

MARCADORES INMUNOLOGICOS EN LOS LINFOMAS

C. F. GARCIA

Los estudios inmunológicos en los linfomas se empezaron a realizar hace poco tiempo. Al principio las técnicas eran rudimentarias y los reactivos limitados. El refinamiento actual de las técnicas de inmunohistoquímica junto con la virtual explosión en el número de anticuerpos monoclonales disponibles permite una disección muy completa de los infiltrados linfoides.

Mediante estos estudios se ha demostrado que la inmensa mayoría de los linfomas se originan en linfocitos y no en histiocitos como inicialmente sugiriera Rapaport y que los linfomas no Hodgkin son proliferación maligna de una clona de linfocitos. Estos estudios también han contribuido notablemente a entender los estados de diferenciación linfoide ya que se ha observado correspondencia entre los distintos tipos de linfoma y algún paso en la maduración de los linfocitos. Los marcadores inmunológicos ofrecen también muchas ventajas desde el punto de vista diagnóstico: permiten diferenciar los infiltrados linfoides malignos de los benignos aún estando éstos en muy escasa cantidad. En la evaluación de ciertas lesiones foliculares ganglionares este recurso presta una ayuda invaluable al diferenciar hiperplasias reactivas, de linfomas nodulares. En el eterno dilema diagnóstico de los tumores indiferenciados, estos estudios permiten diferenciar entre linfomas, carcinomas, melanomas y sarcomas. Gracias a marcadores casi específicos para células de Reed Sternberg se pueden hoy en día diagnosticar casos difíciles de enfermedad de Hódgkin y diferenciarlos de linfomas no Hodgkin y de hiperplasias. Con el tiempo se irán encontrando correlaciones con repercusión pronóstica y terapéutica entre el fenotipo inmunológico y el morfológico de las enfermedades linfoproliferativas. Este hecho

ya se ve representado en el caso de las leucemias linfoblásticas, de las cuales las de fenotipo inmaduro son de relativo buen pronóstico mientras que las de fenotipo B maduro son de pronóstico muy malo y requieren terapia más agresiva.

El propósito de esta publicación es el de revisar brevemente el estado actual de los marcadores inmunológicos en el estudio de los linfomas. Se hará mención de la clasificación internacional de trabajo de los linfomas, de los estados de diferenciación de las células T y B y de aspectos metodológicos. Se dedicará una sección a los inmunofenotipos observados en los distintos linfomas haciendo énfasis en ciertas situaciones de utilidad clínica práctica.

Clasificación internacional de trabajo de los linfomas no Hodgkin

En un intento por resolver la controversia y confusión resultante de los innumerables esquemas de clasificación de los linfomas no Hodgkin, el Instituto Nacional de Cáncer de los EE.UU. promovió un estudio multi-institucional internacional, examinando cada una de las seis clasificaciones más usadas de linfomas en 1.175 casos. El estudio concluyó que cada uno de esos sistemas era útil para separar los pacientes en distintos subgrupos de acuerdo a las características y a los índices de supervivencia. Los investigadores involucrados en este proyecto desarrollaron una formulación de trabajo de los linfomas no Hodgkin para uso clínico, sugiriendo que fuera empleada no como una nueva clasificación sino como un lenguaje común para traducir de un esquema a otro. En vista de que esta formulación de trabajo incluye tres grados de severidad clínica y de que usa terminología simple tomada de las otras clasificaciones, muy rápidamente se ha popularizado. Hoy en día se usa como la clasificación oficial en muchas instituciones. De aquí en adelante nos referiremos únicamente a esta clasificación, la cual se presenta en la Tabla 1.

Dr. Carlos Fernando García, Departamento de Patología y Laboratorios Centro Médico de los Andes, Fundación Santa Fe de Bogotá.

Solicitud de separatas al Dr. García.

Tabla 1. *Clasificación internacional de trabajo.*

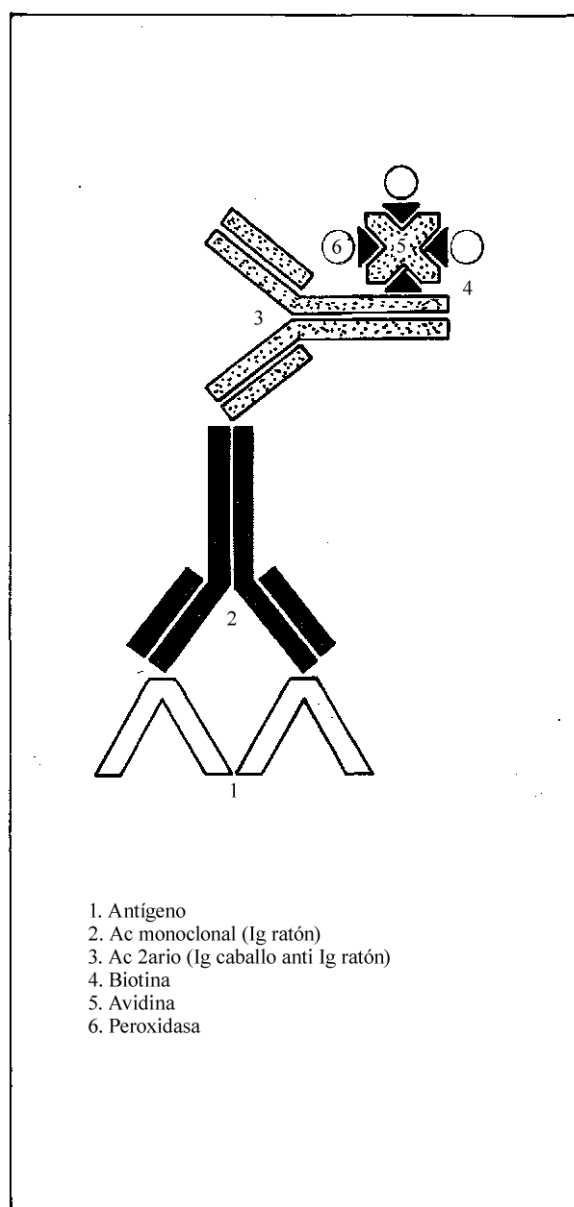
| | |
|------------------|---|
| Bajo grado | |
| A. | Linfoma linfocítico de célula pequeña. |
| B. | Linfoma folicular de célula pequeña hendida. |
| C. | Linfoma folicular mixto de célula pequeña hendida y de células grandes. |
| Grado intermedio | |
| D. | Linfoma folicular de célula grande. |
| E. | Linfoma difuso de célula pequeña hendida. |
| F. | Linfoma difuso mixto de células pequeñas y de células grandes. |
| G. | Linfoma difuso de células grandes. |
| Alto grado | |
| H. | Linfoma de célula grande inmunoblástico. |
| | plasmocitoide de células claras pleomorfo con componente epiteliode |
| I. | Linfoma linfoblástico. |
| J. | Linfoma de célula pequeña no hendida. |

Métodos inmunohistológicos

Los estudios inmunológicos en los linfomas se pueden hacer en suspensión de células preparada a partir de la masa tumoral como se hicieron inicialmente mediante técnicas de fluorescencia o en cortes congelados de la misma. Esta última ofrece tantas ventajas sobre los estudios en suspensión que se ha popularizado e incluso se ha impuesto como recurso necesario en ciertos centros de estudio y tratamiento de enfermedades linfoproliferativas. Los cortes del tejido tumoral permiten visualizar en su sitio los diferentes antígenos y las células productoras de inmunoglobulina. La arquitectura del ganglio se puede evaluar identificándose los diferentes compartimientos y el compromiso tumoral de los mismos. También se pueden observar interacciones celulares e identificar poblaciones de hasta 0.5% del infiltrado. En ciertos casos las relaciones numéricas de las distintas poblaciones celulares se alteran durante la preparación de las suspensiones, lo que no ocurre con los cortes del tejido. Estos cortes se pueden guardar indefinidamente y examinar cada vez que sea necesario mientras que los estudios por fluorescencia tienen que leerse e interpretarse casi de inmediato.

La mayoría de los anticuerpos monoclonales de los que se dispone requieren de cortes

de tejido congelado, puesto que en las preparaciones de parafina no se preserva la mayoría de los antígenos reconocidos por estos anticuerpos. Hay diversos métodos de inmunohistoquímica para el estudio de las enfermedades linfoproliferativas. Nosotros preferimos el método de avidina biotina el cual se ilustra en la Figura 1. Consiste en la aplicación, sobre el tejido, de un anticuerpo monoclonal producido en ratón y dirigido contra una

Figura 1. *Método de avidina biotina*

especificidad dada. Luego se usa un anticuerpo dirigido contra inmunoglobulina de ratón el cual tiene incorporadas moléculas de biotina. En el tercer paso se aplica un compuesto de avidina con la enzima peroxidasa incorporada; éste reacciona con la biotina formando un complejo muy estable. Finalmente se aplican diaminobenzidina y H₂O₂. las cuales reaccionan con la peroxidasa dando un color pardo, indicativo de positividad o de presencia del antígeno en cuestión.

Inmunofenotipos en las enfermedades linfoproliferativas

La tipificación inmunológica de las enfermedades linfoproliferativas está basada en conceptos actuales de la ontogenia y desarrollo de los linfocitos. Se han identificado estados concretos de maduración de los linfocitos T y B los cuales se reconocen por la aparición de antígenos de superficie y del citoplasma. Algunos anticuerpos monoclonales utilizados en la caracterización de las células linfoides se describen en la Tabla. 2

Los estados de diferenciación de las células T y B se encuentran resumidos en las Tablas 3 y 4 respectivamente. Como se observa en estas tablas, algunos consideran los linfomas como neoplasias del sistema inmune en las que prolifera una clona de linfocitos deteni-

Tabla 2 Anticuerpos monoclonales en linfomas.

| | |
|---|---|
| Cadenas pesadas de inmunoglobulinas M, D, G, A, | Células B |
| Cadenas livianas Kappa y Lambda | Células B |
| B1 | Pan B |
| B2 (receptor C3d) | Células dendríticas algún as células B |
| LEU 12 | PAN B |
| LEU 14 | PAN B |
| Calla | Células B |
| LEU 1, LEU 4, LEU 8, LEU 9 | PAN T |
| LEU 2 | Citotóxicos/sup resores |
| LEU 3 | Ayudadores/inductores |
| LEU 6 | Timocitos-células de langerhans |
| LEU M3 | Histiocitos |
| LEU M1 | Granulocitos-células de Reed-Sternberg |
| Antileucocito (PD7/2 B11) TAC | Células hematolinfoides Receptor de interleukina, células T activadas; algunas células B |
| OKT 10 | Células inmaduras; plasmocitos |
| LEU 8 | Células T: algunas células B. |

dos en un estado del esquema de diferenciación. Hay que anotar que en el desarrollo y formulación de la clasificación internacional, deliberadamente los inmunofenotipos de los linfomas no se tuvieron en cuenta. Sin embargo, como veremos, la información inmunoló-

Tabla 3. Estados de diferenciación de células T,

| | Protimocito | Corteza | Timo | Médula | Sangre Periférica | Ganglio Linfático |
|--------------|-------------|---------|------|--------|-------------------|-------------------|
| OKT 10 | + | + | | + | | |
| OKT 9 | | + | | | | |
| LEU 2, 3 | | + | | + | | |
| LEU 2/OKT8 | | | | + | + | + |
| LEU 3/OKT 4 | | | | + | + | + |
| LEU 6/OKT 6 | | + | | | | |
| LEU 1/OKT 1 | | + | | + | + | + |
| LEU 4/OKT 3 | | | | + | + | + |
| LEU 5/OKT 11 | | + | | + | + | + |
| TDT | + | + | | + | | |

1

2

3 - 8

1. Leucemia Linfoblástica T
2. Linfoma Linfoblástico T
3. Leucemia Linfoide Crónica T
4. Linfoma Inmunoblástico T

5. Micosis Fungoides
6. Linfoma Difuso de Célula Pequeña Hendida
7. Linfoma Difuso Mixto
8. Linfoma Difuso de Célula Grande

Tabla 4. Estados de diferenciación de células B.

| B1, LEU 12, | Célula madre | Pre-Preb | Preb | B inmaduras | B virgen | B inmunoblasto-plasmocito plasmoblasto |
|-------------|--------------|----------|------|-------------|----------|--|
| Ia | + | + | + | | + | + |
| Calla | + | + | + | | + | |
| C-M | | | + | | | |
| B1, LEU 12, | | | | | | |
| LEU 14 | | + | + | + | + | + |
| B2 | | | + | + | + | |
| IgS | | | + | + | + | + |
| IgC | | | | | | + |
| OKT 10 | | | | | | + |

1 2 3

4,5

6, 7, 8, 9, 10

1. Leucemia Linfoblástica pre-preB
2. Leucemia Linfoblástica "común"
3. Leucemia Linfoblástica preB
4. Leucemia Linfoide Crónica
5. Linfoma Folicular de Célula Pequeña Hendida

6. Linfoma Difuso de Célula Grande
7. Linfoma de Burkitt
8. Tricoleucemia
9. Linfoma Inmunoblástico B
10. Plasmocitoma

gica que se obtiene de los linfomas no es incompatible con esta clasificación y con el tiempo serán complementarias. Además se va a obtener información valiosa sobre correlaciones entre aspectos clínicos y los inmunofenotipos. En la Tabla 5 se presenta un resumen de los fenotipos inmunológicos de los linfomas de acuerdo con la clasificación internacional.

Todos los linfomas foliculares se originan en linfocitos B, Los folículos tumorales de-

Tabla 5. Inmunofenotipos de los linfomas no Hodgkin.

| | | |
|---|-------------|-----|
| Linfocito de célula pequeña | 99% B, | 1%T |
| Foliculares | 100% B. | |
| Difuso de célula pequeña hendida | B. | |
| Difuso mixto células pequeñas y grandes | B y T | |
| Difuso células grandes | { B, 60 | 70% |
| | { T, | 25% |
| Célula grande inmunoblástico | { T, | 75% |
| | { B, | 25% |
| Linfoblástico | { T y preT | 80% |
| | { preB | 10% |
| | { pre, preB | 10% |
| Pequeña no hendida | B | |
| Micosis fungoides | T | |

muestran reactividad monoclonal para cadenas livianas de las inmunoglobulinas, es decir solamente puede haber expresión de una sola de las cadenas *Kappa* o *Lambda*, según el caso. Este fenómeno ocurre en la mayoría de los linfomas B puesto que muchos de ellos expresan inmunoglobulinas. El tejido entre los nódulos tumorales contiene abundantes células T benignas. Los linfomas B no productores de inmunoglobulina expresan todos o algunos de muchos otros marcadores B como B1, B2, IA, Leu 12 y Leu 14. Las hiperplasias reactivas demuestran un inmunofenotipo que corresponde al de un ganglio linfático con expansión de sus compartimientos antómicos; hay inmunoglobulinas policlonales en los folículos primarios y secundarios. La zona paracortical corresponde al territorio de los linfocitos T con predominio de los linfocitos T ayudadores (leu 3/OKT 4) sobre los citotóxicos/supresores (Leu 2/OKT 8). En muchos casos de linfoma folicular, especialmente los de composición mixta, el diagnóstico por morfología se dificulta ya que las hiperplasias reactivas en ocasiones son muy similares. Los estudios inmunológicos resuelven este dilema por lo que son de gran utilidad en estas situaciones.

El otro linfoma de bajo grado, o linfoma linfocítico de célula pequeña redonda, que corresponde a la leucemia linfoide crónica.

también expresa marcadores B incluyendo una inmunoglobulina monoclonal, generalmente IgM de baja densidad pero también por razones no esclarecidas aún, expresa el marcador Pan T, Leu 1. Este fenómeno puede ser de utilidad cuando se plantea el diagnóstico diferencial entre linfoma linfocítico y enfermedad de Hodgkin de predominio linfocítico.

Los linfomas de grado intermedio son más heterogéneos en cuanto al fenotipo. Los foliculares son todos de origen B como ya se mencionó. La mayoría de los linfomas difusos de célula pequeña hendida se originan en linfocitos B. Los linfomas difusos mixtos se originan tanto en linfocitos B como en células T. Los linfomas difusos de célula grande son en su mayoría linfomas B pero hay una proporción importante de linfomas T dentro de este grupo.

Dentro de los linfomas de alto grado, la mayoría de los linfoblásticos y de los inmunoblásticos se originan en linfocitos T. En cambio el linfoma de Burkkit o linfoma de célula pequeña no hendida se origina en células B.

En la actualidad no existe un marcador de monoclonalidad para los linfocitos T, como sí lo es la restricción a una sola cadena liviana en los linfocitos B. En la Tabla 6 se observa la distribución de los linfomas T en distintas categorías de la clasificación internacional. Se observa también que en más del 80% de los casos los linfomas T tienen expresión anómala de marcadores como es la expresión conjunta o ausencia de los marcadores Leu 2 y Leu 3 o pérdida de algún marcador Pan T, Este fenómeno es de gran utilidad ya que permite hacer el diagnóstico de linfoma ante la ausencia de un marcador de clonalidad. En la Tabla 6 también se ve que la mayoría de las leucemias linfoblásticas tienen fenotipo PreB, Pre-preB ó B maduro y que una minoría son de fenotipo T. Precisamente es en este grupo en el que ya se ha establecido un pronóstico muy malo en las de fenotipo B maduro, que amerita una terapia más agresiva. El caso de los linfomas linfoblásticos es el opuesto ya que la gran mayoría son de origen en linfocitos T.

Los linfomas histiocíticos puros o histiocitosis maligna son una verdadera minoría y expresan marcadores de histiocitos como Leu

Tabla 6.

| Leucemia linfoblástica aguda | % |
|---|----|
| Pre-PreB (Calla) | 50 |
| Pre B (cM) | 20 |
| B (slgM) | 5 |
| Pre T y T | 20 |
| Inclasificable | 5 |
| Linfoma linfoblástico | |
| T (Timocito inmaduro) | 80 |
| Pre-Pre B, Pre B | 20 |
| Linfoma T Periférico | |
| Célula grande inmunoblástico | 36 |
| Difuso de célula grande | 26 |
| Difuso mixto, células pequeñas y grandes | 22 |
| Ayudadores (LEU 3) | |
| Citotóxicos/Supresores (LEU 2 | 64 |
| Expresión simultánea (LEU 3/LEU 2) | 12 |
| Ausencia de LEU 2 ó LEU 3 | 8 |
| Ausencia de algún marcador Pan T (LEU 1, 4, 5 ó 9). | 16 |
| | 64 |

M3 y ciertas enzimas como Alfa-I-antitripsina, Alfa-I-antiquimotripsina y lisozima. Algunos informes sugieren que estas lesiones son muy agresivas y que justifican un tratamiento más intensivo.

En linfomas de Hodgkin la aplicación de marcadores inmunológicos es de gran utilidad en casos de diagnóstico difícil. Existen hoy en día marcadores como el Leu MI y Ki-1 que además de identificar granulocitos también reaccionan con células de Reed Sternberg. Tienen la gran ventaja de poder aplicarse a las secciones de parafina de uso rutinario en patología.

Ya contamos hoy en día con anticuerpos monoclonales que también se pueden usar en cortes de parafina y que reconocen todo tipo de células hematopoyéticas. De esta manera son de extrema utilidad en demostrar la presencia de linfomas en alrededor del 70% de

los "tumores indiferenciados". Estos son los anticuerpos antileucocito que se pueden obtener comercialmente como el PD7-2B 11. Es muy probable que en el futuro contemos con anticuerpos similares a éste y al Leu MI que pueden usarse en tejidos fijados en formol y procesados en parafina y que sean útiles en la tipificación de los linfomas. Gracias a estos marcadores se pueden diagnosticar linfomas en infiltrados linfoides extranodales en sitios tales como órbita, pulmón, piel y aparato gastrointestinal en estados tempranos, cuando los solos hallazgos morfológicos no lo permiten; estos casos usualmente corresponden a linfomas de bajo grado, muchos de los cuales han sido considerados tradicionalmente como pseudolinfomas.

A medida que se acumule información, se encontrarán correlaciones de gran trascendencia entre los fenotipos inmunológicos, los hallazgos morfológicos y el comportamiento clínico. Mientras tanto, las ventajas que ofrece la inmunopatología de los linfomas, desde el punto de vista diagnóstico, no solamente justifican plenamente estos recursos sino que en ocasiones los vuelven una exigencia.

ABSTRACT

The application of immunological markers in lymphomas, their biological importance and their diagnostic use are described.

The advantages of performing these techniques in tissue are emphasized; they make immunopathology a very practical and accessible tool for the study of lymphoproliferative disorders.

As more information is acquired, important correlations among the different immunological phenotypes, the morphological findings and the clinical behavior will be uncovered. In the mean time the diagnostic advantages of performing immunopathological studies in lymphomas not only justify this resource but occasionally make it mandatory.

REFERENCIAS

- 1.- LUKES RJ, COLLINS RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 1974; 34: 1488-1503.
- 2.- The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classifica-

- tion Project. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas. Summary and description of a work formulation for clinical usage. *Cancer* 1982; 49: 2112-2135.
- 3.- STEIN H, GERDES J, MASON DY. The normal and malignant germinal centre. *Clin Haematol* 1982; 11: 531-559.
 - 4.- AISENBERG AC. Cell surface markers in lymphoproliferative disease. *N Engl J Med* 1981; 304: 331-335.
 - 5.- BLOOMFIELD CD, GAJL-PECZ ALSKA KJ, FRIZZERA G, KERSEY JH, GOLDMAN AI. Clinical utility of lymphocyte surface markers combined with the Lukes-Collins histologic classification in adult lymphoma. *N Engl J Med* 1979; 301: 512-518.
 - 6.- HSU SM, JAFFE ES. Leu MI and peanut agglutinin stain the neoplastic cells of Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol* 1984; 82: 29.
 - 7.- LEVY R, WARNKE R, DORFMAN RF, HAIMOVICH J. The monoclonality of human B-cell lymphomas. *J Exp Med* 1977; 145: 1014.
 - 8.- EVANS HL. Extranodal small lymphocytic proliferation: A clinicopathologic and immunocytochemical study. *Cancer* 1982; 49: 84.
 - 9.- ISAACSON P, WRIGHT DH, JUDD MA, MEFHAM BL. Primary gastrointestinal lymphomas: A classification of 66 cases. *Cancer* 1979; 43: 1805.
 - 10.- COLBY TV, CARRINGTON CB. Current concepts: Pulmonary lymphomas. *Hum Pathol* 1983; 14: 884-887.
 - 11.- HARRIS NL, PILCH BZ, BHAN AK, HARMON DC, GOODMAN ML. Immunohistologic diagnosis of orbital lymphoid infiltrates. *Am J Surg Pathol* 1984; 8: 83-91.
 - 12.- WARNKE RA. Diagnosis of human lymphoma with monoclonal antileukocyte antibodies. *N Engl J Med* 1983; 309: 1275-1281.
 - 13.- PINKUS GS, SAID JW. Leu MI Immunoreactivity in Nonhematopoietic Neoplasms and Myeloproliferative Disorders. *Am J Clin Path* 1985; 85: 278-288.
 - 14.- GARCIA CF, WEISS LM, WARNKE R, WOOD G. Cutaneous Follicular Lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 454-463.
 - 15.- WARNKE RA, KINK MP. Identification and significance of cell markers in leukemia and lymphoma. *Ann Rev Med* 1983; 34: 117-131.
 - 16.- WARNKE R, LEVY R. Tissue section immunologic methods in lymphomas. *Diagnostic immunohistochemistry*. RA De Lellis- Masson PC, 1981.
 - 17.- TUBBS RR, SHEIBANI K. Immunohistology lymphoproliferative disorders. *Seminars in diagnostic pathology*. 1984; 1.
 - 18.- TUBBS R, FISCHLEDER A, WEISS R, SAVAGE R, SEBEK B, WEICK J. Immunohistologic cellular phenotypes of lymphoproliferative disorders. Comprehensive evaluation of 564 cases including 257 non-Hodgkin's lymphomas classified by the International Working Formulation *Am J Pathol* 1983; 113: 207-221.
 - 19.- LUKES RJ, PARKER JW, TAYLOR CR, TINDLE BH, CRAMER AD, LINCOLN TL, PATTENGAL PK, TINDLE MD. Immunologic approach to non-Hodgkin's lymphomas and related leukemias. Analysis of the result of multiparameter studies of 425 cases. *Seminars in hematology*. 1978; 15.
 - 20.- HSU SM, JAFFE E. Phenotypic expression of B-lymphocytes identification with monoclonal antibodies in normal lymphoid tissues. *Am J Pathol* 1984; 114: 387-395.
 - 21.- HSU SM, JAFFE ES. Phenotypic expression of B-lymphocytes Immunoglobulin expression of germinal center cells. *Am J Pathol* 1984; 114: 396-402.
 - 22.- WEISS LM, CRABTREE GS, ROUSE R, WARNKE RA. Morphologic and immunologic characterization of 50 peripheral T-cell lymphomas. *Am J Pathol* 1985; 118: 316-324.
 - 23.- CRIST WM, GROSSI CE, PYLLEN J, COOPER MD.

- immunologic markers in child hood acute lymphocytic leukemia. *Seminars in Oncology* 1985; 12: 105-121.
- 24.- TURNER R, WOOD G, BECKSTEAD J, COLBY J, HORNING S, WARNKE RA. Histiocytic malignancies. Morphologic, immunologic and enzyme heterogeneity. *Am J Pathol* 1984; 8: 485-500.
- 25.- BATTIFORA H, TROWBRIDGE IS. A monoclonal antibody useful for the differential diagnosis is between malignant lymphoma and non-hematopoietic neoplasms. *Cancer* 1983; 51: 816-821.