

# RECOMENDACIONES DEL CLUB DE LINFOMAS DE LA SEAP

## Introducción

**Santiago Montes Moreno, coordinador del club**

*Correspondencia: [smontes@humv.es](mailto:smontes@humv.es)*

### 1. OBJETIVO DE LAS GUÍAS DE CONSENSO

El avance en la investigación en el área de patología oncohematológica aporta continuamente nuevos marcadores con potencial valor diagnóstico, pronóstico y predictivo de respuesta a terapias dirigidas. Es tarea del hematopatólogo conocer y participar activamente en este avance así como incorporar gradualmente en su práctica diaria aquellos marcadores que sean validados en el ámbito clínico (1). No obstante, la evidencia disponible en la literatura basada en ensayos clínicos y estudios observacionales (niveles de evidencia I y II) acerca de la aplicabilidad de marcadores diagnósticos en el campo de la hematopatología es escasa y se requiere con frecuencia un consenso de expertos en la materia para generar documentos de recomendaciones sobre aspectos relacionados con diagnóstico en hematopatología (2, 3).

Así, la principal finalidad de estas guías es servir al patólogo general, hematopatólogo y hematólogo dedicado al diagnóstico el producto de la evidencia disponible filtrado por un comité de expertos que matizan las recomendaciones en función, esencialmente, de la aplicabilidad de la técnica y de su relevancia clínica. Se deriva de esto que las guías definen el catálogo de técnicas diagnósticas que se deben utilizar en un laboratorio de hematopatología y la forma en que se integran en el proceso diagnóstico. Adicionalmente se incluyen recomendaciones específicas sobre otros aspectos menos técnicos del proceso diagnóstico como la interpretación de patrones histopatológicos y consideraciones sobre los criterios utilizados en el diagnóstico de cada entidad y su aplicación cotidiana (4).

Aunque es indudable que la terapia de cada paciente y su pronóstico depende en buena medida del diagnóstico histopatológico y de algunos de los marcadores complementarios utilizados en este proceso, la decisión acerca de la mejor terapia para cada paciente se debe tomar en comités multidisciplinares(2). Existe toda una serie de marcadores biológicos clínicos (por ejemplo edad del paciente y estadiaje), esencial en muchos casos en la identificación de la mejor terapia para cada caso, que se deben valorar en conjunto

con los datos histopatológicos y moleculares en la toma de decisión clínica. A este respecto existen guías clínicas de referencia (3). Así, el objetivo al desarrollar estas guías de consenso a nivel nacional es normalizar la aplicación de los criterios diagnósticos y los métodos complementarios empleados en el mismo en patología oncohematológica linfoide.

Específicamente se pretende que las guías aquí desarrolladas provean:

- Recomendaciones acerca de los métodos óptimos de obtención de muestras para diagnóstico y el uso y procesamiento adecuado de las muestras e incorporación del excedente a biobancos.
- Orientación del catálogo de técnicas de uso clínico en el ámbito del diagnóstico hematopatológico (estudio morfológico, inmunohistoquímico y de citometría de flujo, FISH y moleculares). Recomendaciones acerca de condiciones técnicas y de interpretación óptimas.
- Orientación acerca del abordaje diagnóstico óptimo en el ámbito de la hematopatología con énfasis en los criterios diagnósticos vigentes, diagnóstico diferencial y potenciales errores diagnósticos.
- Indicación de marcadores diagnósticos de utilidad pronóstica y con potencial carácter predictivo de respuesta a terapia.

## 2. MÉTODO DE GENERACIÓN DE LAS GUÍAS

Un grupo de siete hematopatólogos expertos (Santiago Montes Moreno, Juan Fernando García, Manuela Mollejo Villanueva, Máximo Fraga, Antonio Martínez, María Rodríguez Pinilla, Jose Luis Villar), tres hematólogos especialistas en diagnóstico hematológico (Ramón García Sanz, María Rozmán y Ana Batlle) y un médico oncólogo especialista en patología hematolinfoides (Mariano Provencio) realiza una revisión exhaustiva de la literatura disponible y genera unos documentos tipo con capítulos dedicados a apartados generales y capítulos específicos para cada entidad nosológica. Al final de cada capítulo se derivan unas recomendaciones específicas. Los niveles de evidencia son los utilizados por la US Agency for Health Care Policy and Research (véase tablas 1 y 2).

Estos documentos se revisan en conjunto por el grupo redactor. Las recomendaciones producto de estos documentos revisados se someten a consenso por el grupo redactor utilizando un sistema de votación sobre un cuestionario. Las opiniones sobre cada ítem se miden utilizando una escala Likert de 4 puntos oscilando desde “muy de acuerdo” a “muy en desacuerdo”. El consenso se define como el apoyo de más del 70% de los expertos a un elemento, habiendo respondido con “muy de acuerdo” o “de acuerdo”. El documento final incluye el texto principal de cada capítulo y las recomendaciones finalmente consensuadas específicas de cada capítulo al final del mismo. El documento guía se revisará y actualizará con una periodicidad bienal.

**TABLA 1.** Niveles de evidencia

Ia	Evidencia obtenida de meta-análisis de ensayos clínicos randomizados.
Ib	Evidencia obtenida de al menos un ensayo clínico randomizado.
Ila	Evidencia obtenida de al menos un ensayo bien diseñado, no randomizado, incluyendo ensayos en fase II y estudios de tipo caso-control.
IIb	Evidencia obtenida de al menos un ensayo de otro tipo,, bien diseñado, cuasi.experimetal, por ejemplo estudios no intervencionistas, incluyendo estudios observacionales.
III	Evidencia obtenida de estudios descriptivos no experimentales bien diseñados. Evidencia obtenida de metaanálisis o ensayos clínicos randomizados o estudios de fase II publicados sólo como resumen a congreso.
IV	Evidencia obtenida de informes de comités de expertos u opiniones y/o experiencia clínica de autoridades en el campo.

TABLA 2. Grados de recomendación.

Grado A. Evidencia nivel Ia, Ib	Recomendación basada en al menos un ensayo clínico randomizado de buena calidad y consistencia, enfocado específicamente en la recomendación.
Grado B. Evidencia nivel Ila, I Ib, III	Recomendación basada en estudios bien planificados pero no ensayos clínicos randomizados acerca del tema de la recomendación.
Grado C. Evidencia nivel IV	Evidencia basada en informes de comités de expertos y/o experiencia clínica de autoridades en el tema.

## REFERENCIAS

1. Montes-Moreno S, López-Ríos F. Patología molecular y dianas terapéuticas. Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España. España, 2013.
2. Parker A BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting. 2012.
3. NCCN. NCCN Guidelines, Non Hodgkin Lymphomas. v 1.2013 ed, 2013.
4. Swerdlow SH CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.



# Recomendaciones para el estudio histopatológico, inmunohistoquímico, citogenético y molecular e informe diagnóstico de los procesos neoplásicos linfoides.

## Consenso SEAP-SEHH-GOTEL.

Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP).

Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH).

Grupo Oncológico para el Tratamiento y Estudio de los Linfomas (GOTEL).

**Grupo de trabajo: Santiago Montes Moreno<sup>(1)</sup>, Manuela Mollejo Villanueva<sup>(2)</sup>, Máximo Fraga<sup>(3)</sup>, Juan Fernando García<sup>(4)</sup>, José Luis Villar<sup>(5)</sup>, Antonio Martínez<sup>(6)</sup>, Socorro María Rodríguez Pinilla<sup>(7)</sup>, Ana Batlle<sup>(8)</sup>, Mariano Provencio Pulla<sup>(9)</sup>, María Rozmán<sup>(6)</sup>, Ramón García Sanz<sup>(10)</sup>.**

(1) Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander, España.

(2) Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen de la Salud, Toledo.

(3) Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela

(4) Servicio de Anatomía Patológica, Hospital MD Anderson, Madrid.

(5) Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen de la Macarena, Sevilla.

(6) Unidad de Hematopatología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clinic, Barcelona.

(7) Servicio de Anatomía Patológica, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

(8) Unidad de Citogenética Hematológica, Servicio de Hematología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander.

(9) Servicio de Oncología Médica, Hospital Puerta de Hierro, Madrid.

(10) Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

*Fecha de revisión: Esta guía publicará en Mayo de 2015. La actualización de la misma se espera en Mayo de 2017.*

*Descargo de responsabilidad: Aunque el contenido de las guías se considera cierto, preciso y actualizado en el momento de la publicación, ni los autores, ni las sociedades científicas a las que representan aceptan ninguna responsabilidad legal en relación con el contenido ni el potencial uso de las mismas. Los autores no tienen conflictos de interés relacionados directa o indirectamente con el contenido de las guías.*

## ÍNDICE

<b>1. GUÍA GENERAL</b>	
a. Obtención de las muestras para diagnóstico hematopatológico .....	85
b. Estudio histopatológico de tejidos hematolinfoides.....	89
c. Estudio inmunohistoquímico. Aplicación del inmunofenotipado de neoplasias linfoides .....	91
d. Estudio citogenético-FISH.....	95
e. Estudio molecular.....	102
f. Informe diagnóstico .....	107
<b>2. LINFOMAS B NO HODGKIN</b>	
a. Linfomas B indolentes .....	109
b. Linfomas B agresivos .....	135
c. Plasmocitoma / GMSI/ Mieloma Múltiple .....	148
<b>3. LINFOMAS DE HODGKIN. LINFOMAS B INTERMEDIOS ENTRE LH Y LBDCG .....</b>	<b>152</b>
<b>4. LINFOMAS T Y T/NK</b>	
a. Linfomas/Leucemias linfoblásticas (B y T) .....	156
b. Linfomas T ganglionares: linfoma T periférico, linfoma T angioinmunoblástico, linfoma anaplásico ALK+ y ALK .....	159
c. Leucemia de linfocitos grandes granulares, Leucemia prolinfocítica, Linfoma hepatoesplénico, Leucemias NK, Linfomas enteropáticos y Síndromes linfoproliferativos T pediátricos asociados a VEB.....	167
<b>5. LINFOMAS PRIMARIOS CUTÁNEOS.....</b>	<b>173</b>
<b>6. NEOPLASIAS DE CÉLULAS HISTIOCÍTICAS. NEOPLASIAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....</b>	<b>181</b>

## 1. GUÍA GENERAL

### 1a. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO HEMATOPATOLÓGICO.

Autor para la correspondencia: Santiago Montes Moreno. [smontes@humv.es](mailto:smontes@humv.es)

#### BIOPSIA DE TEJIDO

La biopsia de tejido es necesaria para establecer el diagnóstico de procesos linfoproliferativos, especialmente en los casos con afectación ganglionar predominante o no leucémicos. La biopsia no sólo permite establecer un diagnóstico de linfoma sino establecer el tipo histológico específico según la clasificación vigente(1), generar información pronóstica y eventualmente orientar la terapia. Asimismo, el material excedente diagnóstico, adecuadamente procesado, se podrá incorporar a los biobancos de tejido para futuros usos en investigación biomédica. Es preciso obtener consentimiento informado del paciente para los diferentes procedimientos requeridos (obtención de la muestra, incorporación de la misma al Biobanco, etc). Es responsabilidad del clínico obtener estos consentimientos informados del paciente.

En todos los casos, la muestra debe acompañarse de una hoja de solicitud de estudio anatomopatológico con un breve resumen de los antecedentes del paciente debiéndose especificar la sospecha diagnóstica, el origen de la muestra y la hora de extracción. Los datos de índole hematológica relevantes en la orientación diagnóstica del caso deben incluirse en todo caso en la hoja de solicitud si no están accesibles en red en el centro en cuestión.

#### BIOPSIA DE ADENOPATÍA. TIPOS DE MUESTRAS

La biopsia de adenopatías en un paciente con sospecha de proceso linfoproliferativo debe ser suficiente para realizar los siguientes estudios:

- Análisis de la morfología en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (FFIP).
- Estudios de inmunohistoquímica en muestras FFIP.
- Estudios de citometría de flujo (CMF) de material en fresco. Si no es posible hacer llegar la muestra en condiciones óptimas al laboratorio de CMF se debe considerar disgregar la muestra e incluir en fijador previo al envío.
- Análisis de FISH a partir de improntas de tejido o tejido FFIP.
- Estudios moleculares (análisis de clonalidad linfoide mediante PCR, PCR cuantitativa y similares, secuenciación) a partir de ADN extraído de la muestra. La mayoría de los análisis moleculares basados en amplificación del ADN se pueden realizar a partir de tejido FFIP aunque la calidad del ADN de partida es significativamente inferior al del extraído de muestras en fresco/congeladas.
- Estudios de citogenética a partir de muestras en fresco.

Tipos de muestra:

**1. Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección y debe de ser el método utilizado siempre en los casos de adenopatías superficiales/palpables. En aquellos pacientes con adenopatías profundas no accesibles a la palpación o que por su localización tienen mayor riesgo quirúrgico, la aproximación dependerá de la situación del paciente, de la sospecha diagnóstica, del tamaño así como de la adherencia a planos profundos.

\*En el caso de masas en mediastino anterior para realizar un correcto diagnóstico es necesario realizar una mediastinoscopia con biopsia incisional (la rentabilidad de las muestras obtenidas mediante EBUS (eco-broncoscopia lineal) para el diagnóstico de procesos hematológicos es en general bajo) o en su defecto, una biopsia-trucut con aguja gruesa (14-16 G).

En el caso de adenopatías retroperitoneales o intraabdominales, ante un paciente con situación clínica que permita afrontar la cirugía se realizará una laparoscopia con toma de biopsia escisional/incisional. En caso de que la situación clínica del paciente no permita una cirugía (por situación general, comorbilidades,

coagulopatía etc.) o el diagnóstico de linfoma sea poco probable, se realizará una BAG (Punción biopsia con aguja gruesa)-trucut.

**2. Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** Es la aproximación a utilizar en aquellos casos en los que el diagnóstico de linfoma NO sea probable o que en caso de que la sospecha sea linfoma no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Siempre que sea posible, se obtendrán 6-8 cilindros con una aguja de 14-16G. En estos casos el estudio de la muestra de BAG debe incluir siempre, además del estudio morfológico, técnicas auxiliares (citometría de flujo, inmunohistoquímica, análisis de reordenamientos mediante FISH y, en situaciones concretas, análisis de clonalidad linfoide B y T).

**3. Punción aspiración con aguja fina (PAAF):** A pesar de la relativa facilidad y el reducido número de complicaciones que presenta la PAAF (dirigida o no mediante técnicas de imagen), debido al escaso rendimiento diagnóstico, esta prueba NO debe de realizarse para el diagnóstico inicial de un paciente con adenopatías de posible origen neoplásico linfoide (muy bajo rendimiento diagnóstico; Grado B; nivel de evidencia III)(2). No obstante puede ser suficiente para establecer un diagnóstico de recidiva (3-7). Igualmente es de utilidad como medio para orientar el manejo del paciente con baja sospecha de proceso neoplásico.

Una vez realizada la biopsia, la muestra será idealmente remitida en fresco inmediatamente al laboratorio de anatomía patológica donde el patólogo se encargará de procesar y derivar con carácter urgente a los laboratorios pertinentes para los estudios especiales que requieran muestra en fresco (citometría de flujo, FISH en improntas, biología molecular y microbiología si procede) y biobanco de tejidos. Para una buena preservación del tejido, el intervalo transcurrido entre la toma de biopsia y su procesamiento no debe ser superior a 30 minutos. Si no es posible asegurar que la muestra se va a procesar en este tiempo se sumergirá intacta en formol tamponado y se enviará de la forma habitual al servicio de Anatomía Patológica.

Las muestras de biopsia incisional/escisional así como BAG destinadas a estudio histopatológico se deben fijar en formol tamponado que permite la realización posterior de estudios morfológicos, fenotípicos, de hibridación in situ y moleculares. Las muestras escisionales se deben procesar adecuadamente para asegurar una fijación homogénea (secciones de 2-5 mm de grosor perpendiculares al eje mayor del ganglio linfático). Para evitar problemas de reactividad inmunohistoquímica se debe evitar la sobrefijación (por ejemplo más de 24 horas en formol o más de 4 horas en zinc formalina o B5(8)).

La congelación de las muestras con destino biobanco o análisis molecular se debe realizar en condiciones estándar:

- Criomoldes con medio OCT que proteja la muestra.
- Inmersión en isopentano o nitrógeno líquido a -80°C.
- Almacenaje a -80°C hasta su uso.

## MÉDULA ÓSEA

La muestra de aspirado de médula ósea, en conjunto con los hallazgos clínicos y en sangre periférica pueden ser suficientes para el diagnóstico de algunos procesos linfoproliferativos, particularmente aquellos con manifestaciones leucémicas (por ejemplo leucemia linfocítica crónica, leucemia de células grandes granulares, tricoleucemia, entre otros). No obstante, en los casos de proceso linfoproliferativo de localización ganglionar o visceral/ósea las muestras obtenidas de médula ósea (aspirado o cilindro de médula ósea de cresta ilíaca) no son suficientes para el diagnóstico inicial de proceso linfoproliferativo y es preciso obtener una muestra de la localización primaria de la neoplasia.

## BIOPSIA DE MÉDULA ÓSEA

El papel de la biopsia-cilindro de médula ósea en el diagnóstico y estadiaje de los procesos linfoproliferativos está bien establecido(2). La biopsia cilindro se debe obtener idealmente de la cresta ilíaca posterior o anterior y tener una longitud de al menos 1,5 cm. Microscópicamente la muestra de biopsia debe contener



entre 7 y 10 áreas intertrabeculares. Es preferible tener en cuenta este criterio en lugar de la longitud del cilindro (al menos 1,5 cm según la OMS) pues la localización subcortical de algunas biopsias o una toma de muestra tangencial a la superficie del hueso puede limitar la representatividad a pesar de tener una longitud de 1,5 cm.

La muestra se puede fijar en medios de formol al 4% o mezclas de formol y B5 u otras aunque estas últimas requieren de un procesamiento adecuado de los residuos peligrosos. La fijación en formol al 4% permite el uso de posteriores técnicas de inmunohistoquímica y moleculares(2). Posteriormente a la fijación en formol la muestra se debe decalcificar (EDTA, mezclas de formol y ácido fórmico, etc) e incluir en parafina.

Las secciones del bloque de parafina se deben teñir con HE (secciones seriadas) y reticulina por defecto(2). La tinción de Giemsa puede ser de utilidad en determinadas circunstancias, así como el PAS y tinciones de hierro (Perls). El panel de inmunohistoquímica se debe solicitar en función de la sospecha basada en el análisis morfológico.

### ASPIRADO DE MEDULA ÓSEA

La muestra de aspirado de MO es útil para análisis morfológico, citometría de flujo, inmunocitoquímica, citogenética convencional, FISH y PCR. La muestra obtenida se puede procesar en fresco en medio anticoagulante o bien fijar en formol tamponado y generar posteriormente un bloque tras FFIP (fijación en formol e inclusión en parafina).

### PIEZA DE ESPLENECTOMÍA

La esplenectomía diagnóstica es una técnica en desuso en la actualidad debido a la mejora en las técnicas de caracterización fenotípica de las poblaciones linfoides en SP y MO. No obstante existe un subgrupo de pacientes que son sometidos a esplenectomías diagnósticas - terapéuticas en el contexto de enfermedades hematológicas. El procesamiento de la pieza de esplenectomía es equivalente al de la biopsia escisional de ganglio linfático. Se recomienda aislar de entrada áreas representativas del parénquima esplénico y ganglio linfático hilar de 2 mm de grosor para asegurar una fijación óptima de la muestra.

### RECOMENDACIONES

1. **Bajo ningún concepto debe utilizarse la PAAF (Punción-aspiración con aguja fina) para el diagnóstico inicial de un paciente con adenopatías de posible origen neoplásico linfoide (el rendimiento diagnóstico es muy bajo y existe riesgo de desvirtuar una muestra necesaria para una biopsia posterior). No obstante puede ser suficiente para establecer un diagnóstico de recidiva (grado B, nivel de evidencia III).**
2. **La biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto es el método de elección para el diagnóstico inicial de los casos con sospecha de proceso linfoproliferativo. En los casos en que por la situación clínica del paciente se realice una BAG (Biopsia con aguja gruesa) el estudio de la muestra de BAG debe incluir siempre, además del estudio morfológico, técnicas auxiliares (citometría de flujo, inmunohistoquímica, análisis de reordenamientos mediante FISH y, en situaciones concretas, análisis de clonalidad linfoide B y T. Grado C. Evidencia nivel IV**
3. **En todos los casos, la muestra debe acompañarse de una hoja de solicitud de estudio anatomopatológico con la sospecha diagnóstica, el origen de la muestra, los datos clínicos y de laboratorio relevantes y la hora de extracción. Grado C. Evidencia nivel IV**
4. **La muestra de tejido será idealmente remitida en fresco inmediatamente al laboratorio de anatomía patológica donde el patólogo se encargará de procesar y derivar con carácter urgente a los laboratorios pertinentes para los estudios especiales. Grado C. Evidencia nivel IV**

5. Las muestras de biopsia incisional/escisional así como BAG destinadas a estudio histopatológico se deben fijar en formol tamponado que permite la realización posterior de estudios morfológicos, fenotípicos, de hibridación in situ y moleculares. El tiempo de fijación en formol debe estar controlado. Grado C. Evidencia nivel IV
6. Si se dispone de una cantidad de tejido limitada se debe priorizar el análisis morfológico y fenotípico básico a las técnicas de análisis citogenético (FISH) o molecular o inclusión de muestra en biobanco. Grado C. Evidencia nivel IV
7. El estudio citogenético de elección en muestras de tejido o improntas es FISH. Grado C. Evidencia nivel IV
8. En la mayoría de los casos de proceso linfoproliferativo (aquellos de localización ganglionar o visceral/ósea, no primariamente medulares) las muestras obtenidas de médula ósea (aspirado o cilindro de médula ósea de cresta ilíaca) no son suficientes para el diagnóstico inicial de proceso linfoproliferativo y es preciso obtener una muestra de la localización primaria de la neoplasia. Grado C. Evidencia nivel IV
9. Se debe realizar una biopsia de médula ósea de estadiaje en todos los casos con diagnóstico de proceso linfoproliferativo de localización ganglionar o visceral. Grado C. Evidencia nivel IV
10. La biopsia-cilindro de médula ósea debe contener al menos 7 espacios intertrabeculares, con una longitud aproximada de 1,5 cm. Grado C. Evidencia nivel IV

## REFERENCIAS

1. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
2. Parker A, BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting. 2012.
3. Hehn ST, Grogan TM, Miller TP. Utility of fine-needle aspiration as a diagnostic technique in lymphoma. *J Clin Oncol.* 2004 Aug;22(15):3046-52.
4. Meda BA, Buss DH, Woodruff RD, Cappellari JO, Rainer RO, Powell BL, et al. Diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma. The usefulness and limitations of combined fine-needle aspiration cytology and flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* 2000 May;113(5):688-99.
5. Dong HY, Harris NL, Preffer FI, Pitman MB. Fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis and classification of primary and recurrent lymphoma: a retrospective analysis of the utility of cytology and flow cytometry. *Mod Pathol.* 2001 May;14(5):472-81.
6. Jeffers MD, Milton J, Herriot R, McKean M. Fine needle aspiration cytology in the investigation of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol.* 1998 Mar;51(3):189-96.
7. Zeppa P, Marino G, Troncone G, Fulciniti F, De Renzo A, Picardi M, et al. Fine-needle cytology and flow cytometry immunophenotyping and subclassification of non-Hodgkin lymphoma: a critical review of 307 cases with technical suggestions. *Cancer.* 2004 Feb;102(1):55-65.

8. Hussong JW, Arber DA, Bradley KT, Brown MS, Chang CC, de Baca ME, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with non-Hodgkin lymphoma/lymphoid neoplasms. Arch Pathol Lab Med. 2010 Jun;134(6):e40-7.

## 1b ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE TEJIDOS HEMATOLINFOIDES

Autor para la correspondencia: *Máximo Fraga* ([maximo.fraga@usc.es](mailto:maximo.fraga@usc.es)).

### 1. INTRODUCCIÓN

Como en cualquier otro campo de la Patología, un examen histopatológico sistemático del tejido, usualmente teñido con Hematoxilina y Eosina, resulta clave para la elaboración de un diagnóstico diferencial adecuado. En algunos casos permite por sí solo emitir un diagnóstico, aunque estudios adicionales suelen ser necesarios, especialmente en el caso de patología neoplásica. Como siempre, es esencial para la correcta orientación diagnóstica el conocimiento del contexto clínico del paciente.

El estudio histopatológico requiere el conocimiento de los compartimentos normales y su composición celular, a fin de valorar primero la arquitectura, para obtener una impresión general y, posteriormente, analizar las características celulares. Por ello, en este capítulo revisaremos brevemente los compartimentos que deben ser examinados de forma sistemática durante el estudio histopatológico de ganglio linfático, bazo y médula ósea. Si el resultado orienta con mayor o menor probabilidad hacia una neoplasia linfoide, pueden consultarse los capítulos de esta guía dedicados a criterios diagnósticos específicos y diferenciales de las diversas entidades.

### 2. GANGLIO LINFÁTICO

El examen de las preparaciones sin microscopio puede ofrecer ya algunas pistas que nos guíen en el estudio microscópico posterior, tales como si el ganglio se encuentra agrandado, si la apariencia es uniforme o heterogénea, si se observan nódulos de tamaño desproporcionado, si la coloración es monótona o existen áreas diferentes, etc.

Una vez al microscopio, se debe explorar la totalidad de la estructura del ganglio, preferiblemente con un objetivo de bajo aumento tipo 2x. Veremos si la arquitectura se encuentra conservada o si, por el contrario, existe un borramiento difuso o una alteración focal de la misma. Posteriormente, con mayor aumento, atenderemos a aquellas áreas en que encontremos algo llamativo o anormal y revisaremos el resto de compartimentos ganglionares. Debemos ir consignando las alteraciones que encontremos porque nos servirán de ayuda para la elaboración del diagnóstico.

De forma sistematizada, los compartimentos que debemos evaluar son:

#### 1. Tejido periganglionar y cápsula del ganglio linfático.

Se debe examinar el tejido periganglionar, por si existiese infiltración del mismo por alguna proliferación linfoide u otro tipo de proceso. También la cápsula, que debe ser fina y uniforme, debe ser examinada para descartar cualquier proceso infiltrativo, engrosamientos, prolongaciones fibrosas hacia el interior del ganglio, etc.

#### 2. Folículos linfoides.

Podemos observar folículos primarios, en forma de nódulos densos constituidos por linfocitos pequeños del tipo de la zona del manto, y/o folículos secundarios, con centros germinales rodeados por un anillo de células del manto. Los centros germinales puede aparecer hiperplásicos o, por el contrario, involucionados o regresivos. Hay que prestar atención a la composición celular de los mismos, que ha de ser polimorfa (centrocitos, centroblastos, macrófagos con cuerpos tingibles...), así como a la existencia o no de polarización, etc; este tipo de características ayudan a distinguir hiperplasias de linfomas foliculares. En diferentes situaciones patológicas, la zona del manto puede estar expandida, atenuada... Con respecto a la zona marginal, en condiciones normales solo está presente en el bazo y en ganglios

mesentéricos, por lo que en ganglios periféricos su existencia siempre indica alguna alteración, ya sea de tipo reactivo o neoplásico.

### 3. Área paracortical o interfolicular.

Se trata de un área heterogénea, con abundantes linfocitos pequeños, linfocitos transformados más grandes, generalmente dispersos, y células dendríticas, entre otros componentes. Puede estar expandida en reacciones de tipo inmunoblástico y en linfomas, especialmente de fenotipo T.

### 4. Senos linfáticos.

En ocasiones aparecen prominentes, como cuando se encuentran ocupados por células que pueden ser de muy diferente naturaleza: macrófagos, células metastásicas, células neoplásicas de un linfoma anaplásico de células grandes, etc. Otras veces prácticamente no se aprecian: ganglios inactivos, ganglios en los que el crecimiento de un linfoma comprime los senos, etc.

## 3. BAZO

El tejido esplénico se compone de pulpa blanca, constituida por folículos linfoides y vainas linfoides periarteriolas, y pulpa roja, ricamente vascularizada. El patrón de afectación esplénico por procesos proliferativos o infiltrativos puede ser difuso o focal:

1. Con respecto al patrón difuso, algunos procesos asientan preferentemente sobre la pulpa blanca y otros sobre la pulpa roja. En el primer caso se trata fundamentalmente de hiperplasias, linfomas B de células pequeñas y linfomas T, que producen expansiones nodulares que pueden llegar a confluir. Cuando la afectación predominante es en la pulpa roja, en casos benignos esto puede responder a congestión inespecífica, anemias hemolíticas, hematopoyesis extramedular, enfermedades de almacenamiento lisosómico, etc.; en caso de malignidad, son ejemplos característicos de afectación de pulpa roja la tricoleucemia y el linfoma T hepatoesplénico, entre otros.
2. La afectación focal del bazo puede estar en relación con alteraciones de tipo muy variado, tanto benignas como malignas: seudotumores inflamatorios, quistes, linfoma de Hodgkin, linfoma B difuso de células grandes, tumores de células foliculares dendríticas, etc.

## 4. MÉDULA ÓSEA

En la biopsia de médula ósea se deben valorar la proporción, el grado de maduración y la topografía de las series hematopoyéticas. También se debe prestar atención al estroma: presencia o no de fibrosis, senos dilatados, ocupación sinusal por células neoplásicas, agregados o nódulos linfoides.

En el caso de las proliferaciones linfoides, el reconocimiento del patrón de infiltración medular ayuda en el diagnóstico diferencial y puede aportar información pronóstica. Habitualmente se describen 5 patrones: intersticial, nodular o focal aleatorio, paratrabecular, intrasinusoidal y difuso. Ninguno de ellos es específico de un tipo de linfoma, pero algunos sí son muy característicos, como la infiltración paratrabecular en el linfoma folicular y la infiltración intrasinusoidal en el linfoma esplénico de la zona marginal.

## REFERENCIAS

1. Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW, Campo E, Arber DA. Hematopathology. Saunders, 2010.
2. O'Malley DP, George TI, Orazzi A, Abbondanzo SL. Benign and Reactive Conditions of Lymph Node and Spleen. AFIP Atlas of Nontumor Pathology, Vol. 7. American Registry of Pathology, 2009.
3. Wilkins BS. Pitfalls in bone marrow pathology: avoiding errors in bone marrow trephine biopsy diagnosis. J Clin Pathol. 2011; 64(5): 380-6.

## 1c. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO. APLICACIÓN DEL INMUNOFENOTIPADO DE NEOPLASIAS LINFÓIDES.

*Autor para la correspondencia: Antonio Martínez (ANTONMAR@clinic.ub.es).*

### INTRODUCCIÓN

La clasificación de las neoplasias linfoides se basa en tres pilares: la morfología, las alteraciones genéticas y el fenotipo. El fenotipado puede realizarse actualmente mediante citometría de flujo y técnicas de inmunohistoquímica sobre secciones de tejidos. La disponibilidad de un citómetro de flujo en muchos de los laboratorios de hematología hace esta primera opción especialmente interesante en nuestros días. El diagnóstico de la patología mieloide, por ejemplo, se realiza básicamente por medio de la citometría de flujo puesto que ofrece un resultado más rápido y amplio que el fenotipo del tejido. Tras convertir el tejido de la biopsia en una suspensión celular, se puede proceder a su estudio con los mismos protocolos con los que se analizan los síndromes linfoproliferativos en sangre periférica. En ocasiones, especialmente en biopsias pequeñas, puede optimizarse la rentabilidad del estudio realizando éste sobre el medio de transporte líquido de la biopsia (suero fisiológico, medio de cultivo o PBS) especialmente en linfomas muy agresivos como el linfoma de Burkitt. Esta técnica permite un diagnóstico rápido en pocas horas y es el complemento ideal del fenotipado de líquidos biológicos (derrames o líquido cefalorraquídeo o incluso citologías vítreas). No obstante, en la mayoría de los casos la citometría será una técnica complementaria a la inmunohistoquímica y nunca la debe suplir. El fenotipado sobre secciones de tejido tiene el poder adicional de preservar la inmunoarquitectura del tejido. La expresión de Bcl2 en un centro germinal tiene el valor diagnóstico de neoplasia del que carece la expresión en la zona del manto o la zona marginal. Además nos permite reconocer el tipo celular donde se observa la expresión, por ejemplo, la expresión de ciclina D1 en un macrófago tisular es fisiológica mientras que la expresión en una célula linfóide es indicativa de neoplasia. Lo mismo sucede con el compartimento subcelular donde se observa la expresión. La presencia de ALK en diferentes compartimentos celulares permite inferir el tipo de translocación asociada al linfoma anaplásico: nuclear y citoplasmática en la translocación t(2;5) NPM-ALK o la vesicular citoplasmática en Clatrina-ALK.

El fenotipado sobre secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina no es ya un desafío. Las modernas técnicas de recuperación antigénica se han estandarizado entorno a tres grandes grupos: las técnicas de calor con buffer de pH ácido, con pH alcalino y la digestión enzimática. En la actualidad existen plataformas totalmente automatizadas que permiten la realización de protocolos individualizados sobre cada sección de tejido para caracterizar la expresión de antígenos mediante inmunohistoquímica. Además, los sistemas actuales de amplificación de señal basados en polímeros, así como la presencia de diferentes enzimas y substratos, han permitido la expansión de técnicas de marcaje múltiple inmunohistoquímico así como de combinación de protocolos de inmunohistoquímica e hibridación in situ.

En los siguientes apartados resumiremos las principales indicaciones de las técnicas de inmunohistoquímica en el diagnóstico de neoplasias linfoides.

### ESTUDIO DE INMUNOGLOBULINAS COMO MARCADOR DE CLONALIDAD.

Una de las aplicaciones más útiles de las técnicas de inmunohistoquímica es la demostración de expresión de cadenas ligeras citoplásmicas como marcador de clonalidad. Todas las células linfoides B neoplásicas muestran, salvo pocas excepciones, expresión en superficie de un receptor. Este receptor es una inmunoglobulina convenientemente modificada para dirigirse a la membrana citoplásmica. De forma similar a nuestros anticuerpos del suero, la inmunoglobulina como receptor consta de dos cadenas pesadas (una de cualquiera de las siguientes; IgA, IgD, IgG, IgM e IgE) y dos cadenas ligeras (kappa o lambda) apropiadamente ensambladas. En condiciones fisiológicas el proceso de exclusión alélica selecciona en cada célula una única forma de cadena ligera, kappa o lambda. En la sangre de forma fisiológica, se encuentran un 60% de linfocitos B kappa y un 40% lambda. La detección en un tejido de una población exclusiva o dominante con expresión de únicamente de una de estas cadenas es altamente sugestivo de clonalidad y por ende de neoplasia. A esta situación la denominamos restricción de cadenas ligeras. La cantidad de expresión de

estas cadenas en un linfoma B de bajo grado es muy baja, y la técnica tiene que estar bien optimizada. La mayor parte de protocolos recomiendan una alta dilución de anticuerpos policlonales que reconozcan cada una de las cadenas tras una conveniente recuperación antigénica con tampones de bajo pH. Por otro lado, la expresión intensa de cadenas citoplasmáticas se observa en linfomas con diferenciación plasmocelular y transformación secretora, además de en neoplasias de células plasmáticas. Por otro lado, la expresión de cadenas ligeras es un argumento sólido para la identificación de la línea B de una neoplasia cuando otros marcadores son negativos (ver más adelante).

De otra forma, las cadenas pesadas son útiles en inmunohistoquímica de procesos linfoproliferativos B. La mayor parte de los linfomas son positivos de forma variable para IgM e IgD. No obstante, IgD es muy útil en la identificación de los mantos foliculares fisiológicos y por ende, en el reconocimiento del patrón infiltrativo de la neoplasia. Además, la positividad casi exclusiva de IgD es característica de los linfomas de zona marginal esplénicos. IgM identifica los plasmablastos del castlemán multicéntrico y es el subtipo de cadena pesada en el linfoma linfoplasmacítico cuando este se presenta como enfermedad de Waldenström. Otros subtipos son característicos de procesos específicos, como IgA, que se expresa en linfomas foliculares primarios duodenales o IgG que se expresa de forma característica en la tricoleucemia. La expresión de IgG es también útil en el diagnóstico de la forma primaria cutánea del linfoma de zona marginal, y la expresión de IgG4 de algunos linfomas de zona marginal de glándulas salivales además del síndrome sistémico esclerosante IgG4.

#### **DIAGNOSTICO DE NEOPLASIAS LINFOIDES B AGRESIVAS**

El diagnóstico de las neoplasias agresivas se basa fundamentalmente en criterios clinicopatológicos fácilmente reconocibles como el crecimiento destructivo del tejido donde se asienta la lesión, el elevado índice mitótico y/o apoptótico (como el "cielo estrellado" del linfoma de Burkitt), la presencia de células grandes y por supuesto la presencia de algunos parámetros clínicos de agresividad (LDH altas, masas grandes tumorales, presencia de anemia severa o la hipercaptación del PET). En esta situación el inmunofenotipo ayuda a definir la línea linfocito B versus T y otras (Hodgkin, mielocito o histiocito/dendrítico, ver más adelante). La utilización de un único marcador pan B y pan T en estos casos puede ser muy engañosa. Algunos linfomas agresivos B pueden ser negativos para CD20, como el linfoma plasmablasto, y otros, como el linfoma difuso de células grandes de tipo activado puede perder la expresión de CD79a. En algunos casos, un linfoma T periférico puede expresar CD20 y CD79a, pero raramente otros marcadores disponibles en la actualidad para identificar células B como PAX5, CD19 o CD22. Además, la expresión de cadenas ligeras puede usarse como un potente argumento a favor de la identificación de la estirpe B de la neoplasia. Por otro lado, en este grupo heterogéneo de neoplasias linfocitos se han descrito numerosos marcadores pronósticos que permiten estratificar en grupos de riesgo a los pacientes. La diferenciación centrogerminal en un linfoma difuso de células grandes, se asocia a un mejor pronóstico, probablemente, porque en ese momento del desarrollo, su contrapartida no neoplásica es extraordinariamente sensible al microambiente que en todo momento controla su capacidad de proliferación. Por ello en los últimos años han aparecido un sinnúmero de marcadores que reflejan este momento de diferenciación, algunos de los cuales son altamente recomendables en la práctica clínica: CD10, Bcl6, IRF4, HGAL y LMO2 son algunos de los mejor caracterizados. La presencia de un fenotipo clásico de centrogerminal normal, positividad para marcadores de centrogerminal y negatividad para Bcl2 es muy útil en el diagnóstico diferencial entre la hiperplasia folicular, siempre negativa para Bcl2 y el linfoma folicular, usualmente positivo. No obstante, algunos tumores agresivos como el linfoma de Burkitt imitan este fenotipo.

#### **DIAGNÓSTICO DE PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS DE CÉLULAS PEQUEÑAS**

En el caso de los linfomas de células pequeñas B, algunas entidades tienen un inmunofenotipo muy característico que permite establecer el diagnóstico casi con total seguridad basado en el inmunofenotipo. Así, el linfoma folicular tiene un fenotipo característico con positividad para CD10, Bcl6 y Bcl2. El linfoma de células del manto expresa CD5 y ciclina D1, mientras que el linfoma linfocítico expresa CD5 y

CD23, pero no ciclina D1. El estudio de cadenas ligeras por inmunohistoquímica en los linfomas de bajo grado es de menos utilidad que en los de alto grado, por el menor nivel de expresión que hace que estas sean raramente detectables en secciones de tejido parafinado a excepción del linfoma de zona marginal o del linfoma linfoplasmacítico en las que de forma constante se observa una marcada diferenciación secretora en el tumor.

#### **DIAGNOSTICO DE PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS DE LINFOCITOS T, T/NK Y NK**

A diferencia de las neoplasias de linfocitos B, este grupo heterogéneo de tumores no dispone de marcadores inmunofenotípicos de clonalidad, apenas existen perfiles fenotípicos específicos de una única entidad tumoral y el diagnóstico de la entidad requiere un panel amplio de marcadores que no están al alcance de todas las unidades de diagnóstico.

La expresión de la kinasa ALK1 por inmunohistoquímica en un linfoma T es característica del linfoma T anaplásico (expresándose también en los linfomas B de célula grande ALK positivos y casos de carcinomas de pulmón y tumores miofibroblásticos inflamatorios). No obstante, a veces el fenotipo T no resulta evidente y requiere el estudio de reordenamientos del receptor antigénico de las células T para establecer la línea de la neoplasia.

CD2, el antiguo receptor implicado en las rosetas con eritrocitos de carnero, es un marcador de línea T poco usado en inmunohistoquímica que tiene unos resultados muy buenos en tejido fijado en formol y parafinado. El panel debe completarse con CD3, CD5, y CD7, éste último perdido en una buena proporción de linfomas T. La pérdida de CD5 y CD3, son sugestivas de derivación T/NK, NK. No obstante, el CD3 citoplasmático puede estar expresado en células NK.

#### **Ki67**

Ki-67 es un antígeno nuclear presente en todas las células proliferantes que se encuentran en la fase activa del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) y ausente en G0. Es un marcador ampliamente utilizado en diversas subdisciplinas de la patología, en combinación con otros marcadores puede ayudar a decantar el diagnóstico a favor de benignidad o malignidad en algunos casos.

En el campo de la hematopatología tiene dos grandes utilidades. Por un lado permite ver cuál es el compartimento linfoide que está proliferando y cuál es la distribución de la proliferación; heterogénea u homogénea. Por ejemplo en el diagnóstico diferencial entre un linfoma de la zona marginal y un linfoma folicular. En el caso del primero esperamos una distribución parcheada (colonización) mientras que en el linfoma folicular de bajo grado esperamos una distribución más homogénea. En algunos casos, como en el linfoma de células del manto, es un marcador pronóstico que es capaz de reflejar una compleja firma molecular de proliferación. Por otro lado, dado que realza los nucléolos y tiñe toda la masa nuclear, puede ser de ayuda en casos en que la morfología es pobre, para establecer el diagnóstico de alto o bajo grado, como en el caso del linfoma folicular.

#### **FACTORES DE TRANSCRIPCION**

En los últimos años se ha ampliado el número de marcadores que podemos utilizar en la rutina diagnóstica. Estos además han pasado de corresponder únicamente a proteínas de membrana y se han desarrollado anticuerpos para algunos factores de transcripción, con tinción nuclear que nos permiten caracterizar las poblaciones linfoides en su proceso madurativo.

#### **Pax-5**

Es un factor de transcripción implicado en la diferenciación de la célula B, cuya expresión se extingue al entrar la célula en la fase terminal de diferenciación. Se utiliza para demostrar la línea B de las células y se expresa de forma débil en las células de Reed-Stemberg y Hodgkin. Fuera del sistema hematolinfoide se expresa en tumores neuroendocrinos principalmente pulmonares y muestra reacción cruzada con Pax-8.

#### **IRF4/MUM-1**

Multiple myeloma oncogene-1 (MUM-1) pertenece a la familia de IRF-4. Es un factor de transcripción involucrado en el desarrollo de células B, T y en la diferenciación plasmocelular. Se usa para identificar un

subtipo de linfomas difusos de célula grande de fenotipo activado, en combinación con CD10 y Bcl-6. Es positivo también en linfocitos T activados, en un subgrupo de células B del centro germinal y en las células de Reed-Stenberg del linfoma de Hodgkin.

#### **Bcl-6**

Es un factor de transcripción implicado en la diferenciación en la célula B. La supresión de su expresión es fundamental para la diferenciación plasmocelular. Se utiliza para identificar células centrogerminales así como sus contrapartidas neoplásicas. Se expresa por tanto en linfoma folicular, un subgrupo de linfomas difusos de célula grande y en linfoma de Burkitt.

### **DIANAS TERAPÉUTICAS**

Desde hace más de 15 años, algunos de los antígenos que utilizamos en el diagnóstico de las neoplasias linfoides se han convertido en dianas terapéuticas de uso en el tratamiento de estos pacientes en combinación con quimioterapia. Muchos de estas dianas pueden estudiarse fácilmente por inmunohistoquímica en biopsias de rutina.

#### **CD20**

Se trata de una fosfoproteína no glicosilada de membrana, involucrada en la regulación de la célula B. Se usa como marcador de primera línea para definir la línea B. Su expresión se pierde en el proceso de maduración terminal de la célula B.

El desarrollo de un anticuerpo monoclonal (rituximab) dirigido contra el CD20 ha puesto de manifiesto la necesidad de la estandarización en la interpretación de la inmunohistoquímica y por otro lado la necesidad de utilizar marcadores de línea B alternativos en los casos de recaídas de pacientes tratados con inmunoterapia previa (rituximab).

#### **CD30**

La inmunoterapia con el anticuerpo conjugado anti-CD30 (brentuximab vedotina) se ha estudiado en pacientes con linfoma Hodgkin y no Hodgkin CD30+ refractarios o en recaída. Brentuximab vedotina está aprobado para el tratamiento de pacientes adultos con linfoma Hodgkin CD30+ en recaída o refractario, después de trasplante autólogo o tras al menos dos líneas previas de tratamiento, y también para pacientes adultos con linfoma T anaplásico de células grandes sistémico en recaída o refractario.

#### **CD 52**

Es una glicoproteína presente en la superficie de linfocitos maduros, monocitos y células dendríticas. Alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD52. Esta terapia se ha usado en los últimos años en el tratamiento de la leucemia linfática crónica, entre otros.

### **MARCADORES PRONÓSTICOS**

#### **P53**

La mutación de p53 es uno de los factores de mal pronóstico más robustos en pacientes con leucemia linfática crónica que reciben tratamiento estándar de primera línea, teniendo impacto tanto en la supervivencia libre de enfermedad como en supervivencia global. Es además una alteración genética secundaria común en progresión/transformación de linfomas de bajo grado a linfoma B de célula grande.

#### **Zap-70**

Esta proteína se expresa de forma fisiológica en linfocitos T y no en células B. Sin embargo estudios de expresión génica identificaron su expresión en leucemia linfática crónica y además su expresión correlaciona con el estado mutacional de las inmunoglobulinas, y por tanto tiene impacto pronóstico. Los casos positivos para Zap-70 tienden a ser no mutados y tener peor pronóstico. La expresión de Zap-70 puede valorarse por citometría de flujo y también por inmunohistoquímica en material parafinado.

#### **MYC**

La translocación de MYC con el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (y en algunos casos con la cadena ligera) es la alteración genética característica del linfoma de Burkitt. Sin embargo esta alteración citogenética se ha descrito en otros linfomas que no cumplen criterios de Burkitt y muestran cariotipos



más complejos; por ejemplo los llamados linfomas “double hit” u otros linfomas difusos de célula grande B. Los resultados publicados sugieren que la presencia de la translocación podría conferir mayor agresividad a estos tumores y podrían ser subsidiarios de regímenes terapéuticos alternativos. Actualmente existe un anticuerpo capaz de reconocer la expresión nuclear de MYC y que podría ser utilizado como cribado inicial para seleccionar los casos con alteraciones de MYC.

### CONTROL DE CALIDAD

Todas las determinaciones analíticas del laboratorio, en especial las técnicas de inmunohistoquímica, deberían estar sometidas a un control de calidad interno y externo. El uso de controles internos es especialmente necesario para aquellos marcadores que no muestran control intrínseco en el tejido estudiado, como es ALK. Para el resto, el tejido estudiado suele contener control intrínseco, por ejemplo células del microambiente tumoral, que ayudan a discernir cuando un estudio es negativo o no valorable. No obstante, la participación en programas externos de garantía de la calidad, como el programa GCP de la SEAP, u otros como el UKNEQAS o NordiQC que permiten mantener nuestro nivel de sensibilidad y especificidad y detectar alteraciones de la normalidad antes que se produzca un error diagnóstico basado en evidencias erróneas.

Algunos programas de control de calidad como el GCP ([www.seap.es/calidad](http://www.seap.es/calidad)), permiten acceso a los mejores protocolos actualizados para cada marcador y pueden ser útiles a la hora de tomar decisiones cuando ponemos a punto un nuevo marcador en el laboratorio.

Los autores desean agradecer a Olga Balagué y Blanca González su colaboración en este capítulo.

### REFERENCIAS

1. [www.e-immunohistochemistry.info](http://www.e-immunohistochemistry.info)
2. [www.seap.es/calidad](http://www.seap.es/calidad)
3. [www.nordiqc.org](http://www.nordiqc.org)
4. [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)
5. [http://www.ihcworld.com/general\\_IHC.htm](http://www.ihcworld.com/general_IHC.htm)

### 1d. ESTUDIO CITOGÉNÉTICO-FISH

*Autor para la correspondencia: Ana Batlle López ([anabatllelopez@gmail.com](mailto:anabatllelopez@gmail.com)).*

#### 1. INTRODUCCIÓN

La citogenética es la parte de la genética que estudia la apariencia microscópica de los cromosomas y sus anomalías en la enfermedad.

El conjunto de técnicas citogenéticas ha sido y continúa siendo clave para la correcta orientación terapéutica de pacientes onco-hematológicos. Esta tecnología ha permitido detectar que determinadas entidades clínicas están en realidad compuestas por múltiples enfermedades distintas no sólo desde el punto de vista molecular sino también clínico. Esto se debe, a que existen reordenamientos genéticos y alteraciones cromosómicas recurrentes asociados con frecuencia a subtipos tumorales específicos, ayudando a establecer el diagnóstico en pacientes en los que no ha podido ser establecido por otras metodologías. Por otro lado, las alteraciones citogenéticas contribuyen decisivamente en muchos casos a establecer el pronóstico de la enfermedad e incluso determinan el tipo de tratamiento a utilizar.

La citogenética junto con biología molecular, además, constituyen en estos momentos unos de los parámetros más importantes para la correcta monitorización de la mayoría de las enfermedades hematológicas.

## 2. CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

**Definición:** Estudio de las anomalías cromosómicas en las metafases de las células neoplásicas, obtenidas de distintos tipos de muestras biológicas (ganglios linfáticos, médula ósea, sangre periférica, líquido ascítico, líquido pleural, etc.). Para la obtención de metafases con frecuencia se requiere cultivar las células in vitro con/sin la adición de estimulantes específicos (tabla 1). Una vez extraída la muestra en tubo de heparina sódica o (en su defecto de litio) sin gel, debe remitirse rápidamente a temperatura ambiente al laboratorio de citogenética siempre que sea posible cultivarse el mismo día. Si no es posible deben mantenerse a 4°C durante 24-48 horas como máximo.

Orientación diagnóstica	Tipo de muestra	Mitógeno	Horas de cultivo
Neoplasias linfoides fenotipo B de bajo grado	SP*/MO*/T	TPA	72
Neoplasias linfoides de células maduras de fenotipo B de alto grado	SP*/MO*/T	PHA	Directo-24h
Linfoma Burkitt	SP*/MO*/T*	no	directo
Leucemia de células plasmáticas/mieloma múltiple	MO*/plasmocitoma	no	72
Neoplasias linfoides fenotipo T	SP*/MO*/T	PHA	72

**Tabla 1.** \*Sólo se realizará el estudio citogenético si existe infiltración por células neoplásicas detectada por citometría de flujo/morfología. Dado que en ocasiones el resultado de la citometría-morfología puede no estar disponible el mismo día de la recepción de la muestra, se recomienda procesar la muestra, cultivarla y fijarla. El estudio de las metafases se puede posponer hasta conocer si existe infiltración en la muestra. T: tejido; las células se obtienen por disrupción mecánica. TPA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate; PHA: phyto-hemagglutinin. SP: sangre periférica, MO: médula ósea.

**Técnica:** Tras el cultivo se realiza el procesamiento de la muestra, que consiste en la detención de la mitosis en metafase mediante la adición de colcemid, la disrupción de las membranas celulares para lo cual se somete a las células a un choque hipotónico y posteriormente se procede a la fijación de las células con una solución de metanol-acético (Carnoy).

Los pellets de células en Carnoy pueden conservarse en frío (idealmente 20°) durante años. Estos pellets de Carnoy pueden utilizarse para realizar tanto el estudio de citogenética convencional como el de hibridación in situ fluorescente. Por ello, en caso de que se desconozca si la muestra presenta o no infiltración tumoral en el momento en que se recibe en el laboratorio, se recomienda parar el procesamiento en este punto. Una vez confirmada la existencia de población patológica se continuará con el procesamiento, que en el caso del estudio citogenético consiste en extensión de las células en portaobjetos, tinción generalmente con bandas G, captura y análisis de 20 metafases y elaboración de la fórmula siguiendo la nomenclatura internacional (Nomenclatura Citogenética. "An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013) (ISCN, 2013)"

**Indicaciones del estudio de citogenética convencional en patología linfoide:** Se recomienda hacer el estudio de citogenética convencional en caso de que se detecte población patológica por otros métodos (citometría de flujo en el caso de los estudios de médula ósea o sangre periférica o suspensión de células de tejido y/o morfología-inmunohistoquímica en caso de cortes de tejido) en:

1. Siempre: Neoplasias de precursores linfoides para la correcta estratificación pronóstica-terapéutica

2. Recomendable en cualquier neoplasia de células linfoides maduras, dado que puede proporcionar información en la orientación diagnóstica y terapéutica (identificación de dianas moleculares). En pacientes con sospecha de linfoma de Burkitt la presencia de un cariotipo complejo debe hacernos dudar de éste diagnóstico.

Ventajas y limitaciones del estudio de citogenética convencional	
<b>VENTAJAS</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Da información de todo el genoma.</li> <li>• Proporciona información global del genoma</li> <li>• Coste medio-bajo</li> </ul>	
<b>LIMITACIONES</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se necesitan metafases (células en división)</li> <li>• Se requiere buena calidad de las metafases para realizar un estudio citogenético concluyente.</li> <li>• No detecta cambios genéticos crípticos (&lt;5Mb).</li> <li>• No permite la identificación de cromosomas marcadores y de las anomalías complejas.</li> <li>• Baja sensibilidad</li> </ul>	

### 3. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH):

**Definición:** Técnica que permite detectar/estudiar secuencias específicas de ADN sobre células o núcleos en metafase o interfase, permitiendo identificar determinadas anomalías numéricas y/o estructurales en las muestras analizadas. Se basa en la hibridación del genoma celular con sondas (oligonucleótidos de DNA o RNA) marcadas con fluorocromos por complementariedad de las bases nitrogenadas.

**Tipos de muestras:** Se puede realizar en una gran variedad de muestras:

- Pellets de carnoy procesados para el estudio citogenético,
- Sangre periférica (tanto en tubo de EDTA como de heparina sódica/litio)
- Médula ósea (tanto en tubo de EDTA como de heparina sódica/litio)
- Líquidos biológicos (ascítico, pleural, LCR, etc que deben ser enviados en fresco lo antes posible al laboratorio, idealmente antes de que transcurran 6 horas desde su extracción)
- Frotis de sangre periférica (incluso previamente teñidos)
- Poblaciones separadas por métodos inmuno-magnéticos o de citometría (sorter). La separación de la población patológica permite incrementar la sensibilidad del estudio.
- Tejido:
  - **Tejido fijado en parafina o en muestras fijadas en formol;** los cortes deben de ser de 2-4µ. Se debe indicar si la muestra procede de bloque de parafina o si ha sido fijada con formol, así como el tiempo que ha transcurrido desde su fijación, ya que el pretratamiento de la muestra puede variar en función de esas variables. El tiempo requerido de digestión proteica también varía en función del grosor del tejido, siendo en ocasiones necesario repetir el proceso en caso de hibridación fallida. El tiempo de digestión puede controlarse haciendo una visualización al microscopio. En aquellos casos en los que la infiltración sea parcheada, es importante que se delimiten claramente las áreas tumorales. El estudio sobre tejido fijado tiene la ventaja de permitir estudiar las anomalías manteniendo la estructura tumoral y se puede realizar con muestras pequeñas. Como desventaja tiene que se produce solapamiento de núcleos, que puede producir falsas imágenes de fusión y la existencia de núcleos incompletos, dos aspectos que explican que la sensibilidad de la técnica sea menor en este tipo de muestras (tabla 2)
  - **Improntas o mediante la obtención de las células en una suspensión por disrupción mecánica** (este procesamiento permite realizar a partir de la misma muestra el estudio de cariotipo y de FISH,

siempre que exista celularidad suficiente). La realización del estudio en improntas o en células en suspensión tiene la ventaja de permitir el estudio sobre células completas sin superposición celular lo que aumenta notablemente la sensibilidad del estudio; tabla 2)

**Técnica:** la muestra de ADN (cromosomas metafásicos o núcleos en interfase) se desnaturaliza, proceso que separa las hebras complementarias de la estructura en doble hélice del ADN. A la muestra desnaturalizada se le añade la sonda de interés, marcada con un fluoróforo, que se asociará al ADN de la muestra en el sitio diana, proceso denominado hibridación. La señal emitida por la sonda se observa mediante un microscopio de fluorescencia, siendo posible clasificar el patrón de ADN en función de la presencia o ausencia de la señal.

**Tipos de sondas:**

- **Sonda centromérica (CEP)** Las sondas CEP reconocen secuencias cromosoma-específicas de ADN satélite altamente repetido, normalmente localizado en la región centromérica del cromosoma. Estas sondas permiten la identificación y enumeración de cromosomas en células en interfase y en metafase. Existen sondas centroméricas de todos los cromosomas.
- **Sondas específicas del locus:** Las sondas para la detección de deleciones son sondas específicas para el locus o región de deleción y suelen incluir una sonda control para la identificación exacta del cromosoma de interés. Ejemplo de estas sonda:
  - LSI TP53 SpectrumOrange/ CEP 17 SpectrumGreen: Esta sonda permite estudiar la deleción del p53, anomalía que potencialmente puede encontrarse en cualquier tumor y cuya presencia suele condicionar un pronóstico muy desfavorable.
- **Sondas Dual Color Dual fusión:** Las sondas dual color dual fusion emplean una sonda específica para cada uno de los loci involucrados en la translocación marcados con diferentes fluorocromos, de tal manera que la presencia de dicha translocación producirá una yuxtaposición de señales (roja y verde juntas o color amarillo) si existe reordenamiento. Debido a que en tejido existe gran superposición celular, las sondas dual color dual fusion presentan el inconveniente de poder dar lugar a falsos positivos por la colocalización de señales al azar en núcleos en interfase. Es por ello que en este tipo de muestras es preferible utilizar sondas break apart.

Ejemplo de esta sonda:

- LSI **t(8;14)(q24;q32)**[*IgH-MYC*]. La t(8;14)(q24;q32) que se detecta en aproximadamente el 80% de los linfomas de Burkitt, conlleva la yuxtaposición del oncogén *MYC* (8q24) al gen de *IgH* (14q32). El método de elección para detectar este reordenamiento es la FISH debido a la variabilidad en los puntos de rotura.
- LSI **t(11;18)(q21;q21)**[*API2-MALT*]. Este reordenamiento es el más frecuentemente detectado en el linfoma MALT, sobre todo en los de afectación pulmonar y gástrica. En el linfoma MALT gástrico, esta translocación se asocia con falta de respuesta al tratamiento con antibióticos. El método de elección para detectar este reordenamiento es la FISH por requerir poca muestra, poder realizarse directamente sobre biopsias endoscópicas incluidas en parafina y sobre todo debido a la variabilidad en los puntos de rotura.
- LSI **t(11;14)(q13;q32)** [*IGH-CICLINA D1*] es el marcador genético característico del linfoma del manto, aunque puede encontrarse también en mielomas. La técnica de elección para detectar este reordenamiento es la técnica de FISH, ya que por PCR sólo se detecta la mitad de los casos debido a la gran variabilidad de los puntos de ruptura.
- LSI **t(14;18)(q32;q21)** [*IGH-BCL2*] se encuentra en alrededor del 90% de los linfomas foliculares, en aproximadamente el 30% de los linfomas B difusos de células grandes y también se detecta en un porcentaje variable de linfomas de características intermedias entre LBDCG y LB. Los puntos de ruptura del gen *BCL2* se ubican generalmente en dos regiones clásicas, el MBR ("major breakpoint region") o, más raramente, MCR ("minor cluster region"). Sin embargo, en un 30-40% de los casos de linfoma folicular el punto de rotura se sitúa en otras regiones. Debido a la variabilidad en los puntos de ruptura el método de elección para el diagnóstico es la FISH.

- **Sondas break apart:** Las sondas "split", van dirigidas contra regiones que flanquean el punto de rotura de un mismo gen; por tanto, en núcleos normales las señales se yuxtaponen, mientras que aparecen señales separadas en núcleos que portan alguna translocación que afecte dicho gen. Como inconveniente, este tipo de sondas no permiten conocer que otro gen está involucrado en la traslocación. Las sondas "split" son muy útiles para el estudio de translocaciones en los que los genes diana presentan múltiples posibles "partners".

Ejemplos de estas sondas:

- *LSI MYC Dual Color Break Apart:* esta sonda permite evaluar la existencia de reordenamiento del gen MYC independientemente del "partner". MYC se encuentra reordenado en  $\approx 100\%$  de los linfomas de Burkitt (aunque se han descrito falsos negativos de un 10% mediante técnica de FISH). También se encuentra reordenado en otros tipos de neoplasias linfoides B maduras, (linfomas de características intermedias entre linfoma de Burkitt y LBDCG, Leucemia linfática crónica/linfoma linfocítico, LBDCG, Linfoma plasmablastico, etc) generalmente implicando un pronóstico desfavorable.
- *LSI BCL6 Dual Color Break Apart:* El gen BCL6 se encuentra fundamentalmente reordenado en 30-40% de los LBDCG, en algunos linfomas de características intermedias entre LBDCG y Linfoma de Burkitt (generalmente asociado a reordenamientos del gen MYC y/o BCL2) y en algunos linfomas foliculares. Se han descrito una gran cantidad de "partners" diferentes, por lo que el método de elección para su detección es la FISH, utilizando esta sonda de tipo "split"
- *LSI ALK Break apart:* Este reordenamiento permite detectar reordenamientos del gen ALK, detectados en algunos tipos de linfomas anaplásicos, y en linfoma "ALK-positive large B cell Lymphoma". La identificación de esta anomalía es de especial interés debido a que existen en la actualidad inhibidores frente al ALK que están en fase de ensayo clínico.
- *LSI BCL2:* Reordenamientos que implican a esta región se observan en varios tipos de linfomas, incluyendo el linfoma folicular. El reordenamiento del BCL2 es un parámetro importante para el diagnóstico diferencial de linfomas no - Hodgkin. Esta sonda permite detectar reordenamiento del gen BCL2, independientemente del "partner implicado". Es la sonda de elección en tejido y en casos de linfomas de características intermedias entre LBDCG y LB, ya que en éstos el "partner" con frecuencia no es la IGH
- *Otros ejemplos: LSI IGH , LSI MALT, etc*

Tipo de sondas	Anomalía a estudio	Punto corte en células en suspensión	Punto corte en células en tejido
<b>Sonda centromérica (CEP)</b>	Monosomía	8-10%	25-50%
	Ganancias	1.5-2%	5-8%
<b>Sondas específicas de locus con control interno</b>	Deleción	6-10%	25-50% (ratio R/G<0.9)
<b>Sondas dual color dual fusion</b>	Reordenamiento	0,5% (400 núcleos); 0,005% (6.000 núcleos)	10-20%**
<b>Sonda break apart</b>	Reordenamiento	1% (400 núcleos); 0,01% (6.000 núcleos)	8-10%**

\*Los puntos de corte de cada sonda deben establecerse en cada laboratorio utilizando 10-20 muestras de individuos sanos.\*\* En linfomas el punto de corte es más alto debido a que la frecuencia de patrones aberrantes es muy elevado

Ventajas y limitaciones del estudio de FISH	
<b>VENTAJAS</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método rápido</li> <li>• Requiere poca celularidad (idealmente un mínimo de 100-200 núcleos)</li> <li>• Se puede realizar a partir de una gran variedad de muestras diferentes. Al igual que la PCR, la FISH se puede realizar sobre tejido fijado</li> <li>• A diferencia del cariotipo puede realizarse en núcleos interfásicos</li> <li>• Permite identificar reordenamientos crípticos o de difícil visualización en el cariotipo</li> <li>• Técnica de elección para la búsqueda de reordenamientos de genes “promiscuos” o con puntos de ruptura variables (frecuente en neoplasias linfoides maduras) o con patrones aberrantes</li> <li>• A diferencia de la PCR permite detectar ganancias o amplificaciones, alteraciones frecuentemente detectadas en linfomas (estas anomalías se visualizan más fácilmente en improntas ganglionares o en células en suspensión)</li> </ul>	
<b>LIMITACIONES</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere un microscopio de fluorescencia</li> <li>• Es un estudio dirigido</li> <li>• No da información de todo el genoma.</li> <li>• Coste intermedio</li> <li>• Sensibilidad intermedia (dependiendo del tipo de sonda y del tipo de muestra)</li> </ul>	

**Indicaciones:** Se recomienda hacer el estudio de FISH sólo en caso de que se detecte población patológica por otros métodos (citometría de flujo en el caso de los estudios de médula ósea o sangre periférica o suspensión de células de tejido y/o inmunohistoquímica en caso de cortes de tejido) en un porcentaje suficiente de células como para ser detectado mediante técnica de FISH (Tabla 2). Además, el panel de sondas a utilizar en cada caso dependerá del subtipo histológico (especificados en capítulos específicos).

Existen anomalías genéticas específicas concretas cuyo estudio se requiere para la adecuada orientación diagnóstica y/o pronóstica de los pacientes con neoplasias linfoides.

#### 4. OTRAS TÉCNICAS DE ESTUDIO CITOGÉNÉTICO

**4.1. Cariotipo multicolor:** técnica que consiste en marcar el ADN de un cromosoma con uno o varios fluorocromos, de tal forma que el espectro de emisión de cada cromosoma sea único. Cada cromosoma por tanto aparecerá de un color específico. No permite detectar deleciones, inversiones ni duplicaciones intracromosómicas. Es útil para identificar que cromosomas estén implicados en los cromosomas marcadores o en las traslocaciones cromosómicas. Requiere metafases. En el momento actual esta técnica sólo se utiliza en investigación.

**4.2. Hibridación genómica comparada:** Método de análisis de cambios en el número de copias (ganancias/pérdidas) en el contenido de ADN de un tejido con respecto a un ADN de referencia. Para ello primero se realiza la hibridación del ADN del tejido tumoral, generalmente utilizando sondas marcadas con FITC y del ADN normal marcado con Rodamina o Texas Red. Ambos ADNs se mezclan en cantidades equimolares y se realiza la hibridación sobre los arrays. Posteriormente se evalúan las diferencias regionales de fluorescencia, identificando regiones anormales del genoma utilizando complejos sistemas informáticos. Existen diferentes tipos de arrays: los de BACs y los de oligonucleótidos. En la actualidad esta metodología se está incorporando a la rutina como complemento al cariotipo convencional. Es posible que en determinadas patologías esta técnica sustituya a la FISH.

## RECOMENDACIONES

1. El estudio de FISH es recomendable en todos los casos, siempre que exista muestra suficiente para contribuir a la orientación diagnóstica, pronóstica y terapéutica de los pacientes con neoplasias linfoides. Para entidades específicas (p ej linfoma de Burkitt) es un dato necesario al diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV
2. El estudio de FISH deberá orientarse en función del diagnóstico histopatológico. Grado C. Evidencia nivel IV
3. En muestras de tejido, la sonda break-apart es la sonda de elección para estudiar reordenamientos, ya que las sondas dual color dual fusion tienen una alta tasa de falsos positivos y elevada variabilidad interobservador. Grado C. Evidencia nivel IV
4. Se recomienda hacer el estudio de citogenética convencional en todo caso de neoplasias de precursores linfoides para la correcta estratificación pronóstica-terapéutica. En los casos de neoplasias linfoides maduras es deseable pero no estrictamente necesario. Grado C. Evidencia nivel IV

## REFERENCIAS

1. Rowley JD. Cytogenetic analysis in leukemia and lymphoma: an introduction. *Semin Hematol.* 2000 Oct;37(4):315-9. Review
2. Nussbaum R, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 7th edition. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2007.
3. Guía de recomendaciones para el diagnóstico genético y seguimiento de las neoplasias hematológicas, 2011. Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH) y el Grupo de Biología Molecular en Hematología (GBMH).
4. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M (eds). ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: Karger; 2013.
5. Heim S, Mitelman F (eds). Cancer Cytogenetics. 3th edition. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2009.
6. Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, Rao KW, Rao PN. Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. *J Mol Diagn.* 2007 Apr;9(2):134-43.
7. Schwaenen C1, Nessling M, Wessendorf S, Salvi T, Wrobel G, Radlwimmer B, Kestler HA, Haslinger C, Stilgenbauer S, Döhner H, Bentz M, Lichter P. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 27;101(4):1039-44
8. Swerdlow SH, Campos E, Harris LN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid Tissues. 2008. ARC ISBN-13 9789283224310
9. Sun T, Nordberg ML, Cotelingam JD, Veillon DM, Ryder J. Fluorescence in situ hybridization: method of choice for a definitive diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Hematol* 2003; 74: 78-84
10. Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Grote W, Siebert R. Interphase cytogenetics of hematological neoplasms under the perspective of the novel WHO classification. *Anticancer Res* 2003; 23: 1139-48
11. Sreekantaiah C. FISH panels for hematologic malignancies. *Cytogenet Genome Res.* 2007;118(2-4):284-96.

**1e. ESTUDIO MOLECULAR.**

Autor para la correspondencia: *Santiago Montes Moreno*. [smontes@humv.es](mailto:smontes@humv.es)

**1. DEFINICIÓN:**

Se incluyen aquí técnicas de detección de alteraciones genéticas basadas en PCR que identifican mutaciones y/o reordenamientos génicos. Este es un campo en continua expansión en el ámbito experimental, especialmente a partir del desarrollo de técnicas de secuenciación masiva. Se incluye un detalle de las diferentes determinaciones y la evidencia disponible que apoya su uso en diagnóstico clínico.

**2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNÓSTICO**

Las técnicas de análisis molecular se basan en la detección de alteraciones en el ADN, esencialmente mutaciones puntuales y reordenamientos. La calidad del ADN extraído de una muestra es variable en función del procesamiento que haya sufrido. Así, el ADN obtenido de muestras en fresco o criopreservadas en medio OCT (incluyendo muestras de tejido, aspirado de médula ósea y sangre periférica) es superior al ADN obtenido de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. Esto obliga a realizar un control de calidad del ADN previo a cualquier determinación molecular que valore la integridad del mismo. El protocolo recomendado mide la amplificación de fragmentos de ADN de tamaño conocido (100-400 pb)(1, 2). Existen otros protocolos basados en la amplificación de genes concretos (por ejemplo p53).

**3. TIPOS DE ESTUDIO MOLECULAR Y METODOLOGÍA DISPONIBLE.**

Análisis de clonalidad linfoide B y T.

Estudio de reordenamientos de BCL2 y CCDN1 mediante PCR.

Estudio de la mutación L265P de MYD-88.

Estudio de la mutación V600E de BRAF.

Otras determinaciones moleculares de potencial utilidad clínica.

**Análisis de clonalidad linfoide B y T.**

En la mayoría de los casos con sospecha de proceso linfoproliferativo el estudio histopatológico y citomorfológico, complementado con inmunohistoquímica y citometría de flujo permite discriminar entre procesos benignos y malignos y, en caso de ser neoplásico, subclasificar el tipo de neoplasia según la OMS. No obstante en 5-10% de los casos los hallazgos histopatológicos no son convincentes o existe una discordancia clínico-patológica. El diagnóstico de neoplasia linfoide se puede apoyar en la identificación de clonalidad ya que >98% de las neoplasias linfoides contienen receptores de inmunoglobulina (Ig) y/o receptor de células T (TCR) reordenados de forma clonal (2, 3). Existen protocolos técnicos e interpretativos estandarizados a nivel europeo por el grupo Euroclonality/Biomed2 que son los que recomienda esta guía (1, 2). Estas recomendaciones estandarizan las condiciones técnicas del ensayo (sets de cebadores recomendados, condiciones de amplificación y control de calidad del ADN, electroforesis capilar y análisis de resultados), así como la interpretación de los mismos y su incorporación a un informe de diagnóstico molecular (1). Este informe de diagnóstico molecular debe ser integrado al informe de diagnóstico histopatológico como un estudio complementario y así tenido en cuenta en el contexto del caso en el diagnóstico definitivo. En este punto es esencial tener en cuenta las limitaciones de sensibilidad de la técnica por un lado y, por otro lado, que la presencia de poblaciones clonales no es suficiente para un diagnóstico de proceso linfoproliferativo.

**Paneles de identificación de clonalidad linfoide:**

En el caso de sospecha de linfoproliferativo de línea B:

**Panel de primera línea:** Clonalidad de IgHVH-JH (3 tubos, FR1, FR2, FR3), preferiblemente con estudio de IGK Vk-Jk e IGK Kde (2 tubos).



**Panel de segunda línea** (si no se detecta clonalidad pero aún se sospecha): IGH DH-JH e IGL (2 tubos).

En el caso de sospecha de linfoproliferativo de línea T:

**Panel de primera línea:** Clonalidad de TCRB V $\beta$ -J $\beta$ , TCRB D $\beta$ -J $\beta$  (3 tubos), preferiblemente con estudio de TCRG (2 tubos).

**Panel de segunda línea** (en caso de sospecha de linfoproliferativo T  $\gamma\delta$ ): TCRD (1 tubo).

En el caso en que no se tenga una sospecha precisa acerca de la línea del linfoproliferativo se deberían aplicar los dos paneles de primera línea.

#### **Estudio de reordenamientos de BCL2 y CCDN1 mediante PCR.**

El gold-estándar para el análisis de reordenamientos de BCL2 y ciclinaD1 es el FISH de interfase utilizando sondas de tipo break-apart con sondas flanqueando el punto de rotura (véase capítulo correspondiente). Estas sondas de FISH se pueden utilizar en material fresco o congelado así como fijado en formol e incluido en parafina (4). Las técnicas basadas en PCR son, por lo general, de menor sensibilidad y pueden ser de utilidad para la monitorización de enfermedad mínima residual (2).

#### **Estudio de la mutación de MYD88- L265P.**

La presencia de la mutación L265P en el gen MYD-88 se ha descrito asociada a la enfermedad de Waldenström, gammapatía monoclonal de significado incierto de tipo IgM, un porcentaje de casos de linfoma B linfoplasmacítico y aislados casos de otros tipo de linfoma B de célula pequeña (SMZL, entre otros) (5-7). No se encuentra en casos de mieloma múltiple. Asimismo se encuentra en un porcentaje apreciable de casos de LBDCG NOS, especialmente de tipo ABC (8, 9) y la variante de Linfoma B difuso de célula grande de tipo piernas ("leg type")(10, 11). La detección de la mutación MYD88/L265P se ha demostrado de utilidad en el diagnóstico diferencial de procesos linfoproliferativos B de bajo grado en muestras de MO(12) de modo que su presencia apoya el diagnóstico de LPL en casos de linfoma B de bajo grado inclasificable.

El estudio de mutaciones de MYD88 se puede realizar con técnicas de Sanger convencional (sensibilidad ~ 10%) o PCR cuantitativa convencional o alelo específica (sensibilidad ~ 0,1%) (6).

#### **Estudio de la mutación de BRAF-V600E.**

La presencia de la mutación V600E en el gen BRAF es la marca genética de la leucemia de células peludas (LCP) encontrándose en virtualmente todos los casos de este tipo de linfoproliferativo y en muy aislados casos de los linfoproliferativos B de bajo grado que la simulan (linfoma esplénico y tricoleumia variante) (13-15). Asimismo se ha encontrado en histiocitosis de células de Langerhans (~60%), sarcoma histiocítico (~60%) y en la enfermedad de Erdheim-Chester (~60%)(16-19). Esta mutación es un potencial marcador de terapia dirigida en LCP y procesos histiocitarios (20, 21).

El estudio de la mutación de BRAFV600E se puede realizar con técnicas de Sanger convencional (sensibilidad ~ 10%), PCR cuantitativa convencional o alelo específica (sensibilidad ~ 0,1%)(22). Existe asimismo un anticuerpo específico de la mutación (clon VE1) que es válido en muestras FFIP, incluso tras procesos de decalcificación (17, 23).

#### **Otras determinaciones moleculares de potencial utilidad clínica.**

Otras determinaciones moleculares de potencial utilidad clínica son el estudio de perfiles de expresión génica y análisis de mutaciones específicas derivadas de los estudios de secuenciación masiva.

El análisis de perfiles de expresión génica ha permitido identificar las dos variantes moleculares del LBDCG (subtipos GCB y ABC). Esta subclasificación utiliza la información de la expresión de 375 genes para subclasificar los casos en las formas GCB y ABC (24). Existen, hasta la fecha, varios modelos pronósticos basados en la expresión de grupos seleccionados de estos genes que contienen 100(25), 27(26) o 15(27) genes y permiten subclasificar los casos en las formas GCB, ABC o tipo 3 (inclasificable, (~10% de los casos)). Los últimos kits de diagnóstico molecular (Lymph2Cx) utilizando la tecnología Nanostring permiten la subclasificación

molecular utilizando tejido FFIP (27). Actualmente estos productos se encuentran en fase experimental y su uso está restringido a estudios moleculares en ensayos clínicos.

También se ha descrito un perfil molecular del linfoma de Burkitt basado en análisis de la expresión génica(28, 29). El linfoma de Burkitt molecular se caracteriza por sobreexpresión de genes relacionados con MYC y cariotipos simples con translocaciones de C-MYC como única anomalía citogenética. La correlación del perfil molecular con la morfología es baja y actualmente no se aplica para diagnóstico rutinario.

Recientemente la disponibilidad de técnicas de secuenciación masiva está permitiendo identificar genes recurrentemente mutados en diferentes condiciones neoplásicas que podrían ser de utilidad en el diagnóstico y otros con potencial aplicación en la selección de terapia o pronósticos. Así, dentro del primer grupo estarían la mutación de BRAFV600E en tricoleucemia (13), y las mutaciones de MYD88/L265P en enfermedad de Waldstrom(7) y la mutación de ID3 en linfoma de Burkitt(30). Otras mutaciones de potencial interés en la clínica son las mutaciones de SF3B1 y NOTCH1 que en leucemia linfocítica crónica se asocian con una enfermedad rápidamente progresiva y menores supervivencias globales (31, 32). Asimismo, en otras patologías como LBDCG se encuentra que una acumulación de mutaciones en las vías de NFkB, JAK/STAT y BCR (8, 9, 33-35) que ya son la base de terapias dirigidas en el contexto de ensayos clínicos(36, 37).

#### 4. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudio de clonalidad linfoide B y/o T en casos de discordancia entre los resultados de la morfología y el estudio inmunohistoquímico, especialmente si existe alta sospecha clínica de proceso linfoproliferativo. Grado C. Evidencia nivel IV
2. Realizar los paneles de primera línea completos de estudio de clonalidad B y/o T en los casos en los que esté indicado. Grado B, nivel de evidencia III
3. Poner en contexto morfológico y fenotípico los resultados del estudio de clonalidad. No emitir un diagnóstico de proceso linfoproliferativo basado exclusivamente en el resultado molecular en ausencia de evidencia morfológica y fenotípica (especialmente en lesiones cutáneas o muestras de SP/MO). Grado B, nivel de evidencia III
4. La realización del análisis del estudio de clonalidad y su interpretación debe seguir las recomendaciones internacionales disponibles (1). Si no se dispone de la tecnología o experiencia suficiente derivar el caso a un centro de referencia. Grado C. Evidencia nivel IV
5. No realizar estudio de reordenamientos de BCL2 y CCND1 mediante PCR con fines diagnósticos. El gold-estándar para el análisis de reordenamientos de BCL2 y ciclinaD1 es el FISH de interfase. Grado B, nivel de evidencia III
6. Realizar estudio de mutaciones de MYD88-L265P en casos de sospecha morfológica y fenotípica de linfoma B linfoplasmacítico, especialmente en casos de linfoma B de bajo grado clasificable. Grado B, nivel de evidencia III
7. Realizar estudio de mutaciones de BRAF-V600E en casos de sospecha de leucemia de células peludas y procesos histiocitarios (histiocitosis de células de Langerhans, enfermedad de Erdheim Chester y Sarcoma histiocítico). Grado B, nivel de evidencia III

#### REFERENCIAS:

1. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012 Oct;26(10):2159-71.
2. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2257-317.

3. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
4. Haralambieva E, Kleiverda K, Mason DY, Schuurin E, Kluijn PM. Detection of three common translocation breakpoints in non-Hodgkin's lymphomas by fluorescence in situ hybridization on routine paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol.* 2002 Oct;198(2):163-70.
5. Jimenez C, Sebastian E, Chillon MC, Giraldo P, Mariano Hernandez J, Escalante F, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenstrom's macroglobulinemia. *Leukemia.* 2013 Aug;27(8):1722-8.
6. Xu L, Hunter ZR, Yang G, Zhou Y, Cao Y, Liu X, et al. MYD88 L265P in Waldenstrom macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood.* 2013 Mar 14;121(11):2051-8.
7. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med.* 2012 Aug 30;367(9):826-33.
8. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Mar;109(10):3879-84.
9. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet.* 2011 Sep;43(9):830-7.
10. Pham-Ledard A, Prochazkova-Carlotti M, Andrique L, Cappellen D, Vergier B, Martinez F, et al. Multiple genetic alterations in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type support a common lymphomagenesis with activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 2014 Mar;27(3):402-11.
11. Pham-Ledard A, Cappellen D, Martinez F, Vergier B, Beylot-Barry M, Merlio JP. MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol.* 2012 Aug;132(8):2118-20.
12. Ondrejka SL, Lin JJ, Warden DW, Durkin L, Cook JR, Hsi ED. MYD88 L265P somatic mutation: its usefulness in the differential diagnosis of bone marrow involvement by B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* 2013 Sep;140(3):387-94.
13. Tacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med.* 2011 Jun 16;364(24):2305-15.
14. Trifa AP, Popp RA, Cucuianu A, Coadă CA, Urian LG, Militaru MS, et al. Absence of BRAF V600E mutation in a cohort of 402 patients with various chronic and acute myeloid neoplasms. *Leuk Lymphoma.* 2012 Dec;53(12):2496-7.
15. Ping N, Wang Q, Wang Q, Dong S, Wu L, Xue Y, et al. Absence of BRAF V600E mutation in hematologic malignancies excluding hairy-cell leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2012 Dec;53(12):2498-9.

16. Haroche J, Charlotte F, Arnaud L, von Deimling A, Helias-Rodzewicz Z, Hervier B, et al. High prevalence of BRAF V600E mutations in Erdheim-Chester disease but not in other non-Langerhans cell histiocytoses. *Blood*. 2012 Sep 27;120(13):2700-3.
17. Mehes G, Irsai G, Bedekovics J, Beke L, Fazakas F, Rozsa T, et al. Activating BRAF V600E Mutation in Aggressive Pediatric Langerhans Cell Histiocytosis: Demonstration by Allele-specific PCR/Direct Sequencing and Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2014 Aug 12.
18. Go H, Jeon YK, Huh J, Choi SJ, Choi YD, Cha HJ, et al. Frequent detection of BRAF(V) (600E) mutations in histiocytic and dendritic cell neoplasms. *Histopathology*. 2014 Aug;65(2):261-72.
19. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, MacConaill LE, Brandner B, Calicchio ML, et al. Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2010 Sep 16;116(11):1919-23.
20. Dietrich S, Glimm H, Andrulis M, von Kalle C, Ho AD, Zenz T. BRAF inhibition in refractory hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2012 May 24;366(21):2038-40.
21. Haroche J, Cohen-Aubart F, Emile JF, Arnaud L, Maksud P, Charlotte F, et al. Dramatic efficacy of vemurafenib in both multisystemic and refractory Erdheim-Chester disease and Langerhans cell histiocytosis harboring the BRAF V600E mutation. *Blood*. 2013 Feb 28;121(9):1495-500.
22. Tiacchi E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, Ambrosetti A, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood*. 2012 Jan 5;119(1):192-5.
23. Andrulis M, Penzel R, Weichert W, von Deimling A, Capper D. Application of a BRAF V600E mutation-specific antibody for the diagnosis of hairy cell leukemia. *Am J Surg Pathol*. 2012 Dec;36(12):1796-800.
24. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000 Feb;403(6769):503-11.
25. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002 Jun 20;346(25):1937-47.
26. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Aug;100(17):9991-6.
27. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih CJ, Walsh W, Jaffe ES, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*. 2014 Feb 20;123(8):1214-7.
28. Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med*. 2006 Jun;354(23):2431-42.
29. Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*. 2006 Jun;354(23):2419-30.

30. Love C, Sun Z, Jima D, Li G, Zhang J, Miles R, et al. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat Genet.* 2012 Dec;44(12):1321-5.
31. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2012 Jan;44(1):47-52.
32. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Beà S, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia.* 2013 Apr;27(5):1100-6.
33. Zhang J, Grubor V, Love CL, Banerjee A, Richards KL, Mieczkowski PA, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jan;110(4):1398-403.
34. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. SnapShot: diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2014 Jan 13;25(1):132-e1.
35. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature.* 2011 Aug;476(7360):298-303.
36. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature.* 2010 Jan;463(7277):88-92.
37. Wyndham H, Wilson M, et al. The Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor, Ibrutinib (PCI-32765), Has Preferential Activity in the ABC Subtype of Relapsed/Refractory De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Interim Results of a Multicenter, Open-Label, Phase 2 Study. *Blood.* 54th ASH Annual Meeting Abstracts, 2012.

## 1f. INFORME DIAGNÓSTICO

Autor para la correspondencia: *Santiago Montes Moreno* ([smontes@humv.es](mailto:smontes@humv.es))

El informe de diagnóstico anatomopatológico debe resumir e integrar todos los hallazgos obtenidos de la muestra de forma estructurada. Existen referencias de otras sociedades científicas que utilizan protocolos de informe con un formato predefinido o checklist<sup>1</sup>. En esta guía se propone sucintamente la estructura y el contenido de un informe de diagnóstico histopatológico de patología hematolinfóide.

**DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:** Se debe especificar el tipo de tejido recibido (ganglio linfático, médula ósea, bazo, otro tejido extraganglionar) y el formato de la muestra (biopsia escisional, incisional, de tipo punción-biopsia con aguja gruesa, PAAF, biopsia y aspirado de MO, pieza de esplenectomía, otros). Se debe consignar si la muestra se recibe en fresco o ya sumergida en algún medio de fijación. Asimismo deben constar las dimensiones máximas de la muestra en caso de biopsia y el tipo de procesamiento (fijación en formol e inclusión en parafina, otros). Si se destina muestra para estudios complementarios (CMF, cariotipo, FISH, molecular) o se incluye parte de la muestra excedente en Biobanco se debe hacer constar en este apartado.

**DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:** Incluye un primer apartado de descripción del patrón histopatológico y de las características citomorfológicas del tejido. En un segundo apartado se deben hacer constar los resultados del estudio inmunohistoquímico.

**DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO:** Incluye el término diagnóstico de acuerdo con la actual clasificación de la OMS de neoplasias del sistema hematopoyético<sup>2</sup>.

**NOTAS:** En este apartado es deseable incluir comentarios relativos a la interpretación de los estudios complementarios en el contexto del diagnóstico histopatológico del caso. Esto es especialmente relevante en lo relativo a los resultados de molecular (clonalidad linfoide, mutaciones puntuales) y de FISH/citogenética, habitualmente de relevancia diagnóstica y pronóstica.

Asimismo es el espacio conveniente para incluir comentarios acerca del diagnóstico histopatológico en el contexto de los datos clínicos y otros datos de laboratorio proporcionados por el clínico solicitante u obtenidos de la historia clínica.

**ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS:** En este apartado se debe incluir el resultado detallado de los diferentes estudios complementarios al diagnóstico realizados sobre el material recibido. Esto incluye resultados de molecular, FISH/citogenética o CMF. En el caso de que estos estudios se realicen en un laboratorio distinto al que genera el informe de anatomía patológica se recomienda incluir la información contenida en dicho informe y hacer referencia al laboratorio y personal responsable del análisis. En todo caso los resultados de los estudios complementarios deben integrarse en el cuerpo principal del informe anatomopatológico y si es preciso realizar algún comentario o interpretación sobre los mismos detallarse en el apartado de notas, junto al diagnóstico principal.

## **REFERENCIAS**

1. Hussong JW, Arber DA, Bradley KT, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with non-Hodgkin lymphoma/lymphoid neoplasms. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(6):e40-47.
2. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.*; 2008.

## 2. LINFOMAS B NO HODGKIN.

### 2a. LINFOMAS B INDOLENTES.

#### LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA/ LINFOMA LINFOCÍTICO.

Autor para la correspondencia: José Luis Villar ([jlwillar@us.es](mailto:jlwillar@us.es))

#### DEFINICIÓN, EPIDEMIOLOGÍA Y RASGOS CLÍNICOS

Neoplasia linfoide que se caracteriza por la proliferación clonal y gradual acumulación de linfocitos B pequeños CD23 y CD5 positivos en la sangre, médula ósea, bazo y ganglios linfáticos.

Dos formas de presentación clínica:

- \* **Leucemia linfocítica (linfática) crónica (LLC)**, que se define por la presencia de linfocitosis en sangre periférica de  $\geq 5 \times 10^9/L$  linfocitos B monoclonales con morfología y fenotipo de LLC, durante al menos tres meses.
- \* **Linfoma linfocítico (LL)**, que exige para su diagnóstico la afectación de territorios linfoides (generalmente ganglios linfáticos) por linfocitos B monoclonales con las mismas características morfológicas e inmunofenotípicas de la LLC, unos valores de linfocitos en sangre  $< 5 \times 10^9/L$  y la ausencia de citopenias debidas a la infiltración de la médula ósea.

Si la cifra de linfocitos monoclonales en sangre es  $< 5 \times 10^9/L$  y no hay afectación de territorios linfoides, citopenias ni síntomas relacionados con la enfermedad el diagnóstico debe ser *linfocitosis B monoclonal con fenotipo de LLC*.

En occidente es la leucemia más común de los adultos (sobre todo en la 7ª década de la vida); ligeramente más frecuente en hombres.. La LLC/LL tiene una elevada predisposición genética. Hay una predisposición familiar a la enfermedad, con un riesgo estimado de 2-7 veces superior en familiares de primer grado de pacientes con LLC/LL.

La LLC/LL es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista clínico, con presentación, curso clínico y evolución muy variables (1, 2).

#### Presentación clínica

- Leucemia ( $\geq 5 \times 10^9/L$  de linfocitos monoclonales en sangre), generalmente asintomática, pero que puede cursar con astenia (a veces sin relación con el grado de actividad), síndrome anémico (por infiltración medular, secuestro esplénico o anemia hemolítica autoinmune) e infecciones.
- Es frecuente la infiltración temprana de los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado, y con ella la aparición de hepatoesplenomegalia y adenopatías.
- Es menos frecuente la afectación de otros territorios extramedulares. De éstos, los que se afectan con mayor frecuencia son: el sistema nervioso central (SNC), el tubo digestivo y la piel (*Cramer, et al 2014*).
- En un reducido porcentaje de casos hay un pequeño pico monoclonal sérico de inmunoglobulinas.
- Se utiliza el término linfoma linfocítico (LL) para los casos con afectación ganglionar sin linfocitosis suficiente para el diagnóstico de LLC ( $< 5 \times 10^9/L$ ).

#### Curso clínico, respuesta al tratamiento y transformación

- La mayoría de casos de LL desarrollan afectación de la médula ósea y la sangre en el curso de la enfermedad.
- El tratamiento sólo está indicado cuando existen síntomas o signos relacionados con enfermedad activa (síntomas B, conglomerados adenopáticos de gran tamaño o adenopatías de crecimiento progresivo, esplenomegalia progresiva, citopenias progresivas o fenómenos autoinmunes refractarios al tratamiento inmunosupresor)

- Según su respuesta al tratamiento la LLC debe encuadrarse en alguna de las siguientes categorías: en remisión completa, en remisión parcial, enfermedad estable, enfermedad en progresión, enfermedad refractaria y enfermedad mínima residual.
- El 2-8% de los pacientes con LLC/LL sufre la transformación de su enfermedad: bien desarrollan un linfoma difuso de células grandes B (LBDCG), (denominado síndrome de Richter), o más raramente un linfoma de Hodgkin (<1%)(3)

### Estadaje de la enfermedad

- Se emplean dos sistemas de Binet o Rai que toma en consideración el número de territorios linfoides afectados (considerando 5 posibles áreas: cervical, axilar, inguino-femoral, bazo e hígado), los valores de hemoglobina (Hb) y la cifra de plaquetas.
- Binet: Se definen tres estadios:
  - Estadio A: Hb  $\geq 10$  g/dL, plaquetas  $\geq 100 \times 10^9/L$  y no más de dos territorios afectados.
  - Estadio B: Hb  $\geq 10$  g/dL, plaquetas  $\geq 100 \times 10^9/L$  y tres o más territorios afectados.
  - Estadio C: Hb  $< 10$  g/dL y/o plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$ , independientemente del número de territorios afectados.
- Rai modificado: se definen 3 estadios:
  - Riesgo bajo: Linfocitosis SP y MO sin otras alteraciones (antes Rai 0)
  - Riesgo intermedio linfocitosis y adenopatías, esplenomegalia y/o hepatomegalia (antes Rai I y Rai II)
  - Riesgo alto: Linfocitosis y anemia debida a la enfermedad (Hb  $< 11$  g/dL, antes Rai III) o trombocitopenia (plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$ , antes Rai IV)

Estos sistemas definen distintos grados de riesgo: bajo (Binet A, Rai 0), intermedio (Binet B, Rai I/II) y alto (Binet C; Rai III-IV). Ambos sistemas tienen limitaciones, siendo la más importante su incapacidad para predecir que pacientes en estadios iniciales tienen mayor riesgo de progresar.

En la actualidad, resulta de gran valor la diferenciación entre LLC con mutaciones o sin mutaciones en la región VH del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGHV*, véase más adelante).

## 2. TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

- En la mayoría de casos, el diagnóstico de LLC se realiza en sangre periférica en base a la cifra de leucocitos, la fórmula leucocitaria, la morfología linfocitaria observada en el frotis y el inmunofenotipo por citometría.
- La biopsia de médula ósea no es necesaria para establecer el diagnóstico y su valor pronóstico es controvertido en el momento actual. Se recomienda hacer biopsia de médula ósea en casos de:
  - Antes de iniciar un tratamiento para posteriormente ayudar en la evaluación de la respuesta al mismo.
  - Citopenias de naturaleza no aclarada, no justificadas por infiltración medular, hemólisis o causa carencial.
- La biopsia ganglionar tampoco es habitualmente necesaria, salvo en:
  - los casos que presenten dificultades diagnósticas, en especial los de presentación ganglionar, sin compromiso de SP y cuando se plantea la posibilidad de linfoma del manto
  - en aquellos casos en los que se sospeche una transformación a un linfoma agresivo (debe sospecharse si aparece deterioro del estado clínico, síntomas B, aumento de la LDH, rápido aumento del tamaño de los ganglios, aparición de lesiones extraganglionares, etc).

## 3. RASGOS HISTOPATOLÓGICOS Y HEMATOLÓGICOS

### En el ganglio linfático

- Borramiento de la arquitectura debido a un patrón de crecimiento difuso, con áreas más claras que le confieren un aspecto vagamente multinodular (pseudofolículos). En ocasiones hay sólo afectación parcial del ganglio (patrones interfolicular y/o perifolicular).



- Linfocitos pequeños, sólo ligeramente mayores que los normales, monomorfos, con el núcleo redondo o algo irregular, la cromatina compacta y un citoplasma escaso. A veces tienen diferenciación plasmocitoide.
- Las áreas claras se denominan *centros de proliferación*, son redondeadas y están constituidas por una población celular heterogénea: linfocitos pequeños, prolinfocitos (algo mayores, con nucléolo) y plasmocitos (de mayor tamaño, cromatina dispersa, nucléolo eosinófilo y con un ribete de citoplasma basófilo).
- El tamaño, número y visibilidad de los centros de proliferación varía de un caso a otro.
- El índice de mitosis es muy bajo.

#### En el bazo

- Afectación predominante de la pulpa blanca, pero también de la roja.
- Los centros de proliferación son menos prominentes que en el ganglio.
- Linfocitos pequeños, con el núcleo redondo, la cromatina compacta y el citoplasma escaso.

#### En la médula ósea

- Cuatro patrones de infiltración: intersticial, nodular (nódulos de cualquier tamaño, en general sin centro claro, y de localización típicamente centromedular), mixta (intersticial y nodular) y difusa. En general, los tres primeros son los habituales en las fases iniciales de la enfermedad, y el último en las fases avanzadas.
- La infiltración paratrabecular no es propia de la LLC.
- En estudios antiguos los patrones histológicos presentaban valor pronóstico y predictivo de progresión, aunque esto no se ha confirmado con los esquemas terapéuticos actuales; hoy en día el pronóstico viene dado fundamentalmente por las alteraciones genéticas.
- Los centros de proliferación son menos prominentes que en el ganglio.
- Linfocitos pequeños, con el núcleo redondo, la cromatina compacta y el citoplasma escaso.

#### En la sangre periférica

- El examen del frotis de sangre periférica permite orientar el diagnóstico en la mayoría de los casos.
- Dos variantes:
  - Forma típica o clásica
  - Forma atípica, que incluye la variante mixta, y la variante prolinfocítica (distinta de la leucemia prolinfocítica).

#### 4. CITOMETRÍA DE FLUJO Y PANEL DE INMUNOHISTOQUÍMICA

**Panel de primera línea CMF:** En la citometría de flujo la LLC típicamente expresa CD19, CD20 (débil), CD5, CD23, CD200 y CD43 y es débil/negativa para slg y FMC7

**Panel de primera línea IHQ:** CD20, CD3, CD5, CD23, BCL2, ciclina D1

**Panel de segunda línea IHQ:** LEF1, IgD, CD43.

- En los cortes histológicos, las técnicas inmunohistoquímicas demuestran expresión de marcadores pan-B (CD20 débil), clgD, CD5, CD23, CD43, LEF1 y BCL2.
- Las células de la LLC/LL no expresan habitualmente CD3, CD10, BCL6, ni ciclina D1.
- Algunos casos de LLC/LL tienen un inmunofenotipo aberrante: CD5- y/o CD43-, CD23-, FMC7+. Si la médula ósea se ha fijado en B5 hay falsos negativos con CD5.
- La expresión de ZAP70 ( $\geq 20\%$ ) y CD38 ( $\geq 30\%$ ) ocurre habitualmente en los casos con *IGHV* no mutado y se asocia a un pronóstico adverso.

#### 5. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

##### Diagnóstico diferencial

- Linfoma del manto

- Linfoma folicular
- Leucemia prolinfocítica B
- Linfoma de la zona marginal
- Linfoma de Hodgkin tipo predominio linfocítico

#### Causas de errores diagnósticos

- Linfocitos atípicos en sangre y/o el aspirado de médula ósea: núcleos hendidos o aspecto linfoplasmacítico.
- Porcentaje de prolinfocitos en la sangre del 10-50%,
- En ganglio linfático, LL con núcleos atípicos y centros de proliferación poco aparentes.
- Afectación inusual de órganos extramedulares como el SNC, la piel o el tubo digestivo.
- Inmunofenotipo aberrante, con ausencia de expresión de CD5 o de CD23, y más raramente de ambos.
- LLC con la t (14; 18) (q32; q21) (poco frecuente), propia del linfoma folicular.

### 6. CITOGÉNICA, MUTACIONES SOMÁTICAS Y EPIGENÉTICA

La LLC/LL es una enfermedad también muy heterogénea y compleja desde el punto de vista genético(4-6).

#### Hipermutaciones somáticas en los genes que codifican la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (*IGHV*)

Según la homología del gen VH del reordenamiento monoclonal de las células leucémicas con la línea germinal se distingue entre LLC con *IGHV* mutado (<98% homología) y LLC con *IGHV* no mutado (≥98% homología). El estado mutacional de *IGHV* permanece invariable a lo largo de la enfermedad.

- Los casos con *IGHV* no mutado tienen peor pronóstico: a) requerimiento terapéutico precoz, b) mayor riesgo de recurrencia tras el trasplante de médula ósea; c) mayor riesgo de transformación (síndrome de Richter) ocurre casi exclusivamente en este subgrupo; d) mayor tendencia a adquirir alteraciones citogenéticas desfavorables y e) menor supervivencia.
- El estado mutacional se correlaciona con la expresión de ZAP70: los casos con *IGHV* no mutado son mayoritariamente ZAP70 positivos, y suelen ser negativos los casos con *IGHV* mutado.
- Alteraciones citogenéticas
- Las alteraciones citogenéticas (cromosómicas) son uno de los principales factores pronósticos independientes, razón por la cual se recomienda su estudio en todos los casos antes de iniciar el tratamiento.
- El estudio de las alteraciones citogenéticas se debe realizar con las técnicas citogenéticas clásicas (que han mejorado sus resultados con los nuevos métodos de cultivo celular, recomendándose el estudio de cariotipo en muestras estimuladas con TPA 72h), y sobre todo mediante FISH (con un panel múltiple frente a las regiones más frecuentemente alteradas). Alternativamente se pueden usar *arrays* de hibridación genómica comparada o SNPs.
- En los casos de LLC se ha identificado una amplia variedad de alteraciones genéticas. Las más frecuentes son:
  - *del(13q14)*: buen pronóstico
  - *trisomía 12* y *del(6q21)*: pronóstico intermedio
  - *del(17p13)* y *del(11q22-23)*: mal pronóstico
  - Mutaciones en *TP53*, *ATM*, *NOTCH1*, *BIRC3* y *SF3B1*: pronóstico adverso
  - Mutaciones de *MYD88*: presentes en casos con *IgHV* mutado (~3% del total).

Debe señalarse que algunos grupos postulan que de forma rutinaria los únicos marcadores que deben estudiarse son la *del(17p)*, +/- *del(11q)* antes de iniciar tratamiento y que el estudio del resto de los marcadores biológicos sólo debería hacerse en el contexto de ensayos clínicos(8). Esta postura sin embargo no es

la más extendida y en general se recomienda el estudio de la trisomía 12, del(17p), del (11q) y del(13q14) para una adecuada orientación pronóstica y terapéutica.

## 7. PRONÓSTICO Y FACTORES PREDICTIVOS DE LA EVOLUCIÓN

- Entre los factores con valor pronóstico y predictivos del curso clínico, la respuesta al tratamiento y la supervivencia en los casos de LLC se consideran los siguientes:
  - Estadío clínico de la enfermedad.
  - Marcadores séricos (LDH,  $\beta$ 2-microglobulina, timidina quinasa, entre otros).
  - Tiempo de duplicación de las cifras de linfocitos en la sangre periférica (mayor o menor de 12 meses).
  - Estado mutacional de *IGHV*
  - Expresión de ZAP70 en  $\geq 20\%$  y/o de CD38 en  $\geq 30\%$  de las células tumorales.
  - Tipo de alteración citogenética:
    - *del(13q14)*: buen pronóstico
    - *trisomía 12* y *del(6q21)*: pronóstico intermedio
    - *del(17p13)* y *del(11q22-23)*: mal pronóstico
  - Mutaciones en *TP53*, *ATM*, *NOTCH1* y *SF3B1*

## RECOMENDACIONES

1. Para establecer el diagnóstico de la LLC/LL es esencial realizar un estudio morfológico e inmunofenotípico mediante citometría de flujo y/o IHQ, generalmente de sangre periférica en los casos de LLC y ocasionalmente en el ganglio linfático en los casos de LL. Grado C. Evidencia nivel IV
2. El patólogo puede contribuir a su diagnóstico en casos atípicos y aportar información valiosa desde el punto de vista pronóstico identificando el patrón de infiltración de la médula ósea o valorando la respuesta al tratamiento. Grado C. Evidencia nivel IV
3. El diagnóstico de Linfoma Linfocítico, generalmente se establece en una biopsia ganglionar, y se debe realizar el diagnóstico diferencial con otros linfomas B de células pequeñas. La eventual transformación en un LBDCG o en un linfoma B Hodgkin-like también es un diagnóstico basado en los hallazgos histopatológicos. Grado C. Evidencia nivel IV
4. El diagnóstico de LLC/LL requiere la colaboración entre el hematólogo y el patólogo. Grado C. Evidencia nivel IV
5. Las alteraciones citogenéticas son frecuentes en la LLC, además de un factor pronóstico independiente, razón por la cual se recomienda su estudio mediante FISH y/o cariotipo en todos los casos antes de iniciar el tratamiento. Grado B, nivel de evidencia III
6. También se recomienda el estudio del estado de mutación de los genes que codifican la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (*IGHV*) y de las mutaciones del p53. Grado B, nivel de evidencia III

\* Los autores desean agradecer a la Dra Neus Villamor la revisión crítica de este capítulo.

## REFERENCIAS

1. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol.* 2013 Sep;88(9):803-16.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008 Jun;111(12):5446-56.

3. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
4. Rodriguez-Vicente AE, Diaz MG, Hernandez-Rivas JM. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogenous disease. *Cancer genetics*. 2013 Mar;206(3):49-62.
5. Martin-Subero JI, Lopez-Otin C, Campo E. Genetic and epigenetic basis of chronic lymphocytic leukemia. *Current opinion in hematology*. 2013 Jul;20(4):362-8.
6. Foa R, Del Giudice I, Guarini A, Rossi D, Gaidano G. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2013 May;98(5):675-85.
7. Tang G, Banks HE, Sargent RL, Medeiros LJ, Abruzzo LV. Chronic lymphocytic leukemia with t(14;18)(q32;q21). *Hum Pathol*. 2013 Apr;44(4):598-605.
8. Parker A BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. *Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting*. 2012.
9. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Beà S, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*. 2013 Apr;27(5):1100-6.
10. Villamor N, Lopez-Guillermo A, Lopez-Otin C, Campo E. Next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*. 2013 Oct;50(4):286-95.

## LEUCEMIA CELULAS B-PROLINFOCITICA

*Autor para la correspondencia: Manuela Mollejo (mmollejov@sescam.jccm.es).*

### 1. DEFINICIÓN:

Es un proceso neoplásico de células B con morfología de prolinfocitos que infiltra médula ósea, sangre periférica y bazo. La cifra de prolinfocitos en sangre periférica debe ser mayor del 55%. Hay que hacer el diagnóstico diferencial con casos de progresión de LLC-B y linfomas del manto con expresión periférica. Es una entidad muy rara, aproximadamente 1% de leucemias linfocíticas. Afecta a pacientes de edad avanzada y tienen un curso clínico más agresivo que LLC.

### 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNOSTICO

El diagnóstico se establecerá en la mayoría de las ocasiones en sangre periférica y/o médula ósea. Las descripciones de la LPL en otras localizaciones son excepcionales y la mayoría corresponden a linfomas del manto blásticos

**Sangre periférica:** La mayoría de las células circulantes son prolinfocitos, células de mediano tamaño con nucléolo prominente central y citoplasma amplio.

**Biopsia-cilindro y aspirado de médula ósea:** El aspirado muestra abundantes prolinfocitos. La biopsia muestra una infiltración intersticial y/o infiltración difusa y nodular peritrabecular por linfocitos de mediano tamaño con núcleos con nucléolos prominentes.

**Bazo:** El bazo muestra infiltración de pulpa blanca y pulpa roja por una población de linfocitos de mediano tamaño. Las descripciones de PLL en bazo son excepcionales.

### 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico diferencial incluye:

- Linfoma de células del manto. Es el principal diagnóstico diferencial, es necesario realizar ciclina D1 y/o descartar la presencia de la t(11;14).
- LLC-B con un aumento de prolinfocitos. El fenotipo por inmunohistoquímica y/o citometría de flujo (escore Matutes de LLC-B ayuda a establecer el diagnóstico).
- Linfoma esplénico de la zona marginal, con aumento de células grandes. La composición citológica de linfocitos pequeños junto con células con diferenciación marginal y blastos salpicados establece el diagnóstico frente a al relativo monomorfismo de la PLL

Este diagnóstico diferencial debe tener en cuenta la morfología y cifra de linfocitos en sangre periférica, fenotipo y características clínicas.

### 4. PANELES DE INMUNOHISTOQUIMICA (IHQ) e HBRIDACION IN SITU CROMOGENICA (HIS-C).

Panel de primera línea CMF: CD19, CD20, FMC7, CD5, CD23, k/l, CD200.

Panel de primera línea IHQ: CD20, CD3, CD5, CD23, ciclina D1,

Paneles de segunda línea: IgD, IgM

### 5. CITOGENETICA Y MOLECULAR

El estudio citogenético no es imprescindible pero sí recomendable por su utilidad en el diagnóstico diferencial. Ausencia de la t(11;14)(q13;q32), bien mediante FISH y/o cariotipo. Los cariotipos complejos son frecuentes y la del Del (17p) descrita en el 50% de los casos, generalmente asociada a mutaciones del *TP53*. La trisomía 12 es infrecuente y las deleciones del 13q14 se detectan en aproximadamente un 30% de los casos

## RECOMENDACIONES

1. El estudio de sangre periférica y/o médula ósea es el método de elección para el diagnóstico inicial de los casos con sospecha de LPL. Grado B, nivel de evidencia III.
2. La morfología prolinfocítica no es sinónimo de LPL. Puede observarse en la progresión o, raramente al diagnóstico de otras leucemias/linfomas de linfocitos B. Grado C. Evidencia nivel IV
3. Debe excluirse linfoma del manto leucémico mediante la ausencia de expresión de ciclina D1 y/o ausencia de t(11;14) mediante FISH. Grado C. Evidencia nivel IV
4. El estudio de cariotipo no es necesario en el panel diagnóstico habitual de la PLL. Grado C. Evidencia nivel IV

## REFERENCIAS

1. Ruchlemer, R., N. Parry-Jones, V. Brito-Babapulle, I. Attolico, A. C. Wotherspoon, E. Matutes and D. Catovsky (2004). "B-prolymphocytic leukaemia with t(11;14) revisited: a splenomegalic form of mantle cell lymphoma evolving with leukaemia." *Br J Haematol* 125(3): 330-336.
2. Schlette, E., C. Bueso-Ramos, F. Giles, A. Glassman, K. Hayes and L. J. Medeiros (2001). "Mature B-cell leukemias with more than 55% prolymphocytes. A heterogeneous group that includes an unusual variant of mantle cell lymphoma." *Am J Clin Pathol* 115(4): 571-581.
3. Swerdlow SH CE, H. N., Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.

## LINFOMA FOLICULAR (LF)

Autor para la correspondencia: José Luis Villar ([jlwillar@us.es](mailto:jlwillar@us.es))

### 1. DEFINICIÓN

Neoplasia de células centrofoliculares constituida por centrocitos y centroblastos, que generalmente adopta un patrón nodular (folicular) pero que puede tener áreas difusas más o menos extensas.

### 2. FRECUENCIA Y FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS

- Es frecuente. Representa el 20% de todos los linfomas.
- Más frecuente en Europa y EE.UU. que en el resto del mundo.
- Adultos (6ª década de la vida), sin diferencia entre sexos.
- Hay una variante pediátrica, casi exclusiva de varones.

### 3. RASGOS CLÍNICOS Y VARIANTES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

#### 3.a. Presentación clínica

- Adenopatías generalizadas (sólo el 30% debuta en estadios I-II), sin otra sintomatología. Es poco frecuente la aparición de síntomas B.
- Frecuente afectación de la médula ósea (60% de los casos) y del bazo.
- Menos frecuentemente: piel, anillo de Waldeyer, tubo digestivo, mama y testículos.
- La expresión leucémica (linfocitosis absoluta) del LF en el momento del diagnóstico varía según las series entre el 4-23% de los casos (Beltran, Quinones et al. 2013).

#### 3.b. Curso clínico y progresión

- Curso clínico prolongado, con remisiones y recurrencias.
- El 25-35% de los LF progresan (sufren transformación) a un LBDCG, y con menos frecuencia a un linfoma de Burkitt o a uno con rasgos intermedios entre ambos.

#### 3.c. Variantes clínico-patológicas

- *LF primario del intestino*: más frecuente en la segunda porción del duodeno, en forma de pequeños pólipos múltiples asintomáticos. La mayoría de los pacientes tiene una enfermedad localizada (estadio IE o IIE).
- *LF primario cutáneo*: lesión solitaria o pocas lesiones localizadas (sólo el 15% se presenta con lesiones generalizadas) en cabeza y tronco (clásicamente, en la espalda). En la mayoría de los casos no hay expresión de BCL2.
- *LF pediátrico*: afectación ganglionar y extraganglionar (anillo de Waldeyer, testículo). Tiene características clínico-patológicas singulares: folículos muy grandes, rasgos citológicos blastoides, alto índice de proliferación y ausencia de expresión de BCL2 y de la t(14;18)(q32;q21); se presenta con un bajo estadio clínico y en general se asocia a un buen pronóstico, aunque parece haber diferencias significativas según la localización anatómica (Liu, Salaverria et al. 2013).

### 4. TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

- La biopsia por escisión del ganglio linfático o del tejido extraganglionar afectado es el procedimiento diagnóstico de elección y debe ser el método empleado en los casos de adenopatías palpables.
- La biopsia con aguja gruesa puede estar justificada en determinadas circunstancias clínicas. Es posible alcanzar el diagnóstico de LF si se emplean adecuadamente la inmunohistoquímica, los análisis de PCR/FISH y la citometría de flujo.
- La PAAF no es un procedimiento diagnóstico recomendable para el diagnóstico inicial de LF.

#### TIPO DE ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS REQUERIDOS PARA LA ESTADIFICACIÓN

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es el método de elección para la estadificación de todos los casos de linfoma folicular. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y

se requiere una biopsia cilindro y estudios inmunofenotípicos y de citogenética/FISH (estos en caso de que se demuestre infiltración por citometría de flujo-morfología).

## 5. RASGOS HISTOPATOLÓGICOS Y GRADOS HISTOLÓGICOS

### 5.a. Rasgos histopatológicos

- Borramiento de la arquitectura ganglionar normal.
- Patrón multinodular: nódulos (folículos) de tamaño similar, en estrecho contacto.
- Mantos ausentes o atenuados.
- Dos tipos celulares en los folículos: centroblastos (CB) y centrocitos (CC), sin distribución zonal ni macrófagos de cuerpo tingible.
- CC neoplásicos (generalmente más pequeños que los foliculares) en los espacios interfoliculares (este no es criterio de patrón difuso).
- En ocasiones, verdadero patrón difuso: áreas sin folículos constituidas por CB y CC. La proporción (<25%; 25-75% y >75%) de estas áreas difusas debe aparecer en el informe anatomopatológico.
- La presencia de áreas difusas en las que haya >15CB por campo de gran aumento es criterio suficiente para el diagnóstico de LBDCG. En este caso se debe informar como LBDCG y Linfoma B folicular del grado que corresponda.
- En un pequeño porcentaje de LF se advierten áreas de diferenciación marginal/monocitoide en la periferia de los folículos, que forman parte de la población neoplásica.

### 5.b. Grados histológicos

- Según el número de CB por campo de gran aumento (contar al menos 10 campos en diferentes folículos).
- Grado 1: 0-5; Grado 2: 6-15; Grado 3A: >15 (con CC presentes); Grado 3B: >15 (no hay CC).
- Se recomienda incluir el grado en el informe anatomopatológico.

### 5.c. LF *in situ*

- En un ganglio con la arquitectura conservada y aspecto reactivo, uno o varios folículos contienen CC que sobreexpresan de forma intensa BCL2 y CD10 y tienen la translocación t(14;18)(q32;q21). Estas células están limitadas al centro germinal, sin compromiso del espacio interfolicular.
- La progresión de un LF *in situ* a un LF establecido es rara (~6% de los casos) y requiere la adquisición de adicionales alteraciones cromosómicas y genéticas (Schmidt, Salaverria et al. 2014).- Más frecuente es la coexistencia simultánea de un LF *in situ* y un LF establecido (16-23% de los casos). Por tanto, en individuos sin un LF conocido es recomendable sugerir un estudio clínico para su despistaje (Cong, Raffeld et al. 2002). En ocasiones se encuentra LF *in situ* en asociación con otros tipos de linfomas (Linfoma de Hodgkin, LZM, CLL/SLL) (Montes-Moreno, Castro et al. 2010, Jegalian, Eberle et al. 2011).
- El LF *in situ* es muy distinto de la afectación parcial de un ganglio por un LF establecido. Los casos de afectación parcial por LF muestra expresión moderada de BCL2 en los folículos neoplásicos, extensión interfolicular y habitualmente estadios clínicos limitados (estadios I, II) (Adam, Katzenberger et al. 2005).

### 5.d. Afectación de la médula ósea

- Típicamente, afectación paratrabecular focal con células de aspecto centrocítico aunque puede mostrar patrones de afectación intersticial nodular. Es preciso realizar estudio IHQ con CD20 y CD3 para descartar infiltrados sutiles morfológicamente.

## 6. PANEL DE INMUNOHISTOQUÍMICA

- El linfoma folicular típicamente expresa Slg, CD20, CD79a, BCL2, BCL6, CD10 y, en las áreas foliculares, CD21 y/o CD23 en las células dendríticas foliculares (éstos últimos pueden ser útiles para distinguir entre folículos confluentes y áreas difusas). En ocasiones se observa sobreexpresión de CD23 por las células neoplásicas.

- En pacientes tratados con anti-CD20 pueden ser útiles otros marcadores de línea B como PAX5, OCT2.
- El linfoma folicular típicamente *no* expresa CD3, CD5, CD43, MUM1. Un pequeño subgrupo de LF es CD5 positivo y otro subgrupo es CD10-MUM1+.
- El índice de proliferación (Ki67) varía entre <20% (LF de grado 1-2) y >20% (LF de grado 3).

## 7. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

### 7.a. Diagnóstico diferencial

- Hiperplasia folicular reactiva
- Linfoma del manto
- Linfoma linfocítico con centros de proliferación (pseudofolículos) prominentes
- Linfoma de la zona marginal con colonización centrofolicular
- Linfoma de Hodgkin tipo predominio linfocítico

### 7.b. Causas de errores diagnósticos

- BCL2 puede ser negativo en linfomas foliculares, particularmente en los de grado 3 (50% de los casos). Por tanto, la ausencia de expresión de BCL2 no excluye el diagnóstico de LF.
- El LF puede presentar patrones histológicos atípicos: afectación parcial del ganglio, afectación parcial de algunos folículos linfoides no neoplásicos, folículos irregulares serpinginosos, patrón floral, patrón invertido o patrón difuso puro (sin áreas nodulares).
- El LF puede estar constituido por tipos celulares atípicos: centroblastos con núcleo lobulado o apariencia linfoblástica, células en anillo de sello, con diferenciación plasmocelular...
- Las células del LF pueden mostrar focalmente una distribución perifolicular, con la apariencia cito-histológica de un linfoma de la zona marginal.
- El LF puede mostrar expresión aberrante de CD5 y CD23; y puede ser negativo para CD10, en especial si es de grado 3B. Algunos casos de linfoma folicular grado 3 expresan CD43.
- El linfoma centrofolicular cutáneo es en la mayoría de los casos BCL2 negativo. La infiltración cutánea por Linfoma B Folicular sistémico es BCL2 positiva.
- El LF que debuta con afectación digestiva es una enfermedad habitualmente localizada.
- El LF pediátrico presenta folículos muy grandes (de aspecto hiperplásico) y con frecuencia es BCL2 negativo.

## 8. CITOGENÉTICA Y DATOS MOLECULARES

- El linfoma folicular frecuentemente presenta la t(14;18)(q32;q21), que produce el reordenamiento del gen *BCL2* con la *IGH*. Alternativamente el gen *BCL2* se reordena con los genes de las cadenas ligeras. Debido a la variabilidad en los puntos de ruptura del gen *BCL2*, el método más sensible y específico para la identificación del reordenamiento *BCL2* es la FISH utilizando una sonda tipo break apart (tejido) o Dual color dual fusión (muestra MO o SP con infiltración tumoral, o células en suspensión obtenidas por ruptura mecánica de muestra de tejido). El estudio de PCR para detectar reordenamientos de *BCL2* no es una alternativa en el ámbito diagnóstico por su escasa sensibilidad (véase capítulo de estudio molecular).
- El estudio citogenético con muestras estimuladas 72 horas con TPA no es imprescindible para el diagnóstico de LF, aunque si recomendable, siempre que sea posible, ya que permite identificar anomalías secundarias con potencial valor pronóstico. Los cariotipos complejos con más de seis anomalías, las translocaciones que afectan al 8q24 (*MYC*), las deleciones de 1p, 6q, 17p así como las ganancias del cromosoma 12 o 18p entre otros parecen asociarse a un pronóstico desfavorable
- Se recomienda el estudio de la traslocación de *BCL2* por FISH en los casos con inmunofenotipo aberrante y/o patrón histológico atípico.
- La translocación t(14;18) del *BCL2* está presente en el 90% de los LF de grado 1-2, y con mucha menos frecuencia en los de grado 3.



- Otras translocaciones son raras en el LF, pero pueden ocurrir. En LF de grado 3 sin la t(14;18) es recomendable emplear la sonda *break-apart* para *BCL6* (el reordenamiento de *BCL6* está presente en el 5-15% de los LF, en su mayoría de grado 3B). El estudio de *BCL6* también puede ser de utilidad en los LF pediátricos. Asimismo existe un subgrupo de Linfomas B de fenotipo GCB (LF y LBDCG) con reordenamientos de IRF4/MUM1 (Salaverria, Philipp et al. 2011).
- Un pequeño subgrupo de LF sin la t(14;18)(q32;q21) y caracterizado por un patrón predominantemente difuso se asocia a deleciones en 1p36 (Katzenberger, Kalla et al. 2009).
- La transformación a LBDCG conlleva la adquisición de adicionales alteraciones genéticas divergentes, particularmente la translocación del gen *MYC* y otras relacionadas con la disregulación del ciclo celular y la respuesta al daño del DNA, o hipermutaciones somáticas. En general, estos linfomas de células grandes secundarios a un LF presentan una combinación singular de alteraciones en oncogenes y genes supresores que lo distinguen del LBDCG *de novo* (Pasqualucci, Khiabani et al. 2014).

## 9. PRONÓSTICO Y FACTORES PREDICTIVOS DE LA EVOLUCIÓN

- La extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico y el Índice Pronóstico Internacional para LF (FLIPI) son importantes factores predictivos de su curso clínico.
- En el FLIPI-2, la afectación de la médula ósea en LF se considera de manera específica un factor pronóstico adverso, aunque su utilidad en la práctica asistencial está siendo evaluada (Federico, Bellei et al. 2009, Freedman 2014).
- El grado histológico es un buen factor predictivo del curso de la enfermedad y de la progresión a LBDCG.
- La presencia de áreas difusas en LF de grado 1-2 no influye en el pronóstico; los de grado 3 con >25% de áreas difusas tienen peor pronóstico que los puramente nodulares.
- En general, el índice de proliferación se correlaciona con el grado histológico, pero hay un subgrupo de LF grado 1-2 con un alto índice de proliferación que se comporta de un modo similar al LF de grado 3.
- Aunque la OMS (2008) no lo considera un dato exigible en el informe anatomopatológico, un índice de proliferación (Ki67) igual o superior al 10% parece ser un factor pronóstico independiente que se asocia a una peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (Yamamoto, Tomita et al. 2013).
- Las características del microambiente tumoral, aunque todavía con bajo nivel de evidencia, podría convertirse en un factor predictivo de la evolución del LF (Fend and Quintanilla-Martinez 2014).

## RECOMENDACIONES

1. El LF se presenta típicamente en la edad adulta con adenopatías generalizadas, pero no siempre es así. No se debe excluir de entrada en casos con afectación extraganglionar, enfermedad localizada, expresión leucémica o en la edad pediátrica. Grado C. Evidencia nivel IV
2. La proporción de áreas difusas y el grado histológico del LF deben aparecer en el informe anatomopatológico. Grado C. Evidencia nivel IV
3. La presencia de áreas difusas en las que haya >15CB por campo de gran aumento es criterio suficiente para el diagnóstico de LBDCG. En este caso se debe informar como LBDCG y Linfoma B folicular del grado que corresponda. Grado B, nivel de evidencia III.
4. El panel inmunohistoquímico de primera línea para el diagnóstico de LF debe incluir: CD20, CD3, BCL2, BCL6, CD10, ciclina D1 y Ki67. Grado C. Evidencia nivel IV
5. El panel inmunohistoquímico de segunda línea para el diagnóstico de LF puede incluir: MUM1, PAX5, OCT2, CD21, CD23, p53. Grado C. Evidencia nivel IV
6. En la biopsia de estadiaje de MO es preciso realizar estudio IHQ con CD20 y CD3 para descartar infiltrados sutiles morfológicamente. PAX5 puede ser de utilidad en pacientes previamente tratados con inmunoterapia. Grado C. Evidencia nivel IV

7. En el caso del LF in situ aislado incluir una nota en el informe acerca del significado de la lesión y la conveniencia de realizar un estudio clínico para descartar LF establecido (técnicas de imagen, TAC y biopsia de MO). Grado B, nivel de evidencia III.
8. El estudio citogenético no es imprescindible para el diagnóstico de LF aunque si recomendable, especialmente en los casos de morfología o fenotipo atípicos. Grado C. Evidencia nivel IV
9. Se recomienda el estudio por FISH del reordenamiento de BCL2 con sondas de tipo BA. En LF de grado 3 sin la t(14;18) es recomendable emplear la sonda break-apart para BCL6. Grado C. Evidencia nivel IV

## REFERENCIAS

1. Adam, P., T. Katzenberger, M. Eifert, M. M. Ott, A. Rosenwald, H. K. Müller-Hermelink and G. Ott (2005). "Presence of preserved reactive germinal centers in follicular lymphoma is a strong histopathologic indicator of limited disease stage." *Am J Surg Pathol* 29(12): 1661-1664.
2. Beltran, B. E., P. Quinones, D. Morales, J. C. Alva, R. N. Miranda, G. Lu, B. D. Shah, E. M. Sotomayor and J. J. Castillo (2013). "Follicular lymphoma with leukemic phase at diagnosis: a series of seven cases and review of the literature." *Leuk Res* 37(9): 1116-1119.
3. Cong, P., M. Raffeld, J. Teruya-Feldstein, L. Sorbara, S. Pittaluga and E. S. Jaffe (2002). "In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection." *Blood* 99(9): 3376-3382.
4. Federico, M., M. Bellei, L. Marcheselli, S. Luminari, A. Lopez-Guillermo, U. Vitolo, B. Pro, S. Pileri, A. Pulsoni, P. Soubeyran, S. Cortelazzo, G. Martinelli, M. Martelli, L. Rigacci, L. Arcaini, F. Di Raimondo, F. Merli, E. Sabbatini, P. McLaughlin and P. Solal-Celigny (2009). "Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project." *J Clin Oncol* 27(27): 4555-4562.
5. Fend, F. and L. Quintanilla-Martinez (2014). "Assessing the prognostic impact of immune cell infiltrates in follicular lymphoma." *Haematologica* 99(4): 599-602.
6. Freedman, A. (2014). "Follicular lymphoma: 2014 update on diagnosis and management." *Am J Hematol* 89(4): 429-436.
7. Jegalian, A. G., F. C. Eberle, S. D. Pack, M. Mirvis, M. Raffeld, S. Pittaluga and E. S. Jaffe (2011). "Follicular lymphoma in situ: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma." *Blood* 118(11): 2976-2984.
8. Katzenberger, T., J. Kalla, E. Leich, H. Stocklein, E. Hartmann, S. Barnickel, S. Wessendorf, M. M. Ott, H. K. Müller-Hermelink, A. Rosenwald and G. Ott (2009). "A distinctive subtype of t(14;18)-negative nodal follicular non-Hodgkin lymphoma characterized by a predominantly diffuse growth pattern and deletions in the chromosomal region 1p36." *Blood* 113(5): 1053-1061.
9. Liu, Q., I. Salaverria, S. Pittaluga, A. G. Jegalian, L. Xi, R. Siebert, M. Raffeld, S. M. Hewitt and E. S. Jaffe (2013). "Follicular lymphomas in children and young adults: a comparison of the pediatric variant with usual follicular lymphoma." *Am J Surg Pathol* 37(3): 333-343.
10. Montes-Moreno, S., Y. Castro, S. M. Rodriguez-Pinilla, J. F. Garcia, M. Mollejo, M. E. Castillo, A. Bas-Vernal, C. Barrionuevo-Cornejo, L. Sanchez-Verde, J. Menarguez, J. C. Cigudosa and M. A. Piris (2010). "Intrafollicular neoplasia/in situ follicular lymphoma: review of a series of 13 cases." *Histopathology* 56(5): 658-662.

11. Pasqualucci, L., H. Khiabani, M. Fangazio, M. Vasishtha, M. Messina, A. B. Holmes, P. Ouillette, V. Trifonov, D. Rossi, F. Tabbo, M. Ponzoni, A. Chadburn, V. V. Murty, G. Bhagat, G. Gaidano, G. Inghirami, S. N. Malek, R. Rabadan and R. Dalla-Favera (2014). "Genetics of follicular lymphoma transformation." *Cell Rep* 6(1): 130-140.
12. Salaverria, I., C. Philipp, I. Oschlies, C. et al. . Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche, G. German High-Grade Lymphoma Study and N. H. L. t. g. Berlin-Frankfurt-Munster (2011). "Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults." *Blood* 118(1): 139-147.
13. Schmidt, J., I. Salaverria, A. Haake, I. Bonzheim, P. Adam, S. Montes-Moreno, M. A. Piris, F. Fend, R. Siebert and L. Quintanilla-Martinez (2014). "Increasing genomic and epigenomic complexity in the clonal evolution from in situ to manifest t(14;18)-positive follicular lymphoma." *Leukemia* 28(5): 1103-1112.
14. Yamamoto, E., N. Tomita, S. Sakata, N. Tsuyama, K. Takeuchi, Y. Nakajima, K. Miyashita, T. Tachibana, H. Takasaki, M. Tanaka, C. Hashimoto, H. Koharazawa, K. Fujimaki, J. Taguchi, H. Harano, S. Motomura and Y. Ishigatsubo (2013). "MIB-1 labeling index as a prognostic factor for patients with follicular lymphoma treated with rituximab plus CHOP therapy." *Cancer Sci* 104(12): 1670-1674.

## LINFOMAS DE LA ZONA MARGINAL

Autor para la correspondencia: *Manuela Mollejo* ([mmollejov@sescam.jccm.es](mailto:mmollejov@sescam.jccm.es)).

## LINFOMA ESPLÉNICO DE LA ZONA MARGINAL

### 1. DEFINICION Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD.

El linfoma esplénico de la zona marginal (LEZM) es un linfoma de células pequeñas y curso clínico indolente caracterizado por infiltración del bazo, médula ósea y sangre periférica. Es poco frecuente, alrededor del 2% de los síndromes linfoproliferativos. Hay casos asociados al virus de la hepatitis C, y en África subsahariana se ha documentado un cuadro idéntico al LZME con linfocitos vellosos asociado con malaria. El LZME aparece en personas de edad avanzada (media de 65 años) y se manifiesta con esplenomegalia, linfocitosis y citopenias de intensidad variable, debidas principalmente a la esplenomegalia más que a la infiltración de la médula. En el 20% de los casos pueden detectarse otros fenómenos autoinmunes. En un tercio de los casos se detecta un pico monoclonal, más frecuentemente IgG. Suele haber elevación de B2M y de LDH pero no síntomas B. En un 10-13% de los casos puede haber transformación a LBDCG, que puede ocurrir en el bazo, ganglios y/o médula ósea, con elevación de LDH, afectación sistémica, síntomas B, aparición de lesiones ocupantes de espacio en el bazo y comportamiento clínico agresivo.

### 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNOSTICO

Los criterios del diagnóstico están recogidos en el documento del "SMZL working group" (Matutes, Oscier et al. 2008) y en la clasificación de las neoplasias hematológicas de la OMS de 2008 (Swerdlow SH CE 2008). El diagnóstico se puede establecer con el estudio de los datos morfológicos, fenotípicos y moleculares de sangre periférica y médula ósea y/o estudio de la pieza de esplenectomía.

**Sangre periférica:** En la sangre periférica casi siempre se detecta una población clonal de linfocitos, que suele ser superior a  $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ , pero sin alcanzar valores superiores a  $25 \times 10^3/\mu\text{L}$ . En el frotis se observan linfocitos de pequeño y mediano tamaño, células con diferenciación plasmocitoide y se suelen identificar,

aunque no siempre, linfocitos vellosos con prolongaciones polares características, aunque su proporción varía en los diferentes casos del 5% al 90% de los linfocitos.

**Biopsia médula ósea:** Infiltrado intersticial, intrasinusoidal y nódulos intertrabeculares. La médula está afectada prácticamente en todos los casos, aunque a veces es muy leve y solo se puede demostrar con tinción para CD20 que marca la infiltración intrasinusoidal e intersticial. Un rasgo útil es la presencia de dendríticas marcadas con CD23 en los nódulos linfoides, reflejando el reemplazamiento folicular como en el bazo.

**Pieza de esplenectomía:** Patrón micronodular, centrado en la pulpa blanca, con un componente interior de linfocitos pequeños que reemplaza el centro germinal con borramiento del manto normal. Este componente está rodeado por una zona periférica de células de pequeño y mediano tamaño con citoplasmas amplios y con blastos salpicados (diferenciación marginal). Se observa infiltración en la pulpa roja en una intensidad variable y con una composición celular semejante a la de la pulpa blanca. Se pueden observar histiocitos epitelioides. Como en otros linfomas de células pequeñas se puede observar diferenciación plasmacítica, con presencia de nidos de células plasmáticas en los centros.

**Ganglio linfático:** Es muy raro la afectación de ganglios periféricos por LEZM. Sin embargo, sí se suelen afectar los ganglios hilio esplénico. En esta muestra el tumor presenta un patrón nodular, con un crecimiento del linfoma alrededor de los centros, reemplazándolos y formado por una composición citológica semejante a la del bazo, pero la diferenciación marginal no es tan evidente.

Cada vez se realiza con más frecuencia el diagnóstico en sangre y/o médula porque está disminuyendo la realización de esplenectomía con fines terapéuticos al utilizarse otras opciones (inmunoterapia con rituximab u otras combinaciones).

### 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

- Es importante tener en cuenta que este tumor no tiene un marcador propio, y que rasgos morfológicos descritos en médula, sangre y bazo pueden manifestarse en otros linfomas de células pequeñas cuando infiltran estas localizaciones.
- El diagnóstico diferencial se plantea con otros linfomas de células pequeñas:
  1. Linfoma de células del manto, la expresión de ciclina D1 excluye el diagnóstico de LEZM.
  2. Linfoma folicular: la coexpresión de folículos de bcl2 y bcl6 favorece el diagnóstico de linfoma folicular. El mayor problema es de LEZM con linfoma folicular *BCL2* negativo. En estos casos, el patrón de tinción con Ki67 (anular o diana) en LEZM, frente a localización en centros en LF, y la expresión en esos centros de Bcl6 ayuda al diagnóstico.
  3. Linfoma linfoplasmacítico. Este diagnóstico se establece principalmente en los casos de LEZM con diferenciación plasmacítica. En estos casos el estudio de mutaciones de MYD88 puede ayudar.
  4. LLC-B. Este diagnóstico se establece en la mayoría de las ocasiones en sangre periférica y médula ósea. La coexpresión de CD5, CD23 favorece el diagnóstico de LLC.
  5. El diagnóstico diferencial con otros linfomas de la zona marginal requiere correlación con los datos clínicos y localización del linfoma.
- Es importante diferenciar el LEZM de las poblaciones monoclonales de linfocitos B, como las asociadas a hepatitis virus C, procesos autoinmunes como artritis reumatoide, lupus, etc. Para establecer un diagnóstico preciso es necesario una correlación clínico-patológica.

### 4. PANELES DE IHQ

**Panel de primera línea CMF:** CD19, CD20/CD22, CD200, CD11c, CD25, CD103, CD123, k/l.

**Panel de primera línea IHQ:** CD20, CD3, bcl2, bcl6, ciclina D1, CD23, Ki67. El patrón de tinción con bcl2 y Ki67 ayudan al diagnóstico de este tumor. Bcl2 permite identificar reemplazamiento de centros bcl2 negativos por células tumorales bcl2+. Con Ki67 se puede observar el patrón en diana, con tinción en el centro de las células del centro residuales y en la zona periférica (marginal), o bien patrón anular, destacando las células proliferantes en la zona marginal, cuando se ha producido el reemplazamiento total del centro por el tumor.

No existe un marcador propio de este tumor, por lo que es necesario descartar otros linfomas de células pequeñas con marcadores relativamente específicos como ciclina D1 para excluir linfoma del manto, y bcl6 para excluir linfoma folicular.

**Panel de segunda línea:** Anexina 1, IgD, IGG, kappa, lambda, LEF1

## 5. CITOGENETICA/MOLECULAR

Los estudios citogenéticos revelan anomalías en el 70-80% de los casos siendo complejos en el 50%. Entre las anomalías más frecuentes se encuentran las trisomías totales o parciales de los cromosomas 3/3q(30-80%) y 12q(15-20%) y deleciones del 6q y del 7q. Ésta última se detecta en el 45% de los casos, siendo excepcional en otros linfomas de células pequeñas. Otras alteraciones citogenéticas descritas son anomalías de 1q, 8q, 9p, 14q, 18q, y deleciones del 17p.ésta última junto con la presencia de cariotipos complejos parecen asociarse a un pronóstico más desfavorable.

La ausencia de la t(11;14)(q13;q32) y la t(14;18)(q32;q21) ayudarán a excluir linfoma del manto y linfoma folicular, especialmente cuando solo se disponga de médula ósea y/o sangre periférica.

Estudios de secuenciación masiva han mostrado mutaciones del gen NOTCH2 en ~20 % de los casos(Rossi, Trifonov et al. 2012, Martinez, Almaraz et al. 2014). Mutaciones del gen MYD88 son poco frecuentes, hasta el 19% en algunas series(Jimenez, Sebastian et al. 2013) y las mutaciones de BRAF son excepcionales en este tumor. Su estudio puede ayudar al diagnóstico diferencial con LPL y tricoleucemia, respectivamente.

## RECOMENDACIONES.

1. El diagnóstico se puede establecer en el estudio de muestra de sangre periférica y médula ósea y/o pieza de esplenectomía. Grado C. Evidencia nivel IV
2. No es imprescindible el estudio del bazo para establecer el diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV
3. El diagnóstico diferencial con otros linfomas de células pequeñas más relevante clínicamente es con el linfoma del manto, por lo que es necesario excluir este diagnóstico mediante la tinción con ciclina D1 y/o estudio de reordenamiento de CCND1 mediante FISH. Grado C. Evidencia nivel IV
4. La presencia de linfocitos vellosos no es exclusiva de este tumor, otros linfomas de células pequeñas pueden presentar linfocitos vellosos, como linfoma manto, folicular, linfoplasmácítico, o linfoma difuso de la pulpa roja. Grado C. Evidencia nivel IV
5. La infiltración intrasinusoidal no es exclusiva de este tumor, se puede ver en otros linfomas. Es necesario integrar el resto de datos morfológicos y fenotípicos para hacer un diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV
6. La diferenciación marginal observada en el bazo no es exclusiva de LEZM, otros linfomas de células pequeñas cuando infiltran el bazo pueden manifestar este aspecto morfológico, por lo que hay que tener en cuenta otros datos morfológicos y fenotípicos. Grado C. Evidencia nivel IV
7. En las biopsia de médula ósea es necesario realizar CD20 para detectar la infiltración, a veces no visible con la HE. Grado C. Evidencia nivel IV
8. El estudio citogenético no es necesario pero es recomendable dado que puede ser de ayuda en el diagnóstico diferencial. Grado C. Evidencia nivel IV

## REFERENCIAS

1. Mollejo M, Menárguez J, Guisado-Vasco P, Bento L, Algara P, Montes-Moreno S, Rodriguez-Pinilla MS, Cruz MA, Casado F, Montalbán C, Piris MA. Hepatitis C virus-related lymphoproliferative disorders encompass a broader clinical and morphological spectrum than previously recognized: a clinicopathological study. Mod Pathol. 2014 Feb;27(2):281-93

2. Montalban C, Abraira V, Arcaini L, Domingo-Domenech E, Guisado-Vasco P, Iannitto E, Mollejo M, Matutes E, Ferreri AJ, Salar A, Rattotti S, Carpaneto A, Perez R, Bello JL, Hernandez M, Caballero D, Carbonell F, Piris MA; Splenic Marginal Zone Lymphoma Study Group (SMZLSG). Simplification of risk stratification for splenic marginal zone lymphoma: a point-based score for practical use. *Leuk Lymphoma*. 2014 Apr;55(4):929-31.
3. Wotherspoon AC. Extranodal and splenic small B-cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2013 Jan;26 Suppl 1:S29-41. Review.
4. Piris MA, Arribas A, Mollejo M. Marginal zone lymphoma. *Semin Diagn Pathol*. 2011 May;28(2):135-45. Review.
5. Manuela Mollejo, María S. Rodríguez-Pinilla, M, Santiago Montes-Moreno, Patrocinio Algara, Ahmet Dogan, Juan C. Cigudosa, Rocío Juárez, Teresa Flores, Jerónimo Forteza, Alberto Arribas, Miguel A. Piris. Splenic Follicular Lymphoma. Clinicopathologic Characteristics of a Series of 32 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2009 May;33(5):730-8.
6. Salido M, Baro C, Oscier D, Stamatopoulos K, Dierlamm J, Matutes E et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-cell Lymphoma Group. *Blood*, 2010; 116; 1479-1488
7. Swerdlow SH, Campos E, Harris NL, et al. Pathology and genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th ed. Lyon: IARC Press, 2008.
8. Matutes E, Oscier D, Montalban C, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia*, 2008;22;487-495
9. Camacho FI, Mollejo M, Mateo MS, Algara P, Navas C, Hernandez JM, Santoja C, Sole F, Sanchez-Beato M, Piris MA. Progression to large B-cell lymphoma in splenic marginal zone lymphoma: a description of a series of 12 cases. *Am J Surg Pathol* 2001 Oct;25(10):1268-76.
10. Piris MA, Mollejo M, Campo E, Menárguez J, Flores T, Isaacson PG. A marginal zone pattern may be found in different varieties of non-Hodgkin's lymphoma: the morphology and immunohistology of splenic involvement by B-cell lymphomas simulating splenic marginal zone lymphoma. *Histopathology*. 1998 Sep;33(3):230-9.
11. Mollejo M, Lloret E, Menárguez J, Piris MA, Isaacson PG. Lymph node involvement by splenic marginal zone lymphoma: morphological and immunohistochemical features. *Am J Surg Pathol*. 1997 Jul;21(7):772-80.
12. Mollejo M, Menárguez J, Lloret E, Sánchez A, Campo E, Algara P, Cristóbal E, Sánchez E, Piris MA. Splenic marginal zone lymphoma: a distinctive type of low-grade B-cell lymphoma. A clinicopathological study of 13 cases. *Am J Surg Pathol*. 1995 Oct;19(10):1146-57.

## **LINFOMA DE LA ZONA MARGINAL, TIPO MALT**

### **1. DEFINICION Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD.**

El linfoma de la zona marginal asociado a tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) se caracteriza por una proliferación linfoide con un patrón de crecimiento perifolicular con colonización de los centros germinales

y extensión perifolicular. Está formada por linfocitos pequeños, células B monocitoides, plasmáticas en una proporción variable y aislados blastos. En mucosas, los linfocitos infiltran el epitelio y forman las llamadas lesiones linfoepiteliales. Los linfomas MALT representan un 8% de los linfomas B y un 50% de los linfomas primarios gástricos.

En muchos casos de linfomas MALT existen lesiones precursoras. Hay una historia de infiltrado inflamatorio crónico, debido a infección, proceso autoinmune o un estímulo desconocido que produce acúmulo de tejido linfoide en una localización extraganglionar, que posteriormente da lugar al linfoma MALT. Entre estas lesiones precursoras se encuentran gastritis por *helicobacter pilory*, tiroiditis de Hashimoto o síndrome de Sjögren.

## 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNOSTICO

Biopsia de la localización extraganglionar afecta. Localizaciones más frecuentes: tracto gastrointestinal (gástrica), pulmón, cabeza y cuello, salivar, ocular, piel.

Biopsia de médula ósea: No está indicada en la mayoría de los linfomas MALT, porque un alto porcentaje de casos se presentan en estadios localizados. Cuando hay infiltración, el patrón de infiltración puede ser intersticial, nodular o difuso.

## 3. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

El diagnóstico diferencial se establece por un lado con procesos reactivos y por otro, con otros linfomas B de células pequeñas.

Los datos favorables al diagnóstico de linfoma frente al de proceso reactivo son el patrón infiltrante del componente linfoide, anomalías fenotípicas/citogenéticas, evidencia indirecta de monoclonalidad por restricción de cadenas ligeras y/o estudio molecular de reordenamiento monoclonal de los genes de Ig.

No hay un marcador específico de este linfoma, por lo que es necesario realizar inmunohistoquímica para descartar otros linfomas de células pequeñas.

Hay que tener en cuenta la hiperplasia marginal atípica con restricción de cadenas ligeras, descrita en la infancia, que plantea DD con linfoma de la zona marginal.

## 4. PANELES DE IHQ

**Panel de primera línea:** CD20, CD3, ciclina D1, bcl2, bcl6, Mib1, kappa, lambda

**Panel de segunda línea:** CD38, IgD, CD23, IRTA1

## 5. CITOGENETICA/MOLECULAR

Se han descrito translocaciones asociadas a linfomas MALT, incluyendo la t(11;18)(q21;q21) que implica a *API2-MALT1* y las t(1;14)(p22;q32), t(14;18)(q32;q21) y la t(3;14)(p14.1;q32), que desregulan los factores de transcripción BCL10, MALT1 Y FOXP1 respectivamente. Estas alteraciones tienen cierta predisposición a producirse en determinadas localizaciones:

- La t(11;18)(q21;q21)(*API2-MALT1*) (15-40%) detectada especialmente en MALT gástricos (10-40%), se asocia a una pobre respuesta al tratamiento antibiótico erradicador del H pilory (<5%) y por ello en estos casos debe considerarse la adición de tratamientos alternativos. Esta anomalía también se detecta en MALT pulmonares
- t(14;18)(q32;q21)(*IGH-MALT1*)(20%) se detecta principalmente en linfomas anejos oculares/órbita y glándula salival
- la t(3;14)(p14.1;q32)(*IGH-FOXP1*) (<5%) asociado fundamentalmente a MALT de tiroides, anejos oculares/órbita y piel.
- la t(1;14)(p22;q32)(*IGH-BCL10*) (<5%), detectado fundamentalmente en los MALT gástricos y pulmonares

Se han descrito deleciones/mutaciones de A20 en el 19%, 8% y 11 % de los linfomas MALT ocular, salival y tiroides respectivamente.

Las trisomías del cromosoma 3 y 18 y las deleciones del 6q, también son frecuentes en este tipo de linfomas, independientemente de la localización anatómica.

Se han descrito mutaciones de MYD88 en el 9%.

#### RECOMENDACIONES.

1. Las lesiones linfoepiteliales no son específicas de los MALT, se pueden observar en otros linfomas infiltrando epitelios y en condiciones reactivas. Grado C. Evidencia nivel IV
2. Hay que recordar que otros linfomas B de células pequeñas pueden presentarse clínicamente infiltrando localizaciones extraganglionares. Grado C. Evidencia nivel IV
3. Como otros linfomas B de células pequeñas puede presentar diferenciación plasmacítica. Grado C. Evidencia nivel IV
4. Se pueden observar células grandes salpicadas en la zona marginal, y eso no es sinónimo de linfoma B difuso de células grandes. Solo cuando se observen zonas difusas formadas por células grandes, el diagnóstico será linfoma B difuso de células grandes con un componente de linfoma MALT. Grado C. Evidencia nivel IV
5. Por la ausencia de marcadores específicos, y por la dificultad de realizar el diagnóstico diferencial con procesos reactivos/precursores, es necesario hacer una correlación clínico-patológica para establecer el diagnóstico definitivo. Grado C. Evidencia nivel IV
6. En casos en los que no haya evidencia indirecta de monoclonalidad mediante estudio IHQ con cadenas ligeras se recomienda realizar estudio de clonalidad de IG para demostrar objetivamente monoclonalidad. Grado C. Evidencia nivel IV
7. Los estudios citogenéticos pueden ser de ayuda en el diagnóstico diferencial. En los linfomas MALT gástrico, se recomienda realizar el estudio de  $t(11;18)(q21;q21)(API2-MALT1)$ , ya que esta traslocación predice una pobre respuesta al tratamiento antibiótico. Grado B, nivel de evidencia III

#### REFERENCIAS

1. Thieblemont C, Bertoni F, Copie-Bergman C, Ferreri AJ, Ponzoni M. Chronic inflammation and extra-nodal marginal-zone lymphomas of MALT-type. *Semin Cancer Biol.* 2014 Feb;24:33-42
2. Ferreri AJ, Govi S, Ponzoni M. Marginal zone lymphomas and infectious agents. *Semin Cancer Biol.* 2013 Dec;23(6):431-40.
3. Suarez F, Lortholary O, Hermine O, Lecuit M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood.* 2006 Apr 15;107(8):3034-44. Review.

#### LINFOMA DE LA ZONA MARGINAL, TIPO GANGLIONAR

##### 1. DEFINICIÓN Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD.

El linfoma de la zona marginal tipo ganglionar (NMZL) es una neoplasia de células B que se asemeja morfológicamente a los ganglios infiltrados por linfoma de la zona marginal tipo MALT o esplénico pero sin afectación de una localización extraganglionar ni del bazo.

Es muy poco frecuente, alrededor del 1,5-1,8% de las neoplasias linfoides. Se han descrito casos asociados a virus de la hepatitis C.



Existe un subtipo clínico-patológico, el linfoma de la zona marginal pediátrico. Se suele presentar en varones, en un estadio clínico inicial y en una sola localización ganglionar. Tienen un curso excelente con baja proporción de recidivas con tratamiento conservador.

## 2. TIPO DE MUESTRA PARA DIAGNOSTICO

La muestra ideal para el diagnóstico es la biopsia escisional del ganglio linfático afectado. Es muy rara la afectación de médula ósea y sangre periférica.

**Biopsia ganglio:** Muestra una proliferación linfoide con un patrón perifolicular, colonizando centros y con crecimiento en las áreas interfoliculares. La composición citológica es semejante a los otros linfomas de la zona marginal: linfocitos pequeños, células plasmáticas, linfocitos con diferenciación marginal y aislados blastos. La tinción para dendríticas destaca el patrón nodular con centros residuales.

## 3. TIPO DE ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS REQUERIDOS PARA LA ESTADIFICACION.

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es el método de elección para la estadificación de todos los casos de LZMG. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro y estudios inmunofenotípicos y de citogenética/FISH (estos en caso de que se demuestre infiltración por citometría de flujo-morfología

## 4. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

El diagnóstico diferencial se plantea especialmente con el linfoma folicular, linfoma linfoplasmacítico y con la infiltración ganglionar por un linfoma de la zona marginal tipo MALT o esplénico.

Por otro lado, se plantea diagnóstico diferencial con hiperplasias foliculares reactivas.

## 5. PANELES DE IHQ

No existe un marcador propio de este linfoma, para establecer el diagnóstico hay que excluir marcadores de otros linfomas y utilizar los que destaquen el patrón arquitectural.

**Panel de primera línea:** CD20, CD3, bcl2, bcl6, ciclina D1, CD23, MIB1

**Panel de segunda línea:** IgD, kappa, lambda, MNDA

## 6. CITOGENETICA/MOLECULAR

No existe marcador específico de este tumor. No son frecuentes las traslocaciones descritas en los linfomas marginales MALT ni la del7q31-32 del linfoma esplénico de la zona marginal. Entre las anomalías más frecuentemente detectadas se encuentra la trisomías de los cromosomas 3, 7,12 y 18 y las traslocaciones del cromosoma 1.

En ocasiones puede ser necesario la demostración de clonalidad por PCR para confirmar el diagnóstico de linfoma de la zona marginal y diferenciarlo de proceso reactivo.

## RECOMENDACIONES.

1. La biopsia escisional/incisional del ganglio es necesaria para el diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV
2. Por la ausencia de marcadores propios, hay que incluir en el panel de inmunohistoquímica ciclina D1 y BCL6 para excluir linfoma del manto y folicular respectivamente. Grado C. Evidencia nivel IV
3. La presencia de folículos es constante, y la tinción para dendríticas (CD21/CD23) destacan el patrón nodular del tumor con la existencia de centros germinales reemplazados por el tumor. Grado C. Evidencia nivel IV
4. Correlacionar con la historia clínica para descartar infiltración de órgano extraganglionar o esplénica. Grado C. Evidencia nivel IV

5. Diferenciación marginal se puede observar en linfomas foliculares. Grado C. Evidencia nivel IV
6. Cuando presenta diferenciación plasmacítica y plantea diagnóstico diferencial con LPL, se puede realizar un diagnóstico de linfoma B de células pequeñas con diferenciación plasmacítica y proponer las diferentes opciones. Grado C. Evidencia nivel IV
7. El número de células grandes que se ven en los LZM ganglionares suele ser mayor que en los otros tipos, MALT y esplénico. Sin embargo, para considerarlo un linfoma B difuso de células grandes tienen observarse un patrón difuso formado por masas o nidos de células grandes sin el patrón nodular del LZM. Grado C. Evidencia nivel IV

## REFERENCIAS

1. van den Brand M, van Krieken JH. Recognizing nodal marginal zone lymphoma: recent advances and pitfalls. A systematic review. *Haematologica*. 2013 Jul;98(7):1003-13.
2. Angelopoulou MK, Kalpadakis C, Pangalis GA, Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos TP. Nodal marginal zone lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2013 Nov 12.
3. Dreyling M, Thieblemont C, Gallamini A, et al. ESMO Consensus conferences: guidelines on malignant lymphoma. part 2: marginal zone lymphoma, mantle cell lymphoma, peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol*, 2013; 24: 857–87
4. Traverse-Glehen A, Bertoni F, Thieblemont C, Zucca E, Coiffier B, Berger F, Salles G. Nodal marginal zone B-cell lymphoma: a diagnostic and therapeutic dilemma. *Oncology (Williston Park)*. 2012 Jan;26(1):92-9, 103-4. Review
5. Kanellis G, Roncador G, Arribas A, Mollejo M, Montes-Moreno S, Maestre L, Campos-Martin Y, Ríos Gonzalez JL, Martínez-Torrecedrada JL, Sanchez-Verde L, Pajares R, Cigudosa JC, Martin MC, Piris MA Identification of MNDA as a new marker for nodal marginal zone lymphoma. *Leukemia*. 2009 23(10):1847-57. PMID: 19474799
6. Mollejo M, Camacho FI, Algara P, Ruiz-Ballesteros E, García JF, Piris MA. Nodal and splenic marginal zone B cell lymphomas. *Hematol Oncol*. 2005 Sep-Dec;23(3-4):108-18. Review.
7. FI Camacho, P Algara, M Mollejo, JF García, C Montalbán, N Martínez, M Sánchez-Beato, MA Piris. Nodal marginal zone lymphoma: a heterogeneous tumor. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 762-771.

## LINFOMA LINFOPLASMATICO

*Autor para la correspondencia: Manuela Mollejo (mmollejov@sescam.jccm.es).*

### 1. DEFINICIÓN

El linfoma linfoplasmático (LPL) es una neoplasia de células B maduras formada por linfocitos pequeños, plasmáticas y linfocitos plasmocitoides que no cumplen los criterios de otros linfomas B de células pequeñas, que pueden presentar diferenciación plasmacítica. Afecta médula ósea, bazo y menos frecuentemente ganglio linfático. Es frecuente la presencia de paraproteína, generalmente IgM. Cuando se produce la asociación entre infiltración de médula ósea y producción de componente monoclonal IgM, independientemente de su

cantidad y de que haya o no sintomatología estamos ante una Macroglobulinemia de Waldenstrom (MW). (Owen et al, 2003; Swerdlow et al, 2008) Anemia, trombopenia, leucopenia puede observarse por infiltración medular y raramente por hiperesplenismo. Otros síntomas-signos que se pueden detectar en estos pacientes, en parte relacionados con la paraproteína sérica son la neuropatía, organomegalias, visceromegalias, citopenias, amiloidosis y crioglobulinemia. Hay casos asociados al virus de la hepatitis C.

## 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNOSTICO

El diagnóstico se establece más frecuentemente en sangre periférica y biopsia de médula ósea y/o en ganglio linfático.

**Sangre periférica:** Frecuentemente muestra rouleaux. Se observan linfocitos pequeños, linfoplasmocitoides y células plasmáticas.

**Biopsia médula ósea:** La biopsia de médula ósea es obligatoria para el diagnóstico. Muestra un infiltrado intersticial y/o nodular por linfocitos pequeños, células linfoplasmocitoides y plasmáticas. Se pueden observar cuerpos de Russell (inclusiones citoplasmáticas de Ig, PAS positivas), o cuerpos de Dutcher (inclusiones nucleares). Se pueden observar aislados blastos, pero no centros de proliferación. Se ven frecuentes mastocitos. No se suele ver ni la infiltración intrasinusoidal, como en linfomas esplénicos de la zona marginal, ni centros germinales residuales. En el aspirado medular se pueden observar signos similares, pero sólo la observación de la arquitectura ósea permite descartar o confirmar la existencia o no de infiltración linfoplasmocítica. Ni la CMF ni los estudios moleculares están aún aceptados para determinar el diagnóstico definitivo.

**Ganglio linfático:** Proliferación linfoide con un patrón vagamente nodular, con centros germinales residuales, y formada por el mismo tipo celular que en médula ósea y sangre periférica. No es raro observar histiocitos epitelioides,

**Bazo:** Es muy raro que se realice el diagnóstico en el bazo. Presenta un infiltrado con las mismas características que en el resto de los órganos, y localizado preferentemente en la pulpa roja.

## 3. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

El diagnóstico de LPL es un diagnóstico de exclusión, ya que otros linfomas B de células pequeñas pueden mostrar diferenciación plasmacítica, por tanto es necesario descartar otros linfomas antes de hacer el diagnóstico de LPL.

El diagnóstico que más dificultad plantea, por la ausencia de marcador específico es el linfoma de la zona marginal.

Por otro lado, el diagnóstico diferencial hay que establecerlo con las proliferaciones linfoplasmacíticas monoclonales asociadas/ o no al virus de la hepatitis C (gammapatía monoclonal de significado incierto IgM). No se conocen los factores de riesgo que determinan la progresión de linfocitosis linfoplasmacíticas monoclonales a evidentes linfomas.

## 4. PANELES DE INMUNOHISTOQUIMICA (IHQ) e HBRIDACION IN SITU CROMOGENICA (HIS-C).

**Panel de primera línea CMF:** CD20, CD22, CD138, CD23, CD5, CD25, CD103, Smlg, CD10

**Panel de primera línea IHQ:** CD20, CD3, CD138, CD38, kappa, lambda, ciclina D1.

**Paneles de segunda línea:** CD56

## 5. CITOGENETICA Y MOLECULAR

La delección de 6q es frecuente (aprox. 30%), pero no tiene mucho impacto clínico y escaso en el diagnóstico diferencial (aunque menos frecuente, también se observa en otros síndromes linfoproliferativos).

La mutación L265P del gen MYD88 es muy frecuente en casos de MW (>90%) y MGUS (50-90%), aunque se ha descrito con muy escasa frecuencia en el resto de los LPL. Esta mutación es de gran utilidad para el diagnóstico diferencial, ya que no está presente en otras neoplasias linfoides, salvo en un 15-20% de los linfomas difusos de célula grande (especialmente de tipo no centro germinal), el 20% de los linfo-

mas B de la zona marginal esplénico y en apenas un 2% de las leucemias linfoides crónicas. Las mutaciones del gen CXCR4 se detectan en un 25-30% de los casos de MW, y aún no han sido descritas en otras neoplasias linfoides.

En ocasiones puede ser necesario realizar FISH para t(11;14) y t(14;18) para excluir linfoma del manto y linfoma folicular respectivamente, que nunca aparecen en el LPL.

## RECOMENDACIONES

1. Cuando no se pueda establecer un diagnóstico preciso de LPL, se aconseja diagnosticarlo de linfoma B de células pequeñas con diferenciación linfoplasmocítica y establecer posibles diagnósticos diferenciales. Grado C. Evidencia nivel IV
2. La detección de la mutación MYD88/L265P se ha demostrado de utilidad en el diagnóstico diferencial de procesos linfoproliferativos B de bajo grado en muestras de MO, de modo que su presencia apoya el diagnóstico de LPL y MW. Grado B, nivel de evidencia III
3. El diagnóstico de MW requiere la identificación de un componente monoclonal IgM en suero, junto con la evidencia de infiltración medular por examen convencional de la biopsia ósea de una población de células con diferenciación linfoplasmocitoide. La expresión sIgM, CD20, CD19, CD25 y CD22 débil con ausencia de CD5, CD23 y CD10 es altamente sugerente de LPL/MW. No obstante, la presencia de alguno de los marcadores negativos o la ausencia de alguno de los positivos no confirma o excluye completamente el diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV
4. La presencia de componente monoclonal IgM, en ausencia de infiltrado reconocible en la biopsia ósea y signos o síntomas clínicos marca el diagnóstico de Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto tipo IgM. Grado C. Evidencia nivel IV

## REFERENCIAS

1. Jiménez C; Sebastián E; Del Carmen Chillón M; Giraldo P; Mariano Hernández J; Escalante F; González-López TJ; Aguilera C; de Coca AG; Murillo I; Alcoceba M; Balanzategui A; Eugenia Sarasquete M; Corral R; Marín LA; Paiva B; Ocio EM; Gutiérrez NC; González M; San Miguel JF; García-Sanz R. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia*. 2013; 27:1722-8. .
2. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, et al. Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003; 30(2):110-115.
3. Gachard, N., M. Parrens, I. Soubeyran, B. Petit, A. Marfak, D. Rizzo, M. Devesa, M. Delage-Corre, V. Coste, M. P. Laforet, A. de Mascarel, J. P. Merlio, K. Bouabdhalia, N. Milpied, P. Soubeyran, A. Schmitt, D. Bordessoule, M. Cogne and J. Feuillard (2013). "IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenstrom macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas." *Leukemia* 27(1): 183-189.
4. Mollejo, M., J. Menárguez, P. Guisado-Vasco, L. Bento, P. Algara, S. Montes-Moreno, M. S. Rodriguez-Pinilla, M. A. Cruz, F. Casado, C. Montalbán and M. A. Piris (2014). "Hepatitis C virus-related lymphoproliferative disorders encompass a broader clinical and morphological spectrum than previously recognized: a clinicopathological study." *Mod Pathol* 27(2): 281-293.
5. Ondrejka, S. L., J. J. Lin, D. W. Warden, L. Durkin, J. R. Cook and E. D. Hsi (2013). "MYD88 L265P somatic mutation: its usefulness in the differential diagnosis of bone marrow involvement by B-cell lymphoproliferative disorders." *Am J Clin Pathol* 140(3): 387-394.

6. Swerdlow SH CE, H. N., Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.
7. Varettoni, M., L. Arcaini, S. Zibellini, E. Boveri, S. Rattotti, R. Riboni, A. Corso, E. Orlandi, M. Bonfichi, M. Gotti, C. Pascutto, S. Mangiacavalli, G. Croci, V. Fiaccadori, L. Morello, M. L. Guerrero, M. Paulli and M. Cazzola (2013). "Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms." Blood 121(13): 2522-2528.

## OTROS PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS (HCL, LINFOMAS B ESPLENICOS INCLASIFICABLES)

Autor para la correspondencia: *Manuela Mollejo* ([mmollejev@sescam.jccm.es](mailto:mmollejev@sescam.jccm.es)).

## LEUCEMIA DE CELULAS PELUDAS

### 1. DEFINICION Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD.

La leucemia de células peludas (LCP) es un proceso linfoproliferativo caracterizado por esplenomegalia, infiltración de médula ósea y presencia en sangre periférica y aspirados de médula ósea de células con prolongaciones citoplasmáticas "peludas". Los pacientes presentan síntomas por pancitopenia, esplenomegalia o infecciones.

### 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNOSTICO

El diagnóstico se establece normalmente en muestra de sangre periférica y médula ósea.

**Sangre periférica:** Se puede observar macrocitosis, pancitopenia, y monocitopenia. Las células peludas tienen núcleos de mediano tamaño y citoplasmas amplios con prolongaciones. No muestran nucléolo prominente.

**Biopsia médula ósea:** Típicamente los aspirados son secos por la fibrosis en la médula, siendo la biopsia de la médula una localización típica para el diagnóstico. El grado de infiltración es variable, desde un infiltrado intersticial con conservación de la arquitectura y del tejido adiposo hasta una infiltración difusa con borramiento de la arquitectura normal, por una proliferación de linfocitos de pequeño-mediano tamaño con citoplasmas amplios y claros. La infiltración de la médula por LCP no suele formar nódulos como ocurre en la infiltración de la médula por otros linfomas.

**Bazo:** Se observa una infiltración difusa en la pulpa roja por una proliferación de linfocitos con citoplasmas claros y núcleos ovoideos. La pulpa blanca suele ser atrófica. Es frecuente observar lagos venosos.

**Ganglio linfático:** No suelen estar infiltrados y raramente se reciben para diagnóstico. El grado de infiltración es variable, y la morfología de las células es similar a la descrita en bazo

### 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

El DD se establece principalmente con la LCP variante, el LEZM y el linfoma esplénico difuso de la pulpa roja.

El patrón de infiltración de la médula ósea más frecuente es intersticial, respetando la arquitectura, requiriendo en esas circunstancias la realización de técnicas de inmunohistoquímica para el diagnóstico (CD20).

### 4. PANELES DE IHQ

Las células de la LCP expresan TRAP, a diferencia de los otros procesos linfoproliferativos con los que se plantea DD.

**Panel de primera línea CMF:** CD19, CD20/CD22, CD200, CD11c, CD25, CD103, CD123, k/I.

**Panel de primera línea IHQ:** CD20, CD3, Anexina1, BRAFV600E (clon VE1).

**Panel de segunda línea:** IgD, DBA44, ciclina D1,

## 5. CITOGENETICA/MOLECULAR

Se ha descrito la presencia de la mutación V600E en más del 88% de los casos de LCP. Esta mutación es un marcador diagnóstico en la LCP y un potencial marcador de selección de terapia dirigida.

### RECOMENDACIONES.

1. El estudio de sangre periférica y médula ósea son las localizaciones donde se realiza normalmente el diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV
2. CD11c, CD25, CD103, CD123 son recomendados cuando se sospecha LCP. Grado C. Evidencia nivel IV
3. Panel de primera línea IHQ: CD20, CD3, Anexina1, BRAFV600E (clon VE1). Grado C. Evidencia nivel IV
4. El estudio de la presencia de la mutación por estudio molecular de BRAF es recomendable aunque no imprescindible en el momento actual para el diagnóstico de LCP. Grado C. Evidencia nivel IV
5. La morfología de las células con citoplasmas amplios y claros hace sospechar el diagnóstico de LCP. Grado C. Evidencia nivel IV
6. Las prolongaciones citoplasmáticas se observan en los extendidos de sangre periférica, pero no en los realizados de médula ni de bazo. Grado C. Evidencia nivel IV
7. La fuerte expresión de TRAP es casi exclusiva de la LCP. Grado C. Evidencia nivel IV
8. En relación a la valoración de la expresión de Anexina 1 en la médula ósea hay que tener en cuenta que también marca células mieloides y algunos linfocitos T, pero no se ha descrito en otros linfomas B. Grado C. Evidencia nivel IV

### REFERENCIAS

1. Shao H, Calvo KR, Grönborg M, Tembhare PR, Kreitman RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: development and validation of diagnostic criteria. *Leuk Res.* 2013
2. Jones G, Parry-Jones N, Wilkins B, Else M, Catovsky D; British Committee for Standards in Haematology. Revised guidelines for the diagnosis and management of hairy cell leukaemia and hairy cell leukaemia variant\*. *Br J Haematol.* 2012 Jan;156(2):186-95.
3. Summers TA, Jaffe ES. Hairy cell leukemia diagnostic criteria and differential diagnosis. *Leuk Lymphoma.* 2011 Jun;52 Suppl 2:6-10.

## LINFOMA B ESPLÉNICO DE CELULAS PEQUEÑAS, DIFUSO DE LA PULPA ROJA.

### 1. DEFINICION Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD.

El linfoma B de células pequeñas esplénico difuso de la pulpa roja (LEDPR) es una entidad provisional incluida en la última edición de la clasificación de linfomas de la OMS. Es un linfoma que afecta médula ósea, sangre periférica y bazo. Es un linfoma muy poco frecuente, representa menos del 10% de los linfomas B diagnosticados en el bazo. Se caracteriza por una infiltración de la pulpa roja por una población monótona de linfocitos pequeños B.

### 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNOSTICO

Como el propio nombre indica, el diagnóstico estándar requiere el examen del bazo, pero por las características de la infiltración de la médula y en sangre periférica se puede sugerir el diagnóstico.

**Sangre periférica:** Se observa una población linfoide homogénea de linfocitos de pequeño-mediano tamaño, con núcleos redondo u oval y citoplasmas basófilos con prolongaciones “vellosas”. Los nucléolos no son prominentes. Se observan células linfoplasmocitoides y ocasionalmente linfocitos grandes con nucléolos prominentes en casos de progresión/transformación

**Médula ósea:** Típicamente se observa una infiltración intrasinusoidal, acompañada con un infiltrado intersticial y/o nodular de variable intensidad.

**Bazo:** Morfológicamente el bazo muestra una infiltración difusa en la pulpa roja, a nivel sinusoidal y cordonal, de linfocitos pequeños. La pulpa blanca suele estar atrófica.

### 3. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

El diagnóstico diferencial se establece básicamente con el LEZM, LCP y con la LCP variante.

La infiltración de la médula y de la sangre periférica puede ser semejante al LEZM. Sin embargo, el examen del bazo es diferente, no observándose ni citología bifásica, ni diferenciación marginal ni reemplazamiento folicular.

El diagnóstico diferencial con la LCP se basa en la morfología (diferente patrón de prolongaciones vellosas, ausencia de fibrosis en médula), fenotipo (ausencia de anexina1, CD25, TRAP en el difuso) y molecular (ausencia de mutaciones de BRAF).

El diagnóstico diferencial con la LCP variante se basa básicamente en la ausencia de nucléolo en el LEDPR y menor grado de linfocitosis. En cualquier caso, hay cierto solapamiento entre ambas entidades.

### 4. PANELES DE IHQ

**Panel de primera línea CMF:** CD19, CD20/CD22, CD200, CD11c, CD25, CD103, CD123, k/l.

**Panel primera línea IHQ:** CD20, CD3, IgG, ciclina D1.

**Panel de segunda línea IHQ:** Anexina 1, IgD, BRAFV600E (clonVE1).

### 5. CITOGENETICA/MOLECULAR

No hay alteraciones citogenéticas ni moleculares propias de este tumor.

Se ha descrito alteraciones de TP53 con aumento de la expresión proteica en un xx 5. A diferencia del LEZM, solo es ocasional la presencia de del7q.

### RECOMENDACIONES.

1. **En caso de duda de diagnóstico, es preferible denominarlo linfoma esplénico B, no clasificable. Grado C. Evidencia nivel IV**

### REFERENCIAS

1. Ponzoni M, Kanellis G, Pouliou E, Baliakas P, Scarfò L, Ferreri AJ, Doglioni C, Bikos V, Dagklis A, Anagnostopoulos A, Ghia P, Stamatopoulos K, Papadaki T. Bone marrow histopathology in the diagnostic evaluation of splenic marginal-zone and splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: a reliable substitute for spleen histopathology? *Am J Surg Pathol.* 2012 Nov;36(11):1609-18
2. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Salles G, Coiffier B, Felman P, Berger F. Splenic diffuse red pulp small-B cell lymphoma: toward the emergence of a new lymphoma entity. *Discov Med.* 2012 Apr;13(71):253-65. Review.
3. Kanellis G, Mollejo M, Montes-Moreno S, Rodriguez-Pinilla SM, Cigudosa JC, Algara P, Montalban C, Matutes E, Wotherspoon A, Piris MA. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: revision of a series of cases reveals characteristic clinico-pathological features. *Haematologica.* 2010 Jul;95(7)

4. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Bauchu EC, Morel D, Gazzo S, Ffrench M, Verney A, Rolland D, Thieblemont C, Magaud JP, Salles G, Coiffier B, Berger F, Felman P. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood*. 2008
5. Mollejo M, Algara P, Mateo MS, Sánchez-Beato M, Lloret E, Medina MT, Piris MA. Splenic small B-cell lymphoma with predominant red pulp involvement: a diffuse variant of splenic marginal zone lymphoma? *Histopathology*. 2002 Jan;40(1):22-30.

## LEUCEMIA DE CELULAS PELUDAS, VARIANTE.

### 1. DEFINICION Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD.

La Leucemia de células peludas variante (LCPv) es una proliferación linfoide B que recuerda a la LCP pero que difiere en que muestra células con prominente nucléolo (variante prolinfocítica de LCP), son CD25-, TRAP -, anexina 1- y no responden a la terapia habitual de la LCP con cladribina. A pesar del nombre, ambas entidades no están relacionadas biológicamente. Está incluida en la OMS como una entidad provisional.

Es un proceso linfoproliferativo muy poco frecuente, que afecta sangre periférica, médula ósea y bazo. Suele presentar leucocitosis.

### 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNOSTICO

El diagnóstico se realiza en sangre periférica.

**Sangre periférica:** La mayoría de las células son grandes, con prolongaciones, y nucléolos prominentes, que semejan prolinfocitos. El fenotipo por CMF es CD25-, CD103-, CD11c+, CD123 + (40%), con un score CLL de 0-1.

**Médula ósea:** El infiltrado de la médula ósea es intersticial e intrasinusoidal, requiriendo la realización de inmunohistoquímica (CD20) para su diagnóstico.

**Bazo:** El patrón de infiltración es en la pulpa roja, con atrofia de la pulpa blanca.

### 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

El diagnóstico diferencial se establece con la LCP, LEDPR y LEZM.

A diferencia de la LCP los aspirados de la médula ósea no son secos por la ausencia de fibrosis reticulínica

### 4. PANELES DE IHQ

Marcadores positivos son DBA44, CD11c, Inmunoglobulinas de superficie (frecuentemente IgG), CD103 y FMC7.

**Panel de primera línea CMF:** CD19, CD20/CD22, CD200, CD11c, CD25, CD103, CD123, k/l.

**Panel de primera línea IHQ:** CD20, CD3, Anexina1, BRAFV600E

**Panel de segunda línea IHQ:** IgD, IgG, DBA44

### 5. CITOGENÉTICA/MOLECULAR

No se conocen alteraciones citogenéticas/moleculares específicas de este tumor. Se ha descrito alteraciones de TP53.

## RECOMENDACIONES.

1. Es una enfermedad excepcional, que a pesar del nombre, no está relacionada con la leucemia de células peludas. La presencia de nucléolo prominente es un rasgo prioritario en esta entidad. Aunque en algunos casos sean nucléolos pequeños, se observan en todos los casos. Grado C. Evidencia nivel IV



2. Para su diagnóstico es preciso demostrar un fenotipo atípico para LCP. Grado B, nivel de evidencia III.
3. Es necesario realizar estudio IHQ con Anexina 1 y BRAFV600E para descartar una LCP clásica. Grado B, nivel de evidencia III

## REFERENCIAS

1. Jones G, Parry-Jones N, Wilkins B, Else M, Catovsky D; British Committee for Standards in Haematology. Revised guidelines for the diagnosis and management of hairy cell leukaemia and hairy cell leukaemia variant\*. Br J Haematol. 2012 Jan;156(2):186-95
2. Hockley SL, Else M, Morilla A, Wotherspoon A, Dearden C, Catovsky D, Gonzalez D, Matutes E. The prognostic impact of clinical and molecular features in hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma. Br J Haematol. 2012 Aug;158(3):347-54.
3. Shao H, Calvo KR, Grönborg M, Tembhare PR, Kreitman RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: development and validation of diagnostic criteria. Leuk Res. 2013 Apr;37(4):401-9

## 2b. LINFOMAS NO HODGKIN, LINFOMAS B AGRESIVOS.

Autor para la correspondencia: *Santiago Montes Moreno* ([smontes@humv.es](mailto:smontes@humv.es))

### LINFOMA DE BURKITT

#### 1. DEFINICIÓN:

El linfoma de Burkitt (LB) es un linfoma B compuesto de células de tamaño mediano, monomorfo que se suele presentar en localizaciones extraganglionares y pacientes en edad pediátrica (30-50% de los linfomas de la infancia, 1-2% de los linfomas en nuestro medio(1)) y jóvenes o inmunodeprimidos. Este tipo de neoplasia se caracteriza molecularmente por traslocaciones aisladas de *MYC* (habitualmente con *IGH* o cadenas ligeras, *IGL* (22q11) o *IGK* (2p12)) que constituye un requisito para el diagnóstico (1).

El LB es una enfermedad potencialmente curable, especialmente las formas endémicas y esporádicas. Después del tratamiento con quimioterapia de combinación intensiva a altas dosis las tasas de curación alcanzan el 80-90% incluso en pacientes con enfermedad diseminada. Son marcadores de mal pronóstico la afectación del SNC y MO, masas >10 cm no resecables y LDH sérica muy elevada(1).

#### 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA ESTABLECER EL DIAGNÓSTICO

- **Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección.
- **Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** Es la aproximación a utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo 1b (Muestras para diagnóstico).

#### TIPO DE ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS REQUERIDOS PARA LA ESTADIFICACION

**Análisis de LCR:** Debe de realizarse siempre. El SNC se encuentra afecto por LB en aproximadamente un 20% de los casos de LB. El diagnóstico en LCR requiere excluir contaminación por SP y la demostración por CMF de una población B clonal(2).

**Biopsia-cilindro y aspirado de médula ósea:** Es el método de elección para la estadificación de todos los casos de LB. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro además de estudios inmunofenotípicos y de citogenética/FISH.

### 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

Los casos de LB plantean el diagnóstico diferencial con neoplasias hematolinfoides y no linfoides, especialmente en edades pediátricas (Sarcoma de Ewing, por ejemplo). Entre las neoplasias hematolinfoides es esencial establecer el diagnóstico diferencial con leucemia/linfoma linfoblástico de precursores B o T, leucemia mieloide aguda indiferenciada o mínimamente diferenciada, linfoma B de células del manto (variante blastoide), linfoma B inclasificable con rasgos intermedios entre LB y LBDCG y Linfoma B Difuso de Células grandes con reordenamientos de *MYC*.

### 4. PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) e HBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENICA (HIS-C).

El linfoma de Burkitt se caracteriza por mostrar un fenotipo B con expresión uniforme de marcadores de fenotipo centro germinal como CD10 y BCL6. Se observa expresión de IgM de superficie y negatividad para BCL2 y TdT. El índice proliferativo es virtualmente del 100% pero las condiciones de procesamiento de tejido pueden artefactar la cuantificación de la expresión de este marcador(2). La sobreexpresión de C-MYC en un porcentaje significativo de la celularidad tumoral es la norma en LB y se asocia con la presencia de traslocaciones del gen, tanto en LB como en LBDCG(4, 5). Así, la sobreexpresión de c-Myc en más del 70% de la celularidad neoplásica tiene una sensibilidad y valor predictivo negativo del 100% y una especificidad del 93% con valor predictivo positivo del 85% en relación con la presencia de traslocaciones de *MYC* en linfomas B agresivos(4).

**Panel de primera línea IHQ:** CD45 (ALC), CD20, CD3, CD10, Ki-67, BCL2, BCL6, TdT, C-MYC.

**Panel de primera línea CMF:** CD45 (ALC), CD34, CD20, CD3, CD10, CD5, CD19, TdT, kappa, lambda(3).

**Panel de segunda línea:** HIS para EBV-EBER.

### 5. 5. CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

La detección de reordenamientos de *MYC* mediante FISH con sondas de tipo BA es de elección para el diagnóstico de LB. En casos negativos para este gen mediante sondas BA se recomienda realizar DF FISH para detectar el reordenamiento(2). Existe no obstante un porcentaje de casos (<10%) de LB típico en los que no se detecta reordenamiento de *MYC* mediante FISH(1).

El estudio de traslocaciones de *BCL2* y *BCL6* debe hacerse en todos los linfomas sugestivos de Burkitt del adulto. La ausencia de reordenamientos de *BCL2* y *BCL6* es un requisito para el diagnóstico de LB. También debe realizarse FISH de *BCL2* y *BCL6* en los pacientes con histologías y/o fenotipos atípicos, incluso en edad pediátrica, tales como aquellos que presentan expresión inmunohistoquímica de BCL2. En estos casos se requiere la demostración de un reordenamiento aislado de *MYC*, sin que simultáneamente presenten reordenamiento de *BCL2* o *BCL6*, para el diagnóstico de LB.

El estudio de cariotipo debe intentar realizarse siempre que exista muestra suficiente, especialmente en aquellos casos con histologías dudosas. Los cariotipos en el LB suelen ser no complejos. En el 40% de los casos la traslocación *IG-MYC* es la única anomalía citogenética. En el resto de los casos se detectan anomalías adicionales siendo las más frecuentes las ganancias del 1q, 7q y pérdidas del 6q,13q32-34 y 17p. Cariotipos complejos deben hacernos dudar del diagnóstico de LB. Se ha descrito un perfil molecular del linfoma de Burkitt basado en análisis de la expresión génica(6, 7). El linfoma de Burkitt molecular se caracteriza por sobreexpresión de genes relacionados con c-Myc y cariotipos simples con translocaciones de *MYC* como única anomalía citogenética. La correlación del perfil molecular con la morfología es baja y actualmente no se aplica para diagnóstico rutinario. Recientemente se han descrito mutaciones somáticas en *MYC*, *ID3*, *GNA13*, *RET*, *PIK3R1*, *ARID1A* y *SMARCA4* entre otros(8). La presencia de mutaciones en *ID3* (en el 34% de los casos) no se encuentra en casos de DLBCL. No

obstante la utilidad de estos marcadores para el diagnóstico, pronóstico o selección de terapia está por determinar.

## RECOMENDACIONES

1. En todos los pacientes debe hacerse biopsia/aspirado de médula ósea y estudio del LCR para estadiaje. Grado B, nivel de evidencia III
2. Panel de primera línea IHQ: CD45 (ALC), CD20, CD3, CD10, Ki-67, BCL2, BCL6, TdT, c-Myc. Grado C. Evidencia nivel IV
3. Panel de primera línea CMF: CD45 (ALC), CD34, CD20, CD3, CD10, CD5, CD19, TdT, kappa, lambda. Grado C. Evidencia nivel IV
4. Panel de segunda línea: HIS para EBV-EBER. Grado C. Evidencia nivel IV
5. La detección de reordenamientos de MYC mediante FISH con sondas de tipo BA es de elección para el diagnóstico de LB. En casos negativos se recomienda realizar el estudio de reordenamiento IGH-MYC con sondas DF FISH para detectar el reordenamiento. Grado C. Evidencia nivel IV
6. El estudio de traslocaciones de BCL2 y BCL6 debe hacerse en todos los linfomas sugestivos de Burkitt del adulto y casos con hallazgos histopatológicos y fenotípicos atípicos. Grado C. Evidencia nivel IV
7. Se requiere la demostración de un reordenamiento aislado de MYC, sin que simultáneamente presenten reordenamiento de BCL2 o BCL6, para el diagnóstico de LB. Grado C. Evidencia nivel IV
8. El estudio de cariotipo puede ser útil para el diagnóstico diferencial del LB y ocasionalmente para identificar reordenamientos no detectados por FISH. Los cariotipos complejos deben hacernos dudar del diagnóstico de LB. Grado C. Evidencia nivel IV

## REFERENCIAS:

1. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
2. Parker A, BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting. 2012.
3. NCCN. NCCN Guidelines, Non Hodgkin Lymphomas. v 1.2013 ed, 2013.
4. Green TM, Nielsen O, de Stricker K, Xu-Monette ZY, Young KH, Moller MB. High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2012 Apr;36(4):612-9.
5. Ruzinova MB, Caron T, Rodig SJ. Altered subcellular localization of c-Myc protein identifies aggressive B-cell lymphomas harboring a c-MYC translocation. *Am J Surg Pathol.* 2010 Jun;34(6):882-91.
6. Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med.* 2006 Jun;354(23):2431-42.
7. Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med.* 2006 Jun;354(23):2419-30.
8. Love C, Sun Z, Jima D, Li G, Zhang J, Miles R, et al. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat Genet.* 2012 Dec;44(12):1321-5.

## LINFOMA B DIFUSO DE CELULA GRANDE.

### 1. DEFINICIÓN:

El linfoma B difuso de células grandes es una neoplasia de células linfoides B de tamaño grande (núcleo igual o mayor que el de un macrófago o tamaño superior al doble de un linfocito normal) que tiene un patrón de crecimiento puramente difuso en las secciones histopatológicas(1). Existen una serie de variantes morfológicas, moleculares y fenotípicas así como entidades específicas compuestas de células B grandes. En este apartado se trata del LBDCG NOS de forma general con anotaciones específicas para los subtipos/entidades de LBDCG.

El LBDCG NOS constituye del 25-30% de los linfomas B no Hodgkin en el mundo occidental. Es más frecuente en pacientes añosos pero puede aparecer a cualquier edad(1). Algunas formas pediátricas(2) y la asociadas a edad avanzada(3) e infección por EBV(1, 4, 5) tienen rasgos clinicopatológicos y moleculares característicos.

### 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto: Es el método de elección.**

**Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** Es la aproximación que se debe utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo 1b (Muestras para diagnóstico).

### 3. TIPO DE ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS REQUERIDOS PARA LA ESTADIFICACION

**Biopsia-cilindro de médula ósea: Estudio requerido** para la estadificación de todos los casos de LBDCG. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro. La médula ósea puede estar infiltrada de forma concordante (morfología de linfoma B difuso de células grandes), discordante (afectación por linfoma B de células pequeñas) o no infiltrada. El significado pronóstico de la infiltración discordante es limitado(8, 9) y en una minoría de casos representa una situación de linfoma B indolente en progresión a Linfoma B de células grandes(6).

### 4. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

Los casos de LBDCG plantean diagnóstico diferencial histopatológico con una amplia variedad de procesos neoplásicos no linfoides y linfoides (Linfoma de Hodgkin y Linfoma T periférico, principalmente). La aproximación diagnóstica inicial debe incluir un estudio morfológico con hematoxilina –eosina (HE) y un panel básico con marcadores de línea linfoide (CD45, ALC), B (CD20) y T (CD3). Una vez determinada la naturaleza linfoide B del infiltrado de células grandes el diagnóstico diferencial debe tener en cuenta:

- Linfoma B de células del manto (variante pleomórfica).
- Linfoma B de células de Burkitt y Linfoma B con rasgos intermedios entre linfoma de Burkitt y Linfoma B Difuso de Células grandes.
- Linfomas B con rasgos intermedios entre Linfoma de Hodgkin y Linfoma B Difuso de Células grandes.
- Subtipos específicos de linfomas B de células grandes: Linfoma B rico en células T e histiocitos, Linfoma B de células grandes EBV positivo asociado a edad avanzada, Linfoma B difuso primario cerebral, Linfoma B Difuso primariamente cutáneo (tipo piernas), Linfoma B difuso primario mediastínico, Linfoma plasmablástico, Linfoma B ALK positivo, Linfoma B asociado de enfermedad de castleman multicéntrica HHV-8 positiva, Linfoma B primario de cavidades, granulomatosis linfomatoide, linfoma B difuso asociado con inflamación crónica.

Este diagnóstico diferencial debe tener en cuenta características clínicas de la enfermedad (localización de las lesiones) y del paciente (edad), así como rasgos morfológicos específicos de la neoplasia (morfología Hodgkin-like, morfología plasmablástica) e inmunofenotípicos.

## 5. PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) e HBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENÉTICA (HIS-C).

Se reconocen al menos dos variantes moleculares de LBDCG NOS, el subtipo centro germinal (GCB) y el subtipo activado (ABC). Estas variantes moleculares se definen en función del perfil de expresión génica determinada mediante análisis de expresión de ARNm, de modo que la mayoría de las series publicadas asignan un porcentaje de casos al tipo ABC entre el 46 y 48%(2, 10, 11). Se han desarrollado varios algoritmos inmunohistoquímicos que son subrogados imperfectos del perfil de expresión génica con tasas de concordancia variables en torno al 90%(10-12). Ya que la IHQ es un método factible para la subclasificación de estos casos y hay datos que sugieren que el fenotipo noGCB/ABC pudiera ser útil en un futuro de tratamientos actualmente no estándar se recomienda incluir, al menos, el fenotipado según el algoritmo de Hans en los casos de LBDCG(12). Es preciso incluir en el informe el porcentaje estimado de células positivas para cada marcador analizado. Adicionalmente hay evidencia de que la coexpresión mediante inmunohistoquímica de C-MYC y BCL2 en casos de LBDCG (C-MYC  $\geq$ 40%, BCL2  $\geq$ 70%) identifica un subgrupo de LBDCG de conducta clínica especialmente agresiva(13-15). Se recomienda incluir la determinación de la expresión de C-MYC y BCL2, identificando el porcentaje estimado de células positivas. Asimismo, la expresión de CD30 en casos de LBDCG se asocia con rasgos clinicopatológicos y moleculares específicos(16). La potencial disponibilidad de terapias específicas frente esta molécula hace aconsejable identificar la positividad y el porcentaje estimado de células positivas para CD30 en cada caso de LBDCG.

En cualquier caso, este tipo de subdivisiones pronósticas independientes del índice IPI no tienen hoy mucha aplicabilidad clínica fuera de los ensayos clínicos, ya que no se utilizan estrategias terapéuticas diferentes para los distintos subgrupos de pacientes.

Existe un conjunto de subtipos de linfomas B de células grandes con morfología inmunoblástica y plasmablástica que se asocian con rasgos clinicopatológicos distintivos. Para su identificación precisa se requiere un panel que permita la identificación de un fenotipo específico (pérdida de marcadores de línea B y adquisición de marcadores de diferenciación terminal) asociado con marcadores propios de las diferentes entidades (EBV-EBER y C-MYC en el caso de linfomas plasmablásticos, HHV-8 en el caso de linfomas de cavidades, por ejemplo). Se recomienda el uso de un panel específico de segunda línea en estos casos para subclasificar adecuadamente la neoplasia.

Algunas entidades específicas incluyen en su definición la demostración de la presencia de EBV en las células neoplásicas. Entre estas se encuentran además de los ya citados, los casos de Linfoma B Difuso de Células Grandes asociado a EBV y edad avanzada, los casos de granulomatosis linfomatoide y casos de desorden linfoproliferativo post-trasplante de tipo LBDCG. En estos casos la demostración de EBV-EBER mediante ISH-C es un requisito para el diagnóstico. En su defecto una inmunotinción positiva para EBV-LMP1 es un subrogado adecuado. La negatividad para EBV-LMP1 no descarta la presencia de EBV, siendo la ISH EBV-EBER la técnica de sensibilidad óptima en tejido adecuadamente fijado.

**Panel de primera línea:** CD45 (ALC), CD20, CD3. En caso de terapia previa con antiCD20 es útil el uso de otros marcadores de línea B como PAX5, OCT2, CD79.

### Paneles de segunda línea:

- Necesario en casos con el probable diagnóstico de LBDCG NOS: CD10, BCL6, MUM1, BCL2, C-MYC, Ki67, ciclinaD1.
- Aconsejable en casos con el probable diagnóstico de LBDCG NOS: CD30.
- Necesario en casos con morfología inmunoblástica/plasmablástica: CD138, CD38, Ki67, C-MYC, HHV-8, ALK, EBV-EBER (en su defecto EBV-LMP1).
- Necesario en casos con edad avanzada (>50 años), granulomatosis linfomatoide y desorden linfoproliferativo post-trasplante de tipo LBDCG: EBV-EBER (en su defecto EBV-LMP1).

## 6. CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

El estudio de FISH para la detección de reordenamientos de *MYC*, *BCL2* y *BCL6* utilizando sondas de tipo BA es de utilidad para identificar casos con alteraciones citogenéticas múltiples asociadas con mal pronóstico clínico y potenciales candidatos a terapias no estándar(17). La presencia de traslocaciones en estos genes,

particularmente en *MYC* y *BCL2* se asocia estrechamente con la sobreexpresión de la proteína en porcentajes significativos de la celularidad neoplásica(13, 14, 18). Se sugiere, basándose en esta evidencia, testar para FISH de *MYC* y *BCL2* aquellos casos con sobreexpresión de *MYC* en, al menos, el 50% de la población neoplásica. Si se encuentra *MYC* reordenado, con o sin reordenamiento de *BCL2* mediante FISH, es de utilidad identificar el posible reordenamiento de *BCL6*(19).

Cerca de un 2% de los casos de LBDCG sobreexpresan ciclinaD1 mediante IHQ(20). Si se observa la sobreexpresión homogénea e intensa de ciclinaD1 mediante IHQ es necesario realizar FISH de *CCND1* para descartar una forma pleomórfica de LCM.

La presencia de traslocaciones de *MYC* y *ALK* está descrita en algunos subtipos de linfoma B de células grandes de morfología inmunoblástica/plasmablástica(21, 22). La demostración de estas alteraciones mediante sondas FISH de tipo BA es aconsejable pero no estrictamente necesaria para un diagnóstico.

Se ha descrito un subgrupo de Linfomas B de fenotipo centrogerminal (LBDCG y LF) con traslocaciones de *MUM1/IRF4*. Este subgrupo se encuentra en pacientes jóvenes y muestran una conducta clínica relativamente favorable(2). La demostración de estas alteraciones mediante sondas FISH de tipo BA es aconsejable pero no estrictamente necesaria para un diagnóstico. El estudio de cariotipo no es necesario, aunque si existe muestra suficiente es recomendable, ya que puede resultar de utilidad para identificar nuevos reordenamientos no conocidos, anomalías secundarias, potenciales dianas terapéuticas y en el diagnóstico diferencial por ejemplo con linfomas de características intermedias, en los que los cariotipos son muy complejos a diferencia de los cariotipos del linfoma de Burkitt.

#### **Análisis de clonalidad linfoide (reordenamientos de Ig) mediante PCR y electroforesis capilar.**

En contadas ocasiones (abundancia de necrosis, mala calidad de la muestra, aberraciones inmunofenotípicas inesperadas) puede ser necesaria la ayuda de un estudio molecular que confirme la clonalidad B de la muestra. Para ello, la técnica recomendada es la amplificación de la región variable de los genes de las inmunoglobulinas y su estudio por análisis del tamaño de los fragmentos o su secuenciación(23, 24). Este estudio es siempre complementario al estudio morfológico e inmunohistoquímico de la muestra, y nunca debe utilizarse en solitario para asignar un diagnóstico.

## **RECOMENDACIONES**

1. Panel de primera línea: CD45 (ALC), CD20, CD3. En caso de terapia previa con antiCD20 es útil el uso de otros marcadores de línea B como PAX5, OCT2, CD79. Grado C. Evidencia nivel IV
2. Paneles de segunda línea: Necesario en casos con el probable diagnóstico de LBDCG NOS: CD10, BCL6, MUM1, BCL2, C-MYC, Ki67, CD30, ciclinaD1. Grado C. Evidencia nivel IV
3. Se recomienda incluir en el diagnóstico la subclasificación en GCB-ABC según el algoritmo de Hans, especificando en el informe el porcentaje de células positivas para cada marcador evaluado. Grado C. Evidencia nivel IV
4. Se recomienda incluir la determinación de la expresión de C-MYC y BCL2, identificando el porcentaje estimado de células positivas para cada marcador. Grado C. Evidencia nivel IV
5. Se aconseja identificar la positividad y el porcentaje estimado de células positivas para CD30 en cada caso de LBDCG. Grado C. Evidencia nivel IV
6. Paneles de segunda línea: Necesario en casos con morfología inmunoblástica/plasmablástica: CD138, CD38, Ki67, C-MYC, HHV-8, ALK, EBV-EBER (en su defecto EBV-LMP1). Grado C. Evidencia nivel IV
7. 7. Paneles de segunda línea: Necesario en casos con edad avanzada (>50 años) , granulomatosis linfomatoide y desorden linfoproliferativo post-trasplante de tipo LBDCG: EBV-EBER (en su defecto EBV-LMP1). Grado C. Evidencia nivel IV
8. FISH de *MYC* y *BCL2* aquellos casos con sobreexpresión de C-MYC en, al menos, el 50% de la población neoplásica. Si se encuentra *MYC* reordenado mediante FISH es de utilidad identificar el posible reordenamiento de *BCL6*. Grado C. Evidencia nivel IV

9. La presencia de un doble hit genético (reordenamientos concurrentes de IGH-BCL2/t(14;18) (q32;q21) y MYC(8q24) o BCL6 (3q27) y MYC se debe hacer constar en el informe anatomopatológico. Grado C. Evidencia nivel IV
10. Si se observa la sobreexpresión homogénea e intensa de ciclinaD1 mediante IHQ es necesario realizar FISH de CCND1 para descartar una forma pleomórfica de LCM. Grado C. Evidencia nivel IV
11. La demostración de alteraciones de MYC y ALK en casos de morfología inmunoblástica/plasmablastica mediante sondas FISH de tipo BA es aconsejable pero no estrictamente necesaria para un diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV
12. La demostración de traslocaciones de MUM1/IRF4 mediante sondas FISH de tipo BA es aconsejable pero no necesaria para un diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV
13. El estudio de cariotipo no es necesario pero si recomendable en caso de existir muestra suficiente en el panel diagnóstico habitual del LBDCG. Grado C. Evidencia nivel IV

#### REFERENCIAS:

1. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
2. Salaverria I, Philipp C, Oschlies I, Kohler CW, Kreuz M, Szczepanowski M, et al. Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood*. 2011 Jul 7;118(1):139-47.
3. Klapper W, Kreuz M, Kohler CW, Burkhardt B, Szczepanowski M, Salaverria I, et al. Patient age at diagnosis is associated with the molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2012 Feb;119(8):1882-7.
4. Nakamura S, JE, Swerdlow SH. EBV positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. Lyon, 2008.
5. Santiago Montes-Moreno LO, Julio Alexander Diaz-Perez, Ana Batlle Lopez, Sonia Gonzalez de Villambrosía, Francisco Mazorra, Maria E. Castillo, Mar Lopez, Raquel Pajares, Juan F. García, Manuela Mollejo, Francisca I. Camacho, Carmen Ruiz-Marcellán, Magdalena Adrados, Nazario Ortiz, Renato Franco, Carlos Ortiz-Hidalgo, Ana Suarez-Gauthier, Ken H Young, Miguel A. Piris. EBV-positive Diffuse Large B Cell Lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B cell neoplasm characterized by prominent Nuclear Factor-kB activation.: *Modern Pathology*, 2012.
6. Parker A, BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. *Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting*. 2012.
7. NCCN. *NCCN Guidelines, Non Hodgkin Lymphomas*. v 1.2013 ed, 2013.
8. Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M, Berry B, Ruskova A, Berkahn L, et al. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 10;29(11):1452-7.
9. Chung R, Lai R, Wei P, Lee J, Hanson J, Belch AR, et al. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1278-82.
10. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular

- subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia*. 2012 Sep;26(9):2103-13.
11. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011 Jan;29(2):200-7.
  12. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004 Jan;103(1):275-82.
  13. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein co-expression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2013 Feb.
  14. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012 Oct;30(28):3460-7.
  15. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012 Oct;30(28):3452-9.
  16. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, Manyam GC, Visco C, Tzankov A, et al. CD30 expression defines a novel subset of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2013 Jan.
  17. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011 Feb;117(8):2319-31.
  18. Ruzinova MB, Caron T, Rodig SJ. Altered subcellular localization of c-Myc protein identifies aggressive B-cell lymphomas harboring a c-MYC translocation. *Am J Surg Pathol*. 2010 Jun;34(6):882-91.
  19. Pillai RK, Sathanoori M, Van Oss SB, Swerdlow SH. Double-hit B-cell lymphomas with BCL6 and MYC translocations are aggressive, frequently extranodal lymphomas distinct from BCL2 double-hit B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2013 Mar;37(3):323-32.
  20. Ok CY, Li L, Xu-Monette Z, Visco C, Tzankov A, Manyam G, et al. Prevalence and Clinical Implications of Epstein-Barr Virus Infection in de novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Western Countries. *Clin Cancer Res*. 2014 Feb.
  21. Valera A, Balagué O, Colomo L, Martínez A, Delabie J, Tadesse-Heath L, et al. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2010 Nov;34(11):1686-94.
  22. Valera A, Colomo L, Martínez A, de Jong D, Balague O, Matheu G, et al. ALK-positive large B-cell lymphomas express a terminal B-cell differentiation program and activated STAT3 but lack MYC rearrangements. *Mod Pathol*. 2013 Oct;26(10):1329-37.



23. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012 Oct;26(10):2159-71.
24. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2257-317.

## LINFOMAS B CON RASGOS INTERMEDIOS ENTRE LB Y LBDCG.

### 1. DEFINICIÓN:

Esta categoría diagnóstica provisional en la actual clasificación de la OMS es un grupo heterogéneo de neoplasias que no cumplen con los criterios diagnósticos establecidos para LB o LBDCG(1, 2). Las características morfológicas constituyen el primer requisito para el diagnóstico de este tipo de neoplasias. Así estos tumores muestran una morfología atípica para LB con áreas con una celularidad mixta de tamaño intermedio y grande, mitosis, patrón en cielo estrellado (morfologías semejantes a LB o LB-like) o aspecto blastoide. Si el caso tiene una morfología uniforme concordante con LBDCG se debe clasificar como tal, independientemente de los resultados de los estudios complementarios(1). Un porcentaje de estos casos representan la transformación de un Linfoma B Folicular de bajo grado previo(3, 4).

Este tipo de neoplasias son relativamente infrecuentes pero como grupo son más frecuentes que el linfoma de Burkitt en pacientes adultos. Habitualmente muestran rasgos clínicos de alto riesgo (IPI intermedio-alto, estadios avanzados(5-7)) y un pronóstico muy adverso(3-5, 7). En la actualidad no existe una terapia definida y cada caso debe tratarse en función de los factores clínicos al diagnóstico, incluyendo el IPI(1, 7).

### 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto: Es el método de elección.**

**Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** Es la aproximación a utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo 1b (Muestras para diagnóstico).

### TIPO DE ESTUDIOS REQUERIDOS PARA LA ESTADIFICACION.

**Análisis de LCR:** El diagnóstico en LCR requiere excluir contaminación por SP y la demostración por CMF de una población B clonal(8).

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro y estudios inmunofenotípicos y de citogenética/FISH.

### 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

Los casos de Linfoma B inclasificable con rasgos intermedios entre LB y LBDCG plantean el diagnóstico diferencial con leucemia/linfoma linfoblástico de precursores B o T, linfoma B de células del manto (variante blastoide), Linfoma B Difuso de Células grandes y linfoma de Butkitt.

### 4. PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) e HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENICA (HIS-C).

Estos casos suelen mostrar un fenotipo de tipo centro germinal con expresión habitual de CD10 y BCL6 y expresión variable de BCL2 (~50%)(7, 10). En algunas series publicadas la sobreexpresión intensa de BCL2 se encuentra en hasta el 79% de los casos(7) y es un marcador útil en la distinción con LB. Otras alteraciones como la ausencia de expresión de CD10 también ayudan a identificar un fenotipo atípico para LB y apoyan

el diagnóstico(11). El índice proliferativo con Ki67 es habitualmente homogéneo y mayor del 90%. Aproximadamente la mitad de los casos muestran sobreexpresión de C-MYC en al menos el 50% de la celularidad neoplásica(6, 7).

**Panel de primera línea IHQ:** CD45 (ALC), CD20, CD3, CD10, Ki-67, BCL2, BCL6, TdT, C-MYC, ciclinaD1.

**Panel de primera línea CMF:** CD45 (ALC), CD20, CD3, CD10, CD5, CD19, TdT, kappa, lambda(9).

## 5. CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

El análisis de FISH es necesario para demostrar la presencia de traslocaciones de *MYC*, *BCL2* y *BCL6*. A diferencia del LB, en esta categoría *MYC* se encuentra reordenado en aproximadamente el 50% de los casos (habitualmente con un gen distinto a las *IG*) y no es la única alteración citogenética presente. Así, se pueden encontrar reordenamientos adicionales en *BCL2* (~15%)(12) y/o *BCL6* en estos casos(12). Los linfomas con doble hit son el subgrupo mejor caracterizado de estos casos y se definen por la presencia de reordenamientos concurrentes de *IGH-BCL2/t(14;18)(q32;q21)* y reordenamientos de *MYC/8q24*(5). Infrecuentemente se reordena */BCL6 (3q27)*(10). Un porcentaje variable de estos casos (15-30%) representan la transformación de un Linfoma B folicular de bajo grado (G1, G2) previo(3, 4). Es destacable, no obstante, que entre el 30%-67% de los casos de LBI-LB-LBDCG puede no tener traslocaciones de *MYC*(6, 7).

Así, la detección de reordenamientos de *MYC*, *BCL2* y *BCL6* mediante FISH con sondas de tipo BA debe hacerse en todos los linfomas sugestivos de LBI-LB-LBDCG. La presencia de reordenamientos aislados de *MYC* debe hacer considerar la posibilidad de un LB de morfología atípica si el fenotipo es de tipo LB (CD10+BCL6+BCL2-). El estudio del cariotipo no es necesario pero recomendable, dado su potencial utilidad en el diagnóstico diferencial y para la identificación de anomalías secundarias

## RECOMENDACIONES

1. **Panel de primera línea IHQ:** CD45 (ALC), CD20, CD3, CD10, Ki-67, BCL2, BCL6, TdT, C-MYC, ciclinaD1. **Grado C. Evidencia nivel IV**
2. El diagnóstico de LB-I-BCL-LBDCG requiere que el caso tenga una morfología atípica para LB y LBDCG. La morfología de estos casos muestran rasgos intermedios (formas burkitt-like, blastoides o la combinación de áreas de tipo LB con otras de tipo LBDCG). **Grado C. Evidencia nivel IV**
3. Una morfología típica de LBDCG apoya el diagnóstico de LBDCG independientemente del fenotipo y resultados del estudio de FISH. **Grado C. Evidencia nivel IV**
4. Una morfología de LB atípico con un fenotipo de LB (CD10+BCL6+BCL2-) y un reordenamiento aislado de *MYC* (demostrada la ausencia de alteraciones en *BCL2* y *BCL6*) debe hacer considerar LB atípico. En estos casos el estudio de cariotipo puede ser de utilidad (los LB-I-BCL-LBDCG presentan cariotipos complejos; esto es infrecuente en los LB). **Grado C. Evidencia nivel IV**
5. La detección de reordenamientos de *MYC*, *BCL2* y *BCL6* mediante FISH con sondas de tipo BA debe hacerse en todos los linfomas sugestivos de LBI-LB-LBDCG. **Grado C. Evidencia nivel IV**
6. La presencia de un doble hit genético (reordenamientos concurrentes de *IGH-BCL2/t(14;18)(q32;q21)* y *MYC(8q24)* o */BCL6(3q27)* y *MYC* se debe hacer constar en el informe anatomopatológico. **Grado C. Evidencia nivel IV**

## REFERENCIAS:

1. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 May;117(19):5019-32.
2. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.

3. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, Hsu JJ, Ackerman AM, Dal Cin P, et al. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar;34(3):327-40.
4. Li S, Lin P, Fayad LE, Lennon PA, Miranda RN, Yin CC, et al. B-cell lymphomas with MYC/8q24 rearrangements and IGH@BCL2/t(14;18)(q32;q21): an aggressive disease with heterogeneous histology, germinal center B-cell immunophenotype and poor outcome. *Mod Pathol*. 2012 Jan;25(1):145-56.
5. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011 Feb;117(8):2319-31.
6. Cook JR, Goldman B, Tubbs RR, Rimsza L, Leblanc M, Stiff P, et al. Clinical Significance of MYC Expression and/or "High-grade" Morphology in Non-Burkitt, Diffuse Aggressive B-cell Lymphomas: A SWOG S9704 Correlative Study. *Am J Surg Pathol*. 2014 Apr;38(4):494-501.
7. Perry AM, Crockett D, Dave BJ, Althof P, Winkler L, Smith LM, et al. B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and burkitt lymphoma: study of 39 cases. *Br J Haematol*. 2013 Apr.
8. Parker A BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. *Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting*. 2012.
9. NCCN. *NCCN Guidelines, Non Hodgkin Lymphomas*. v 1.2013 ed, 2013.
10. Pillai RK, Sathanoori M, Van Oss SB, Swerdlow SH. Double-hit B-cell lymphomas with BCL6 and MYC translocations are aggressive, frequently extranodal lymphomas distinct from BCL2 double-hit B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2013 Mar;37(3):323-32.
11. Haralambieva E, Boerma EJ, van Imhoff GW, Rosati S, Schuurin E, Müller-Hermelink HK, et al. Clinical, immunophenotypic, and genetic analysis of adult lymphomas with morphologic features of Burkitt lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2005 Aug;29(8):1086-94.
12. Salaverria I, Siebert R. The gray zone between Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma from a genetics perspective. *J Clin Oncol*. 2011 May 10;29(14):1835-43.

## LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO

### 1. DEFINICIÓN:

El linfoma de células del manto (LCM) es un linfoma B compuesto de células de tamaño mediano, monomorfo, con núcleos irregulares, que se caracteriza molecularmente por la traslocación de *CCND1*(1). El LCM supone del 3 al 10% de los LNH y suele afectar a pacientes de edad media-avanzada. La afectación ganglionar es la presentación más habitual. La localización extraganglionar más frecuente es el tracto aerodigestivo (tracto gastrointestinal y anillo de Waldeyer).

Se han descrito variantes histopatológicas agresivas (LCM blastoide y pleomórfico) y otras de curso indolente, con variable presentación clínica, frecuente afectación leucémica y extraganglionar, hipermutación somática de IgVH y expresión disminuida de SOX11(2-4).

Igualmente existe un subgrupo de casos, clínicamente equivalentes a LCM clásico, que carecen de la traslocación de *CCDN1* y presentan traslocaciones en *CCDN2(5)* o *CCDN3*. El LCM in situ es una forma muy inhabitual de linfocitosis ganglionar de fenotipo LCM con t(11;14) restringida a la capa interna de la zona del manto. Su incidencia es desconocida y su significado clínico es impreciso(6).

## 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto: Es el método de elección.**

**Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** Es la aproximación a utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo 1b (Muestras para diagnóstico).

## TIPO DE ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS REQUERIDOS PARA LA ESTADIFICACIÓN

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es el método de elección para la estadificación de todos los casos de LCM. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro y estudios inmunofenotípicos y de citogenética/FISH (estos últimos en caso de que se demuestre infiltración por citometría de flujo-morfología).

## 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

Los casos de LCM clásico plantean el diagnóstico diferencial histopatológico con otras formas de Linfoma B como Linfoma B folicular de bajo grado, Linfoma B de la zona marginal y leucemia linfocítica crónica B/ Linfoma linfocítico de linfocitos B pequeños. Las formas de linfoma del manto blastoide plantean el diagnóstico diferencial con Linfoma de Burkitt, Linfoma B Difuso de células grandes, formas intermedias entre LB y LBDCG y linfoma B linfoblástico. El linfoma del manto pleomórfico plantea el diagnóstico diferencial con Linfoma B folicular y Linfoma B difuso de células grandes. Existe un subgrupo (<5%) de LBDCG que muestran sobreexpresión de *CCDN1* no asociada con traslocación del gen(9).

## 4. 4. PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) e HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENÉTICA (HIS-C).

El LCM clásico se caracteriza por la expresión de CD20, CD5, CD43, BCL2 y CICLINAD1. No se suele observar expresión de CD23 (<10%). Habitualmente se observa restricción de cadenas ligeras lambda. Se pueden observar fenotipos anómalos con expresión de CD10 y BCL6, especialmente en las formas agresivas (i.e manto pleomórfico), así como negatividad para CD5.

La detección de la expresión de SOX11 mediante IHQ es de utilidad en las formas de LCM ciclinaD1 negativos(5). En estos casos se suele encontrar sobreexpresión de *CCDN2* o *CCDN3* así como negatividad para p27(5, 10, 11).

Los estudios de perfil de expresión génica identifican la firma molecular de proliferación como un marcador pronóstico significativo(12). El índice proliferativo cuantificado con Ki67 es un marcador surrogado de esta firma y tiene valor pronóstico en LCM(13, 14), al igual que el recuento mitótico(1, 14).

**Panel de primera línea CMF:** CD19, CD20/CD22, CD5, CD23, CD200, k/l

**Panel de segunda línea CMF:** FMC7

**Panel de primera línea IHQ:** CD45 (ALC), CD20, CD3, CD5, CD23, Ki-67, CICLINAD1.

**Panel de segunda línea IHQ:** SOX11, p27, p53, *CCDN2*, *CCDN3*.

## 5. CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

La detección de reordenamientos de *CCDN1* mediante FISH con sondas de tipo BA es de elección para el diagnóstico de LCM. Habitualmente la positividad mediante IHQ con el anticuerpo contra *CCDN1* hace innecesaria la confirmación mediante FISH. Una indicación de FISH son los casos con tinción heterogénea y de intensidad variable para *CCDN1* ya que cerca del 2% de LBDCG pueden sobreexpresar *CCDN1*, sin asociar traslocación del gen(9). Los casos de LCM *CCDN1* negativos presentan reordenamientos de *CCDN2* que es recomendable pero no necesario identificar para el diagnóstico si el perfil IHQ es concordante con LCM (CD20+CD5+SOX11+, p27-).

El estudio del cariotipo en muestras estimuladas con TPA 72 horas no es necesario en el proceso diagnóstico habitual pero si recomendable, ya que permite detectar anomalías asociadas, algunas de las cuales se asocian a un pronóstico desfavorable (cariotipos complejos y/o tetraploides, traslocaciones de *MYC*, deleciones de 17p, 13q33 entre otras y/o ganancias de 3q26, etc). Estas anomalías también pueden ser detectadas mediante FISH y/o arrays (CGH o SNPs), si bien no existen recomendaciones clínicas establecidas en este sentido.

## RECOMENDACIONES

1. Panel de primera línea IHQ: CD45 (ALC), CD20, CD3, CD5, CD23, Ki-67, CCLINAD1. Grado C. Evidencia nivel IV
2. Panel de segunda línea IHQ: SOX11, p27, p53, CCDN2, CCDN3. Grado C. Evidencia nivel IV
3. La detección de la expresión de SOX11 mediante IHQ es necesaria en las formas de LCM ciclinaD1 negativos. Grado C. Evidencia nivel IV
4. La detección de reordenamientos de CCDN1 mediante FISH con sondas de tipo BA es el método de elección complementario al diagnóstico de LCM. Grado C. Evidencia nivel IV
5. Una indicación de FISH para detectar traslocación de CCDN1 son los casos con tinción heterogénea y de intensidad variable para CCDN1. La expresión uniforme e intensa mediante IHQ de CCLINAD1 es suficiente para el diagnóstico en los casos de LCM típico. Grado C. Evidencia nivel IV
6. Los casos de LCM CCDN1 negativos presentan traslocaciones de CCDN2 que es recomendable pero no necesario identificar para el diagnóstico si el perfil IHQ es concordante con LCM (CD20+CD5+SOX11+, p27-). Grado C. Evidencia nivel IV
7. El análisis de cariotipo no es necesario pero sí recomendable en el proceso diagnóstico habitual del LCM. Grado C. Evidencia nivel IV
8. No es necesario realizar la tinción de CCDN1 en los casos con patrón histopatológico de hiperplasia linfoide reactiva sin sospecha clínica de proceso linfoproliferativo. Grado C. Evidencia nivel IV

## REFERENCIAS:

1. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
2. Navarro A, Clot G, Royo C, Jares P, Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, et al. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res.* 2012 Oct 15;72(20):5307-16.
3. Fernandez V, Salamer O, Espinet B, Sole F, Royo C, Navarro A, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 2010 Feb 15;70(4):1408-18.
4. Ondrejka SL, Lai R, Smith SD, Hsi ED. Indolent mantle cell leukemia: a clinicopathological variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Haematologica.* 2011 Aug;96(8):1121-7.
5. Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A, Clot G, Navarro A, Valera A, et al. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood.* 2013 Feb 21;121(8):1394-402.
6. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 2011 May;117(19):5019-32.

7. Parker A BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting. 2012.
8. NCCN Guidelines, Non Hodgkin Lymphomas. v 1.2013 ed, 2013.
9. Ok CY, Xu-Monette ZY, Tzankov A, O'Malley DP, Montes-Moreno S, Visco C, et al. Prevalence and clinical implications of cyclin D1 expression in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) treated with immunochemotherapy: A report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Cancer*. 2014 Mar 19.
10. Quintanilla-Martinez L, Thieblemont C, Fend F, Kumar S, Pinyol M, Campo E, et al. Mantle cell lymphomas lack expression of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Am J Pathol*. 1998 Jul;153(1):175-82.
11. Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Dave S, Wright G, Rosenwald A, et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*. 2005 Dec 15;106(13):4315-21.
12. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2003 Feb;3(2):185-97.
13. Katzenberger T, Petzoldt C, Holler S, Mader U, Kalla J, Adam P, et al. The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2006 Apr 15;107(8):3407.
14. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol*. 2005 Oct;131(1):29-38.

## 2c. PLASMOCITOMA/GMSI/MIELOMA MÚLTIPLE.

### 1. DEFINICIÓN:

Las neoplasias de células plasmáticas derivan de la expansión de un clon de células terminalmente diferenciadas, que han realizado el cambio de clase (de IgM/IgD a IgG, o IgA y más raramente IgE) o *switching*, y que secretan inmunoglobulina monoclonal (paraproteína o componente M). Se discute aquí el diagnóstico histopatológico de la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), mieloma múltiple y plasmocitoma óseo y extraóseo. El diagnóstico definitivo de estas entidades descansa en la combinación de los hallazgos histopatológicos con los hallazgos clínicos y de laboratorio (paraproteína sérica, anemia, lesiones líticas, daño renal, hipercalcemia). En ausencia de estos datos, se debe emitir un diagnóstico genérico de tipo neoplasia de células plasmáticas que se deberá valorar en el contexto clínico y de laboratorio.

### 2. TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Aspirado de MO:** Es un método habitual para el diagnóstico de GMSI/mieloma múltiple, que exige tanto la presencia de infiltrado por células plasmáticas como su clonalidad(1).

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es un método complementario en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con GMSI/mieloma múltiple.

El examen morfológico del aspirado puede ser suficiente para el diagnóstico de las neoplasias de células plasmáticas si se acompaña de los datos clínicos, inmunofenotípicos (IHQ, CMF), citogenéticos o moleculares necesarios. No obstante, el estudio de la biopsia de MO con inmunohistoquímica permite au-

mentar la sensibilidad y precisión en la estimación de la infiltración por células plasmáticas, y se sigue recomendando (1-5).

La infiltración plasmocitaria de la médula ósea se basará en el examen convencional tanto del aspirado como de la biopsia de médula ósea. Dicha estimación no debería hacerse por ahora con citometría de flujo, ya que los estudios que determinarán si tal enumeración es factible están aún en desarrollo. Si al enumerar las células plasmáticas hay una discrepancia entre la estimación del aspirado y la de la biopsia, se deberá utilizar el número más elevado que se obtenga(1).

**Biopsia escisional/incisional del tejido extramedular afectado:** Es el método de elección y debe de ser el método utilizado siempre en los casos de lesiones (plasmocitomas) accesibles.

**Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** Es la alternativa que se utilizaría en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional. Véase capítulo 1b (Muestras para diagnóstico).

Si se utiliza sólo punción aspiración con aguja (fina o gruesa), es obligado el empleo de técnicas complementarias como Inmunohistoquímica, Citometría de Flujo, Hibridación In Situ o Biología Molecular.

### 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

El primer diagnóstico diferencial a valorar en los casos de biopsia de MO en paciente con sospecha de discrasia de células plasmáticas es la distinción entre plasmocitosis reactiva, GMSI y mieloma. El segundo diagnóstico diferencial a plantear es con linfoma B linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldenström si existe una población mixta, linfoide y plasmocelular.

Las células plasmáticas en la MO normal se disponen de localización perivascular, aisladas o en pequeños grupos, sin reacción estromal y sin mostrar inmunofenotipos aberrantes, restricción de cadenas ligeras o anomalías citogenéticas o moleculares. Los casos de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) muestran un incremento significativo de la cantidad de plasmáticas en el tejido, de localización intersticial, con evidente restricción de cadenas ligeras mediante IHQ. Si se utilizan técnicas de citometría de flujo es posible distinguir células con fenotipo aberrante e incluso con anomalías genéticas, incluyendo traslocaciones cromosómicas. En estos casos se pueden observar pequeños grupos (5-10 células) de plasmáticas intersticiales, sin formar grandes grupos, sábanas o distorsión arquitectural con reacción estromal. El aspirado de las MO con GMSI no muestra más de un 10% de células plasmáticas clonales y el componente M es inferior a 30 g/L. Además, desde el punto de vista clínico, el diagnóstico de GMSI exige la ausencia de repercusiones fisiopatológicas (ausencia de anemia, lesión ósea, lesión renal o hipercalcemia debidas a la presencia del clon de células plasmáticas anómalas). En el caso del mieloma múltiple (quiescente o sintomático) la biopsia de MO suele mostrar un infiltrado más denso, con distorsión arquitectural y atipia celular (plasmáticas atípicas, con inclusiones nucleares y otras alteraciones morfológicas). El patrón del infiltrado puede ser intersticial, nódulo-intersticial o difuso. El estudio IHQ y de CMF es de gran utilidad para demostrar infiltrados mielomatosos ocultos. En ocasiones el porcentaje de células plasmáticas atípicas es inferior al 10% en el aspirado y la infiltración tisular sutil. En estos casos es necesaria la presencia del resto de criterios clínicos para el diagnóstico de mieloma múltiple (componente monoclonal >30 g/L y ausencia de consecuencias fisiopatológicas –criterios CRAB- para el mieloma quiescente, o cualquier componente si hay alguna de las consecuencias fisiopatológicas para el mieloma sintomático)(1).

El espectro morfológico de los casos de mieloma es amplio con formas con atipia mínima y otras de aspecto linfoplasmocitoide, plasmablástico o anaplásico. La atipia morfológica puede ser el único dato si el infiltrado es sutil. En estos casos es esencial el estudio IHQ y de CMF.

Hay que considerar el diagnóstico diferencial con metástasis de neoplasias no hematológicas en los casos de morfología anaplásica o con linfomas B no Hodgkin de alto grado en los casos de morfología inmunoblástica/plasmablástica, aunque en estos casos la ausencia del componente monoclonal ayuda mucho en la diferenciación

En casos de plasmocitoma extramedular (por ejemplo de localización en tracto digestivo) también hay que plantear el diagnóstico diferencial con linfomas B de bajo grado con diferenciación plasmocítica (linfoma B de la zona marginal, linfoma B linfoplasmocítico).

**4. PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) e HBRIDACIÓN IN SITU CROMOGÉNICA (HIS-C)(6-9).**

**Panel de primera línea IHQ:** CD138, CD56, kappa, lambda.

**Panel de primera línea CMF:** CD45, CD19, CD138, CD38, beta-2-microglobulina, CD56, Clg-kappa, Clg-lambda.

El ratio normal de expresión de cadenas ligeras en células plasmáticas es de 2-4 células kappa por cada célula lambda. Un ratio de 8 o más células kappa es concordante con monotipia kappa. Inversamente un ratio de 4 o más células lambda por cada célula kappa es un marcador indirecto de monoclonalidad lambda(7). Mediante citometría de flujo estos números varían, ya que es posible distinguir pequeños números de células plasmáticas aberrantes. Si se encuentran estas células y el porcentaje de aberrantes respecto al de plasmáticas totales no supera el 95%, estaremos muy probablemente ante una GMSI, mientras que en el caso del mieloma ese porcentaje se supera (habitualmente es >99%).

**Panel de segunda línea IHQ:** CD38, VS38, HIS para kappa y lambda, ciclinaD1, IgM, IgG, IgD, IgA, IgE.

**Panel de segunda línea CMF:** CD27, CD28, CD81 y CD117.

**5. CITOGENÉTICA Y MOLECULAR**

No son esenciales para el diagnóstico (1, (7). No obstante la evidencia disponible demuestra un claro valor pronóstico de las alteraciones genéticas evaluadas mediante cariotipo y/o FISH en los casos de mieloma múltiple.(10) Excepcionalmente, cuando la demostración de clonalidad no se ha podido hacer en suero o en orina, y en el tejido ha fallado la IHQ y la CMF, el estudio molecular (presencia de monoclonalidad) o la FISH (presencia de anomalías cromosómicas) puede descartar la existencia de cuadros reactivos.

**RECOMENDACIONES**

1. En caso de sospecha de neoplasia de células plasmáticas se debe hacer un aspirado y biopsia de médula ósea. El estudio de CMF y citogenética es conveniente. Si con los datos del aspirado y biopsia, junto a los datos clínico-biológicos no se llega a un diagnóstico definitivo, se deben añadir técnicas moleculares. Grado C. Evidencia nivel IV
2. En la biopsia de MO, realizar siempre un estudio IHQ con panel de primera línea.: CD138, CD56, kappa, lambda. Grado C. Evidencia nivel IV
3. En casos de infiltración medular significativa por plasmáticas clonales, en ausencia del resto de datos clínicos para el diagnóstico de mieloma múltiple, hay que plantear un diagnóstico genérico de neoplasia de células plasmáticas proporcionando el porcentaje y patrón de infiltración para permitir diferenciar entre GMSI y MM quiescente. Grado C. Evidencia nivel IV
4. En casos de morfología plasmablástica o anaplásica, valorar el diagnóstico diferencial con infiltración por LNH y metástasis de proceso no hematológico respectivamente. Grado C. Evidencia nivel IV
5. En casos de morfología linfoplasmocitoide o mixta linfoide y plasmocelular, valorar el diagnóstico diferencial con linfoma B linfoplasmacítico y otros linfomas B indolentes. Grado C. Evidencia nivel IV
6. Valorar el diagnóstico diferencial con linfomas de célula B en casos de plasmocitoma extraóseo. Grado C. Evidencia nivel IV

**REFERENCIAS:**

1. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014 Nov;15(12):e538-e48.
2. Joshi R, Horncastle D, Elderfield K, Lampert I, Rahemtulla A, Naresh KN. Bone marrow trephine combined with immunohistochemistry is superior to bone marrow aspirate in follow-up of myeloma patients. *J Clin Pathol.* 2008 Feb;61(2):213-6.



3. Stifter S, Babarovic E, Valkovic T, Seili-Bekafigo I, Stemberger C, Nacinovic A, et al. Combined evaluation of bone marrow aspirate and biopsy is superior in the prognosis of multiple myeloma. *Diagnostic pathology*. 2010;5:30.
4. NCCN. Multiple Myeloma v2.2015. 2015.
5. Al-Quran SZ, Yang L, Magill JM, Braylan RC, Douglas-Nikitin VK. Assessment of bone marrow plasma cell infiltrates in multiple myeloma: the added value of CD138 immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 2007 Dec;38(12):1779-87.
6. Cao W, Goolsby CL, Nelson BP, Singhal S, Mehta J, Peterson LC. Instability of immunophenotype in plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2008 Jun;129(6):926-33.
7. Parker A BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. *Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting*. 2012.
8. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Hematologica*. 2008 Mar;93(3):431-8.
9. Mateo G, Castellanos M, Rasillo A, Gutierrez NC, Montalban MA, Martin ML, et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2005 May 15;11(10):3661-7.
10. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009 Dec;23(12):2210-21.

### 3. LINFOMAS DE HODGKIN. LINFOMAS B INTERMEDIOS ENTRE LH Y LBDCG

Autor para la correspondencia: Juan Fernando García ([jfgarcia@mdanderson.es](mailto:jfgarcia@mdanderson.es))

#### 1. DEFINICIÓN:

El linfoma de Hodgkin (LH) es una neoplasia clonal, en la mayoría de los casos derivada de células linfoides B (1,2), caracterizada por la presencia de muy escasas células neoplásicas acompañadas de un abundante microambiente celular de características inflamatorias (3). Se reconocen dos entidades clinicopatológicas diferenciadas: el LH de tipo predominio linfocítico nodular (LHPLN) y el LH clásico (LHc) (4).

El LHPLN es una neoplasia clonal derivada de células linfoides B (5), caracterizada por la presencia de las células de PL ó L&H (variantes linfocítica-histiocítica), con expresión de marcadores fenotípicos B (CD20, CD79a, BCL6, PAX5, OCT2) y EMA, (6-7) acompañadas de grandes agregados de linfocitos B maduros e histiocitos, en un patrón de crecimiento nodular o nodular y difuso, y característicamente rodeadas de linfocitos T con fenotipo T<sub>FH</sub> (PD1+) (8). Este tumor no está asociado a infección por virus de Epstein-Barr (VEB) (4,6).

El LHc se define por la presencia de las características células de Hodgkin y de Reed-Sternberg (HRS), con expresión de CD30 y CD15 y con expresión ausente o defectiva de marcadores fenotípicos B en la mayoría de casos (CD20-/+ , CD79a- , OCT2-/+), acompañadas de un fondo reactivo rico en linfocitos T, histiocitos, eosinófilos, neutrófilos, células plasmáticas, etc. (1). El patrón de crecimiento puede ser nodular o difuso. La composición del microambiente reactivo y la presencia de esclerosis define los subtipos histológicos: LHc rico en linfocitos (LHcRL), esclerosis nodular (EN), celularidad mixta (CM), y depleción linfocitaria (DL). El LHc está asociado a infección por VEB en un porcentaje variable de casos (30-70%) (9).

El LH constituye el 25-30% de todos los linfomas, siendo mucho más frecuente las formas de LHc (95%) que las formas de LHPLN (5%).

#### 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto: Es el método de elección. Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** se puede utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo 1b (Muestras para diagnóstico).

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es el método de elección imprescindible para la estadificación de todos los casos de LH. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro.

#### 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

Los casos de LHPLN plantean diagnóstico diferencial histopatológico con LHc y con linfomas B difusos de células grandes (LBDCG), en particular las formas de Linfoma B rico en células T e histiocitos, así como procesos reactivos (en particular hiperplasia folicular reactiva con transformación progresiva de centros germinales) (3).

Los casos de LHc plantean diagnóstico diferencial histopatológico con una amplia variedad de procesos neoplásicos no linfoides y linfoides, así como procesos reactivos. Es particularmente trascendente la diferenciación con linfomas B difusos de células grandes (LBDCG), en particular las formas de Linfoma B rico en células T e histiocitos (7), y con Linfomas de células T (linfoma T periférico, linfoma T angioinmunoblástico y linfoma anaplásico ALK+) (3).

En el diagnóstico inicial debe incluir un estudio morfológico adecuado con hematoxilina –eosina (HE). El diagnóstico se establece por la presencia de las células de HRS y sus variantes, en el apropiado contexto celular reactivo. El panel inmunofenotípico básico debe incluir marcadores de línea linfoide (CD45), línea B (CD20, CD79a) y línea T (CD3), además de CD30 y CD15. Adicionalmente, en el diagnóstico diferencial se debe tener en cuenta:

- LHPLN: morfología característica y expresión normal de marcadores de línea B; puede ser complementado con PAX5 y OCT2; la celularidad acompañante son linfocitos B maduros IgD+, formando nódulos (al menos focalmente).
- LHc: morfología característica y presencia de células de HRS típicas en todas las formas de la enfermedad; expresión de CD30 (en virtualmente todos los casos) y CD15 (75%); expresión defectiva de CD45, CD20, CD79a; las células de HRS expresan habitualmente PAX5 y OCT2; la celularidad acompañante es variada según subtipos histológicos:
  - LHCRL: imagen semejante a LHPLN, con nódulos de linfocitos B maduros, pero con células neoplásicas de HRS en lugar de células L&H (11).
  - LHc subtipo EN: nódulos neoplásicos rodeados de esclerosis con abundantes linfocitos T, histiocitos y eosinófilos; variantes "lacunares" de células de HRS.
  - LHc subtipo CM: patrón difuso o nodular; puede haber fibrosis intersticial fina; fondo celular muy heterogéneo, con abundantes histiocitos (incluso granulomas), células plasmáticas y eosinófilos; variantes "mumificadas" de células de HRS.
  - LHc subtipo DL: predominio de abundantes células tumorales, HRS y variantes mononucleares; escaso fondo reactivo con fibrosis intersticial.
- Linfomas B inclasificable, con rasgos intermedios entre LBDCG y LHc: se define por la presencia de rasgos morfológicos y fenotípicos intermedios o superponibles entre LHc y LBDCG, habitualmente linfoma B difuso primario mediastínico; presencia de típicas células HRS, CD30+, muy numerosas y con patrones difuso o nodular y expresión intensa de marcadores de línea B (3).
- LBDCG asociado a EBV y edad avanzada, granulomatosis linfomatoide y casos de desorden linfoproliferativo post-trasplante de tipo LH: pueden presentar rasgos morfológicos de LHc; es imprescindible la evaluación de EBV y considerar expresión normal de marcadores de línea B (3).
- En determinados casos, se debe considerar en el diagnóstico diferencial subtipos específicos de linfomas T. Estos diagnósticos diferenciales deben tener en cuenta características clínicas de la enfermedad (localización de las lesiones) y del paciente (edad), rasgos morfológicos e inmunofenotípicos.

#### 4. PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).

En los casos característicos y ante una presentación clínica típica, un adecuado estudio morfológico de la biopsia y un panel IHQ básico serán suficientes para el diagnóstico:

##### Panel de primera línea:

**Linfoma de Hodgkin clásico:** CD45 (ALC), CD20, CD3, CD30, CD15, PAX5.

Es necesario determinar la presencia de EBV mediante IHQ para EBV-LMP1.

**Linfoma de Hodgkin de tipo Predominio Linfocítico Nodular:** CD20, OCT2, CD3, PD1, BCL2.

##### Paneles de segunda línea:

- Ante sospecha de LHPLN y en casos conflictivos es recomendable el uso de EMA, IGD y otros marcadores de línea B como CD79 y BCL6.
- Existe evidencia de que la expresión incrementada de proteína BCL2 en casos de LHc, puede asociarse a falta de respuesta a terapia habitual (nivel de evidencia III) (12,13).
- Ante el diagnóstico diferencial de subtipos específicos de linfomas T, se deben incluir marcadores fenotípicos dirigidos: CD4, CD8, PD1, ALK.
- Conveniente si se sospecha LBDCG asociado a EBV y edad avanzada, granulomatosis linfomatoide y desorden linfoproliferativo post-trasplante: hibridación in situ para EBV-EBER.

#### 5. CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

En general, el análisis de clonalidad linfoide B (reordenamientos de IGH) mediante PCR y electroforesis capilar no es necesario para el diagnóstico de LHc.

En contadas ocasiones, en especial ante la expresión anormal de marcadores fenotípicos T, o dificultad en el diagnóstico diferencial con linfomas T, puede ser útil el análisis de clonalidad linfoide T (reordenamientos de TCR) (14).

Los estudios citogenéticos y/o de cariotipo no están recomendados en el diagnóstico del LH.

## RECOMENDACIONES

1. Panel de primera línea Linfoma de Hodgkin clásico: CD45 (ALC), CD20, CD3, PAX5, CD30, CD15, EBV-LMP1.
2. Panel de primera línea Linfoma de Hodgkin de tipo Predominio Linfocítico Nodular: CD20, OCT2, CD3, PD1, BCL2. Grado C. Evidencia nivel IV
3. Paneles de segunda línea: CD79, BCL6, EMA, IGD, CD4, CD8, ALK, hibridación in situ para EBV-EBER. Grado C. Evidencia nivel IV
4. Estudios de clonalidad linfoide B y T mediante PCR y electroforesis capilar en casos seleccionados. Grado C. Evidencia nivel IV
5. Los estudios citogenéticos/cariotipo no están recomendados en el diagnóstico del LH. Grado C. Evidencia nivel IV

## REFERENCIAS:

1. Hummel M, Marafioti T, Stein H. Clonality of Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 1999;340(5):394-395.
2. Marafioti T, Hummel M, Foss HD, et al. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood.* 2000;95(4):1443-1450.
3. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2008.
4. Anagnostopoulos I, Hansmann ML, Franssila K, et al. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood.* 2000;96(5):1889-1899.
5. Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, et al. Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med.* 1997;337(7):453-458.
6. Mason DY, Banks PM, Chan J, et al. Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. A distinct clinicopathological entity. *Am J Surg Pathol.* 1994;18(5):526-530.
7. Fraga M, Sánchez-Verde L, Forteza J, García-Rivero A, Piris MA. T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma is a disseminated aggressive neoplasm: differential diagnosis from Hodgkin's lymphoma. *Histopathology.* 2002;41(3):216-229.
8. Nam-Cha SH, Roncador G, Sanchez-Verde L, et al. PD-1, a follicular T-cell marker useful for recognizing nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(8):1252-1257.

9. Khan G. Epstein-Barr virus, cytokines, and inflammation: a cocktail for the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma? *Exp Hematol.* 2006;34(4):399-406.
10. Parker A BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. *Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting*; 2012.
11. Nam-Cha SH, Montes-Moreno S, Salcedo MT, Sanjuan J, Garcia JF, Piris MA. Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: distinctive tumor and microenvironment markers. *Mod Pathol.* 2009;22(8):1006-1015.
12. Garcia JF, Camacho FI, Morente M, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood.* 2003;101(2):681-689.
13. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, et al. BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. *Blood.* 2002;100(12):3935-3941.
14. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia.* 2012;26(10):2159-2171.

## 4. LINFOMAS T Y T/NK

### 4a. LINFOMAS/LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS (B y T)

Autor para la correspondencia: *Máximo Fraga* ([maximo.fraga@usc.es](mailto:maximo.fraga@usc.es))

#### 1. DEFINICIÓN

La OMS (2008) las define como neoplasias de células precursoras (linfoblastos) comprometidas hacia estirpe B o T. Como contrapartida normal se postulan células stem hematopoyéticas o células progenitoras B en el primer caso y células progenitoras T o linfocitos tímicos en el segundo.

Morfológicamente constan de células blásticas de pequeño o mediano tamaño, con citoplasmas escasos y núcleos irregulares o redondeados que generalmente muestran cromatina finamente punteada y nucleolo poco aparente.

Se trata de una enfermedad típica de la infancia: el 75% de los pacientes tiene menos de 6 años. Se estima una incidencia mundial de entre 1-4,75 cada 100.000 personas/año.

La misma enfermedad puede presentarse como linfoma (lesión de tipo masa) o como leucemia (afectación de médula ósea y sangre periférica). Si coexisten ambos tipos de afectación, la denominación es puramente arbitraria, aunque en protocolos terapéuticos suele emplearse un umbral del 25% de blastos para considerarlo leucemia. Entre los casos de fenotipo B, lo habitual es la presentación leucémica, mientras que las neoplasias precursoras T suelen ser linfomas con masa mediastínica.

La clasificación actual de la OMS (2008) las divide en:

- Linfoma/leucemia linfoblástica B (no específica)
- Linfoma/leucemia linfoblástica B con anomalías citogenéticas recurrentes
- Linfoma/leucemia linfoblástica T

De acuerdo con ello, basta el estudio morfológico e inmunohistoquímico para establecer el diagnóstico de linfoma/leucemia linfoblástica (LLB) y distinguir entre LLB de fenotipo B (LLB-B) y fenotipo T (LLB-T). En cambio, se requerirán estudios citogenéticos para saber si un caso de LLB-B presenta alteraciones cromosómicas características que permitan subclasificarlo.

#### 2. TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia de médula ósea:** La médula ósea se encuentra siempre infiltrada, por definición, en los casos leucémicos. La infiltración suele ser difusa en la presentación, pero en las recaídas puede ser focal. Salvo en casos de médula “empaquetada” o fibrosis reticulínica, el aspirado medular y/o la sangre periférica pueden aportar información muy valiosa para el diagnóstico, con el inmunofenotipo por citometría de flujo y los estudios citogenéticos.

**Biopsia escisional/incisional de adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección siempre que no exista afectación medular. En el linfoma LB-B, los tejidos más frecuentemente afectados son piel, tejidos blandos, hueso y ganglios linfáticos. En el linfoma LB-T suele haber una masa mediastínica anterior y, a menudo, adenopatías, aunque la presentación puede incluir también otras localizaciones.

**Punción-biopsia con aguja gruesa (BAG):** En casos sin afectación medular y en los que la biopsia escisional/incisional esté contraindicada por la localización de la lesión y/o la situación clínica del paciente.

**Punción-aspiración con aguja fina (PAAF):** No debe utilizarse para el diagnóstico inicial; su uso solo sería admisible, en ciertos casos, para el seguimiento de la enfermedad.

#### 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico diferencial de LLB se debe realizar, en primer lugar, con otras proliferaciones de morfología de tipo blástico. En algunas ocasiones, determinadas características morfológicas que

pueden aparecer, como imagen “en cielo estrellado” o una arquitectura multinodular (“seudofolicular”), pueden plantear también problemas con linfoma de Burkitt o linfoma folicular, respectivamente. También deben ser considerados tumores no hematolinfoides que presentan una morfología semejante.

En concreto, los diagnósticos diferenciales que se pueden plantear son:

- Leucemia mieloide aguda (LMA) y sarcoma mieloide (SM)
- Leucemia aguda de estirpe ambigua
- Neoplasia de célula dendrítica blástica plasmocitoide
- Linfoma del manto blastoide
- Linfoma de Burkitt
- Linfoma folicular
- Linfoma B difuso de células grandes
- Timo ectópico
- Timoma rico en linfocitos
- Tumores de células redondas y azules (sarcoma de Ewing, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma embrionario, meduloblastoma)
- Hematogonias (precursores normales de células B en médula ósea)

Con respecto a la diferenciación entre LLB-B, LLB-T y LMA/SM, una fuente de error pueden ser las positividades “aberrantes”, es decir, la expresión de marcadores que son más propios de otras estirpes celulares que de la verdadera estirpe tumoral. Hay que recordar que LLB-T puede expresar antígenos B (p. ej., CD79a en un 10% de casos), y viceversa. Los LLB -B y -T también pueden expresar algunos antígenos mieloides (CD13, CD15, CD33), así que esto no supone automáticamente un diagnóstico de LMA/SM o que se trate de una neoplasia bifenotípica. Para el diagnóstico de leucemia aguda de estirpe ambigua deben seguirse los criterios de la OMS (2008).

#### 4. PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

**Panel de primera línea:** CD79a, PAX5, CD3, CD7, CD10, TdT, mieloperoxidasa.

**Paneles de segunda línea:**

- LLB-B: CD19, CD22, CD24, CD25, CD15, CD13, IgM.
- LLB-T: CD2, CD5, CD4, CD8, CD34, CD1a.

El panel de primera línea tiene como objetivo confirmar el diagnóstico de LLB y asignar la estirpe más probable con anticuerpos relativamente comunes. El segundo panel confirma la estirpe tumoral y ofrece información adicional para subclasificar la enfermedad en función de su grado de diferenciación, lo que parece tener trascendencia clínica; en el caso de LLB-B, algunos de los marcadores propuestos se relacionan con alteraciones citogenéticas recurrentes (v. siguiente apartado). Existe un pequeño porcentaje de casos de LLB y T que muestran expresión limitada o negatividad para TdT.

#### 5. CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

En la categoría de **LLB-B no específica** existen alteraciones genéticas que se correlacionan con pronóstico adverso: la amplificación intracromosómica del gen AML1 en el cromosoma 21 (iAMP21) y la muy rara t(17;19).

En la **LLB-B con anomalías citogenéticas recurrentes** se reconocen las siguientes alteraciones genéticas asociadas a una biología distintiva de la enfermedad:

- t(9;22)(q33;q11.2); BCR-ABL1 (fenotipo característico: expresión de CD19, CD10, CD25, CD13 y CD33): adultos, pronóstico infausto, tratamiento adicional con imatinib mejora la supervivencia precoz libre de evento.
- t(v;11q23); reordenamiento de MLL (fenotipo característico: CD19+, CD10-, CD15+): alto recuento leucocitario, afectación de sistema nervioso central.
- t(12;21)(p13;q22); TEL-AML1 (fenotipo característico: CD19+, CD10+, CD13+): buena respuesta a tratamiento estándar.

- hiperdiploidía cromosómica (CD19+, CD10+; otros, variables): buena respuesta a tratamiento estándar.
  - hipodiploidía (CD19+, CD10+; otros, variables): mal pronóstico.
  - t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH (CD19+, CD10+; otros, variables): eosinofilia reactiva inducida por IL-3, blastos pueden ser menos del 20% en médula ósea e indetectables en sangre periférica.
  - t(1;19)(q23;p13.3); E2A-PBX1 (fenotipo característico: CD19+, CD10+, IgMc): no presenta asociación significativa con la respuesta a protocolos terapéuticos actuales, pero sus peculiares fenotipo y genética sustentan su reconocimiento como una entidad aparte.

En **LLB-T**, aunque existen numerosas alteraciones citogenéticas recurrentes, no son necesarias para el diagnóstico y su relevancia pronóstica es controvertida. Se trata habitualmente de translocaciones, que involucran a la región reguladora de uno de los loci TCR y a genes como HOX11, MYC, TAL1, LYL1, HOX11L2, NOTCH1, etc.

Con respecto a los genes de receptores de antígenos (IgH y TCR), prácticamente todos los casos muestran reordenamiento clonal de los mismos, pero es frecuente la denominada “infidelidad de estirpe”: hasta un 70% de LLB-B pueden presentar clonalidad adicional para TCR; en el caso de LLB-T, un 20% pueden presentar también clonalidad para IgH.

## RECOMENDACIONES

1. Debe tenerse siempre en cuenta, para interpretar los datos inmunohistoquímicos, que no hay ningún marcador absolutamente específico para una entidad. Como en cualquier otro campo de la patología, el diagnóstico debe establecerse en función de la morfología, con un panel de anticuerpos adecuado, y de acuerdo con el contexto clínico del paciente. Por ejemplo, TdT, aunque muy característico de LLB, puede ser positivo también en casos de LMA/SM. Grado C. Evidencia nivel IV
2. Debe recordarse que los LLB, además de los marcadores de estirpe “propios”, pueden expresar marcadores de la otra estirpe linfóide o incluso marcadores mieloides, aunque generalmente de forma más débil o restringida. Los diagnósticos de “estirpe ambigua” deben ceñirse a los criterios establecidos en la clasificación de la OMS (2008). Grado C. Evidencia nivel IV
3. En tejidos parafinados, los marcadores más sensibles y específicos de estirpe B y T se consideran PAX5 y CD3 respectivamente, teniendo en cuenta las salvedades del apartado anterior (PAX5, por ejemplo, puede ser positivo también en algunas LMA, especialmente las que portan t(8;21)).
4. De acuerdo con el panel IHQ de primera línea propuesto, se puede sustentar un diagnóstico de LLB de acuerdo con los siguientes perfiles resultantes:
5. LLB-B: CD79a+, PAX5+, CD10+, TdT+, CD3-, CD7-, mieloperoxidasa-. Grado C. Evidencia nivel IV
6. LLB-T: CD3+, CD7+, TdT+, CD10- (puede ser+), CD79a-, PAX5-, mieloperoxidasa-. Grado C. Evidencia nivel IV
7. El panel IHQ de segunda línea ayuda a establecer la estirpe tumoral en casos dudosos. También, aunque esto es opcional, permite especificar el grado de diferenciación de los LLB. Grado C. Evidencia nivel IV
8. A la hora de valorar una masa mediastínica, debe recordarse que la mera presencia de células T con fenotipo inmaduro (TdT, CD1a, CD99 y CD3 +) no es sinónimo de LBL-T, ya que tanto en timo normal como en hiperplasias tímicas y timomas, existen poblaciones normales con inmunofenotipo similar. Grado C. Evidencia nivel IV
9. De igual manera, la presencia de células CD19+, CD10+ en médula ósea no implica necesariamente un diagnóstico de LBL-B, ya que puede tratarse de hematogonias, precursores normales de células B. Grado C. Evidencia nivel IV
10. En LLB los reordenamientos de IgH y TCR no son útiles para la asignación de estirpe B o T, dada la frecuente “infidelidad de estirpe”. Es útil la demostración de clonalidad linfóide para apoyar un diagnóstico de proceso linfoproliferativo. Grado C. Evidencia nivel IV



## REFERENCIAS

1. McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol* 2012; 29 (1): 2-11.
2. Moorman AV. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 2012; 26(3):123-35.
3. Racke FK, Borowitz J. Precursor B- and T-cell neoplasms. En: Jaffe E, Harris NL, Vardiman JW, Campo E, Arber A. *Hematopathology*. Elsevier 2011, pp. 629-39.
4. Savage NM, Johnson RC, Natkunam Y. The spectrum of lymphoblastic, nodal and extranodal T-cell lymphomas: characteristic features and diagnostic dilemmas. *Hum Pathol* 2013; 44 (4): 451-71.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds.). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition*. IARC: Lyon 2008.

### **4b. LINFOMAS T GANGLIONARES: LINFOMA T PERIFÉRICO, LINFOMA T ANGIOINMUOBLÁSTICO, LINFOMA ANAPLÁSICO ALK+ Y ALK-**

*Autor para la correspondencia: Máximo Fraga (maximo.fraga@usc.es)*

Los linfomas T ganglionares constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias, tanto por su patogenia como por sus características histológicas e inmunofenotípicas; habitualmente cursan con una clínica agresiva y pobre respuesta a terapia.

Las cuatro formas más frecuentes de linfomas T ganglionares son el linfoma T periférico no específico, el linfoma T angioinmunoblástico y el linfoma T anaplásico ALK+ y ALK-.

### **LINFOMA T PERIFÉRICO, NOS**

#### **1. DEFINICIÓN:**

El linfoma de células T periférico (LCTP) es una neoplasia clonal derivada de células linfoides T maduras. La OMS define la entidad como un grupo heterogéneo de linfomas T, ganglionares y extraganglionares, que no cumplen los criterios diagnósticos de alguna de las otras categorías de linfoma T. Es por tanto un diagnóstico de exclusión en la mayoría de los casos.

El LCTP es más común en poblaciones sin alta incidencia de infección por EBV (Norteamérica y Europa). La presentación es predominantemente ganglionar, pero puede existir extensión extraganglionar; a menudo es una enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico. Puede haber incluso presentaciones extraganglionares (piel, tracto gastrointestinal,...), pero en este caso deben descartarse primero entidades específicas. El curso clínico es muy agresivo, con escasa respuesta al tratamiento.

La morfología puede ser extremadamente variable y los subtipos morfológicos no tienen valor pronóstico. Las células neoplásicas pueden ser de tamaño medio-grande, con pleomorfismo, o pequeñas, con núcleos irregulares, en los que la atipia puede ser muy sutil. El patrón de infiltración es habitualmente difuso.

Variante de infiltración de zona T (paracortical). Pueden estar los folículos B preservados.

Acompañamiento vascular e inflamatorio variable. Puede haber histiocitos epitelioides abundantes ("Linfoma de Lennert") o granulomas.

Puede existir proliferación B asociada en el 20% de casos (linfocitos B maduros o células plasmáticas). Es necesario recordar que evidencia de clonalidad B mediante PCR no es criterio suficiente para el diagnóstico de linfoma B, ya que puede detectarse en procesos linfoproliferativos T.

## 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección. **Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** se puede utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo 1b (Muestra para diagnóstico).

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es el método de elección imprescindible para la estadificación de todos los casos. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro.

## 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

Los casos de LCTP plantean diagnóstico diferencial histopatológico con una gran variedad de procesos:

- Otros linfomas
  - Linfoma T angioinmunoblástico
  - Linfoma anaplásico de células grandes
  - Linfomas extranodales T/NK de tipo nasal
  - Linfoma B rico en células T e histiocitos
  - Linfoma de Hodgkin, tanto formas clásicas como de tipo predominio linfocítico
- Linfadenopatías no neoplásicas
  - Hiperplasia linfoide paracortical (zona T)
  - Linfadenitis virales, en particular mononucleosis infecciosa
  - Linfadenitis por fármacos
  - Linfadenopatía dermatopática
  - Linfadenitis por toxoplasma
  - Enfermedades granulomatosas
  - Linfadenitis en el síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS)
  - Linfadenitis de Kikuchi-Fujimoto

El estudio diagnóstico inicial debe incluir un estudio morfológico adecuado con hematoxilina-eosina (HE). El panel inmunofenotípico básico debe incluir marcadores de línea linfoide (CD45), línea T (CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7), línea B (CD20, CD79a) y CD30. La expresión anormal de marcadores T es útil en el reconocimiento de procesos neoplásicos (pérdida de antígenos T, expresión intensa de CD56...). También es conveniente incluir marcadores citotóxicos (TIA1 y/o granzima B y/o perforina). Adicionalmente, en el diagnóstico diferencial se debe tener en cuenta:

- En el diagnóstico diferencial con linfoma T angioinmunoblástico se deben incluir marcadores de células dendríticas foliculares (CD23 y/o CD21) y marcadores de linfocitos TFH ("T follicular helper", como PD1, CD10, BCL6 y/o CXCL13), así como estudio de EBV mediante hibridación in situ para EBER (la inmunohistoquímica para LMP1 tiene numerosos falsos negativos en esta situación).
- En el diagnóstico diferencial con linfoma de Hodgkin clásico se deben incluir CD30, CD15 y PAX5 u OCT2.
- En el diagnóstico diferencial con linfoma anaplásico se deben incluir CD30, EMA, ALK.
- En el diagnóstico diferencial con otros linfomas T se deben incluir marcadores inmunofenotípicos adicionales (p. ej., CD56 para linfoma T/NK extraganglionar de tipo nasal o un tipo de linfoma T asociado a enteropatía).
- En muchas ocasiones se precisa el análisis de clonalidad linfoide T (reordenamientos de TCR) y B (reordenamientos de IGH) como datos coadyuvantes al diagnóstico. La presencia de clonalidad linfoide T en un contexto morfológico y fenotípico apropiado (fenotipo aberrante) favorece el diagnóstico de proceso linfoproliferativo. La presencia de reordenamientos monoclonales de IgH se puede encontrar en un subgrupo de casos de linfoma T, particularmente Linfoma T angioinmunoblástico y linfoma T periférico.

Estos diagnósticos diferenciales deben tener en cuenta características clínicas de la enfermedad (síntomas sistémicos, localización de las lesiones) y del paciente (edad), además de rasgos morfológicos, inmunofenotípicos y moleculares.

#### 4. PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).

Todos los procesos linfoproliferativos T precisan estudio inmunofenotípico completo y, en la mayoría de las ocasiones, estudio molecular complementario.

**Panel de primera línea:** CD20, CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7, CD30, CD56.

**Paneles de segunda línea:**

- Marcadores citotóxicos.
- Hibridación in situ para EBERs.
- Paneles específicos para diagnóstico diferencial con LH y linfomas B: dirigidos.
- Ante el diagnóstico diferencial con subtipos específicos de linfomas T, se deben incluir marcadores fenotípicos específicos: PD1, CD10, BCL6, CXCL13, ALK, TCRbF1, TCR Gamma, TIA1, perforina, GZB.

#### 5. CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

Se recomienda análisis de clonalidad linfoide T y B (reordenamientos de TCR e IGH) mediante PCR y electroforesis capilar.

Los estudios citogenéticos y/o de cariotipo no son necesarios para diagnóstico rutinario. Con frecuencia se detectan alteraciones cariotípicas complejas que ayudan a establecer clonalidad, pero no son significativas para el diagnóstico o pronóstico.

### RECOMENDACIONES

1. **Panel de primera línea: CD20, CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7, CD30, CD56. Grado C. Evidencia nivel IV**
2. **Paneles de segunda línea dirigidos (PAX5, CD15, PD1, CD10, CD21, CD23, ALK, TIA1, PERFORINA, GZB, TCR bF1, TCR Gamma, BCL6, CXCL13), hibridación in situ para EBV-EBER. Grado C. Evidencia nivel IV**
3. **Estudios de clonalidad linfoide B y T mediante PCR y electroforesis capilar en casos seleccionados. Grado C. Evidencia nivel IV**

### REFERENCIAS:

1. Asano N, Suzuki R, Kagami Y, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of cytotoxic molecule expression in nodal peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:1284-1293.
2. Ioachim HL, Ratech H. Ioachim's Lymph Node Pathology. Lippincott Williams and Wilkins, 3rd Edition, 2002.
3. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, World Health Organization Classification of Tumours 2001
4. Savage KJ *Blood Rev.* Peripheral T-cell lymphomas. 2007 Jul;21(4):201-16.
5. Tan BT, Warnke RA, Arber DA. The frequency of B- and T-cell gene rearrangements and epstein-barr virus in T-cell lymphomas: a comparison between angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified with and without associated B-cell proliferations. *J Mol Diagn.* 2006 Sep;8(4):466-75.
6. Warnke RA, Jones D, Hsi ED. Morphologic and immunophenotypic variants of nodal T-cell lymphomas and T-cell lymphoma mimics. *Am J Clin Pathol.* 2007 Apr;127(4):511-27.

7. Warnke RA, Weiss LM, Chan JKC, Cleary ML, Dorfman RF . Tumors of the Lymph Nodes and Spleen, Atlas of Tumor Pathology, AFIP Third Series, Fascicle 14, 1995

## LINFOMA T ANGIOINMUNOBLÁSTICO

### 1. DEFINICIÓN:

El linfoma T angioinmunoblástico (LTAI) es una neoplasia de probable origen en células T del centro germinal, CD4+, caracterizado por un infiltrado celular polimorfo con una característica proliferación de vénulas de endotelio alto y células dendríticas foliculares.

Se presenta habitualmente como enfermedad sistémica (estadio III/IV) con síntomas constitucionales asociados (fiebre, rash cutáneo prurítico, edema,...), anomalías analíticas (anemia, hipergammaglobulinemia policlonal,...), esplenomegalia y otros desórdenes inflamatorios o autoinmunes (artritis, vasculitis, pleuritis, anemia hemolítica). Pronóstico semejante a LCTP, NOS.

Son criterios diagnósticos:

- Pérdida de la arquitectura ganglionar normal
- Centros germinales atróficos o ausentes.
- Prominente proliferación arborizante de vénulas de endotelio alto.
- Patente seno subcapsular.
- Infiltrado polimorfo paracortical que incluye linfocitos, inmunoblastos, células plasmáticas, histiocitos y eosinófilos. Proliferación de células dendríticas fuera de los centros germinales y alrededor de las vénulas de endotelio alto.
- La población T neoplásica habitualmente está enmascarada y es poco patente: usualmente células de tamaño pequeño o intermedio, con citoplasma claro y contorno nuclear irregular. Con frecuencia agrupadas alrededor de las vénulas.
- Se describe una forma asociada a folículos hiperplásicos con centros germinales reactivos.
- Muchos casos presentan expansión B acompañante, con frecuencia positivas para EBV-EBER El diagnóstico de linfomas B de células grandes asociado requiere la existencia de grandes grupos cohesivos de células B atípicas. El diagnóstico de plasmocitoma requiere grupos extensos de células plasmáticas monoclonales. La evidencia molecular (PCR) de clonalidad B no es suficiente para el diagnóstico de neoplasia B asociada.
- Puede existir proliferación "LH-like" de células de Reed-Sternberg con fenotipo clásico.

### 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección. **Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** se puede utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo 1b (Muestra para diagnóstico).

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es el método de elección imprescindible para la estadificación de todos los casos. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro.

### 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS

- Otros linfomas
  - LCTP
  - Linfomas B, en particular linfoma B de la zona marginal, nodal, y linfoma folicular.
  - Linfoma B rico en células T e histiocitos
  - Linfoma de Hodgkin, tanto formas clásicas como de tipo predominio linfocítico
- Linfadenopatías no neoplásicas
  - Hiperplasia linfoide paracortical (zona T)
  - Linfadenitis virales, en particular mononucleosis infecciosa

- Linfadenitis por fármacos
- Linfadenitis por toxoplasma
- Enfermedad de Castleman, tipo plasmocelular

El diagnóstico inicial debe incluir un estudio morfológico adecuado con hematoxilina-eosina (HE). El panel inmunofenotípico básico debe incluir marcadores de línea linfoide (CD45), línea T (CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7) y línea B (CD20, cadenas ligeras kappa y lambda). Se deben incluir también marcadores de células foliculares dendríticas (CD23 y/o CD21), marcadores de linfocitos TFH (PD1, CD10, BCL6 y/o CXCL13), así como estudio de EBV mediante hibridación in situ para EBER (la inmunohistoquímica para LMP1 tiene numerosos falsos negativos en esta situación).

- En el diagnóstico diferencial con linfoma de Hodgkin clásico se deben incluir CD30, CD15 y PAX5 u OCT2.
- En el diagnóstico diferencial con linfoma anaplásico se deben incluir CD30 y ALK.
- En el diagnóstico diferencial con otros linfomas T se debe incluir marcadores inmunofenotípicos adicionales.
- En muchas ocasiones se precisa el análisis de clonalidad linfoide T (reordenamientos de TCR) y B (reordenamientos de IGH).

Estos diagnósticos diferenciales deben tener en cuenta características clínicas de la enfermedad (con especial atención a la presencia de síntomas sistémicos y anomalías analíticas en virtualmente todos los casos) y rasgos morfológicos e inmunofenotípicos.

#### 4. PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).

Todos los procesos linfoproliferativos T precisan estudio inmunofenotípico completo, y en la mayoría de las ocasiones estudio molecular complementario.

**Panel de primera línea:** CD20, CD3, CD4, CD8, CD30, cadenas ligeras kappa y lambda, marcadores de células TFH (PD1, CD10, BCL6 y/o CXCL13), marcadores de células foliculares dendríticas (CD23 y/o CD21) e hibridación in situ para EBERs.

**Paneles de segunda línea:** Paneles específicos para diagnóstico diferencial con LH, otros linfomas T y linfomas B: dirigidos: CD56, PAX5, CD15, ALK, TIA1, PERFORINA, GZB, TCR bF1, TCR Gamma.

#### 5. CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

Se recomienda análisis de clonalidad linfoide T y B (reordenamientos de TCR e IGH) mediante PCR y electroforesis capilar.

Los estudios citogenéticos y/o de cariotipo no son necesarios para diagnóstico rutinario.

#### RECOMENDACIONES

1. **Panel de primera línea:** CD20, CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7, CD30, PD1, CD10, bcl6, CXCL13, CD23, hibridación in situ para EBV-EBER. Grado C. Evidencia nivel IV
2. **Paneles de segunda línea dirigidos:** CD56, PAX5, CD15, ALK, TIA1, PERFORINA, GZB, TCR bF1, TCR Gamma, ICOS. Grado C. Evidencia nivel IV
3. **Estudios de clonalidad linfoide B y T mediante PCR y electroforesis capilar en casos seleccionados.** Grado C. Evidencia nivel IV

#### REFERENCIAS:

1. Attygalle A, Al-Jehani R, Diss TC, Munson P, Liu H, Du MQ, Isaacson PG, Dogan A. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood*. 2002 Jan 15;99(2):627-33.
2. Bruggemann M, White H, Gaulard P, Garcia-Sanz R, Gameiro P, Oeschger S, Jasani B, Ott M, Delsol G, Orfao A, Tiemann M, Herbst H, Langerak AW, Spaargaren M, Moreau E, Groenen PJ, Sambade C, Foroni L, Carter GI, Hummel M, Bastard C, Davi F, Delfau-Larue MH, Kneba M, van Dongen JJ, Beldjord K, Molina TJ. Pow-

- erful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936. *Leukemia*. 2007 Feb;21(2):215-21.
3. Dupuis J, Boye K, Martin N, et al. Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL): a new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular helper T cells. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:490-494.
  4. H. J. Ree, M.D.; M. E. Kadin, M.D.; M. Kikuchi, M.D.; Y. H. Ko, M.D.; J. H. Go, M.D.; J. Suzumiya, M.D.; D. S. Kim, M.D., Ph.D. Angioimmunoblastic lymphoma (AILD-type T-cell lymphoma) with hyperplastic germinal centers. *Am J Surg Pathol*. 1998 Jun;22(6):643-55.
  5. Ioachim HL, Ratech H. Ioachim's Lymph Node Pathology. Lippincott Williams and Wilkins, 3rd Edition, 2002.
  6. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, World Health Organization Classification of Tumours 2001
  7. Kojima M, Nakamura S, Itoh H, Motoori T, Sugihara S, Shinkai H, Masawa N. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma with hyperplastic germinal centers: a clinicopathological and immunohistochemical study of 10 cases. *APMIS*. 2001 Oct;109(10):699-706
  8. Lachenal F, Berger F, Ghesquieres H, Biron P, Hot A, Callet-Bauchu E, Chassagne C, Coiffier B, Durieu I, Rousset H, Salles G. Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma: Clinical and Laboratory Features at Diagnosis in 77 Patients. *Medicine (Baltimore)*. 2007 Sep;86(5):282-292.
  9. Merchant SH, Amin MB, Viswanatha DS. Morphologic and immunophenotypic analysis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: Emphasis on phenotypic aberrancies for early diagnosis. *Am J Clin Pathol*. 2006 Jul;126(1):29-38.
  10. Quintanilla-Martinez L, Fend F, Moguel LR, Spilove L, Beaty MW, Kingma DW, Raffeld M, Jaffe ES. Peripheral T-cell lymphoma with Reed-Sternberg-like cells of B-cell phenotype and genotype associated with Epstein-Barr virus infection. *Am J Surg Pathol*. 1999 Oct;23(10):1233-40.
  11. Tan BT, Warnke RA, Arber DA. The frequency of B- and T-cell gene rearrangements and Epstein Barr virus in T-cell lymphomas: a comparison between angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified with and without associated B-cell proliferations. *J Mol Diagn*. 2006 Sep;8(4):466-75.
  12. Warnke RA, Jones D, Hsi ED. Morphologic and immunophenotypic variants of nodal T-cell lymphomas and T-cell lymphoma mimics. *Am J Clin Pathol*. 2007 Apr;127(4):511-27.
  13. Warnke RA, Weiss LM, Chan JKC, Cleary ML, Dorfman RF. Tumors of the Lymph Nodes and Spleen, Atlas of Tumor Pathology, AFIP Third Series, Fascicle 14, 1995

## LINFOMA DE CÉLULAS GRANDES T ANAPLÁSICO, ALK+ Y ALK-

### 1. DEFINICIÓN:

El linfoma de células grandes T anaplásico (LCGTA) es una neoplasia sistémica habitualmente compuesta de grupos cohesivos de células grandes atípicas, CD30+, con abundante citoplasma y núcleos pleomórficos.

Alrededor del 70% expresan la kinasa del linfoma anaplásico (ALK1) y constituyen una entidad claramente definida, el LCGTA ALK+. Los casos restantes, LCGTA ALK-, se recogen como una entidad provisional en la clasificación actual de la OMS.

Criterios diagnósticos:

- Grupos cohesivos de células grandes atípicas, CD30+, con abundante citoplasma y núcleos pleomórficos.
- "Hallmark cells": células grandes características con núcleos en U, en C, arriñonados o "en donut", rodeando un área de Golgi eosinófila.
- Frecuente patrón intrasinusoidal y/o distribución perivascular.
- Numerosas variantes morfológicas:
  - Variante común o clásica, con las características antes mencionadas bien patentes
  - Variante de células pequeñas
  - Variante linfocitocítica
  - Variantes ricas en neutrófilos, con células gigantes, con células en "anillo de sello", sarcomatoide, "Hodgkin-like" con esclerosis nodular.
- Inmunofenotipo T o "null".
- Ausencia de marcadores de línea B o inmunofenotipo clásico de LH.
- Inmunopositividad para ALK1 y translocación de ALK presentes por definición en los LCGTA ALK+

Los LCGTA ALK+ son más frecuentes en niños y pacientes jóvenes y presentan mejor pronóstico. Los criterios diagnósticos de los casos ALK1 negativos son controvertidos; en general se admiten como tales aquellos casos que muestran las características morfológicas de la variante común e intensa positividad para CD30, frecuentemente acompañada de EMA. No obstante, en muchos casos se discute su posible clasificación como LCTP, NOS.

La expresión de ALK1 no es exclusiva de LCGTA; otros tumores, entre los que se encuentra un subtipo de linfoma B de células y una variante inhabitual de histiocitosis infantil autolimitada grandes pueden expresarlo.

Además de con afectación ganglionar, el LCGTA puede presentarse también con afectación de localizaciones extraganglionares, tejidos blandos y piel; con menor frecuencia, hueso y tracto gastrointestinal.

La infiltración de médula ósea puede ser muy sutil y siempre requiere estudio inmunohistoquímico para CD30 y ALK1.

## 2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección. **Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** se puede utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo 1b (Muestra para diagnóstico).

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es el método de elección imprescindible para la estadificación de todos los casos. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro.

## 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

- Carcinoma (debe recordarse la frecuente positividad para EMA del LCGTA)
- Melanoma
- Linfoma B difuso de células grandes ALK+
- Variantes de linfoma B difuso de células grandes con morfología anaplásica (ALK-).
- Formas clásicas de linfoma de Hodgkin, que a veces pueden ser muy ricas en células tumorales
- Linfoma de células grandes anaplásico, primario cutáneo.

El diagnóstico inicial debe incluir un estudio morfológico adecuado con hematoxilina-eosina (HE). El panel inmunofenotípico básico debe incluir marcadores de línea linfoide, línea T (CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7), línea B (CD20, PAX5), CD30, EMA y ALK.

En algunas ocasiones se precisa el análisis de clonalidad linfoide T (reordenamientos de TCR) y B (reordenamientos de IGH).

#### 4. PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).

**Panel de primera línea:** CD45, CD43, CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7, CD20, PAX5, CD30, EMA, ALK1.

**Paneles de segunda línea:** Marcadores citotóxicos (TIA1 y/o Granzima B o perforina). Paneles específicos para diagnóstico diferencial con LH y linfomas B

#### 5. CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

Sólo el LCGTA ALK+ muestra características citogenéticas distintivas. La expresión inmunohistoquímica de ALK1 que lo define se correlaciona con una translocación del gen ALK, que puede mostrar diversas variantes. La demostración formal de la traslocación es mediante FISH con sondas de tipo BA.

La translocación más frecuente en el LCGTA ALK+ es la t(2;5) (alrededor del 80% de los casos), que involucra a los genes ALK y NPM ("nucleophosmin"). Dicha translocación se asocia con una positividad de ALK1 de distribución nuclear y citoplasmática.

En aproximadamente un 20% de casos el reordenamiento de ALK es diferente y se asocia con una positividad de ALK1 fundamentalmente citoplasmática (p. ej., t(1;2), que produce la fusión TPM3-ALK).

No se precisa en la mayoría de los casos análisis de clonalidad linfoide (reordenamientos de TCR e IGH) mediante PCR y electroforesis capilar, excepto en los casos con fenotipo "nulo" y para descartar neoplasias B.

#### RECOMENDACIONES

1. Recordar que no todos los LCGAT ALK+ muestran la gran cantidad de células "hallmark" típicas de la variante clásica. Grado C. Evidencia nivel IV
2. Panel de primera línea: CD45, CD43, CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7, CD20, PAX5, CD30, EMA, ALK1. Grado C. Evidencia nivel IV
3. Paneles de segunda línea dirigidos (marcadores citotóxicos). Paneles específicos para diagnóstico diferencial con LH y linfomas B. Grado C. Evidencia nivel IV
4. Estudios de clonalidad linfoide B y T mediante PCR y electroforesis capilar en casos seleccionados. Grado C. Evidencia nivel IV
5. Los casos ALK1 negativos siempre representan un diagnóstico controvertido. En esta situación puede ser recomendable remitir el caso a hematopatólogos experimentados. Grado C. Evidencia nivel IV

#### REFERENCIAS:

1. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, et al. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood*. 1998;91:2076–2084
2. d'Amore ES, Menin A, Bonoldi E, Bevilacqua P, Cazzavillan S, Donofrio V, Gambini C, Forni M, Gentile A, Magro G, Boldrini R, Pillon M, Rosolen A, Alaggio R. Anaplastic large cell lymphomas: a study of 75 pediatric patients. *Pediatr Dev Pathol*. 2007 May-Jun;10(3):181-91.
3. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW eds. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, World Health Organization Classification of Tumours 2001.
4. Kesler MV, Paranjape GS, Asplund SL, McKenna RW, Jamal S, Kroft SH. Anaplastic large cell lymphoma: a flow cytometric analysis of 29 cases. *Am J Clin Pathol*. 2007 Aug;128(2):314-22.



5. Medeiros LJ and KSJ Elenitoba-Johnson. Anaplastic Large Cell Lymphoma. Am J Clin Pathol 2007;127:707-722
6. Warnke RA, Weiss LM, Chan JKC, Cleary ML, Dorfman R. Tumors of the Lymph Nodes and Spleen, Atlas of Tumor Pathology, AFIP Third Series, Fascicle 14, 1995.

#### 4c. LINFOMAS T EXTRAGANGLIONARES NO CUTÁNEOS

##### LEUCEMIA DE LINFOCITOS GRANDES GRANULARES, LEUCEMIA PROLINFOCITICA, LINFOMA HEPATOESPLENICO, LEUCEMIAS NK, LINFOMAS ENTEROPATICOS Y SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS T PEDIATRICOS ASOCIADOS A VEB.

Autor para la correspondencia: *Antonio Martínez* ([ANTONMAR@clinic.ub.es](mailto:ANTONMAR@clinic.ub.es))

#### 1. DEFINICIÓN Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD.

En este capítulo no se describe una sola entidad, sino un grupo de síndromes linfoproliferativos de presentación extranodal y que aunque pueden afectar la piel no son primariamente cutáneos. Las entidades clínico-patológicas incluidas en este capítulo son muy poco frecuentes representando entre el 2-5% de los síndromes linfoproliferativos y el diagnóstico preciso es importante por las implicaciones pronósticas y terapéuticas que conlleva. Como en todos los linfomas T, la forma de presentación clínica forma parte esencial de la definición de la entidad y debe orientar todo el proceso diagnóstico. Así, la presencia de una marcada hepatoesplenomegalia es característica de la leucemia prolinfocítica T y del linfoma T hepatoesplénico mientras que la leucemia de linfocitos grandes granulares se manifiesta con baja carga tumoral sin organomegalia o con una esplenomegalia leve, citopenias y frecuentemente asociada a enfermedad autoinmune. La presencia de adenopatías junto con afectación cutánea, en este contexto, favorecería el diagnóstico de leucemia prolinfocítica T o de una leucemia linfoma T del adulto. La afectación de sangre periférica, con linfocitosis, es común a la leucemia prolinfocítica T, la leucemia de linfocitos grandes granulares, las formas aguda y crónica de las leucemia/linfoma T del adulto y a los procesos derivados de linfocitos NK mientras que es excepcional en el linfoma T hepatoesplénico y en el enteropático; en este último es característica la presencia de enteropatía, especialmente en enfermos celíacos. La hipercalcemia es típica de la leucemia/linfoma T del adulto. El origen geográfico del paciente puede ser también útil en la aproximación al diagnóstico. Así, los síndromes linfoproliferativos T de la infancia, se observan fundamentalmente en niños de Asia y América del Sur (especialmente en Méjico) mientras que la leucemia linfoma T del adulto es más frecuente en pacientes emigrantes de Japón, Caribe, América del Sur (Chile y Brasil principalmente), África central e Irán. No obstante los movimientos migratorios recientes influyen en la distribución de estas entidades, las cuales pueden también afectar a pacientes que no proceden de esas áreas geográficas.

Por la complejidad del diagnóstico y el tratamiento de este grupo de neoplasias, la recomendación es que ante la sospecha de que nos enfrentamos a un proceso de este grupo, el diagnóstico debe realizarse en un centro con experiencia y con posibilidad de realizar un estudio completo genético, inmunofenotípico y molecular, y que preferentemente disponga de experiencia en el tratamiento de estos pacientes.

#### 2. TIPO DE MUESTRA

El tipo de muestra adecuada para el diagnóstico depende de la forma de presentación de la enfermedad. El estudio citomorfológico e inmunofenotípico por citometría de flujo de los linfocitos en sangre periférica y médula ósea, y la biopsia de médula ósea con inmunohistoquímica son mandatorios, en especial en las formas con linfocitosis y en los que no disponemos de una muestra tisular tal como el bazo para el estudio histológico. Mientras que en la leucemia prolinfocítica T, la infiltración medular suele ser difusa o mixta

(nodular e intersticial), en la leucemia de linfocitos granulares y el linfoma hepatoesplénico es predominantemente intrasinusoidal. En estas dos últimas entidades y en especial en la leucemia de linfocitos granulares la infiltración puede ser mínima por lo que el estudio inmunohistoquímico es esencial para ponerla de manifiesto. Aunque la esplenectomía se realiza en algunos pacientes con fines diagnósticos y terapéuticos y la histología esplénica permite diferenciar claramente la leucemia prolinfocítica T de la leucemia de linfocitos granulares, no siempre se dispone de ella. La afectación cutánea se halla presente en el 40% de casos de leucemia/linfoma T del adulto y hasta el 25% de leucemias prolinfocíticas T. La biopsia cutánea puede ser de ayuda en el diagnóstico diferencial ya que permite distinguir la leucemia prolinfocítica T de linfomas cutáneos T, especialmente del síndrome de Sézary, puesto que en la primera no se aprecia nunca epidermotropismo. Sin embargo, el 50% de casos de leucemia/linfoma T del adulto muestra epidermotropismo y en estos casos, la biopsia cutánea por sí sola no permite distinguirla de linfomas primarios cutáneos T. El estudio serológico para el virus HTLV-1 es mandatorio para establecer el diagnóstico de leucemia/linfoma T del adulto y se recomienda éste en todos los pacientes emigrantes de zonas endémicas para este retrovirus a los que se diagnostica de linfoma T en la piel o de linfoma T periférico en el ganglio linfático. El título de inmunoglobulinas frente antígenos del virus de Epstein-Barr (EBV), o la carga viral en suero, además del estudio de hibridación in situ para el RNA del virus en el tejido son imprescindibles en el diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos pediátricos asociados a EBV así como en el de los linfomas T/NK y las leucemias agresivas de células NK, que a diferencia de las proliferaciones crónicas de células NK son con frecuencia EBV positivas.

### 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico diferencial de estos procesos se plantea esencialmente con proliferaciones reactivas y con otros síndromes linfoproliferativos T.

#### 1. *Linfadenitis reactivas*

Algunas formas de presentación pueden imitar un proceso reactivo. La leucemia prolinfocítica, cuando afecta el ganglio, puede remedar un patrón de hiperplasia parafolicular preservando los folículos linfoides. Por ello es esencial disponer de información clínica y del análisis morfológico e inmunofenotípico de los linfocitos de sangre periférica.

De igual manera, los síndromes linfoproliferativos T del niño asociados a EBV pueden preservar exquisitamente la arquitectura del ganglio o de la amígdala. En estos casos, sólo la hibridación in situ para EBERs del EBV destaca una masiva proliferación perifolicular de células T positivas para este virus.

#### 2. *Dermatitis reactivas*

La leucemia/linfoma T del adulto en su forma indolente o "smoldering" puede manifestarse con un "rash" cutáneo exfoliativo con infiltración linfoide muy poco atípica citológicamente que puede confundirse con un proceso inflamatorio o si muestra epidermotropismo con un linfoma T primario cutáneo especialmente con la afectación cutánea por el Síndrome de Sézary o una Micosis Fungoides.

#### 3. *Mucositis reactivas*

El diagnóstico del linfoma T/NK nasal se retrasa frecuentemente porque las biopsias muestran solo tejido necrótico desvitalizado o material fibrinoleucocitario, dado que las lesiones son altamente angioinvasivas y producen necrosis. Sólo biopsias profundas pueden demostrar la lesión diagnóstica característica sobre tejido viable.

#### 4. *Otros síndromes linfoproliferativos*

La leucemia/linfoma T del adulto en su forma linfomatosa puede presentar una histología ganglionar que no puede distinguirse de los linfomas periféricos T NOS.

Asimismo, la biopsia de medula ósea en la leucemia de linfocitos granulares puede mostrar además de la infiltración leucémica intrasinusoidal o intersticial, nódulos linfoides reactivos compuestos en su mayoría por linfocitos pequeños B CD20+ que pueden dar lugar a un diagnóstico erróneo de linfoma B de bajo grado.

#### 5. Síndromes linfoproliferativos de infiltración intrasinusoidal

La infiltración intrasinusoidal en una biopsia hepática afecta por linfoma T hepatoesplénico puede ser sutil, con mínima atipia citológica sobre un hígado que muestra la arquitectura preservada. De igual forma, la infiltración intrasinusoidal en el bazo o en la médula ósea de una leucemia de linfocitos grandes granulares o una leucemia crónica de células NK pueden pasar desapercibidas a un patólogo no experto si no se realiza un estudio inmunohistoquímico completo. El estudio de clonalidad del receptor de células T (RCT) mediante técnicas de PCR es mandatorio para descartar proliferaciones de linfocitos granulares reactivas y confirmar el diagnóstico de leucemia ya que las características citológicas e inmunofenotípicas son muy similares en los procesos clonales y los reactivos. Recientemente se han descrito procesos NK indolentes del tracto gastrointestinal que no deben ser confundidos con linfomas NK. Por todo ello, es imprescindible una correcta sospecha clínica en el momento de interpretar la biopsia. Todo caso discordante debería ser revisado por un experto.

#### 4. PANELES DE IHQ

El abordaje de las neoplasias linfoides T requiere de un número amplio de marcadores, algunos de los cuales solo están disponibles para técnicas de citometría de flujo. En general, el poder definir la línea linfoide vs NK; linfoide T CD8+, CD4+ o doble negativo o doble positivo ayuda a orientar el proceso. La expresión de cadenas del TCR en superficie o citoplasma excluye línea NK, aunque algunos linfomas de tipo NK nasal pueden tener un genotipo y fenotipo T. En los últimos años disponemos de anticuerpos que funcionan en tejido parafinado para identificar células T alfa/beta y gamma/delta. Otros marcadores imprescindibles son CD25, CD56, CD57 y anticuerpos que detectan las granulaciones citotóxicas (TIA-1, Granzima B, Perforina). Además es imprescindible el uso de hibridación para EBER que, en la mayoría de los casos, no es reemplazable por otros antígenos de latencia del EBV como la proteína LMP1.

En la Tabla 1 se describen los anticuerpos disponibles para tejido en parafina y en la Tabla 2 se resumen las características inmunofenotípicas de los diversos procesos linfoproliferativos T incluidos en este capítulo.

**Tabla 1.** Lista de marcadores que pueden aplicarse en tejido en parafina para el diagnóstico de linfomas T, NK y T/NK

Grupo	Marcadores
Célula T	CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD52, TCRBeta, TCRGamma, TCRdelta
Citotóxico	TIA1, granzima B, perforina
Treg	FoxP3, CD25, CD152
NK	CD16, CD56, CD57
IEL*	CD103
Th1	T-Bet
Th2	GATA3
Activación	CD25, CD30
Proliferación	Ki67
EBV	EBER ISH (hibridación in situ), LMP1, EBNA2

\*IEL: linfocitos intraepiteliales (Intraepithelial lymphocyte).

**Tabla 2** Resumen de las características inmunofenotípicas

Entidad	CD3	CD5	CD7	CD4	CD8	CD25	CD16	CD56	CD57	CD52	Gránulos	TCR	EBER
PLL*	+	+	+	+60%	+15%	+25%	-	-	-	+	-	αβ	-
LGL**	+	+/-	+/-	-	+85%	-	+	-/+	+	+	activados	αβ	-
cNK***	+citop	-	-	-	+/-	-	+	+	-	?	activados	-	-
aNK	+citop	-	-	-	-	-	+debil	+	+	?	activados	-	+
NK/T***	+citop	-	?	-	-	+30%	-/+	+	-/+	+25%	activados	-	+
EBV-TLPD pediátrico	+	+	-/+	-	+	-/+	+/-	-	-	?	Tia-1	αβ	+
HSTL	+	-	-	-	-/+	-	+	+/-	-	-/+	incompleto	γδ>αβ	-/+
ATLL	+	+	-	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	-	αβ	-
EATL tipo I	+	+	-	-	+	+25%	+/-	+	+/-	?	activados	αβ	-

\* Coexpresión de CD4 y CD8 en el 25% de los casos y ausencia de expresión de CD3 y RCT en la membrana en el 20% de los casos. Una expresión elevada de Tcl-1 es frecuente pero no exclusiva de esta enfermedad

\*\* Expresan gránulos citotóxicos TIA-1, granzima B y perforina independientemente de que la proliferación sea de linfocitos CD8+ o la menos frecuente CD4+

\*\*\* Expresan gránulos citotóxicos TIA-1, perforina y Granzima B

## 5. ESTUDIO CITOGÉNICO/MOLECULAR

El estudio de clonalidad es de gran utilidad en las neoplasias linfoides T dada la ausencia de algún marcador subrogado por inmunohistoquímica, similar a las cadenas ligeras en los linfomas B, que pueda usarse en la rutina diagnóstica. Un inmunofenotipo aberrante con pérdida de expresión de antígenos T es sugestivo pero no definitivo de un proceso clonal. En las proliferaciones de linfocitos granulares deberá determinarse siempre la clonalidad mediante el análisis del reordenamiento de las cadenas Beta o Gamma del RCT mediante PCR. Mediante citometría de flujo, la expresión de un mismo receptor de tipo inhibidor de células NK (KIR) se puede usar como sinónimo de clonalidad en la leucemia de linfocitos granulares T y NK aunque solo permite obtener información en una proporción de casos. Recientemente mutaciones de STAT3 se han implicado en la patogénesis de la leucemia de linfocitos granulares T y NK hallándose presente en alrededor del 20-23% de pacientes. Hay alteraciones genéticas características y recurrentes en algunos de estos procesos en especial en la leucemia prolinfocítica T que muestra alteraciones recurrentes tales como inv(14)(q11;q32) que involucra el reordenamiento del oncogén *TCL1* (80% casos) e iso(8q) (60% de casos). Si bien la citogenética o FISH no son imprescindibles en casos francamente leucémicos y con morfología típica de prolinfocítica T, sí que son de ayuda y corroboran el diagnóstico en las variantes morfológicas y/o en formas de bajo voltaje de leucemia prolinfocítica. La presencia de isocromosoma 7 que puede estudiarse mediante técnica de FISH en parafina puede sustentar el diagnóstico de linfoma T hepatoesplénico. Estos estudios sólo están disponibles en unidades de diagnóstico hematopatológico especializado.

## RECOMENDACIONES.

1. El grupo de neoplasias que se discuten en este capítulo son entidades clínico-patológicas muy poco frecuentes que requieren para su diagnóstico definitivo la integración de datos clínicos y de laboratorio y de unidades de hematopatología expertas en estos procesos y con gran variedad de técnicas disponibles. Grado C. Evidencia nivel IV
2. El informe final del patólogo debe incluir una descripción detallada de la citología, patrón de infiltración tisular, inmunofenotipo y a ser posible anomalías genéticas/moleculares, especialmente en casos problemáticos con dificultades para establecer un diagnóstico final. Grado C. Evidencia nivel IV

3. **Es recomendable referir las muestras a centros de referencia nacionales con experiencia en este tipo de enfermedades en fases iniciales del proceso para un diagnóstico y manejo adecuado del paciente. Grado C. Evidencia nivel IV**

\* Los autores desean agradecer a los Dres Blanca González y Estella Matutes su colaboración en la redacción de este capítulo.

## REFERENCIAS

1. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
2. Garcia-Herrera A, Song JY, Chuang SS, Villamor N, Colomo L, Pittaluga S, Alvaro T, Rozman M, de Anda Gonzalez J, Arrunategui AM, Fernandez E, Gonzalvo E, Estrach T, Colomer D, Raffeld M, Gaulard P, Campo E, Jaffe ES, Martinez A. Nonhepatosplenic  $\gamma\delta$  T-cell lymphomas represent a spectrum of aggressive cytotoxic T-cell lymphomas with a mainly extranodal presentation. *Am J Surg Pathol*. 2011 Aug;35(8):1214-25. doi:10.1097/PAS.0b013e31822067d1. PubMed PMID: 21753698; PubMed Central PMCID: PMC3136885.
3. Osuji N, Beiske K, Randen U, Matutes E, Tjonnfjord G, Catovsky D, Wotherspoon A. Characteristic appearances of the bone marrow in T-cell large granular lymphocyte leukaemia. *Histopathology*. 2007 Apr;50(5):547-54. PubMed PMID:17394489.
4. Osuji N, Matutes E, Catovsky D, Lampert I, Wotherspoon A. Histopathology of the spleen in T-cell large granular lymphocyte leukemia and T-cell prolymphocytic leukemia: a comparative review. *Am J Surg Pathol*. 2005 Jul;29(7):935-41. Review. PubMed PMID: 15958859.
5. Jerez A1, Clemente MJ, Makishima H, Koskela H, Leblanc F, Peng Ng K, Olson T, Przychodzen B, Afable M, Gomez-Segui I, Guinta K, Durkin L, Hsi ED, McGraw K, Zhang D, Wlodarski MW, Porkka K, Sekeres MA, List A, Mustjoki S, Loughran TP, Maciejewski JP. STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2012 Oct 11;120(15):3048-57. doi: 10.1182/blood-2012-06-435297. Epub 2012 Aug 2
6. Dungarwalla M, Matutes E, Dearden CE. Prolymphocytic leukaemia of B- and T-cell subtype: a state-of-the-art paper. *Eur J Haematol*. 2008 Jun;80(6):469-76. doi: 10.1111/j.1600-0609.2008.01069.x. Epub 2008 Mar 10. Review. PubMed PMID:18331594.
7. Asano N, Kato S, Nakamura S. Epstein-Barr virus-associated natural killer/T-cell lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013 Mar;26(1):15-21. doi:10.1016/j.beha.2013.04.002. Epub 2013 May 25. Review. PubMed PMID: 23768637.
8. Suzuki R, Takeuchi K, Ohshima K, Nakamura S. Extranodal NK/T-cell lymphoma: diagnosis and treatment cues. *Hematol Oncol*. 2008 Jun;26(2):66-72. doi:10.1002/hon.847. Review. PubMed PMID: 18283711.
9. Semenzato G, Marino F, Zambello R. State of the art in natural killer cell malignancies. *Int J Lab Hematol*. 2012 Apr;34(2):117-28. doi:10.1111/j.1751-553X.2011.01374.x. Epub 2011 Sep 6. Review. PubMed PMID: 21895989.
10. Ohshima K. Pathological features of diseases associated with human T-cell leukemia virus type I. *Cancer Sci*. 2007 Jun;98(6):772-8. Epub 2007 Mar 27. Review. PubMed PMID: 17388788.

11. Matutes E. Adult T-cell leukaemia/lymphoma. *J Clin Pathol*. 2007 Dec;60(12):1373-7. Review.
12. Vega F, Medeiros LJ, Gaulard P. Hepatosplenic and other gammadelta T-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 2007 Jun;127(6):869-80. PubMed PMID: 17509984.
13. Wlodarska I, Martin-Garcia N, Achten R, De Wolf-Peeters C, Pauwels P, Tulliez M, de Mascarel A, Brière J, Patey M, Hagemeyer A, Gaulard P. Fluorescence in situ hybridization study of chromosome 7 aberrations in hepatosplenic T-cell lymphoma: isochromosome 7q as a common abnormality accumulating in forms with features of cytologic progression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Mar;33(3):243-51. PubMed PMID: 11807981.
14. Swerdlow SH, Jaffe ES, Brousset P, Chan JK, de Leval L, Gaulard P, Harris NL, Pileri S, Weiss LM; International Lymphoma Study Group. Cytotoxic T-cell and NK-cell lymphomas: current questions and controversies. *Am J Surg Pathol*. 2014 Oct;38(10):e60-71. doi: 10.1097/PAS.0000000000000295. Review. PubMed PMID:25025449.

## 5. LINFOMAS PRIMARIOS CUTÁNEOS.

Autor para la correspondencia: María Rodríguez Pinilla ([smrodriguez@fjd.es](mailto:smrodriguez@fjd.es))

### DEFINICIÓN Y ENTIDADES A CONSIDERAR.

Linfoma primario cutáneo es el que infiltra de forma primaria la piel. Tanto los linfomas B como los linfomas T sistémicos pueden infiltrar secundariamente la piel y adoptar cualquier patrón morfológico de infiltración por lo que siempre deben ser excluidos mediante un adecuado estudio clínico.

### LINFOMAS T PRIMARIOS CUTÁNEOS.

Representan el 70% de los linfomas primarios cutáneos, siendo la micosis fungoides (MF) y sus variantes el tipo más frecuente (~40%) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de los linfomas T y NK primario cutáneos según la WHO-EORTC. \*La frecuencia dada se refiere a la totalidad de los linfomas primarios cutáneos B y T.

Linfomas T/NK primario cutáneos	Frecuencia (%)*
<b>Curso clínico indolente:</b>	
Micosis fungoides	44
Subtipos y variantes de Micosis fungoides	6
Linfoma primario cutáneo de linfocitos T CD4-positivos de pequeño-mediano tamaño	1
Linfoma NK/T tipo hydroa vacciniforme	2
Desordenes linfoproliferativos CD30+ primario cutáneos	<1
- Linfoma anaplásico de células grandes CD30+ primario cutáneo	8
- Papulosis Linfomatoide.	12
<b>Curso clínico agresivo:</b>	
Síndrome de Sézary	3
Linfoma primario cutáneo de células NK/T de tipo nasal	<1
Linfoma T citotóxico CD8-epidermotropo agresivo primario cutáneo	<1
Linfoma T primario cutáneo gamma/delta	<1
Linfoma T periférico no especificado primario cutáneo	2

### A1. MICOSIS FUNGOIDES (MF).

El diagnóstico de MF debe restringirse a aquellos pacientes que cursen con historia de lesiones en forma de mancha, placa y finalmente en algunos casos nódulos/tumores. Es más frecuente en adultos, generalmente varones, aunque se ha descrito en niños. El curso clínico es variable, aunque por lo general, prolongado produciéndose ocasionalmente en estadios avanzados afectación ganglionar y visceral (hígado, bazo, pulmón y sangre periférica, principalmente).

Histológicamente se caracteriza por un infiltrado epidermotropo de linfocitos pequeños con escasa atipia citológica que forman cúmulos intraepidérmicos (abscesos de Pautrier). Los linfocitos tumorales suelen expresar CD4 y en la mayoría de los casos hay pérdida de CD7. Se han descrito casos con expresión de CD8, que suelen presentarse en forma de manchas o placas hipo o hiperpigmentadas así como casos con expresión de CD56, TCRgamma y otros con ausencia de expresión de CD4 y CD8. Estos subtipos inmunofenotípicos no suelen presentar diferente comportamiento biológico.

En estadios iniciales el infiltrado linfoide se dispone principalmente en banda en dermis superficial y tanto la atipia citológica como el epidermotropismo pueden ser muy sutiles haciendo muy complicado el diagnóstico. No suele observarse pérdida de expresión de marcadores T ni reordenamientos clonales del gen TCR. A medida que las lesiones se vuelven más tumorales, se pierde el epidermotropismo, el infiltrado dérmico es más denso y difuso y disminuye el componente de células reactivas mientras que las tumorales

aumentan en número. Puede observarse transformación histológica, definida como la presencia de más de un 25% de células grandes de aspecto blástico. Estas células pueden ser CD30-positivas o CD30-negativas. Esto es más común en fases tumorales de MF. Puede adquirirse la expresión de marcadores citotóxicos. En casos de positividad para CD30 se requiere hacer el diagnóstico diferencial con otras entidades del espectro de los desórdenes linfoproliferativos cutáneos CD30 positivos.

#### VARIANTES DE MF.

- **MF foliculotropía:** No siempre se observa mucinosis folicular. Se asocia a curso clínico más agresivo.
- **MF granulomatosa:** Se asocia con granulomas de tipo sarcoideo o con patrones de infiltración tipo granuloma anular. Las células multinucleadas gigantes destruyen y fagocitan las fibras elásticas. No siempre se observa epidermotropismo (50%). Curso clínico más agresivo que la variante clásica.
- **Síndrome de piel laxa granulomatosa:** Histológicamente es indistinguible de la MF granulomatosa y se caracteriza por la aparición de una piel laxa y colgante en los grandes pliegues cutáneos y por un curso clínico muy benigno.
- **Reticulosis pagetoide:** El término se restringe a lesiones únicas en placa de crecimiento lento y progresivo. Se observa un llamativo epidermotropismo por linfocitos con halo claro. Se han descrito casos con expresión de CD4, CD8 e incluso CD30. El pronóstico es muy bueno.

#### A2. SÍNDROME DE SÉZARY (SS).

Es una forma rara de linfoma T primario cutáneo (representa el 3% de todos los linfomas primario cutáneos). Se caracteriza clínicamente por la presencia de eritrodermia, alopecia, hiperqueratosis palmo-plantar y linfadenopatías. Tan sólo en un 40% de los casos se observan imágenes de linfocitos atípicos con epidermotropismo por lo que la biopsia cutánea no siempre es del todo útil para el diagnóstico. La mayoría de los autores coinciden en que es necesaria la presencia de >1000 células atípicas con núcleos cerebriformes (células de Sézary o células de Lutzner) en sangre periférica para hacer el diagnóstico de SS; si bien, aún no existen criterios diagnósticos consensuados. El pronóstico es muy malo, con una supervivencia media de 2-4 años.

#### A3. PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS PRIMARIO CUTÁNEOS CD30-POSITIVOS.

Incluye un espectro clinicopatológico en el que la clasificación de la WHO-EORTC reconoce tres subgrupos:

- **El linfoma anaplásico de células grandes primario cutáneo.**
- **La papulosis linfomatoide**
- **Lesiones mal definidas entre estas dos entidades ("lesiones borderline").**

#### A3A. LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES PRIMARIO CUTÁNEO (LACGPC).

Aparece principalmente en pacientes varones adultos, aunque está descrita en niños. Normalmente se trata de una lesión única o de lesiones múltiples localizadas en forma de pápulas o nódulos que frecuentemente se ulceran. A veces regresan espontáneamente tras un periodo medio de 2 meses (23-44% de los casos). Ocasionalmente pueden presentar recidivas cutáneas (~39% de los casos). La presencia de lesiones multifocales se ha descrito en el 20% de los pacientes. La afectación ganglionar locorregional se observa en un 10% de los casos y no parece tener implicaciones pronósticas. El pronóstico es muy bueno, con una supervivencia global a los 5 años del 76-96%.

Morfológicamente se caracterizan por una proliferación difusa de células grandes anaplásicas que afecta la dermis y en muchas ocasiones el tejido celular subcutáneo con expresión de CD30 en más de un 75% de las mismas. Es rara la presencia de epidermotropismo. El infiltrado linfo-leucocitario reactivo acompañante es muy escaso.

La mayoría de los casos expresa CD4 y marcadores citotóxicos (TIA-1, granzima, perforina) y suelen perder CD2, CD5, CD7 y/o CD3. Un 5% de los casos expresa CD8. De forma ocasional se han descrito casos doble CD4/CD8 negativos.



### **A3B. PAPULOSIS LINFOMATOIDE (PL).**

La PL se define como un proceso crónico, recurrente y autolimitado de afectación cutánea y en ocasiones de mucosas constituido por una proliferación de células grandes, anaplásicas, de aspecto inmunoblástico o de tipo Hodgkin con abundante infiltrado inflamatorio. Aparece principalmente en adultos de sexo masculino aunque también ha sido descrita en niños. Clínicamente se caracteriza por la aparición en brotes de múltiples pápulas, o nódulos, en tronco y extremidades en diferentes estadios evolutivos (pápula, necrosis, escara) que regresan espontáneamente tras 3-12 semanas dejando cicatrices hiperpigmentadas.. Se han descrito varios patrones de infiltración cutáneas que definen los distintos tipos (A-E).

### **A4. LINFOMA T SUBCUTÁNEO DE TIPO PANICULÍTICO (LTSP).**

Puede aparecer en adultos o niños, frecuentemente mujeres. Se caracteriza por la aparición de nódulos o placas únicas o múltiples generalmente en tronco y extremidades. Se ulceran con frecuencia. Es rara la afectación extracutánea. Es frecuente la aparición de síntomas sistémicos aunque el síndrome hemofagocítico (SHF) solo ocurre en un 15% de los casos. Un 20% de los pacientes presentan algún tipo de enfermedad autoinmune, especialmente lupus eritematoso sistémico. El curso clínico es, por lo general, poco agresivo, especialmente si no presentan SHF.

Histopatológicamente es una proliferación exclusivamente subcutánea por células neoplásicas de diferente tamaño y atipia citológica que se disponen alrededor de adipocitos de forma individual. Es frecuente la necrosis, la cariorrexis y la presencia de histiocitos.

El estudio IHQ muestra una proliferación de linfocitos T-citotóxicos frecuentemente CD8 que expresan fenotipo TCR $\alpha\beta$  (TCRBF1 mediante IHQ) y que, con frecuencia muestran un alto índice proliferativo (Ki67) en torno a vacuolas adiposas. Es poco frecuente la positividad con CD30 o CD56.

### **A5. LINFOMA T GAMMA-DELTA PRIMARIO CUTÁNEO (LTGDPC).**

Suelen debutar en forma de placas, nódulos o tumores úlcero-necróticos diseminados o en miembros inferiores en pacientes adultos añosos sin predilección de sexo. La afectación mucosa es frecuente. Es frecuente una rápida diseminación sistémica, aunque la afectación ganglionar y de la médula ósea es rara. Suelen presentar síntomas sistémicos y SHF, especialmente los pacientes con tumores con predominio de afectación paniculítica. Es un linfoma altamente resistente a la poliquimioterapia con muy mal pronóstico, especialmente los casos con afectación del tejido celular subcutáneo. La supervivencia media es inferior a 15 meses.

El patrón de afectación puede ser dérmico, intraepidérmico o subcutáneo. Dichos patrones pueden aparecer individualmente o en combinación. Las células tumorales también pueden presentar distintos grados de atipia morfológica.

Las células tumorales expresan CD3, TCR $\gamma\delta$  (TCR gamma y/o TCR delta mediante IHQ) y marcadores citotóxicos. La presencia de CD56 es frecuente. Suelen ser CD4/CD8 doble negativos o CD8-positivos.

### **A6. LINFOMA T CITOTÓXICO CD8-EPIDERMOTROPICO AGRESIVO PRIMARIO CUTÁNEO (LTC-CD8EA-PC). Entidad provisional según la OMS.**

Suele aparecer en forma de placas, pápulas, nódulos o tumores generalizados con frecuente ulceración. Suele afectar adultos sin predilección de sexo. El curso clínico es agresivo y suele metastatizar en mucosa oral, testículo, bazo, pulmón o SNC con poca afectación ganglionar. La supervivencia media es inferior a 3 años.

Las lesiones tempranas suelen presentar un patrón de infiltración intraepidérmico de tipo pagetoide. En las lesiones establecidas hay epidermotropismo marcado con necrosis de queratinocitos, espongiosis y ulceración. Suele observarse un patrón liquenoide y en banda en dermis superficial con frecuente destrucción de anejos pero sin angioinvasión, angiodestrucción o afectación de fascículos nerviosos. Se observa frecuente afectación de panículo adiposo.

Las células tumorales suelen expresar CD3, CD8, CD5, CD7, TCRBF1, TIA1. Suelen ser negativos con CD2, CD30, perforina y granzima. No se observa expresión de TCRGamma ni EBV-EBER.

**A7. LINFOMA T/NK EXTRAGANGLIONAR DE TIPO NASAL.**

Suele presentarse como múltiples placas o tumores, generalmente ulceradas en tronco y extremidades. Los pacientes son adultos, generalmente añosos y es más frecuente en individuos varones que provienen de Asia, Centro América o América del Sur. Se ha descrito de forma excepcional en niños. Suele presentar síntomas sistémicos y frecuentemente SHF.

Las células tumorales son de tamaño y morfología variable. Se disponen generalmente de forma difusa en dermis y tejido celular subcutáneo, aunque también pueden presentar epidermotropismo. Es muy característica la presencia de angiodestrucción con extensas áreas de necrosis. En ocasiones se observa abundantes células acompañantes de carácter reactivo constituidas por leucocitos, histiocitos y plasmáticas.

Las células neoplásicas son característicamente citotóxicas y expresan EBV-EBER. Suelen presentar expresión de CD3 citoplasmático y CD56 y no suelen expresar CD4 ni CD8. La expresión de TCRBF1 y TCR gamma es variable y de significado clínico impreciso en este grupo.

**A8. LINFOMA T/NK DE TIPO HYDROA-VACCINIFORME.**

Forma parte del espectro de lesiones relacionadas con infección crónica por EBV y se relaciona con hipersensibilidad a picaduras de insectos. Se presenta en niños de origen asiático, México, centro América y América del sur. Se caracteriza por la presencia de lesiones en forma de vesículas que evolucionan a papulas, se ulceran y dejan cicatriz residual. Tienen un curso clínico autoresolutivo y recurrente durante mucho tiempo hasta que finalmente desarrollan afectación sistémica por linfoma. La afectación cutánea ocurre en áreas foto y no fotoexpuestas. Las lesiones mucosas son frecuentes. Se asocian síntomas generales, fiebre, aumento de títulos de IgG frente a EBV y edema facial.

El fenotipo T es más frecuente (75% de los casos), presenta más síntomas sistémicos y se asocia a mayor agresividad de las lesiones cutáneas. El fenotipo NK (25% de los casos) aparece en pacientes más jóvenes, presenta un curso clínico más indolente pero mayor tendencia al desarrollo de linfomas NK de tipo nasal y leucemias NK.

El patrón histopatológico es variable con infiltración intraepidérmica (cúmulos de linfocitos pequeños con escasa atipia intraepidérmica formando vesículas espongióticas), dérmica y perivascular (escasas células en dermis con ligero angiotropismo y destrucción de anejos) o bien extensa con áreas de ulceración epidérmica, infiltración de tejido celular subcutáneo, partes blandas y tejido muscular. En estadios avanzados se observa infiltración ganglionar por linfoma. El tamaño y la atipia citológica es variable y aumenta a medida que evoluciona la enfermedad.

Las células tumorales son EBV-EBER positivas con expresión de CD3 citoplasmático y marcadores citotóxicos. Pueden expresar CD56 y CD30. La expresión de CD4 y CD8 es variable siendo frecuentemente doble negativas. Se ha observado la expresión frecuente de TCRBF1 y en menor medida de TCR-Gamma o la ausencia de expresión de ambos marcadores. Se observan abundantes células de hábito linfocitario negativas para EBV-EBER.

**A9. LINFOMA T CD4-POSITIVO DE CELULAS PEQUEÑAS-MEDIANAS. Entidad provisional según la OMS.**

Es un proceso linfoproliferativo que se presenta como nódulos únicos en región de cabeza, cuello y parte superior del tronco. Se han descrito casos con lesiones múltiples. Ocurren en adultos, y tienen un curso clínico benigno.

Histopatológicamente se observa una proliferación difusa dérmica de células de pequeño-mediano tamaño con no más de un 20% de células grandes. Hay escaso foliculotropismo, con presencia de "Grenz zone", escasos centros germinales reactivos de pequeño tamaño generalmente en áreas profundas y puede observarse abundante componente B reactivo acompañante, así como plasmáticas, eosinófilos, histiocitos y células gigantes multinucleadas.

Las células neoplásicas expresan CD3, CD4 y característicamente marcadores T de fenotipo centrofolicular como PD1, CXCL13, BCL6 y en ocasiones CD10. No suelen observarse restricción de cadenas ligeras en el componente linfoplasmocitario.

## **B. LINFOMAS B PRIMARIO CUTÁNEOS**

Representan el 30% de los linfomas primarios cutáneos.

### **B1. LINFOMA B DE LA ZONA MARGINAL PRIMARIO CUTÁNEO (LMPC)**

Este tipo de linfomas suponen el 7% de los linfomas primarios cutáneos. Son de muy buen pronóstico con una supervivencia global específica de enfermedad del 99-100% a los 5 años. Suelen presentar recidivas ocasionales pero no suelen tener afectación extracutánea. Entre los pacientes con linfoma B de la zona marginal de presentación primaria cutánea tan sólo un 2% presentan infiltración franca de la médula ósea, momento en el que dejan de considerarse cutáneos. Las lesiones pueden ser únicas o múltiples, en forma de pápulas, nódulos o placas principalmente en el tronco y extremidades. De forma inhabitual pueden tener un curso clínico intercurrente (aparición y desaparición de las lesiones espontáneamente). La desaparición espontánea puede asociarse con la aparición de anetodermia.

Histopatológicamente presentan un patrón de afectación dérmica difuso o pseudonodular constituido por folículos linfoides de centros germinales reactivos y expansión de linfocitos del área marginal que disecan los haces de colágeno. Se acompañan de un número variable de células dendríticas multinucleadas y blastos. Hay abundantes células de hábito linfoplasmocitode o plasmáticas maduras en la periferia de la lesión y bajo la epidermis.

Las células neoplásicas del área marginal expresan CD20, CD79a y BCL2 y son CD10 y BCL6 negativas. Las células plasmáticas expresan CD138 y CD79a pero son CD20 negativas y presentan restricción de cadenas ligeras en el estudio inmunohistoquímico en el 75% de los casos. Los linfocitos B del centro germinal de carácter reactivo expresan CD10 y BCL6 pero son BCL2 negativos. Se ha descrito positividad nuclear con BCL10 (46% de los casos) y se asocia con tumores agresivos localmente.

Se describen dos subtipos:

- Con cambio de clase de las inmunoglobulinas (Igs) y expresión de IgG, principalmente IgG4; presenta abundantes linfocitos T reactivos acompañantes de fenotipo TFH2 y escasa células B neoplásicas.
- Sin cambio de clase de las Igs; expresan IgM, y suelen acompañarse de proliferaciones difusas de células B, expresión de CXCR3, y asociarse con infección por *Borrelia burgdorferi*.

### **B2. LINFOMA B CENTROFOLICULAR PRIMARIO CUTÁNEO (LCFPC)**

Representan el 9-11% de los linfomas primarios cutáneos. Frecuentemente se presentan como placas o tumores múltiples o solitarios en la región del tronco, de la cabeza o el cuello. A veces se presentan como placas eritematosas con nódulos sobre ellas ("Linfoma de Crosti") y algunos pacientes presentan múltiples lesiones papulosas de pequeño tamaño alejadas 10-15 cm de la lesión principal.

El pronóstico es muy bueno, con una supervivencia global superior al 95% a los 5 años. Los casos de presentación multifocal o de localización en piernas parecen tener peor pronóstico. Se ha descrito la progresión a linfoma B difuso de células grandes.

Histopatológicamente se definen como una proliferación de centrocitos y centroblastos que puede adoptar un patrón nodular, mixto (nodular y difuso) o difuso. Las células tumorales se acompañan de numerosas células T de carácter reactivo. Algunos LCFPCs presentan morfología fusocelular. A diferencia de los linfomas foliculares ganglionares los LCFPC no se gradan.

Las células tumorales expresan CD20 y CD79a. Son característicamente BCL6 positivos. Se observa positividad variable con CD10 en los de patrón de crecimiento nodular. No se observa expresión de MUM1.

La expresión de BCL2 está más restringida que la contrapartida ganglionar. Su presencia en más del 50% de las células tumorales en LCFPC constituidos por células grandes y patrón de crecimiento difuso se asocia a peor pronóstico. En casos con una expresión intensa y difusa de BCL2, se debe descartar que se trate de una forma secundariamente cutánea de linfoma B folicular. La presencia de translocación entre los genes IgH@/BCL2 se detecta hasta en un 10-41% de los LCFPCs. Sin embargo, se recomienda igualmente descartar clínicamente en estos casos afectación cutánea por un linfoma B folicular sistémico.

**B3. LINFOMA B DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES PRIMARIO CUTÁNEO DE TIPO PIERNAS (LBDCG-PCTP).**

Representan el 4% de los linfomas primarios cutáneos. Son linfomas agresivos con una supervivencia a los 5 años del 55%. Se presentan característicamente en las piernas, aunque no son exclusivos de esta localización (15-20% otra localización). Son más frecuentes en personas ańosas y frecuentemente mujeres. Suelen cursar en forma de nódulos únicos o múltiples, uni o bilaterales. Presentan rápido crecimiento y gran tendencia a la diseminación extracutánea (50%), principalmente a ganglios locorregionales.

Histopatológicamente se caracterizan por un infiltrado difuso dérmico de células de mediano-gran tamaño y aspecto inmunoblástico o centrobástico que frecuentemente alcanzan el tejido celular subcutáneo y respetan la epidermis. No se observan células B de pequeño tamaño y el componente reactivo de fenotipo T es muy escaso y frecuentemente limitado al área perivascular.

Las células tumorales expresan CD20, CD79a y BCL2. Pueden expresar CD10 y BCL6. De forma característica presentan expresión de IgM, MUM1 y FOXP1 en la mayoría de los casos. La mutación L265P de MYD88 se encuentra en un porcentaje variable de casos de LBDCG-PCTP según las series (33-61%).

**B4. OTROS TIPOS/SUBTIPOS DE LINFOMAS B DIFUSOS DE CÉLULAS GRANDES (LBDCG) (muy infrecuentes).**

Se han descrito principalmente y representan la afectación cutánea por un linfoma sistémico en la mayoría de los casos, Linfomas B con características intermedias entre linfomas de Burkitt y linfoma B difuso de células grandes, Linfoma primario de cavidades extracavitario, Linfomas plasmablasticos, Linfoma B rico en células T, Linfomas asociados a inmunosupresión (asociados a la edad avanzada, uso de metotrexato y procesos linfoproliferativos de tipo úlcera-mucocutánea), Granulomatosis linfomatoide, Linfoma B linfoblástico.

El linfoma B intravascular aunque normalmente es multisistémico (suele afectar sistema nervioso central y pulmón) puede tener un patrón de afectación exclusivamente cutánea. Se caracteriza por la presencia de células neoplásicas grandes en el interior de la luz de estructuras vasculares de pequeño-mediano calibre en dermis o tejido celular subcutáneo. Clínicamente se caracteriza por la aparición de manchas o placas violáceas o lesiones de tipo telangiectásico en piel de extremidades inferiores o tronco. Se ha descrito la colonización exclusiva de tumores vasculares benignos (hemangiomas) y la extravasación de escasas células tumorales a dermis perivascular. Aunque requiere tratamiento quimioterápico es de mejor pronóstico que el de presentación sistémica. Demostrar el inmunofenotipo B es esencial para descartar otros procesos neoplásicos con similar presentación clínico-patológica como el LACGPC o Linfoma T/NK de tipo nasal.

**2. TIPO DE MUESTRA IDONEA PARA EL DIAGNÓSTICO**

Biopsia incisional o escisional cutánea que incluya epidermis, dermis y tejido adiposo.

Biopsia-cilindro de médula ósea: Su indicación es controvertida en linfomas T de curso clínico indolente y en Linfoma B de la zona marginal primario cutáneo. En los linfomas B y T agresivos está indicada como método de estadiaje.

**3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNOSTICOS**

Los casos de linfomas cutáneos plantean diagnóstico diferencial histopatológico con una amplia variedad de procesos no neoplásicos. Entre ellos se destacan:

- MF en estadio inicial vs procesos inflamatorios (eczema, psoriasis, etc) vs reacción a fármacos.
- MF CD8-positiva vs vitíligo.
- MF granulomatosa vs procesos inflamatorios de carácter granulomatoso (tuberculosis, hongos, sarcoidosis, granuloma anular, etc..)
- LACGPC con abundante componente inflamatorio vs PL vs procesos virales, pioderma, reacción a fármacos, etc.
- La variante hiperplásica pseudoepiteliomatosa de LACGPC debe diferenciarse de carcinomas epidermoides.

- LTSP vs paniculitis lúpica. Este diagnóstico diferencial es especialmente difícil en niños.
- LMPC y LCFPC vs Hiperplasia folicular cutánea.

Este diagnóstico diferencial debe tener en cuenta principalmente características clínicas de la enfermedad y debe realizarse una adecuada correlación clínico-patológica. En caso de sospecha de proceso linfoproliferativo es preciso realizar un estudio IHQ apropiado y estudios moleculares en casos seleccionados.

#### 4. PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) e HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENÉTICA (HIS-C).

Dado el amplio espectro de LPC se aconseja inicialmente definir si se trata de un proceso B o T y posteriormente según el patrón morfológico y las características clínicas del paciente ampliar la batería de marcadores inmunohistoquímicos.

**Panel de primera línea:** CD45 (ALC), CD20, CD3, CD4, CD8, CD30, ki67.

**Paneles de segunda línea:**

Línea T: CD5, CD7, TCRBF1, TCR-Gamma, TCR-delta, CD56, ALK, EBV-EBER, PD1.

Línea B: BCL2, BCL6, CD10, KAPPA, LAMBDA, MUM1.

**Paneles de tercera línea:** TdT, TCL1, CD123, CD68, FOXP3, CD25.

Si el caso no es claramente tipificable con los estudios previos considerar infiltrados de tipo leucémico (leucemia cutis, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas), linfoma linfoblástico, leucemia T-prolinfocítica y leucemia-linfoma T del adulto.

#### 5. CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

Se recomienda la determinación molecular de clonalidad linfoide de Ig y TCR mediante PCR como método complementario al diagnóstico y evaluación de recidivas (véase apartado de diagnóstico molecular). Se debe tener en cuenta que en estadios iniciales de la MF debido a la escasez de infiltrado tumoral pueden no encontrarse reordenamientos clonales de los genes de TCR. A su vez, se pueden encontrar reordenamientos clonales T en algunos procesos de carácter reactivo. Ocasionalmente, en algunos procesos neoplásicos de estirpe T/NK el estudio molecular muestra un patrón policlonal del gen TCR.

Se observan reordenamientos clonales de los genes de Ig en la mayoría de los linfomas B primario cutáneos (80-83% de los LMPC; un 91-100% de los LCFPC y en un 100% de los LBDCG-PCTP). Sin embargo se han descrito también en un 4-22% de los infiltrados reactivos B de carácter no neoplásico. Se encuentran a su vez reordenamientos clonales T hasta en un 35% de los casos de linfoma B de la zona marginal primario cutáneo.

En aproximadamente un 26% de los LACGPC se ha descrito la translocación del gen IRF4 (6p25.3). Adicionalmente se ha descrito la presencia de la translocación del locus 6p25.3 afectando al gen *DUSP22-IRF4* en un 20-57% de los LACGPC, en un subgrupo de PL con patrón morfológico bifásico, en un 8% de linfomas T periféricos sin rasgos específicos y en un 30% de linfomas T anaplásicos sistémicos ALK-negativos.

En los LMPC se han descrito traslocaciones afectando a las cadenas pesadas de las IgGs (IGH) y a los genes MALT y FOXP1, respectivamente; t(14;18)(q32;q21) y t(3,14)(p14.1;q32), respectivamente. No se han encontrado reordenamientos similares a los descritos en el linfoma del área marginal (MALT) de tipo gástrico, t(11;18)(q21;q21) o t(1;14)(p22;q32).

La presencia de translocación entre los genes IgH@/BCL2 se detecta hasta en un 10-41% de los casos de LCFPC. Sin embargo, se recomienda descartar en estos casos afectación cutánea por un linfoma folicular sistémico.

Se ha demostrado de forma frecuente translocación de los genes CMYC y BCL6 y amplificación de los genes BCL2 y MALT1 en LBDCG-PCTP. La mutación L265P de MYD88 se encuentra en un porcentaje variable de casos de LBDCG-PCTP según las series (33-61%).

#### RECOMENDACIONES

1. La biopsia incisional amplia y escisional incluyendo epidermis y tejido celular subcutáneo de la lesión cutánea es el método de elección para el diagnóstico inicial de los casos con sospecha de proceso linfoproliferativo primariamente cutáneo. Las biopsias tipo "punch" no son adecuadas para el diag-

**nóstico. Grado C. Evidencia nivel IV**

2. Se deben descartar procesos reactivos que simulan linfomas; vitíligo, paniculitis lúpica, cambios secundarios a fármacos, infecciones virales, etc. Grado C. Evidencia nivel IV
3. Se recomienda estudio histopatológico convencional con H-E y un panel inmunohistoquímico básico que incluya marcadores B y T para el diagnóstico inicial. Grado C. Evidencia nivel IV
4. Panel de primera línea: CD45 (ALC), CD20, CD3, CD4, CD8, CD30, ki67. Grado C. Evidencia nivel IV
5. Panel de segunda línea: Grado C. Evidencia nivel IV
6. Línea T: CD5, CD7, TCRBF1, TCRGamma, CD56, ALK, EBV-EBER, PD1.
7. Línea B: BCL2, BCL6, CD10, KAPPA, LAMBDA, MUM1.
8. La presencia de clonalidad en el estudio molecular mediante PCR de los genes Ig y TCR es un dato a favor del diagnóstico de linfoma en un contexto clínico morfológico y fenotípico adecuado. Su ausencia no excluye el diagnóstico de proceso linfoproliferativo y su presencia aislada, en ausencia de otros datos clínicos y anatomopatológicos, no es suficiente. Grado C. Evidencia nivel IV
9. Se recomienda incluir dentro del grupo de linfomas primarios cutáneos T o B no clasificables aquellos casos que no cumplan los criterios establecidos para las diferentes entidades descritas por la WHO-EORTC. Grado C. Evidencia nivel IV
10. Es preciso tratar de establecer una buena correlación clínico patológica en cada caso para una correcta clasificación del mismo según la OMS. Grado C. Evidencia nivel IV

**REFERENCIAS**

1. Quintanilla-Martinez L, Jansen PM, Kinney MC, et al. Non-mycosis fungoides cutaneous T-cell lymphomas: report of the 2011 Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology workshop. *Am J Clin Pathol.* 2013;139:491-514.
2. Swerdlow SH, Quintanilla-Martinez L, Willemze R, et al. Cutaneous B-cell lymphoproliferative disorders: report of the 2011 Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology workshop. *Am J Clin Pathol.* 2013;139:515-535.
3. Senff NJ, Hoefnagel JJ, Jansen PM, et al. Reclassification of 300 primary cutaneous B-Cell lymphomas according to the new WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas: comparison with previous classifications and identification of prognostic markers. *J Clin Oncol.* 2007;25:1581-1587.
4. Burg G, Kempf W, Cozzio A, et al. WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: histological and molecular aspects. *Journal of cutaneous pathology.* 2005;32:647-674.
5. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood.* 2005;105:3768-3785.
6. Wilcox RA. Cutaneous B-cell lymphomas: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2013;88:73-76.

## 6. NEOPLASIAS DE CÉLULAS HISTIOCÍTICAS. NEOPLASIAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Autor para la correspondencia: Antonio Martínez ([ANTONMAR@clinic.ub.es](mailto:ANTONMAR@clinic.ub.es))

### 1. DEFINICIÓN Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD.

Las neoplasias de células dendríticas e histiocitarias son el grupo de tumores hematolinfoides menos frecuentes de todos, representando <1% de los tumores que se presentan en ganglios linfáticos y partes blandas. Dentro de este grupo se incluyen principalmente el sarcoma histiocítico, los tumores derivados de células de Langerhans, el sarcoma de células dendríticas interdigitantes y el sarcoma de células foliculares dendríticas.

Estas neoplasias pueden aparecer en cualquier edad sin embargo, son más frecuentes en la edad adulta (40-50 años). La etiología es desconocida en la mayoría de casos, con excepción de algunos casos de sarcomas de células foliculares dendríticas que se desarrollan sobre enfermedad de Castleman hialino-vascular y en las variantes tipo pseudotumor inflamatorio en que el virus de Epstein-Barr juega un papel importante, pues se ha demostrado estar en forma monoclonal en virtualmente todas las células neoplásicas.

La mayoría de estos tumores se presentan como linfadenopatía indolora aislada o bien como masa de partes blandas y tienen un pronóstico variable en función de la entidad, siendo los sarcomas de células foliculares dendríticas los de curso clínico más indolente y los sarcomas histiocíticos y los sarcomas de células de Langerhans los de peor pronóstico con una mortalidad alrededor del 50% .

### 2. TIPO DE MUESTRA

El diagnóstico de estas entidades se basa principalmente en el estudio morfológico e inmunofenotípico, siendo por tanto la **biopsia escisional** del tejido extraganglionar o del ganglio linfático afectado el procedimiento diagnóstico de elección. Sin embargo, cuando el contexto clínico del paciente no permita el estudio completo de la masa/ ganglio afecto, una **biopsia con aguja gruesa (BAG)** con material suficiente para poder realizar un estudio inmunohistoquímico amplio podría estar indicado.

Es necesaria la realización de una **biopsia medular** para el correcto estadiaje del paciente. En casos con sospecha de sarcoma histiocítico, una afectación difusa de la médula nos tendría que hacer considerar también el diagnóstico de leucemia monocítica aguda, ya que cuando estos tumores afectan la médula, normalmente es de forma parcheada.

### 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

Para el adecuado diagnóstico de las neoplasias de células histiocitarias y dendríticas, es necesario no solamente el estudio morfológico sino también un panel inmunohistoquímico amplio para descartar las principales entidades con las que hay que establecer el diagnóstico diferencial.

1. **Proliferaciones histiocitarias reactivas:** en este caso el diagnóstico es puramente morfológico. Citológicamente el sarcoma histiocítico tiene características evidentes de malignidad a diferencia de los núcleos ovales, con cromatina fina que encontramos en las proliferaciones histiocitarias reactivas.
2. **Sarcoma histiocítico:** Por definición tiene que existir:
  - a) Expresión de **uno o más** marcadores de diferenciación histiocitaria, incluyendo
    - CD163 (tinción de membrana y/o de citoplasma),
    - CD68 (clones KP1 y PGM1) (tinción granular de citoplasma y/o patrón de Golgi)
    - Lisozima (tinción granular de citoplasma y/o patrón de Golgi).
  - b) **Ausencia** de marcadores de
    - Células de Langerhans (CD1a\*, langerina)
    - Células Foliculares dendríticas (CD21, CD35, CD23)
    - Células Mieloides (CD33, CD13, Mieloperoxidasa)
    - Epiteliales (pancitoqueratinas, EMA)
    - Melanocíticos (HMB45, MelanA)

Puede existir expresión focal de CD15, S100, CD45, CD45RO, HLA-DR. CD4 es generalmente positivo.

\* Existe algún caso descrito con expresión focal y débil.

3. **Sarcoma de células foliculares dendríticas:** Para un diagnóstico de seguridad hay que demostrar positividad para uno o más marcadores de células foliculares dendríticas (CD21, CNA42, CD35 o CD23), aunque a veces la positividad es solamente focal, especialmente en las variantes más agresivas o en las pseudotumor inflamatorio-like. Otros marcadores que suelen ser positivos son CXCL13, EGFR, Vimentina y fascina. Hay que tener en cuenta que también pueden ser positivos, aunque de manera focal, CD68, EMA, S100, CD20, CD45 o queratinas.
4. **Sarcoma de células dendríticas interdigitantes:** La células expresan intensa e invariablemente S100 siendo negativas para langerina. Otros marcadores que pueden ser positivos son vimentina, HLA-DR y fascina. CD68 también puede ser positivo. Los marcadores de células foliculares dendríticas (CD21, CD35 y CD23), mieloperoxidasa y CD34 son negativos. CD1a aunque generalmente negativo, se ha reportado algún caso con positividad focal y débil.
5. **Histiocitosis de células de Langerhans y Sarcoma de células de Langerhans:** Las células de Langerhans son positivas para CD1a, proteína S100 y/o langerina aunque en casos de SCL la tinción puede ser focal o débil.  
Otros marcadores que pueden ser positivos son HLA-DR, CD68, CD45, Vimentina y Lisozima. Los marcadores de células foliculares dendríticas son negativos (CD21, CD23, CD35). Para diferenciar el SCH de la HCL es importante la morfología ya que las HCL las células de Langerhans son citológicamente "benignas" y se acompaña frecuentemente de eosinófilos. En casos de SCL el acompañamiento de eosinófilos está o bien ausente o estos son escasos. Aunque hay casos de HCL con tasas mitóticas altas, generalmente son bajas. Clínicamente puede existir superposición entre estas dos entidades ya que también existen casos de HCL con afectación multiorgánica.
6. **Leucemia monocítica:** A diferencia del SH, Generalmente tiene presentación sistémica y además expresa marcadores de diferenciación mielóide como CD33 y CD34.
7. **Otros diagnósticos** que hay que tener en cuenta ya que morfológicamente pueden remedar neoplasias histiocitarias/dendríticas son el linfoma difuso de células grandes B, los linfomas anaplásicos, el melanoma o casos de carcinomas indiferenciados. Sin embargo, el estudio inmunohistoquímico nos permitirá en cualquiera de estos casos llegar al diagnóstico definitivo.

#### 4. PANELES DE IHQ

El abordaje de las neoplasias histiocitarias/dendríticas debe incluir un panel inmunohistoquímico amplio, en primer lugar descartar neoplasias más frecuentes que morfológicamente pueden ser similares y en segundo lugar, incluir otra serie de marcadores para la mejor subclasificación de las diversas entidades.

Los marcadores de origen histiocitario/dendrítico que se recomienda utilizar en primer lugar son CD68 (clones PGM1 y/o KP1), CD1a, lisozima, S100, CD21 y CD23. De este modo podemos subclasificar alrededor del 90% de los casos.

Otros marcadores que serían de utilidad para el 10% restante serían CD163, langerina, CD35.

#### 5. CITOGENÉTICA/MOLECULAR

Aunque todavía no existe ninguna alteración molecular recurrente reconocida en la última clasificación de la OMS (2008) para este tipo de neoplasias, estudios recientes sugieren implicaciones importantes de la vía de BRAF en la patogénesis o en la transformación de las neoplasias de células histiocitarias y dendríticas. Así se ha encontrado la mutación BRAFV600E en histiocitosis de células de Langerhans (~60%), sarcoma histiocítico (~60%) y en la enfermedad de Erdheim-Chester (~60%) (véase capítulo de molecular).

Además, estudios recientes, sugieren que los pacientes con mutaciones de BRAF podrían beneficiarse de tratamientos con inhibidores del mismo.



## RECOMENDACIONES.

1. Se trata de entidades muy poco frecuentes y cuyo diagnóstico es de exclusión en la mayoría de los casos, de modo que para el adecuado diagnóstico es necesario un conocimiento del estado clínico y analítico del paciente, así como un extenso estudio morfológico e inmunohistoquímico para descartar otras entidades. Grado C. Evidencia nivel IV
2. Panel de IHQ: CD68 (clones PGM1 y/o KP1), CD1a, lisozima, S100, CD21, CD23, CD163, langerina, CD35. El uso del panel de inmunohistoquímica propuesto, permitiría virtualmente la subclasificación de la gran mayoría de estas neoplasias. Sin embargo, se dispone también de otras técnicas como la microscopía electrónica que pueden ser de utilidad en determinados casos. Grado C. Evidencia nivel IV
3. Al tratarse de tumores de difícil abordaje diagnóstico, se recomienda la derivación del caso a hospitales con larga trayectoria y experiencia en el diagnóstico de neoplasias hematolinfoides. Grado C. Evidencia nivel IV

\*Los autores desean agradecer a la Dra Blanca González su colaboración en la redacción de este capítulo.

## REFERENCIAS

1. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
2. Pileri et al. *Histopathology* 41, 1–29 (2002). Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases.
3. Kairouz et al. *Am J Hematol.* 2007 Oct;82(10):924-8. Dendritic cell neoplasms: an overview.
4. Hornick JL et al. *Am J Surg Pathol.* 2004 Sep;28(9):1133-44. Extranodal histiocytic sarcoma: clinicopathologic analysis of 14 cases of a rare epithelioid malignancy.
5. Go H et al. *Histopathology.* 2014 Aug;65(2):261-72. Frequent detection of BRAF(V600E) mutations in histiocytic and dendritic cell neoplasms.
6. Bubolz AM et al. *Oncotarget.* 2014 Jun 30;5(12):4060-70. Potential clinical implications of BRAF mutations in histiocytic proliferations.
7. Haroche J, Charlotte F, Arnaud L, von Deimling A, Helias-Rodzewicz Z, Hervier B, et al. High prevalence of BRAF V600E mutations in Erdheim-Chester disease but not in other non-Langerhans cell histiocytoses. *Blood.* 2012 Sep 27;120(13):2700-3.
8. Mehes G, Irsai G, Bedekovics J, Beke L, Fazakas F, Rozsa T, et al. Activating BRAF V600E Mutation in Aggressive Pediatric Langerhans Cell Histiocytosis: Demonstration by Allele-specific PCR/ Direct Sequencing and Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 2014 Aug 12.
9. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, MacConaill LE, Brandner B, Calicchio ML, et al. Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2010 Sep 16;116(11):1919-23.