente las células en suspensión de la sangre periférica hemos empleado un procedimiento de inmunofluorescencia directa e indirecta (130).

El estudio inmunológico del tejido linfoide

ganglionar, amigdalario y esplénico nos ha permitido conocer su organización inmunológica y los patrones de tinción con SIg y anticuerpos monoclonales.

Las áreas foliculares son funcionalmente áreas B y presentan SIg y tinción con los anticuerpos contra células B, OKB2, OKB7 y OKIa1. La mayoría de los linfocitos del manto folicular muestran SIgM y SIgD, mientras que las células centrofoliculares tienen SIgM, SIgG y SIgA, pero no SIgD. Además, éstas son CALLA + y expresan el anticuerpo OKT9 que identifica el receptor de la transferrina. Este patrón de tinción, SIgM más SIgD, también ha sido comprobado por Stein y cols (128) en los linfocitos del manto folicular y por Moretta y cols (90) en los linfocitos de la sangre periférica. De esta manera, hoy se admite que los folículos linfoides son áreas de recirculación de linfocitos B, de la misma manera que las zonas paracorticales lo son de linfocitos T.

El aspecto inmunológico más importante, como han señalado diversos autores (49, 112, 128), es el patrón de tinción policlonal con cadenas ligeras kappa y lambda de las áreas foliculares, lo que va a permitir distinguir entre hiperplasias foliculares y linfomas foliculares.

La presencia de inmunoglobulina intercelular en los centros germinales, con frecuencia, dificulta

la interpretación de la SIg de las células centrofoli-  
culares. Esta parece corresponder a las prolongaciones  
de las células reticulares dendríticas (112,128)  
o células presentadoras del antígeno a los linfocitos  
B, que muestran tinción con los anticuerpos OKM1  
y OKM5.

Knowles y cols (66) han elaborado un intere-  
sante esquema de diferenciación celular B, donde  
los linfocitos B adquieren el anticuerpo OKB2 dentro  
del hígado fetal, OKB1, OKB2 y OKB7 en el manto folicular  
y más tarde OKB1, OKB2, OKB4 y OKB7 en el interior  
de los folículos linfoides. Posteriormente, las células  
B interfoliculares toman los anticuerpos OKB1, OKB2  
y OKB7 que son perdidos por las células plasmáticas. En  
este sentido, hemos comprobado que la mayoría de  
los linfocitos B interfoliculares son OKB7 + más  
que OKB2 +, por lo que este último anticuerpo aparece  
en un estadio de diferenciación más precoz y se  
pierde en las células B más diferenciadas.

Se ha señalado que las células T intrafolicu-  
lares, la mayoría OKT4 +, participan en la diferenciación  
y maduración de las células B (101) e incluso su  
distribución dentro de los centros germinales varía  
según el tiempo de estimulación antigénica (28).

La zona paracortical se pone de manifiesto  
por su reactividad con los anticuerpos contra células

T y OKT11, expresando la mayoría de las células un fenotipo inductor/colaborador). En esta zona, con los anticuerpos OKT6, OKT9 y OKIa1 hemos identificado a las células reticulares interdigitantes o células presentadoras del antígeno a las células T. Una relación entre la célula reticular interdigitante de la zona paracortical y la célula de Langerhans de la epidermis ha sido señalada por Rausche y cols (105), por la expresión en ambas del anticuerpo OKT6. Más recientemente, Carbone y cols (16) han demostrado que tanto las células reticulares interdigitantes como las células reticulares dendríticas pueden ser detectadas por su tinción con la proteína S-100.

En la zona T amigdalara, la escasez de células reticulares interdigitantes se compensa por la presencia de células OKT6 + en el epitelio de la cripta amigdalara, pudiendo asumir el papel de células presentadoras del antígeno.

El estudio inmunológico del tejido linfoides tímico nos ha permitido demostrar que la maduración celular T se realiza de corteza a médula. Los timocitos subcapsulares son OKT9 +, los timocitos corticales OKT10, OKT6 y CALLA +, los timocitos medulares expresan el anticuerpo contra células T y los timocitos tanto corticales como medulares los anticuerpos OKT11, OKT4 y OKT8. De esta forma mediante una batería de anticuer-

pos monoclonales contra células T es posible identificar a los timocitos medulares y células T-periféricas como células T maduras y a los timocitos subcapsulares y corticales como células T inmaduras (56).

En los tumores de células plasmáticas y linfomas secretores de inmunoglobulinas mediante una técnica de inmunoperoxidasa es fácil identificar el producto de secreción, sin embargo hoy se sabe que la mayoría de LLC y linfomas foliculares producen pero no necesariamente segregan inmunoglobulinas (81).

Taylor ,(134) mediante un método de PAP, en 75 linfomas no hodgkinianos, demuestra ausencia de CIg en el 40%. Por otro lado, Pangalis y cols (97), en 101 pacientes con proliferaciones linfocíticas bien diferenciadas, utilizando el mismo método, detectan CIg en el 18% de los linfomas linfocíticos bien diferenciados, en el 93% de los linfomas con diferenciación plasmocitoide y sólo en el 5% de las LLC.

Nosotros, mediante un procedimiento de inmunoperoxidasa, sistema avidina-biotina, en 82 linfomas no hodgkinianos y 20 mielomas, hemos puesto de manifiesto ausencia de CIg en 11 linfomas T y en 16 linfomas B, lo que supone el 23,5% de todos los linfomas B. Por el contrario, hemos demostrado CIg en los mielomas y linfomas B secretores de inmunoglobulinas como

los linfomas plasmocitoides, linfoplasmocitoides polimorfos e inmunoblásticos con diferenciación plasmocitoide. Por consiguiente, es necesario estudiar en congelación los linfomas B que carecen de CIg para identificar SIg y antígenos de diferenciación linfocitarios. La utilidad de este método ha quedado demostrada, en nuestro estudio, al detectar SIg en los 20 linfomas B y su ausencia en 6 linfomas T.

La monoclonalidad de la mayoría de los linfomas B y mielomas, estudiados en congelación, parafina o suspensión ha quedado establecida por un patrón de tinción monotípico con cadenas ligeras, bien kappa o bien lambda.

Como han demostrado Levy y cols (81), inmunológicamente las células en suspensión de la sangre periférica de las LLC, incluida la variante prolinfocítica, se caracterizan por presentar SIg polivalente, tinción con los anticuerpos B1 y OKIa1, y expresión monotípica de una cadena ligera con predominio de kappa sobre lambda.

Slease y cols (125), han observado que en las LLC B la densidad de SIg es escasa y tiene una distribución uniforme, mientras que ésta es mayor en las leucemias prolinfocíticas B (70). Esto si bien ha sido confirmado en nuestro estudio de un modo subjetivo por comparación entre ambas y con



las células centrofoliculares, para una valoración correcta debe ser cuantificada mediante citometría de flujo.

La positividad observada con Leu-1 en un porcentaje importante de células linfoides, en 3 de 7 LLC y en 1 leucemia prolinfocítica, es un hecho bien establecido (32,106,122) y puede ser debido a la existencia de un pequeño subgrupo de células B Leu-1 +, a una transformación neoplásica o a un fenómeno de glicosilación (67). En parafina, las LLC y la variante prolinfocítica carecen de CIg y en congelación muestran SIg de tipo IgM e IgD, excepto la leucemia prolinfocítica que sólo presenta IgM. Las células de las LLC expresan los anticuerpos contra células B, OKB2, OKB7 y OKIa1. Las células de la leucemia prolinfocítica también expresan estos anticuerpos excepto OKB7. Quizá, ésta sea una variante de LLC en distinto estadio de diferenciación. Por otro lado, con el anticuerpo OKT9 hemos identificado los centros de proliferación de 1 LLC, ya que son zonas de alto índice metabólico. El patrón de tinción SIgM +SIgD de las LLC coincide con el observado en los mantos foliculares de las hiperplasias foliculares reactivas, por lo que las LLC B se consideran neoplasias de linfocitos B maduros recirculantes.

Harris y Bhan (48) han señalado que la

expresión de cadenas pesadas de inmunoglobulinas por las células linfoides varía durante el proceso de diferenciación celular B. Así, las células pre-B sólo tienen CIgM, en un estadio más avanzado presentan una cadena ligera, más tarde los linfocitos B expresan SIgM y los linfocitos B maduros SIgM y SIgD. La SIgD desaparece después de la estimulación antigénica y está ausente en las células B centrofoliculares. En algún momento de la diferenciación, una célula linfoide puede cambiar de IgM a IgG o IgA, mientras que las células plasmáticas contienen principalmente IgG o IgA. Esta variación en el tipo de inmunoglobulina también ocurre in vivo. En la respuesta inmune 1ª hay un predominio de los anticuerpos IgM y en la respuesta inmune 2ª de los anticuerpos IgG. De esta manera, la variación del tipo de cadena pesada de inmunoglobulina acontece en el centro germinal y la producción de ésta por una célula linfoide B puede ser un indicador de su estado de diferenciación.

Lennert (77) y Weissman y cols (151) han indicado que la diferenciación celular B, como respuesta a un antígeno, puede seguir 2 caminos diferentes. En la respuesta inmune 1ª, los linfocitos pequeños con SIgM y SIgD se transforman en inmunoblastos y éstos en células linfoplasmocitoides y plasmáticas productoras de IgM. La respuesta inmune 2ª tiene lugar en

los centros germinales de forma que las células plasmáticas que se originan van a producir IgG o IgA.

En nuestro estudio, los linfomas plasmocitoides, linfoplasmocitoides polimorfos e inmunoblásticos con diferenciación plasmocitoide han presentado inmunoglobulina, principalmente citoplásmica, de tipo IgM. Además, en congelación han expresado los anticuerpos monoclonales contra células B, OKB2, OKB7 y OKIa1, pero no el anticuerpo CALLA. Entonces, estos linfomas representan un grupo homogéneo desde el punto de vista inmunológico.

Por otro lado, los mielomas han presentado CIg, principalmente de tipo IgG o IgA y en congelación uno de ellos carecía de SIg y de reactividad con los anticuerpos monoclonales de la serie OKB.

Así pues, queda demostrado que la mayoría de los linfomas plasmocitoides y todos los linfoplasmocitoides polimorfos e inmunoblásticos con diferenciación plasmocitoide siguen la vía de diferenciación observada en la respuesta inmune 1ª y se corresponden con las células plasmáticas productoras de IgM. Por el contrario, los mielomas siguen la vía de diferenciación observada en la respuesta inmune 2ª y se corresponden con las células plasmáticas secretoras de IgG o IgA.

Es importante destacar la buena correlación que hemos obtenido entre el tipo de inmunoglobulina detectada en el tejido por el método de inmunoperoxidasa y la detectada en el suero mediante inmunolectroforesis, en los pacientes con linfomas plasmocitoides y mielomas.

La negatividad observada en el linfoma inmunoblástico con el anticuerpo CALLA y su positividad en las células centrolículares de los linfomas foliculares (111,132), puede ser útil en el diagnóstico diferencial entre los linfomas inmunoblástico y centrolístico.

Con respecto al mieloma múltiple IgD,2 son los casos en los que hemos detectado esta cadena pesada de inmunoglobulina, además de cadenas ligeras lambda. La expresión de IgD por el mieloma múltiple, como han demostrado Jancelewicz y cols (63), tiene una connotación pronóstica y es que la supervivencia de estos pacientes es significativamente más corta que la de los pacientes con mieloma múltiple IgG o IgA.

Los linfomas foliculares, se asemejan a las hiperplasias foliculares reactivas, arquitectural y citológicamente. Desde el punto de vista inmunológico, aunque ambos comparten algunos aspectos, pueden ser distinguidos en base al patrón de tinción con cadenas

ligeras, que como hemos demostrado es monoclonal en los linfomas foliculares y policlonal en las hiperplasias foliculares.

Globalmente, IgM e IgG son las cadenas pesadas de inmunoglobulina detectadas con mayor frecuencia en los linfomas foliculares, lo que unido al mayor número de casos con SIg que con CIg, coincide con la maduración intrafolicular de las células B. El origen y función del patrón intercelular de inmunoglobulina observado en el centro germinal de las hiperplasias foliculares y de algunos linfomas foliculares, es desconocido, aunque se ha sugerido que puede representar anticuerpos citofílicos localizados sobre los procesos de las células reticulares dendríticas (47).

El estudio de los linfomas foliculares con anticuerpos monoclonales ha puesto de manifiesto una gran similitud de éstos con las hiperplasias foliculares, ya que en ambos el patrón de tinción es homogéneo con los anticuerpos contra células B, OKB2, OKB7, OKIa1, OKT9 y CALLA. Los folículos neoplásicos y reactivos al ser centros de proliferación y áreas de gran dinámica celular expresan el anticuerpo OKT9. La tinción con CALLA es también más intensa en las estructuras foliculares neoplásicas (111,132).

La presencia de células B interfoliculares

con SIg del mismo tipo que las células centrofoliculares neoplásicas y que presentan tinción con OKB7 y apenas con OKB2, parece indicar que las células interfoliculares se encuentran en un estadio de diferenciación más tardío que las células intrafoliculares.

El estudio inmunológico de las células en suspensión de la sangre periférica de 2 linfomas foliculares de célula pequeña hendida, estudiados también en congelación, ha demostrado SIg polivalente, monoclonalidad para cadenas ligeras kappa, reactividad con los anticuerpos B1 y OKIa1 y negatividad con CALLA. Haría falta un mayor número de casos para comprobar si la pérdida de CALLA por las células centrofoliculares sanguíneas está o no en relación con la leucemización de los linfomas foliculares.

La poli o monoclonalidad de los linfocitos del manto folicular, que con frecuencia rodean a las células centrofoliculares en los linfomas foliculares, ha sido ampliamente debatida (47,75,132,138). Stein y cols (128), en los linfomas foliculares incluidos en parafina, mediante un método de PAP y sometiendo el tejido a la acción de la tripsina, demuestran SIg en los linfocitos del manto folicular con un patrón de tinción difuso y policlonal. En nuestros linfomas foliculares, la policlonalidad de los linfoci-

tos del manto folicular se ha puesto de manifiesto, tanto en congelación como en parafina, demostrando así, su carácter reactivo y no neoplásico.

Harris y Data (47) han señalado la posibilidad de que estas células linfoides sean responsables de una reacción inmunológica contra la neoplasia o bien representen células normales que, inducidas por las células tumorales, participen en la formación de las estructuras foliculares.

Nosotros estamos de acuerdo con Warnke y Levy (138) en que estas células linfoides son zonas marginales residuales de los folículos linfoides que han sido invadidas por las células tumorales, lo que explicaría su desaparición a medida que el linfoma se va extendiendo localmente (109).

Desde el punto de vista inmunológico, los linfomas difusos de célula pequeña hendida se caracterizan por presentar cadenas pesadas IgM, reactividad con los anticuerpos contra células B, OKB2, OKB7 y OKIa1 y negatividad con CALLA. Si se comparan con los linfomas foliculares vemos que existen 2 diferencias. Mientras que los linfomas foliculares presentan IgM o IgG y son CALLA +, los linfomas difusos de célula pequeña hendida presentan IgM y son CALLA -. Estos resultados coinciden con los de Harris y cols (46), en que el linfoma difuso de célula pequeña

hendida es una proliferación de células centrofoliculares en un estadio más precoz de maduración que las células de los linfomas foliculares.

Los linfomas difusos mixtos de célula grande y pequeña hendidas, así como los linfomas difusos de célula grande muestran variabilidad en cuanto a la expresión de cadenas pesadas de inmunoglobulinas, lo que parece indicar un origen centrofolicular. Hacen falta estudios con anticuerpos monoclonales y un mayor número de casos para poder definir y caracterizar con mayor exactitud estos linfomas.

Es interesante destacar la doble expresión de cadena pesada de inmunoglobulina por las células linfoides de algunos linfomas difusos de célula grande. Esto, que también ha sido observado por Harris y cols (49) y por Lauder y cols (75), parece que está en relación con un mecanismo de tipo genético (24).

El linfoma de célula grande de núcleo multilobulado se caracteriza por presentar doble cadena pesada de inmunoglobulina, IgM e IgG y positividad con los anticuerpos contra células B, OKB2, OKB7, OKIa1 y CALLA. La positividad con CALLA en este linfoma B sugiere un origen centrofolicular. Este tipo de linfoma puede tener un fenotipo inmunológico B o T como han señalado Parfrey y cols (98).



Los linfomas de célula pequeña no hendida constituyen un grupo de linfomas B (49,96). Los linfomas tipo Burkitt y no Burkitt incluidos en este grupo, se caracterizan por presentar SIgM y CIgG, respectivamente. En congelación, los primeros muestran reactividad con el anticuerpo contra células B y sólo uno de ellos positividad con OKB2, OKB7, OKIa1, CALLA y OKT9. La reactividad con CALLA en un linfoma de Burkitt sugiere un origen centrofolicular. El anticuerpo OKT9, ligado a la transferrina, puede ser utilizado como un marcador de la agresividad tumoral (111), ya que está presente, principalmente, en los linfomas de alto grado de malignidad.

La presencia de abundante S y CIgG, monoclonalidad lambda y reactividad con el anticuerpo contra células B, permite definir el fenotipo B de las tricoleucemias, tal y como han señalado Catovsky y cols (19) y Golde y cols (40).

En conjunto, los linfomas T pueden ser inicialmente descubiertos al no identificar CIg en las células tumorales y al demostrar un patrón de tinción policlonal con cadenas ligeras en el citoplasma de las células plasmáticas T-asociadas que, con frecuencia, acompañan a estos linfomas. Después, el fenotipo T debe ser confirmado, siempre que sea posible, mediante un estudio en congelación.

El origen T de 3 micosis fungoides y 2 linfomas T-periféricos se ha puesto de manifiesto al demostrar ausencia de SIg y positividad con el anticuerpo contra células T y OKT11. Como han demostrado diferentes autores (124,136,143), todos estos linfomas tienen un fenotipo T maduro (Ac.CT+,OKT6-) y la mayoría con características inductoras/colaboradoras (OKT4+).

Con frecuencia, los linfomas T-periféricos revelan eosinofilia, hipercalcemia, hipergammaglobulinemia policlonal y se acompañan de proliferación histiocitaria, vascular e incremento de las fibras de reticulina (95). Estas últimas características parece que pueden ser inducidas por sustancias biológicas como las linfoquinas producidas por las células T neoplásicas (113).

El fenotipo T de los linfomas linfoblásticos se ha determinado por criterios morfológicos, citoquímicos e inmunológicos, como la ausencia de CIg en las células tumorales. El estudio inmunológico de las células en suspensión de la sangre periférica de uno de ellos, ha puesto de manifiesto ausencia de SIg polivalente, negatividad con CALLA y positividad con OKT11 y OKT6, demostrándose así, el origen tímico de este linfoma linfoblástico T.

La fase leucémica del linfoma linfoblástico

T, es a menudo, morfológicamente indistinguible de la LLA-T. Estudios con anticuerpos monoclonales han demostrado que la mayoría de los linfomas linfoblásticos T tienen un fenotipo de timocito común y maduro (estadios II y III), mientras que las LLA-T tienen un fenotipo de timocito inmaduro (estadio I) (6). Además, el 40% de las células de los linfomas linfoblásticos expresan el antígeno CALLA, mientras que éste aparece en menos del 10% de las células de la LLA-T.

Probablemente, el anticuerpo OKT6 es el marcador más importante para identificar la población de células T de los linfomas linfoblásticos, que además como hemos demostrado, está ausente en los linfomas con fenotipo T maduro. Sólo un pequeño subgrupo de las células de los linfomas linfoblásticos T, puede ser detectado con el anticuerpo que identifica el antígeno de la LLA común (43). Cossman y cols (25), han señalado que el linfoma linfoblástico T es algo más maduro que la LLA-T pero menos maduro que el linfoma T-periférico. De esta manera, los linfomas T constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias linfoides con fenotipos inmunológicos que se relacionan con los diferentes estadios de diferenciación intratímico y periférico.

Diferentes estudios han demostrado numerosas

células T, la mayoría con fenotipo inductor/colaborador (OKT4+) en el interior de los folículos linfoides, tanto reactivos (101,131) como neoplásicos (28,45). Entonces, las células T no sólo parecen intervenir en la formación de los folículos linfoides normales sino que participan en la formación de los folículos neoplásicos. En principio, estas células se consideran reactivas ya que no ha sido posible establecer su clonalidad.

El estudio de la población y subpoblaciones de células T en las áreas foliculares de los linfomas e hiperplasias foliculares, nos ha permitido demostrar la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de células T, OKT11 y OKT4 +, y una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de células OKT8+. El mayor número de células OKT8+, observado en los folículos neoplásicos, como han señalado Dvoretzky y cols (28) y Miller y cols (89), pueden ser las responsables de una respuesta inmune contra la neoplasia.

Mientras que en los folículos neoplásicos, el 65% de las células T son OKT4+, éstas representan el 58% de las células T en los folículos reactivos. Esto, junto a la disposición periférica de las células OKT4+, observada en algunos linfomas foliculares, sugiere que éstas podrían actuar facilitando el proceso neoplásico. La posibilidad de que las células T repre-

senten elementos residuales benignos también ha sido indicada por Knowles y cols (68).

Las diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de células T, OKT11, OKT4 y OKT8 +, en las áreas interfoliculares, no es más que el reflejo de la presencia de numerosas células B neoplásicas que han invadido estas áreas.

Inmunológicamente, los linfomas T pueden ser distinguidos de los linfomas B, mediante los anticuerpos monoclonales OKT11 y OKT4. En los linfomas T, el porcentaje de células OKT11 y OKT4 + es muy superior al observado en los linfomas B. La presencia de células OKT8 + en los linfomas T, también podrían indicar la existencia de un mecanismo de defensa del huésped contra la neoplasia.

En los linfomas difusos B y en un mieloma, el porcentaje de células T es variable, en ocasiones importante y en general, la ratio OKT4/OKT8 demuestra un mayor número de células con fenotipo inductor/colaborador. Sólo en un paciente con linfoma de Burkitt y un síndrome de inmunodeficiencia adquirida, hemos constatado una inversión de este cociente, a favor de las células OKT8 +, probablemente en relación con su situación de inmunodeficiencia.

El procedimiento de inmunoperoxidasa, sistema avidina-biotina, es un método útil y válido, con mejores

resultados en congelación que en parafina, para determinar el fenotipo inmunológico de los linfomas no hodgkinianos. De esta forma, en el 82% hemos demostrado un fenotipo B y en el 10% un fenotipo T, mientras que el 8% corresponde a linfomas sin fenotipo inmunológico. Resultados similares han obtenido Lukes y cols (83) y Lennert y cols (77), con la diferencia de que un 13 y un 6% de sus linfomas son no-B, no-T, respectivamente.

En el 8% de los linfomas no hodgkinianos, no hemos podido determinar el fenotipo inmunológico, debido a que han sido estudiados exclusivamente en tejido incluido en parafina y no en congelación. No obstante, 5 linfomas foliculares pueden considerarse linfomas B y 3 linfomas difusos de célula grande pueden ser B, T o no-B, no-T.

Los linfomas T se distribuyen en la clasificación de la Formulación Internacional de Trabajo (94) en los grupos, linfoma linfocítico pequeño, linfoma difuso mixto, linfoma de célula grande inmunoblástico, linfoma linfoblástico y probablemente en el de linfoma difuso de célula grande. Las micosis fungoides se sitúan en el grupo de miscelánea y los demás grupos de linfomas no hodgkinianos están constituidos por linfomas B.

Recientemente, Lauder y cols (75) intentando

relacionar la expresión de cadenas ligeras de inmunoglobulina y la respuesta al tratamiento en un grupo de pacientes con linfomas B, han demostrado que aquéllos que expresan cadenas ligeras lambda responden peor al tratamiento que los que expresan cadenas ligeras kappa.

Nosotros demostramos un claro predominio de cadenas ligeras lambda en los linfomas de alto grado de malignidad, lo cual creemos está en relación con la mayor agresividad de este grupo de linfomas. Falta establecer la evolución de los linfomas de bajo e intermedio grado de malignidad con expresión de cadenas ligeras lambda, pero en cualquier caso, parece probable que la expresión de cadenas ligeras de inmunoglobulina por las células linfomatosas, puede ser utilizada como un indicador pronóstico.

VI.- CONCLUSIONES.



1ª.- Los linfomas linfocíticos pequeños constituyen el grupo más frecuente de linfomas no hodgkinianos, debido fundamentalmente a la inclusión en él de las LLC. La mayoría de los linfomas 1º gastrointestinales, que representan el 11,3% de todos los linfomas, son difusos, principalmente de célula grande y de localización gástrica. Los mielomas múltiples suponen el 55% de las neoplasias de células plasmáticas.

2ª.- Mientras que los linfomas inmunoblásticos se presentan en pacientes de edad avanzada, los linfomas linfoblástico y de célula pequeña no hendida, son propios de la infancia y adolescencia. No existen diferencias significativas entre las edades medias de los pacientes con mielomas, múltiple y solitario. En los grupos de linfomas inmunoblástico y de célula pequeña no hendida hay un claro predominio de los hombres sobre las mujeres.

3ª.- En los pacientes con LLC, la clasificación de la "International Workshop", pone de manifiesto una evidente relación entre los patrones histológicos de invasión medular y los estadios clínicos. Por otro lado, el 62,5% de los pacientes con linfomas de bajo grado, excluida la LLC, se encuentran en estadio IV de la clasificación de Ann Arbor y el 95% tienen invasión de la médula ósea. Ésta ocurre en el 70 y 50% de los pacientes en estadio IV con linfomas

de grado intermedio y gastrointestinales, respectivamente. En la categoría de alto grado de malignidad, la invasión de la médula ósea es más frecuente en los linfomas, linfoblástico y de célula pequeña no hendida, que en los linfomas inmunoblásticos.

4ª.- Los linfomas difusos mixtos de célula pequeña y grande representan, desde el punto de vista citohistológico, un grupo muy heterogéneo. En él se incluyen: los L. Linfoplasmocitoides polimorfos, formados por células grandes y pequeñas, algunas con diferenciación plasmocitoide y con frecuentes inclusiones intranucleares y citoplásmicas de Ig, un patrón pseudofolicular e histiocitos epitelioides, planteándose el diagnóstico diferencial con la enfermedad de Hodgkin de predominio linfocítico y linfomas foliculares; aquéllos linfomas constituidos por células pequeñas hendidas y grandes, que son la contraparte difusa de los linfomas foliculares mixtos y por último, los linfomas T-periféricos caracterizados por una celularidad mixta y polimorfa, con células de contornos nucleares irregulares junto a plasmocitos y eosinófilos, intensa vascularización y fibrosis reticulínica.

5ª.- La citoquímica y ultraestructura son métodos que contribuyen al reconocimiento y clasificación de los LNH. Con los marcadores enzimáticos lisosomiales, fosfatasas y estererasas ácidas, se descubren la mayoría

de linfomas T, si bien ANAE identifica los linfomas T maduros y está ausente en los linfomas T inmaduros. Ultraestructuralmente, la presencia de núcleos con hendiduras junto a células reticulares dendríticas, sugiere un linfoma B de origen folicular, mientras que la presencia de contornos nucleares irregulares es una evidencia de origen T. La existencia de cisternas dilatadas de RER con Ig en el citoplasma, diferenciación plasmocitoide e inclusiones intranucleares y citoplásmicas de Ig son características de los linfomas B secretores de Ig.

6ª.- El procedimiento de inmunoperoxidasa, sistema avidina-biotina, es útil y válido, con mejores resultados en congelación que en parafina, para identificar C y SIg así como antígenos de diferenciación linfocitarios. Además, permite establecer, en la mayoría de los casos, la monoclonalidad de los linfomas B y mielomas. En nuestro estudio, el 82% de los linfomas tienen fenotipo B y el 10% fenotipo T.

7ª.- En el tejido linfoide ganglionar y esplénico con hiperplasia folicular, los complejos foliculares muestran tinción de superficie con kappa, lambda, IgM, IgG e IgA y reactividad con los anticuerpos contra células B, OKB2, OKB7 y OKIa1. Los linfocitos del manto folicular expresan SIgD y los centros germinales son reactivos con CALLA y OKT9. Con los anticuerpos

contra células T, OKT11, OKT4 y OKT8 se identifican las zonas paracorticales, con OKT6 las células reticulares interdigitantes y con OKM1 y OKM5 las células reticulares dendríticas y del sistema histiocito-macrófago. En el tejido linfóide tímico, los timocitos subcapsulares presentan tinción con OKT9, los timocitos corticales con OKT6, OKT10 y CALLA, los timocitos medulares con el anticuerpo contra células T y los timocitos cortico-medulares con OKT11, OKT4 y OKT8.

8ª.- Casi todos los linfomas plasmocitoides, linfoplasmocitoides polimorfos e inmunoblásticos plasmocitoides tienen de forma constante CIgM, por lo que siguen la vía de diferenciación de la respuesta inmune 1ª. Por el contrario, los mielomas tienen CIgG o CIgA y siguen la vía de diferenciación de la respuesta inmune 2ª. Los demás linfomas B muestran SIg de diferente cadena pesada. Las LLC SIgM+D; los L. foliculares, difusos mixtos de célula pequeña hendida y grande, de célula pequeña no hendida y de célula grande SIgM o SIgG, estos últimos con frecuente expresión de doble cadena pesada de Ig; los L. difusos de célula pequeña hendida y leucemia prolinfocítica SIgM y las tricoleucemias SIgG. Los linfomas T carecen de C y SIg.

9ª.- Los anticuerpos monoclonales permiten identificar los linfomas B y T, pero en ningún caso distinguir

entre distintos grupos de linfomas B. La mayoría de éstos son reactivos con los anticuerpos contra células B, OKB2, OKB7 y OKIa1. Algunas LLC y prolinfocíticas expresan el anticuerpo Leu-1. CALLA está presente en los L. foliculares, difusos de célula grande y de célula pequeña no hendida y ausente en los L. difusos de célula pequeña hendida e inmunoblásticos. OKT9 está presente en los linfomas de alto grado de malignidad. Los L. T maduros, micosis fungoides y linfomas T-periféricos muestran reactividad con los anticuerpos contra células T, OKT11 y OKT4. Aunque es necesario estudiar un mayor número de casos, los linfomas T inmaduros como los L. linfoblásticos, expresan los anticuerpos OKT11 y OKT6, al igual que los timocitos corticales.

10ª.- El patrón de tinción policlonal con cadenas ligeras de los linfocitos del manto folicular, presentes en algunos linfomas foliculares, indica su naturaleza reactiva y no neoplásica, correspondiendo a zonas marginales residuales de los folículos linfoides. La policlonalidad de las células plasmáticas, a veces numerosas, en algunos linfomas B y T puede contribuir a establecer el diagnóstico correcto. El único criterio inmunológico capaz de distinguir entre linfoma e hiperplasia folicular es el patrón de tinción con cadenas ligeras, monoclonal en los linfomas y policlonal

en las hiperplasias.

11ª.- El aumento significativo de células OKT8+ en los folículos de los linfomas foliculares parece indicar la existencia de una respuesta inmunológica contra la neoplasia. En las áreas interfoliculares de los linfomas foliculares la reducción significativa de células T, es debida a la presencia en ellas de células B neoplásicas. Por otra parte, en la mayoría de los linfomas B hay un predominio de linfocitos T con fenotipo inductor/colaborador.

12ª.- Existe una relación entre la expresión monoclonal de cadenas ligeras por los linfomas y su clasificación en las 3 categorías de malignidad. Mientras que los linfomas de alto grado expresan con mayor frecuencia cadenas ligeras lambda, los linfomas de bajo e intermedio grado de malignidad expresan preferentemente cadenas ligeras kappa. Esto parece estar en relación con la mayor agresividad de los linfomas de alto grado de malignidad.

VII.- BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Aisenberg,A.C. and Long,J.C.:Lymphocyte surface characteristics in malignant lymphoma.Am.J.Med.,58:300-306,1975.
- 2.- Banks,P.M.:Diagnostic applications of an immunoperoxidase method in haematopathology.J.Histochem.Cytochem.,27:1192-1194,1979.
- 3.- Bataille,R. and Sany,J.:Solitary myeloma:clinical and prognostic features of a review of 114 cases. Cancer.,48:845-851,1981.
- 4.- Bennett,J.M.;Catovsky,D.;Daniel,M.T.;Flandrin,G.;Galton,D.A.;Gralnick,H.R. and Sultan,C.:Proposals for the classification of the acute leukaemias.Br.J. Haematol.,33:451-458,1976.
- 5.- Bennet,M.H.;Farrer-Brown,G.;Henry,K. and Jelliffe,A.M.:Classification of non-hodgkin's lymphomas.Lancet., 2:405-406,1974.
- 6.- Bernard,A.;Boumsell,L.;Reinherz,E.L.;Nadler,L.M.;Ritz,J.;Coppin,H.;Richard,Y.;Valensi,F.;Dausset,J.;Flandrin,G.;Lemerle,J. and Schlossman,S.F.:Cell surface characterization of malignant T cells from patients with acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma.Blood.,57:1105-1110,1981.
- 7.- Bhan,A.K.;Nadler,L.M.;Stashenko,P.;McCluskey,R.T. and Schlossman,S.F.:Stages of B cell differentiation in human lymphoid tissue.J.Exp.Med.,154:737-749,1981.
- 8.- Billing,R.J.;Safani,M. and Peterson,P.:Isolation



and characterization of human B cell alloantigens. *J. Immunol.*, 117:1589-1593, 1976.

9.- Billing, R.; Rafizadeh, B.; Brew, I.; Hartman, G.; Gale, R. and Terasaki, P.: Human B-lymphocyte antigens expressed by lymphocytic and myelocytic leukemia cells. I. Detection by rabbit antisera. *J. Exp. Med.*, 144:167-178, 1976.

10.- Binet, J.L.; Leporrier, M.; Dighiero, G.; Charron, D.; D'athis, P.H.; Vaugier, G.; Merle Beral, H.; Natali, J.C.; Raphael, M.; Nizet, B. and Follezou, J.Y.: A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.*, 40:855-864, 1977.

11.- Binet, J.L.; Catovsky, D.; Chandra, P.; Dighiero, P.; Montserrat, E.; Rai, K.R. and Sawitsky, A.: Chronic lymphocytic leukaemia: proposals for a revised prognostic staging system. *Br. J. Haematol.*, 48:365-367, 1981.

12.- Borowitz, M.J.; Croker, B.P. and Burchette, J.: Immunocytochemical detection of lymphocyte surface antigens in fixed tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 30:171-174, 1982.

13.- Brain, P.; Gordon, J. and Willets, W.A.: Rosette formation by peripheral lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 6:681-688, 1970.

14.- Brisbane, J.V.; Berman, L.D. and Neiman, R.S.: Peripheral T-cell lymphoma: a clinicopathologic study of nine cases. *Am. J. Clin. Pathol.*, 79:285-293, 1983.

15.- Brouet, J.C.; Flandrin, G.; Sasportes, M.; Preud-

- homme, J.L. and Seligman, M.: Chronic lymphocytic leukaemia of T-cell origin. Immunologic and clinical evaluation in eleven patients. *Lancet.*, 2:890-893, 1975.
- 16.- Carbone, A.; Manconi, R.; Poletti, A.; Volpe, R. and Santi, L.: S-100 protein immunostaining in cells of dendritic morphology within reactive germinal centers by ABC immunoperoxidase method. *Virchows Arch (Pathol Anat).*, 406:27-32, 1985.
- 17.- Carbone, A.; Santoro, A.; Pilotti, S. and Rilke, F.: Bone marrow patterns and clinical staging in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.*, 1:606, 1978.
- 18.- Carbone, P.P.; Kaplan, H.S.; Musshoff, K.; Smithers, D.W. and Tubiana, M.: Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res.*, 31:1860-1861, 1971.
- 19.- Catovsky, D.; Pettit, J.E.; Galetto, J.; Okos, A. and Galton, D.A.G.: The B-lymphocyte nature of the hairy cell of leukaemic reticuloendotheliosis. *Br. J. Haematol.*, 26:29-37, 1974.
- 20.- Cerezo, L.: B-cell multilobated lymphoma. *Cancer.*, 52:2277-2280, 1983.
- 21.- Cleary, B.; Binder, R.A.; Kales, A.N. and Veltri, J.V.: Simultaneous presentation of acute myelomonocytic leukemia and multiple myeloma. *Cancer.*, 41:1381-1386, 1978.
- 22.- Cline, M.J. and Billing, R.: Antigens expressed

by lymphocytes and myeloid stem cells. *J. Exp. Med.*, 146: 1143-1145, 1977.

23.- Collins, R.D.; Waldrom, J.A. and Glick, A.D.: Results of multiparameter studies of T-cell lymphoid neoplasms. *Am. J. Clin. Pathol.*, 72: 699-707, 1979.

24.- Cossman, J.; Neckers, L.M.; Hsu, S.M.; Longo, D. and Jaffe, E.S.: Low-grade lymphomas. Expression of developmentally regulated B-cell antigens. *Am. J. Pathol.*, 115: 117-124, 1984.

25.- Cossman, J.; Jaffe, E.S. and Fisher, R.I.: Diversity of immunologic phenotypes of T-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.*, 6: 72, 1982.

26.- Dorfman, R.F.: The non-hodgkin's lymphomas. In: The reticulo-endothelial system. International Academy of Pathology monograph 16, 262-281. Baltimore, Williams and Wilkins, 1975.

27.- Durie, B.G.M. and Salmon, S.E.: A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer.*, 36: 842-854, 1975.

28.- Dvoretzky, P.; Wood, G.S.; Levy, R. and Warnke, R.A.: T-lymphocyte subsets in follicular lymphomas compared with those in non neoplastic lymph nodes and tonsils. *Hum. Pathol.*, 13: 618-625, 1982.

29.- Eisenbarth, G.S.; Haynes, B.F.; Schroer, J.A. and Fauci, A.S.: Production of monoclonal antibodies reacting with peripheral blood mononuclear cell surface differentiation antigens. *J. Immunol.*, 124: 1237-1244, 1980.

- 30.- Evans, R.I.; Faldetta, T.J.; Humphreys, R.E.; Pratt, D.M.; Yunis, E.J. and Schlossman, S.F.: Peripheral human T cells sensitized in mixed leukocyte culture synthesize and express Ia-like antigens. *J. Exp. Med.*, 148:1440-1445, 1978.
- 31.- Foon, K.A.; Schroff, R.W. and Gale, R.P.: Surface markers on leukemia and lymphoma cells: recent advances. *Blood.*, 60:1-19, 1982.
- 32.- Foon, K.A.; Billing, R.J. and Terasaki, P.I.: Dual B and T markers in acute and chronic lymphocytic leukemia. *Blood.*, 55:16-20, 1980.
- 33.- Frizzera, G. and Murphy, S.B.: Follicular (nodular) lymphoma in childhood, a rare clinical-pathological entity: report of eight cases from four cancer centers. *Cancer.*, 44:2218-2235, 1979.
- 34.- Frizzera, G.; Anaya, J.S. and Banks, P.M.: Neoplastic plasma cells in follicular lymphomas. Clinical and pathologic findings in six cases. *Virchows Arch (Pathol Anat)*., 409:149-162, 1986.
- 35.- Fu, S.M.; Chiorazzi, N.; Wang, C.Y.; Montazeri, G.; Kunkel, H.G.; Ko, H.S. and Gottlieb, A.B.: Ia-bearing T lymphocytes in man. Their identification and role in the generation of allogenic helper activity. *J. Exp. Med.*, 148:1423-1428, 1978.
- 36.- Gall, E.A. and Mallory, T.B.: Malignant lymphoma. A clinicopathological survey of 618 cases. *Am. J. Pathol.*,

18:381-429,1942.

37.- Galton,D.A.G.;Catovsky,D. and Wiltshaw,E.:Clinical spectrum of lymphoproliferative diseases.Cancer.,42: 901-910,1978.

38.- Garvin,A.J.;Spicer,S.S. and McKeever,P.E.:The cytochemical demonstration of intracellular immunoglobulin.Am.J.Pathol.,82:457,1976.

39.- Gathings,W.E.;Lawton,A.R. and Cooper,M.D.:Immunofluorescent studies of the development of pre-B cells,B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans.Eur.J.Immunol.,7:804-810,1977.

40.- Golde,D.W.;Stevens,R.H.;Quan,S.G. and Saxon,A.: Immunoglobulin synthesis in hairy-cell leukemia.Br.J. Haematol.,35:359-365,1977.

41.- Good,R.A. and Finstad,J.:The association of lymphoid malignancy and immunologic functions,in Zarafonetic (ed):Proceedings of the international conference on leukemia-lymphoma.Philadelphia,Lea and Febiger,175-197,1968.

42.- Grossi,C.E.;Webb,S.R.;Zicca,A.;Lydyard,P.M.;Moretta,L.;Mingari,M.C. and Cooper,M.D.:Morphological and histochemical analyses of two human T-cell subpopulations bearing receptors for IgM and IgG.J.Exp.Med., 147:1405-1407,1978.

43.- Habeshaw,J.A.;Bailey,D.;Standfeld,A.G. and Greaves,M.F.:The cellular content of non hodgkin

lymphomas:a comprehensive analysis using monoclonal antibodies and other surface marker techniques.Br.J. Cancer.,47:327-351,1983.

44.- Hansen,J.A. and Good,R.A.:Malignant disease of the lymphoid system in immunological perspective. Hum.Pathol.,5:567-599,1974.

45.- Harris,N.L. and Bhan,A.K.:Distribution of T-cell subsets in follicular and diffuse lymphomas of B-cell type.Am.J.Pathol.,113:172-180,1983.

46.- Harris,N.L.;Nadler,L.M. and Bhan,A.K.:Immunohistologic characterization of two malignant lymphomas of germinal center type (centroblastic/centrocytic and centrocytic) with monoclonal antibodies.Follicular and diffuse lymphomas of small-cleaved-cell type are related but distinct entities.Am.J.Pathol.,117:262-272,1984.

47.- Harris,N.L. and Data,R.E.:The distribution of neoplastic and normal B-lymphoid cells in nodular lymphomas.Hum.Pathol.,13:610-617,1982.

48.- Harris,N.L. and Bhan,A.K.:B-cell neoplasms of the lymphocytic,lymphoplasmacytoid and plasma cell types:immunohistologic analysis and clinical correlation.Hum.Pathol.,16:829-837,1985.

49.- Harris,N.L.;Poppema,S. and Data,R.E.:Demonstration of immunoglobulin in malignant lymphomas:use of an immunoperoxidase technique on frozen sections.Am.J.

Clin.Pathol.,78:14-21,1982.

50.- Hautzer,N.W.;Wittkuhn,J.F. and McCaughey,W.T.E.:  
Trypsin digestion in immunoperoxidase staining.J.Histo-  
chem.Cytochem.,28:52-53,1980.

51.- Haynes,B.F.;Metzgar,R.S.;Minna,J.D. and Bunn,P.A.:  
Phenotypic characterization of cutaneous T-cell  
lymphoma.Use of monoclonal antibodies to compare  
with other malignant T cells.N.Engl.J.Med.,304:1319-  
1323,1981.

52.- Hernandez Nieto,L.;Montserrat Costa,E.;Muncunill,  
J. and Rozman,C.:Bone marrow patterns and clinical  
staging in chronic lymphocytic leukaemia.Lancet.,1:  
1269,1977.

53.- Hernandez Nieto,L.;Montserrat Costa,E.;Muncunill,  
J.;Brugues,R.;Grañena,A.;Nomdedeu,B.;Feliu,E. and  
Rozman,C.:Leucemia linfática crónica.Tipos de patrón  
histopatológico medular y su relación con los estadios  
clínicos.Sangre.,22:882-887,1977.

54.- Heyderman,E.:Immunoperoxidase techniques in  
histopathology:applications,methods and controls.J.  
Clin.Pathol.,32:971-978,1979.

55.- Hodgkin,T.:On some morbid appearances of the  
absorbent glands and spleen.Trans.R.Med.Chirurgical  
Soc.Glasgow.,XVII:68-114,1832.

56.- Hsu,S.M. and Jaffe,E.S.:Phenotypic expression  
of T lymphocytes in thymus and peripheral lymphoid

tissues. *Am. J. Pathol.*, 121:69-78, 1985.

57.- Hsu, S.M.; Raine, L. and Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29:577-580, 1981.

58.- Humphreys, R.E.; McCune, J.M.; Chess, L.; Herrman, H.C.; Malenka, D.J.; Mann, D.L.; Parham, P.; Schlossman, S.F. and Strominger, J.L.: Isolation and immunologic characterization of a human, B-lymphocyte specific cell surface antigen. *J. Exp. Med.*, 144:98-112, 1976.

59.- Isaacson, P.; Wright, D.H.; Judd, M.A. and Mepham, B.L.: Primary gastrointestinal lymphomas: a classification of 66 cases. *Cancer.*, 43:1805-1819, 1979.

60.- Jaffe, E.S.; Shevach, E.M.; Frank, M.M.; Berard, C.W. and Green, I.: Nodular lymphoma. Evidence for origin from follicular B lymphocytes. *N. Engl. J. Med.*, 290:813-819, 1974.

61.- Jaffe, E.S.; Shevach, E.M.; Sussman, E.H.; Frank, M.M.; Green, I. and Berard, C.W.: Membrane receptor sites for the identification of lympho-reticular cells in benign and malignant situations. *Br. J. Cancer.*, 31:107-120, 1975.

62.- Jaffe, E.S.; Strauchen, J.A. and Berard, C.W.: Predictability of immunologic phenotype by morphologic criteria in diffuse aggressive non-hodgkin's lymphomas.



Am.J.Clin.Pathol.,77:46-49,1982.

63.- Jancelewicz,Z.;Takatsuki,K.;Sugai,S. and Pruzanski,W.:IgD multiple myeloma.Review of 133 cases.Arch.Intern.Med.,135:87-93,1975.

64.- Johansson,B.;Klein,E. and Haglund,S.:Correlation between the presence of surface localized immunoglobulin (Ig) and the histological type of human malignant lymphomas.Clin.Immunopathol.,5:119-132,1976.

65.- Jones,E.L.:Antibody probes in diagnosis and classification of lymphomas.J.Pathol.,141:259-286,1983.

66.- Knowles,D.M.;Tolidjian,B.;Marboe,C.;Mittler,R.S.;Talle,A. and Goldstein,G.:Distribution of antigens defined by OKB monoclonal antibodies on benign and malignant lymphoid cells and on nonlymphoid tissues.Blood.,63:886-896,1984.

67.- Knowles,D.M.;Halper,J.P.;Azzo,W. and Wang,C.Y.: Reactivity of monoclonal antibodies Leu-1 and OKT1 with malignant human lymphoid cells.Correlation with conventional cell markers.Cancer.,52:1369-1377, 1983.

68.- Knowles,D.M.;Halper,J.P. and Jakobiec,F.A.:T-lymphocyte subpopulations in B-cell-derived non-hodgkin's lymphomas and hodgkin's disease.Cancer.,54: 644-651,1984.

69.- Köhler,G. and Milstein,C.:Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined

specificity. *Nature.*, 256:495-497, 1975.

70.- Koziner, B.; Kempin, S.; Posse, S.; Gee, T.; Good, R.A. and Clarkson, B.D.: Characterization of B-cell leukemias: a tentative immunomorphological scheme. *Blood.*, 56:815-823, 1980.

71.- Kulenkampff, J.; Janossy, G. and Greaves, M.F.: Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: a marker for T lymphocytes. *Br. J. Haematol.*, 36:231-240, 1977

72.- Kung, P.C.; Berger, C.L.; Goldstein, G.; Logerto, P. and Edelson, R.L.: Cutaneous T cell lymphoma: characterization by monoclonal antibodies. *Blood.*, 57:261-266, 1981.

73.- Kurtin, P.J. and Pinkus, G.S.: Leukocyte common antigen-A diagnostic discriminant between hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms in paraffin sections using monoclonal antibodies: correlation with immunologic studies and ultrastructural localization. *Hum. Pathol.*, 16:353-365, 1985.

74.- Lauder, I.; Holland, D.; Mason, D.Y.; Gowland, G. and Cunliffe, W.J.: Identification of large cell undifferentiated tumours in lymph nodes using leucocyte common and keratin antibodies. *Histopathology.*, 8:259-272, 1984.

75.- Lauder, I.; Bird, C.C.; Child, J.A. and Grigor, I.: Surface membrane phenotypic expression and treatment response of malignant lymphomas. *J. Pathol.*, 145:259-268, 1985.

- 76.- Lay, W.H.; Mendes, N.F.; Bianco, C. and Nussenzweig, V.: Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes. *Nature.*, 230:531-532, 1971.
- 77.- Lennert, K.: Datos estadísticos de la clasificación de Kiel. En: *Linfomas no hodgkin: clasificación de Kiel. Procesos tumorales malignos de los ganglios linfáticos, excluida la enfermedad de Hodgkin.* Edit., Espaxs, S.A. 1984.
- 78.- Lennert, K. and Mohri, N.: *Histopathology and diagnosis of nonhodgkin's lymphomas. In malignant lymphomas other than hodgkin's disease.* New York, Springer-Verlag. 1978.
- 79.- Lennert, K.; Mohri, N.; Stein, H. and Kaiserling, E.: The histopathology of malignant lymphoma. *Br. J. Haematol.*, 31: 193-203, 1975.
- 80.- Lennert, K.; Stein, H. and Kaiserling, E.: Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br. J. Cancer.*, 31:29-43, 1975.
- 81.- Levy, R.; Wanrke, R.; Dorfman, R. and Haimovich, J.: The monoclonality of human B-cell lymphomas. *J. Exp. Med.*, 145: 1014-1028, 1977.
- 82.- Li, C.; Yam, L.T. and Lam, K.W.: Studies of acid phosphatase isoenzymes in human leukocytes. Demonstration of isoenzyme cell specificity. *J. Histochem. Cytochem.*, 18:901-910, 1970.
- 83.- Lukes, R.J.; Parker, J.W.; Taylor, C.R.; Tindle, T.H.;

Cramer,A.D. and Lincoln,T.L.:Immunologic approach to non-hodgkin lymphomas and related leukemias.Analysis of the results of multiparameter studies of 425 cases.Seminars in hematology,15:322-351,1978.

84.- Lukes,R.J. and Collins,R.D.:New approaches to the classification of the lymphomata.Br.J.Cancer., 31:1-28,1975.

85.- Lukes,R.J. and Collins,R.D.:Immunologic characterization of human malignant lymphomas.Cancer.,34:1488-1503,1974.

86.- Mason,D.Y. and Biberfeld,P.:Technical aspects of lymphoma immunohistology.J.Histochem.Cytochem.,28: 731-745,1980.

87.- Mathe,G.;Rappaport,H.;O'conor,G.T. and Torloni,H.: Histological and cytological typing of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissues.In: WHO international histological classification of tumors.Nº 14.Geneva,World Health Organization.1976.

88.- Meyer,J.E. and Schulz,M.D.:"Solitary" myeloma of bone:a review of twelve cases.Cancer.,34:438-440,1974.

89.- Miller,M.L.;Tubbs,R.R.;Fishleder,A.J.;Savage,R.A.; Sebek,B.A. and Weick,J.K.:Immunoregulatory Leu-7+ and T8+ lymphocytes in B-cell follicular lymphomas.Hum. Pathol.,15:810-817,1984.

90.- Moretta,L.;Mingari,M.C.;Moretta,A. and Fauci,A.S.:

Human lymphocyte surface markers. *Seminars in hematology*, 19:273-283, 1982.

91.- Morgan, D.R.; Holgate, C.S.; Dixon, M.F. and Bird, C.C.: Primary small intestinal lymphoma: a study of 39 cases. *J. Pathol.*, 147:211-221, 1985.

92.- Nathwani, B.N.: A critical analysis of the classifications of non-hodgkin's lymphomas. *Cancer*, 44:347-384, 1979.

93.- Nathwani, B.N.; Kim, H. and Rappaport, H.: Malignant lymphoma lymphoblastic. *Cancer*, 38:964-983, 1976.

94.- National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. The non-hodgkin's lymphoma pathologic classification project. *Cancer*, 49:2112-2135, 1982.

95.- Neiman, R.S.: The peripheral T-cell lymphomas come of age. *Mayo Clin. Proc.*, 61:504-505, 1986.

96.- Pallesen, G.; Madsen, M. and Schifter, S.: Immune marker expression in 53 lymphomas of high-grade malignancy. *Histopathology*, 7:841-857, 1983.

97.- Pangalis, G.A.; Nathwani, B.N. and Rappaport, H.: Detection of cytoplasmic immunoglobulin in well-differentiated lymphoproliferative diseases by the immunoperoxidase method. *Cancer*, 45:1334-1339, 1980.

98.- Parfrey, N.A.; Mann, R.S.; Selonick, S.E. and Beschorner, W.E.: Malignant large cell lymphoma of B-cell

- type with multilobated nuclei. Report of a case and review of the literature. *Cancer.*, 55:1913-1917, 1985.
- 99.- Pinkus, G.S.; Said, J.W. and Hargreaves, H.: Malignant lymphoma, T-cell type. A distinct morphologic variant with large multilobated nuclei, with a report of four cases. *Am. J. Clin. Pathol.*, 72:540-550, 1979.
- 100.- Pizzolo, G.; Sloane, J.; Beverley, P.; Thomas, J.A.; Brads, K.F.; Mattingly, S. and Janossy, G.: Differential diagnosis of malignant lymphoma and non-lymphoid tumors using monoclonal anti-leucocyte antibody. *Cancer.* 46:2640-2647, 1980.
- 101.- Poppema, S.; Bhan, A.K.; Reinherz, E.L.; McCluskey, R.T. and Schlossman, S.F.: Distribution of T cell subsets in human lymph nodes. *J. Exp. Med.*, 153:30-41, 1981.
- 102.- Quesada, V.; Isidoro, A. y López, L.A.: Curso y ejercicios de estadística. Edir, Alhambra. Universidad de Madrid. 1982.
- 103.- Rai, K.R.; Sawitsky, A.; Cronkite, E.P.; Chanana, A.D.; Levy, R.N. and Pasternack, B.S.: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.*, 46:219-234, 1975.
- 104.- Rappaport, H.: Tumors of the hematopoietic system. In atlas of tumor pathology, sect III, fasc 8. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D.C. 1966.
- 105.- Rausche, E.; Kaiserling, E. and Goos, M.: Langerhans cells and interdigitating reticulum cells in the thymus dependent region in human dermatopathic lympho-

- denitis. Virchows Arch. B. Cell path., 25:327-343, 1977.
- 106.- Royston, I.; Majda, J.A.; Baird, S.M.; Meserve, B.L. and Griffiths, J.C.: Human T cell antigens defined by monoclonal antibodies: the 65000-dalton antigen of T cells (T65) is also found on chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulin. J. Immunol., 125:725-731, 1980.
- 107.- Reinherz, E.L.; Kung, P.C.; Goldstein, G.; Levey, R.H. and Schlossman, S.F.: Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemia lymphoblasts of T cell lineage. Proc. Natl. Acad. Sci., 77:1588-1592, 1980.
- 108.- Ribas-Mundó, M.: Linfomas: linfogranuloma de Hodgkin y linfomas no hodgkinianos. En, conducta diagnóstica y terapéutica en medicina interna. Sandoz, S.A.E. Barcelona. 139-165, 1985.
- 109.- Risdall, R.; Hoppe, R.T. and Warnke, R.: Non-hodgkin's lymphomas. A study of the evolution of the disease based upon 92 autopsied cases. Cancer., 44:529-542, 1979.
- 110.- Rotz, J.; Nadler, L.M.; Bhan, A.K.; Notis-McConarty, J.; Pesando, J. and Schlossman, S.F.: Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) by lymphomas of B-cell and T-cell lineage. Blood., 58:648-652, 1981.
- 111.- Rivas, C.; Piris, M.A. and Oliva, H.: Aportación de los anticuerpos monoclonales al estudio de los

- linfomas B. Bol. Fund. Jimenez Diaz., 10:269-276, 1983.
- 112.- Rivas, C.; Piris, M.A. and Oliva, H.: Inmunomorfología de los órganos linfoides. Estudio con anticuerpos monoclonales. Bol. Fund. Jimenez Diaz., 10:247-254, 1983.
- 113.- Rocklin, R.E.; McDermott, R.P.; Chess, L.; Schlossman, S.F. and David, J.R.: Studies on mediator production by highly purified human T and B-lymphocytes. J. Exp. Med. 140:1303-1316, 1974.
- 114.- Rosenberg, S.A.: Validity of the Ann Arbor staging classification for the non-hodgkin lymphomas. Cancer. Treat. Rep., 61:1023-1027, 1977.
- 115.- Ross, G.C. and Polley, M.J.: Specificity of human lymphocyte complement receptors. J. Exp. Med., 141:1163-1180, 1975.
- 116.- Roulet, F.: Das primäre retothel sarkom der lymphknoten. Virchows Arch. (Pathol. Anat.), 277:15-47, 1930.
- 117.- Rozman, C.; Montserrat, E.; Morey, M.; Aranalde, J.M.; Feliu, E.; Grañena, A.; Hernandez Nieto, L. y Nomdedeu, B.: Sobrevivencia de la leucemia linfoide crónica en relación con los estadios clínicos. Análisis estadístico de 95 casos. Med. Clin., 72:265-270, 1979.
- 118.- Said, J.W.; Hargreaves, H.K. and Pinkus, G.S.: Non-hodgkin's lymphomas: an ultrastructural study correlating morphology with immunologic cell type. Cancer., 44:504-528, 1979.



- 119.- Sanchez Fayos, J. and Calabuig, T.M.: Linfomas malignos-leucemias linfoides. Un intento de interpretación biológica unitaria. Bol. Fund. Jimenez Diaz., 9:69-84, 1982.
- 120.- Saxon, A.; Stevens, R.H. and Golde, D.W.: Helper and suppressor T-lymphocyte leukemia in ataxia telangiectasia. N. Engl. J. Med., 300:700-704, 1979.
- 121.- Schneider, D.R.; Taylor, C.R.; Parker, J.W.; Cramer, A. C.; Meyer, P.R. and Lukes, R.J.: Immunoblastic sarcoma of T- and B-cell types: morphologic description and comparison. Hum. Pathol., 16:885-900, 1985.
- 122.- Schroff, R.W.; Foon, K.A.; Billing, R.J. and Fahey, J. L.: Immunologic classification of lymphocytic leukemia based on monoclonal antibody-defined cell surface antigens. Blood., 59:207-215, 1982.
- 123.- Siegal, F.P.; Filippa, D.A. and Koziner, B.: Surface markers in leukemias and lymphomas. Am. J. Pathol., 90:451-460, 1978.
- 124.- Slater, D.N.; Rooney, N.; Bleehen, S. and Hamed, A.: The lymph node in mycosis fungoides: a light and electron microscopy and immunohistological study supporting the Langerhans cell-retrovirus hypothesis. Histopathology., 9:587-621, 1984.
- 125.- Slease, R.B.; Wistar, R. and Scher, I.: Surface immunoglobulin density on human peripheral blood mononuclear cells. Blood., 54:72-86, 1979.

- 126.- Smith,R.W.;Terry,W.D.;Buell,D.N. and Sell,K.W.:An antigenic marker for human thymic lymphocytes.J.Immunol.,110:884-887,1973.
- 127.- Stein,H.;Lennert,K. and Parwaresch,M.R.:Malignant lymphomas. of B-cell type.Lancet.,2:855-857,1972.
- 128.- Stein,H.;Bonk,A.;Tolksdorf,G.;Lennert,K.;Rodd,H. and Gerdes,J.:Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and non-hodgkin's lymphomas.J.Histochem.Cytochem.,28:746-760,1980.
- 129.- Sternberger,L.A.:The unlabelled antibody (PAP) method.J.Histochem.Cytochem.,27:1657,1979.
- 130.- Stevenson,G.T.;Smith,J.L. and Hamblin,T.J.:Tests on cells in suspension.In:Immunological investigation of lymphoid neoplasms.Churchill Livingstone.Edinburgh.London.Melbourne and New York.,22-55,1983.
- 131.- Swerdlow,S.H.;Habeshaw,J.A.;Murray,L.J.;Dhaliwal,H.S.;Lister,T.A. and Stansfield,A.G.:Centrocytic lymphoma:a distinct clinicopathologic and immunologic entity.A multiparameter study of 18 cases at diagnosis and relapse.Am.J.Pathol.,113:181-197,1983.
- 132.- Swerdlow,S.H.;Murray,L.J.;Habeshaw,J.A. and Stansfeld,A.G.:B-and T-cell subsets in follicular centroblastic/centrocytic (cleaved follicular center cell) lymphoma:an immunohistologic analysis of 26 lymph nodes and three spleens.Hum.Pathol.,16:339-352,1985.

- 133.- Tanaka,M.;Tanaka,H. and Ishikawa,E.:Immunohistochemical demonstration of surface antigen of human lymphocytes with monoclonal antibody in acetone-fixed paraffin-embedded sections.J.Histochem.Cytochem., 32:452-454,1984.
- 134.- Taylor,C.R.:Immunohistological study of follicular lymphoma,reticulum cell sarcoma and hodgkin's disease.Europ.J.Cancer.,12:61-75,1976.
- 135.- Taylor,C.R.:Immunohistologic studies of lymphomas.New methodology yields new information and poses new problems.J.Histochem.Cytochem.,27:1189-1191,1979.
- 136.- Van Den Oord,J.J.;De wolf-Peeters,C.;Frizzera,G.;Desmet,V.J.;Tricot,G.;Thomas,J.;Marien,K.;Gatter,K.C. and Mason,Y.:T-helper cell lymphoma involving the lymph nodes and skin.Cancer.,55:1714-1721,1985.
- 137.- Warnke,R.A. and Rouse,R.V.:Limitations encountered in the application of tissue section immunodiagnosis to the study of lymphomas and related disorders.Hum.Pathol.,16:326-331,1985.
- 138.- Warnke,R. and Levy,R.:Immunopathology of follicular lymphomas:a model of B-lymphocyte homing.N.Engl.J. Med.,198:481-486,1978.
- 139.- Warnke,R.A. and Link,M.P.:Identification and significance of cell markers in leukemia and lymphoma. Ann.Rev.Med.,34:117-131,1983.
- 140.- Watanabe,S.;Nakajima,T.;Shimosato,Y.;Shimoyama,M.

- and Minato, K.: T-cell malignancies: subclassification and interrelationship. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 9:423-442, 1979.
- 141.- Weinberg, D.S. and Pinkus, G.S.: Non-hodgkin's lymphoma of large multilobated cell type. A clinicopathologic study of ten cases. *Am. J. Clin. Pathol.*, 76:190-196, 1981.
- 142.- Weingrad, D.N.; Decosse, J.J.; Sherlock, P.; Straus, D.; Lieberman, P.H. and Filippa, D.A.: Primary gastrointestinal lymphoma: a 30 year review. *Cancer.*, 49:1258-1265, 1982.
- 143.- Weis, J.W.; Winter, M.W.; Phylly, R.L. and Banks, P.M.: Peripheral T-cell lymphomas: histologic, immunohistologic and clinical characterization. *Mayo. Clin. Proc.*, 61:411-426, 1986.
- 144.- Weissman, I.L.; Warnke, R.; Butcher, E.C.; Rouse, R. and Levy, R.: The lymphoid system: its normal architecture and the potential for understanding the system through the study of lymphoproliferative diseases. *Hum. Pathol.*, 9:25-45, 1978.
- 145.- Whiteside, T.L. and Rowlands, D.T.: T-cell and B-cell identification in the diagnosis of lymphoproliferative disease. *Am. J. Pathol.*, 88:754-792, 1977.
- 146.- Winberg, C.D.; Nathwani, B.T.; Bearman, R.B. and Rappaport, H.: Follicular (nodular) lymphoma during the first two decades of life: a clinicopathologic study of 12 patients. *Cancer.*, 48:2223-2235, 1981.

147.- Winchester,R.J.;Meyers,P.A.;Broxmeyer,C.Y.;Wang,  
C.Y.;Moore,M.A.S. and Kunkel,H.G.:Inhibition of  
human erythropoietic colony formation in culture  
by treatment with Ia antisera.J.Exp.Med.,148:613-  
617,1978..

148.- Woodruff,R.K.;Malpas,J.S. and White,F.L.:Solitary  
plasmacytoma II:solitary plasmacytoma of bone.Cancer.,  
43:2344-2347,1979.

149.- Woodruff,R.K.;Whittle,J.M. and Malpas,J.S.:Soli-  
tary plasmacytoma I:extramedullary soft tissue plasma-  
cytoma.Cancer.,43:2340-2343,1979.