

Estudio del contenido en ADN y cinética celular de síndromes linfoproliferativos. Estudio por citometría de flujo e inmunohistoquímica

Xavier Gómez i Arbonés

I S B N: 84-89727-64-3
Depósito Legal: S. 54-98

Servei de Publicacions
Universitat de Lleida

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS

I.- INTRODUCCIÓN

A.- Los linfomas no hodgkinianos

1.- Definición

2.- Descripción histórica de la enfermedad; identificación histológica y celular

3.- Epidemiología

4.- Etiología

4.1.- Virus

4.2.- Factores inmunológicos

4.3.- Alteraciones cromosómicas

4.4.- Otros factores

5.- Clasificación

5.1.- Bases citomorfológicas

5.2.- Clasificación histopatológica de los linfomas

6.- Manifestaciones clínicas

7.- Pruebas de laboratorio

8.- Clasificación por estadios y diagnóstico de extensión

8.1.- Estudio de la extensión del linfoma

9.- Características de los principales tipos de linfoma

9.1.- Linfomas de bajo grado

9.2.- Linfomas de grado intermedio

9.3.- Linfomas de alto grado

10.- Caracterización biológica de los linfomas

10.1.- Estudio con anticuerpos monoclonales

10.2.- Aplicación de la citogenética a los linfomas

10.3.- Biología molecular

10.4.- Citometría de flujo

11.- Tratamiento de los linfomas

11.1.- Enfermedad localizada

11.2.- Enfermedad diseminada

11.3.- Tratamiento en niños

11.4.- Tratamientos en los pacientes con edad avanzada

11.5.- Tratamiento en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana

11.6.- Tratamiento de la enfermedad recurrente

12.- Factores pronósticos en linfoma

B.- Citometría de flujo

1.- Introducción

2.- Historia de la citometría de flujo

3.- Características generales de los citómetros de flujo

3.1.- El sistema óptico

3.2.- Sistema hidráulico y electrónico

3.3.- Componente electrónico

3.4.- Prestaciones de los citómetros de flujo

4.- Separación por citometría de flujo de partículas biológicas

4.1. Prestaciones de los sorters

5.- Procesamiento de las muestras

5.1.- Preparación de suspensiones celulares/nucleares para citometría de flujo

5.2.- Disgregación de material fresco (células)

5.3.- Disgregación de muestras y tumores frescos para obtener núcleos para la cuantificación de ADN

5.4.- Disgregación de material parafinado

6.- Fluorocromos para citometría de flujo

6.1.- Técnicas inmunofluorescentes: marcadores fluorescentes de unión covalente

6.2.- Fluorocromos que se unen no covalentemente a estructuras celulares

6.3.- Marcadores fluorescentes que son sensibles al microambiente que les rodea

7.- Reproducibilidad y comparación de resultados: standards y controles

7.1.- Standards o patrones de normalidad

7.2.- Controles

8.- El procesamiento de los datos

9.- Aplicación de la citometría de flujo para la identificación de antígenos celulares, técnicas inmunofluorescentes e inmunofenotipaje

10.- Estudio del contenido en ADN y fases del ciclo celular por citometría de flujo

10.1.- Grupos generales de fluorocromos

10.2.- Estudio de la aneuploidía y del ciclo celular

C.- Técnicas inmunológicas, inmunocitoquímicas y citomorfológicas para la identificación de antígenos celulares y estudio de la proliferación celular

1.- Técnicas inmunológicas

1.1.- Introducción

1.2.- Los anticuerpos

1.3.- Métodos de marcaje de anticuerpos

2.- Estudio de antígenos celulares

2.1.- Introducción

2.2.- Marcadores de diferenciación linfocitoide T

2.3.- Marcadores de diferenciación linfocitoide B

2.4.- Marcadores de diferenciación de células mielomonocíticas, eritroides y megacariocíticas

3.- Estudio de la proliferación celular

3.1.- Introducción

3.2.- Contaje de figuras de mitosis

3.3.- Marcaje con timina tritiada

3.4.- Bromodeoxiuridina

3.5.- Ki-67

3.6.- Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

3.7.- Alfa ADN polimerasa

3.8.- p(105)

3.9.- Ag-NOR

D.- Estudio del contenido en ADN y de la proliferación celular en linfoma

1.- Perspectiva histórica

2.- Introducción

3.- Contenido de ADN y proliferación celular en linfomas

II.- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A.- Justificación del trabajo

B.- Hipótesis del estudio

1.- Hipótesis primera

2.- Hipótesis segunda

3.- Hipótesis tercera

4.- Hipótesis cuarta

C.- Objetivos del estudio

1.- Objetivo general

2.- Objetivos específicos

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

A.- Material y métodos

1.- Planteamiento metodológico

2.- Muestra del estudio

2.1.- Criterios de inclusión

2.2.- Criterios de exclusión

3.- Procedimientos, técnicas e instrumentos utilizados

3.1.- Recogida de los datos

3.2.- Corte de los bloques histológicos para procesamiento por citometría de flujo e inmunohistoquímica

3.3.- Análisis del contenido en ADN y fases del ciclo celular, por citometría de flujo, de núcleos obtenidos a partir de muestras parafinadas

3.4.- Estudio del inmunofenotipo y de la proliferación celular por técnicas inmunohistoquímicas

3.5.- Interpretación de los resultados de la lectura por citometría de flujo

3.6.- Interpretación de los resultados de las técnicas inmunohistoquímicas para el estudio del inmunofenotipo y la actividad proliferativa

4.- Variables del estudio

4.1.- Identificación de los casos

4.2.- Variables demográficas

4.3.- Datos clínicos del diagnóstico y seguimiento

4.4.- Variables del estudio por citometría de flujo

4.5.- Estudio histológico e inmunohistoquímico

5.- Base de datos, tratamiento de la base de datos

6.- Estudio estadístico de los resultados

6.1.- Comparación de variables cualitativas

6.2.- Comparación de variables cualitativas y cuantitativas

6.3.- Comparación de variables cuantitativas

6.4.- Estudio de series temporales

7.- Estudio del contenido en ADN y fases del ciclo celular de tejido linfóide no neoplásico

IV RESULTADOS

A.- Resultados y Estadística descriptiva univariante

1.- Edad y sexo

1.1.- Edad

1.2.- Sexo

2.- Clínica

2.1.- Estadio clínico

2.2.- Presencia de síntomas B

2.3.- Carga tumoral

2.4.- Localización del linfoma

2.5.- Respuesta al tratamiento

2.6.- Tiempo libre de enfermedad

2.7.- Mortalidad

2.8.- Tiempo de supervivencia

3.- Anatomía patológica

- 3.1.- Diagnóstico histológico del linfoma según la *Working Formulation*
- 3.2.- Grado histológico de malignidad del linfoma según la *Working Formulation*
- 3.3.- Grado histológico de malignidad del linfoma según la clasificación de Kiel
- 3.4.- Tipo celular predominante
- 3.5.- Patrón histológico

4.- Citometría de flujo

- 4.1.- Dispersión lateral de luz
- 4.2.- Dispersión frontal de luz
- 4.3.- Análisis del ADN: fase G0G1 del ciclo celular
- 4.4.- Análisis del ADN: fase G2M del ciclo celular
- 4.5.- Análisis del ADN: fase S del ciclo celular
- 4.6.- Índice de proliferación
- 4.7.- Aneuploidía; índice de ADN

5.- Inmunohistoquímica

- 5.1.- Inmunofenotipo
- 5.2.- Índice de marcaje con PCNA

6.- Citometría de flujo de la serie normal

B.- Resultados II: Estudio estadístico

1.- Comparación de las variables demográficas con el resto de variables

- 1.1.- Edad
- 1.2.- Sexo

2.- Comparación entre las variables clínicas y el resto de variables

- 2.1.- Comparación de las variables clínicas entre si
- 2.2.- Comparación de las variables clínicas con las variables histológicas
- 2.3.- Comparación entre las variables clínicas y los resultados de la citometría de flujo
- 2.4.- Comparación de las variables clínicas con el resultado de la inmunohistoquímica

3.- Comparación de las variables histopatológicas y el resto de las variables

- 3.1.- Comparación de la histología con el análisis por citometría de flujo
- 3.2.- Comparación entre la histología y la inmunohisto-química

4.- Comparación del resultado del análisis por citometría de flujo con el resto de las variables

- 4.1.- Comparación del resultado de la citometría de flujo y el índice de marcaje con PCNA

5.- Comparación de la inmunohistoquímica con el resto de variables del estudio

C.- Resultados III: Estudio de supervivencia

D.- Resultados IV: Contenido en ADN y proliferación celular

1.- Estudio del contenido de ADN

- 1.1.- Contenido de ADN y *Working Formulation*
- 1.2.- Contenido de ADN y clasificación de Kiel

2.- Estudio de la proliferación celular

- 2.1.- Proliferación celular y clasificación histopatológica

V.- DISCUSIÓN

A.- Discusión

1.- Introducción, aspectos metodológicos

2.- Composición y características de la muestra

3.- Dispersión de luz y linfoma

4.- Valor del estudio del contenido en ADN de los linfomas no hodgkinianos

5.- Valor del estudio de la proliferación celular por citometría de flujo

6.- Valor del índice de marcaje con PCNA para el estudio inmunohistoquímico de la proliferación celular en linfomas

7.- Valor del índice de marcaje con PCNA en los linfomas no hodgkinianos

VI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

A.- Resumen

1.- Introducción y objetivos

2.- Material y métodos

3.- Resultados

4.- Discusión

B.- Conclusiones

VII.- ANEXO I

A.- Anexo I Variables y casos del estudio

1.- Lista de variables del estudio

2.- Lista de los casos del estudio

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

A.- Bibliografía

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de un buen número de personas, a las cuales deseo expresar mi agradecimiento, en especial:

Al Dr. Josep Macià i Virgili, Jefe de Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Arnau de Vilanova y profesor de Patología Médica II (Hematología) de la *Facultat de Medicina* de la Universitat de Lleida. Por su interés, sus desvelos, su constante estímulo y apoyo, sin los cuales no se hubiera podido realizar este trabajo.

Al Dr. Miguel Angel Gallart i Blanco, del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Arnau de Vilanova. El fue quien me introdujo en el apasionante mundo del inmunofenotipaje de las neoplasias hematológicas y en de la citometría de flujo aplicada a la oncohematología.

Al Dr. Julio Ramos Ñañez y a la Dra. María José Panadés i Siurana, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Arnau de Vilanova, por su dedicación en la revisión histopatológica de las muestras y permitir la utilización de los medios materiales de su laboratorio. También al Dr. Ramón Egido García, del mismo Servicio, que gentilmente nos ha facilitado el anticuerpo monoclonal PC10 contra el antígeno nuclear de proliferación celular.

Al todo el personal del laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Arnau de Vilanova, especialmente a María Antonia Taboada y a Antonieta Sallas, por su inestimable ayuda en la búsqueda de las muestras parafinadas y la preparación de los cortes histológicos.

Al Dr. Rafeal Parra López, del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Arnau de Vilanova por sus acertados comentarios y sugerencias.

A todo el personal del Servicio de Hamatología y Hemoterapia del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida, especialmente al de la Sección de Citología, por su contribución desinteresada.

Al *Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques* de la *Facultat de Medicina* de la *Universitat de Lleida*, por facilitar el empleo de sus recursos infomáticos y de material de laboratorio.

Al *Departement de Medicina i Cirurgia* de la *Facultat de Medicina* y a la *Universitat de Lleida*, por favorecer las condiciones necesarias para que se llevara a cabo este trabajo de investigación.

Al Profesor Joan Viñas Salas por aceptar la tutoría de esta Tesis y por sus adecuados consejos en la realización del manuscrito final.

Especial mención merece el Profesor **Elías Campo Güerri**, profesor titular de Anatomía Patológica de la *Facultat de Medicina* de la *Universitat de Lleida*, que durante la época de mi formación académica despertó mi interés por la investigación biomédica, y que ahora tengo la enorme satisfacción de tener como Director de Tesis. Deseo expresar mi agradecimiento por la dirección, apoyo y ayuda en la elaboración de este trabajo.

I.- Introducción

A.- Los linfomas no hodgkinianos

1.- Definición:

Los linfomas o, según algunos autores, linfomas no hodgkinianos son un grupo heterogéneo de tumores del sistema linforreticular. Habitualmente se originan en los ganglios linfáticos o en otras estructuras linfoides extraganglionares y generalmente se presentan como formas diseminadas. La mayoría de las veces su origen son los linfocitos y, sólo muy rara vez, los linfomas tienen su origen en los histiocitos(1).

Los linfomas forman parte de los síndromes linfoproliferativos crónicos. El linfoma histiocítico verdadero se incluye dentro de los linfomas, pero no se considera un síndrome linfoproliferativo crónico(2).

2.- Descripción histórica de la enfermedad; identificación histológica y celular:

Algunos autores han tratado en sus publicaciones acerca de la descripción y caracterización histórica de los linfomas. Parte de esta revisión, sobre todo acerca de la historia más antigua, se ha basado en ellas(1) (3).

El conocimiento de los linfomas malignos se inicia con las descripciones clínicas y necrópsicas, realizadas en 1832, por Thomas Hodgkin, de la enfermedad que lleva su nombre. Unos años más tarde, Virchow relaciona a la enfermedad con un proceso hematológico e introduce el término de «linfoma» y, posteriormente, junto a Kundrat, el término de «linfosarcoma».

En 1898, Sternberg, y en 1902, Reed, describen y definen los aspectos histopatológicos de la enfermedad de Hodgkin y los de las células gigantes que la caracterizan.

A principios del siglo XX, Ewing y Oberling distinguen dos grupos de linfosarcomas, unos constituidos por células pequeñas y otros por células grandes. A los últimos se los considera originados en las células reticuloendoteliales de los ganglios linfáticos y los denominan «reticulosarcomas».

En 1927, Brill y Symmers, resultado de sus trabajos, individualizan del grupo genérico de los linfosarcomas una entidad anatomoclínica que cursa de forma diseminada y con una lenta evolución a la que denominan «linfoma gigantofolicular».

Burkitt, en 1958, descubre un linfoma de origen africano que cursa especialmente en niños, localizándose preferentemente en mandíbula, órbita y gónadas. Se trata de un linfoma de rápido crecimiento y que se encuentra en áreas epidemiológicamente relacionadas con malaria y con el virus de Epstein-Barr(4).

En 1977, Uchiyama describe una nueva entidad, el linfoma-leucemia T del adulto, que aparece sobretodo en Japón y que su origen, presumiblemente vírico, es atribuible al virus HTLV-1(5).

Hasta mitad del siglo XX, existe cierto desconcierto en la denominación y clasificación de los linfomas. La primera clasificación importante de los linfomas fue realizada por Rappaport en 1966. Ésta se basaba en el origen celular de la neoplasia y el patrón nodular o difuso del ganglio. Fue ampliamente aceptada por su reproductibilidad y aplicación pronóstica(6). El desarrollo de técnicas de caracterización biológica celular impulsaron la creación de otras clasificaciones como la de Lukes, Collins y Lennert en 1974(7). En ésta clasificación se perfila la identificación de los linfocitos B y T y se observa que los linfomas histiocíticos de Rappaport proceden casi en su totalidad de células linfoides(8) (10). Otras clasificaciones, basadas en criterios morfológicos, son la de Kiel(11) y la *Working Formulation*(12) que son ampliamente utilizadas en la actualidad.

La clasificación de Rye y la de Ann Arbor (13) establecieron los estadios de la

enfermedad de Hodgkin que también se han aplicado a los linfomas, a pesar de que éstos últimos se presentan, en la mayoría de los casos, como formas diseminadas y los estadios clásicos son de discutida utilidad(1).

El desarrollo de los medios terapéuticos ha permitido la curación de una parte importante de los linfomas. Hasta antes de 1895, con el descubrimiento de los rayos X por Roentgen, el tratamiento de los linfomas fue puramente sintomático. La radioterapia se aplicó a la enfermedad de Hodgkin y a los linfomas con resultados alentadores.

El tratamiento quimioterápico se inicia, en 1942, por Gillman y Goodman con el empleo de un derivado del gas mostaza que produce remisiones pasajeras en pacientes con leucemias y linfomas. Desde entonces y, hasta 1970, se introducen la ciclofosfamida, el metotrexato, los alcaloides de la Vinca, la bleomicina y la adriamicina que serán de gran utilidad en el tratamiento de los linfomas.

Hacia 1970, comienzan a desarrollarse protocolos de poliquimioterapia que demuestran mayor eficacia que la monoterapia, aumentando el número de remisiones completas y las posibilidades de curación en los linfomas de alto grado(14).

El interés por el estudio de factores pronósticos en los linfomas deriva de los trabajos de Bloomfield, en 1974, y de Cabanillas, en 1978. Se ha demostrado que los estadios avanzados, la elevada carga tumoral y la elevación de la LDH son signos de mal pronóstico(15) (16).

A los factores pronósticos clínicos, analíticos o patológicos se han empezado a incorporar, recientemente, hallazgos derivados del conocimiento de la biología celular de la célula linfomatosa.

3.- Epidemiología:

Se calcula que los linfomas acontecen de entre un 1 a un 7 por 100.000 habitantes cada año(2). En Estados Unidos, en 1983, se diagnosticaron 18.000 nuevos casos(17); mientras que, en 1987, se proyectaba una incidencia de 29.900 nuevos casos(18). En nuestro medio se ha estimado la incidencia entre 1,5 y 3,5 de nuevos casos por 100.000 habitantes cada año(19) (20).

La edad media de aparición suele ser a partir de los 50 años de edad(12), aumentando considerablemente con la vejez, excepto en los linfomas tipo Burkitt y linfoma linfoblástico(12). La incidencia global puede considerarse similar en hombres y en mujeres, aunque parece que los linfomas difusos podrían predominar en varones(6) (12) (21) (22).

4.- Etiología:

La etiología de la mayoría de linfomas es desconocida, pero hay ciertos factores que se han descrito como determinantes o influyentes en la etiología y patogenia.

4.1.- Virus:

La participación del virus de Epstein Barr en la génesis del linfoma de Burkitt deriva del hallazgo de formas endémicas de esta enfermedad en Africa(23). El virus de Epstein Barr es un virus ADN que se ha encontrado en más del 90 % de los casos de linfoma de Burkitt tipo endémico africano y en cerca del 15 % de los linfomas de Burkitt no endémicos que aparecen en otras zonas(2). Este virus penetra en los linfocitos B produciendo una estimulación con alta probabilidad de alteraciones genéticas del tipo t(8;14) y producción de un tumor monoclonal autónomo.

El virus HTLV-1 se ha asociado al linfoma-leucemia T del adulto(24) y a los linfomas T cutáneos. Este virus infecta y transforma a los linfocitos CD4 positivos que reducen sus necesidades de interleucina 2 y proliferan(25), aunque se ha descrito algún caso en que los linfocitos tumorales eran CD4 negativos(26).

Otro virus relacionado con linfoma es el Herpes-6, aunque su papel es incierto en la génesis de la enfermedad(27) (28). Se han descrito algunos virus ARN como factores causales de leucemia y linfoma en animales, pero no en humanos(17).

4.2.- Factores inmunológicos:

Existen evidencias que las alteraciones funcionales del sistema inmune(29), como los estados de inmunodeficiencia congénita(30) o adquirida(31) (34) y el tratamiento con inmuno-supresores se asocian con un aumento de probabilidad de padecer linfoma(2).

Inmunodeficiencias Congénitas	Inmunodeficiencias adquiridas
Ataxia-telangiectasia	Tto quimioterápico/ inmunosupresor
Síndrome de Wiskott-Aldrich	Linfadenopatía angioinmunoblástica
Inmunodeficiencia común Variable	Enfermedad celiaca
Aganunaglobulinemia tipo Suizo	LLC/Waldenström
	Radioterapia
	Sdme inmunodeficiencia adquirida
	Transplante renal y cardíaco
	Sdme Sjögren, tiroiditis
	Hashimoto ...

Tabla 1-1.- Factores inmunológicos que predisponen al desarrollo de linfoma.

4.3.- Alteraciones cromosómicas:

Las alteraciones citogenéticas, encontradas en muchos linfomas, es posible que actúen más como factores patogenéticos al activar oncogenes que como factores etiológicos(35).

Las alteraciones se suelen corresponder con determinados tipos histológicos(36). En una excelente revisión se describen las principales alteraciones citogenéticas asociadas a linfoma(37); entre ellas hay que destacar la asociación entre la t(8;14) y el linfoma de Burkitt, entre la t(14;18) y los linfomas foliculares independientemente de su subtipo histológico, entre la t(11;14) y los linfomas de célula pequeña y, por último, las deleciones 6q- y monosomía parcial o total del cromosoma 17 en los linfomas de células grandes(38) (36).

La presencia de anormalidades cromosómicas, aunque se asocia en una elevadísima proporción de casos a malignidad(39), no es prueba irrefutable de ella, así como, un cariotipo

normal no excluye una anomalía cromosómica de las células malignas. Algunos cambios pueden corresponder a un defecto primario que traen como consecuencia el desarrollo de un tumor, como podría ser la t(8;14) en el Burkitt, otras anomalías podrían ocurrir junto con la alteración oncogénica primaria favoreciendo la progresión y agresividad del tumor; por último, otros cambios podrían ocurrir totalmente al azar y no representar ningún cambio en el comportamiento del tumor(37).

4.4.- Otros factores:

Inciden sobre casos aislados familiares, ciertas profesiones que implican la manipulación de productos químicos (cloruro de vinilo, asbestos, derivados del petróleo), el efecto de las hidantoínas y la exposición a quimioterapia y/o radiaciones(40).

5.- Clasificación:

5.1.- Bases citomorfológicas:

La definición inicial y la más importante de los linfomas es la histocitopatológica. Se debe tener en cuenta el tipo celular predominante en el proceso y si la afección del ganglio es folicular, difusa o mixta(19).

Los principales tipos celulares que van a formar parte de los linfomas son los siguientes(2):

5.1.1.- Linfocitos pequeños y redondos: (tipo leucemia linfática crónica): son muy parecidos a los linfocitos maduros normales. No están hendidos, implican un bajo grado de malignidad y son indistinguibles de los linfocitos de la leucemia linfática crónica.

5.1.2.- Células linfoplasmocitoides y plasmáticas: van a formar parte de los linfomas linfoplasmocitoides.

5.1.3.- Linfocitos hendidos pequeños o grandes: son células linfoides que tienen un aspecto del núcleo irregular o hendido y en los que citológicamente se observa la hendidura nuclear. Es el término equivalente a centrocito en la clasificación de Kiel.

Figura 1 1

5.1.4.- Linfocitos grandes no hendidos: son células grandes con nucleolos, situados generalmente en la periferia del núcleo. Este es el término equivalente a centroblasto en otras clasificaciones.

5.1.5.- Inmunoblastos son células grandes y redondas de aspecto inmaduro. Es característica la presencia de un nucleolo evidente de localización central y la basofilia del citoplasma.

5.1.6.- Linfoblastos no convolutos o células pequeñas no hendidas son células pequeñas y medianas, no hendidas, de escaso citoplasma y con núcleo de aspecto inmaduro. Las mitosis suelen ser frecuentes.

5.1.7.- Linfoblastos convolutos o células grandes convolutas son células grandes o medianas y que poseen un núcleo convoluto. Las mitosis también son frecuentes.

Figura 1 2

5.2.- Clasificación histopatológica de los linfomas:

La clasificación histopatológica de los linfomas ha sido uno de los puntos más complejos de la nosología anatómo-patológica(19). Ello se debe a la necesidad de hacer coincidir, en la clasificación de un proceso tan heterogéneo, la de ser correcta científicamente, reproductible, tener correlación anatomoclínica y poseer implicación pronóstica(1).

Desde finales del siglo XIX, con la descripción de los linfomas y el desglose de los mismos en subentidades anatomoclínicas diferentes, se han sucedido una serie de

clasificaciones que están basadas en dos principios genéricos: las clasificaciones morfológicas, basadas en criterios arquitecturales-citológicos, y las clasificaciones inmunológicas y morfológicas(41). Se han propuesto otras clasificaciones que pretenden objetivizar el diagnóstico anatomopatológico del linfoma(42), pero las clasificaciones más extendidas son las siguientes:

5.2.1.- Clasificación de Rappaport: ésta clasificación se formuló por parte del equipo de H. Rappaport en 1966(43) y fue, durante más de 10 años, la clasificación de referencia de los linfomas. Separa a los linfomas en nodulares y difusos en función del patrón arquitectural del ganglio y establece diferencia en linfomas linfocíticos bien o poco diferenciados, linfomas histiocíticos bien o poco diferenciados, linfomas mixtos y linfomas indiferenciados.

	Patrones histológico nodular y difuso
Aspecto citológico en cortes histológicos	<p>Linfoma linfocítico bien diferenciado (linfoma linfocítico)</p> <p>Linfoma linfocítico pobremente diferenciado (linfoma linfocítico)</p> <p>Linfoma histiocítico (reticulosarcoma)</p> <p>Linfoma mixto (Linfocítico-histiocítico)</p> <p>Linfoma indiferenciado (<i>stem cell</i> linfoma)</p>

Tabla 1-2.- Clasificación de los linfomas no Hodgkinianos según Rappaport.

Esta clasificación demostró ser reproducible y tener correlación clínica y pronóstica. Su insuficiencia vino derivada de los avances en inmunología y del reconocimiento que, en la mayoría de los casos, los linfomas histiocíticos eran proliferaciones tumorales de linfocitos de gran tamaño. Posteriormente, de los linfomas difusos pobremente diferenciados se desglosaron los linfomas linfoblásticos(44).

5.2.2.- Clasificación de Kiel agrupa a los linfomas en dos grupos de alto y bajo grado de malignidad. Dentro de los linfomas de bajo grado incluye al linfoma linfocítico, linfoma linfoplasmocitario (o inmunocitoma), linfoma plasmocitario (o plasmocitoma) y las formas nodulares y difusas de los linfomas centrocíticos y centrocíticos-centroblásticos. Dentro de los linfomas de alto grado incluye a los linfomas centroblásticos, linfoblástico e inmunoblástico. Esta clasificación posee una coherencia inmunológica, diferenciando formas

B y T y delimitando diversos tipos en la maduración linfoide(11).

I Bajo grado de malignidad	I Bajo grado de malignidad
Linfoma finfocítico (LLC y otros)	Linfoma finfocítico (LLC)
Linfoma linfoplasmocitoide (ininunocítico)	Tricoleucemia (?)
Linfoma centrocítico	Micosis fungoide y síndrome de Sézary
Linfoma centroblástico/ centrocítico (folicular, folicular y difuso, difuso; con esclerosis o sin ella)	Linfoma de la zona T
	Linfoma finfoplasmocítico/ linfoplasmocitoide (inmunocitoma)
	Linfoma plasmocítico (plasmocitorna extramedular)
	Linfoma centrocítico
	Linfoma centroblástico/ centrocítico (folicular, folicular y difuso, difuso; con esclerosis o sin ella)
II Alto grado de malignidad	II Alto grado de malignidad
Linfoma centroblástico	Linfoma centroblástico
Linfoma linfoblástico (tipo Burkitt, convoluto, otros)	Linfoma linfoblástico (tipo Burkitt, convoluto, otros)
Linfoma inmunoblástico	Linfoma inmunoblástico
	(con diferenciación plasmoblástica/plasmocítica, B)
	(sin diferenciación plasmoblástica/plasmocítica, B o T)

Tabla 1-3.- Clasificación de Kiel, y su modificación posterior, de los linfomas.

5.2.3.- Clasificación de Lukes y Collins: es similar a la anterior. Diferencia los linfomas, según su origen, en B, T e histiocíticos, otorgando gran importancia al tipo citológico. En los linfomas foliculares la identificación se realiza según que la célula sea grande o pequeña y hendida o no hendida(7).

Dentro de esta clasificación, se distinguen linfomas de célula B y, dentro de ellos, el linfoma linfocítico de célula pequeña, el linfoma linfocítico plasmocitoide, linfoma centrofolicular y el sarcoma inmunoblástico de células B. También se distinguen los linfomas de célula T, con el linfoma linfocítico pequeño, la micosis fungoide-enfermedad de Sézary, el linfoma linfoblástico convoluto y el sarcoma inmunoblástico de célula T. Las dos últimas categorías corresponden a los linfomas histiocíticos verdaderos y al grupo de los linfomas inclasificables.

I	Células U (indefinidas, <i>unknown</i>)
II	Células T: Pequeño linfocito Linfocito convoluto Célula Sézary-micosis fungoide Sarcoma inmunoblástico de células T Linfoma de Lennert
III	Células B: Pequeño linfocito Linfocito plasmocitoide Células centrofoliculares (pequeña hendida, grande hendida, pequeña no hendida, grande no hendida) folicular, difuso, con esclerosis, o sin ella Sarcoma inmunoblástico de células B
IV	Histiocítico

Tabla 1-4.- Clasificación funcional de Lukes y Collins.

5.2.4.- *Working Formulation*:

Esta nueva ordenación de los linfomas surge a propuesta del National Cancer Institute como un estudio cooperativo con cerca de 1200 casos procedentes de centros europeos y americanos que aportaron datos histopatológicos, clínicos y evolutivos(12).

En principio, no se pretendía substituir a ninguna de las clasificaciones existentes, sino proporcionar recomendaciones morfológicas, de fácil interpretación y sin la necesidad de emplear técnicas inmunológicas, que tuviesen implicación pronóstica y de fácil correlación con el resto de clasificaciones. Dada la necesidad de unificar criterios y la adopción de la *Working Formulation* por numerosos centros, ésta se ha transformado actualmente en una clasificación de referencia.

La *Working Formulation* divide a los linfomas en función del tipo citológico y el patrón ganglionar. Se distinguen 10 tipos diferentes y un grupo de miscelánea. Los 10 tipos son: linfoma de linfocitos pequeños, linfoma folicular con predominio de células pequeñas hendidas, linfoma folicular mixto con células pequeñas hendidas y grandes, linfoma folicular con predominio de células grandes, linfoma difuso de células pequeñas hendidas, linfoma difuso mixto con células pequeñas hendidas y grandes, linfoma difuso de células grandes, linfoma de células grandes inmunoblástico, linfoma linfoblástico y linfoma de células pequeñas no hendidas. Estos pueden agruparse en 3 categorías de agresividad clínica: bajo grado (los tres primeros), grado intermedio (del cuarto al séptimo) y alto grado (los tres restantes). Se han asignado códigos a esta clasificación para poder establecer comparaciones entre estudios que empleen diferentes clasificaciones de linfoma.

Bajo grado malignidad	A	Linfoma maligno: linfocito pequeño. Consistente con Plasmocitoide
	B	Linfoma maligno folicular: predominio de células Áreas difusas, esclerosis
	C	Linfoma maligno folicular mixto: células hendidas pequeñas y células grandes Áreas difusas, esclerosis
Grado intermedio	D	Linfoma maligno folicular: predominio de células Áreas difusas, esclerosis
	E	Linfoma maligno difuso: células hendidas pequeñas Esclerosis
	F	Linfoma maligno difuso mixto: células pequeñas y Esclerosis. Componente epitelioide
	G	Linfoma maligno difuso: célula grande hendida, no
Alto grado malignidad	H	Linfoma maligno: célula grande, inmunoblástica. Plasmocitoide, célula clara, polimorfo. Componente
	I	Linfoma maligno: linfoblástico Célula convoluta, Célula no convoluta
	J	Linfoma maligno: célula no hendida pequeña Burkitt Áreas foliculares
Miscelánea		Compuesto Micosis fungoide Histiocito Plasmocitoma extramedular Inclasificable Otros

Tabla 1-5.- Clasificación de los linfomas según el Proyecto del Instituto Nacional del Cáncer en EE.UU. (*Working Formulation*).

Las comparaciones entre la *Working Formulation* y las clasificaciones de Rappaport, Kiel y Lukes-Collins han demostrado que todas ellas permiten separar eficazmente a los pacientes en subgrupos con implicación pronóstica(45). El tipo histológico del linfoma ha demostrado tener una importante implicación pronóstica(45).

Desde que se iniciaron los estudios de la *Working Formulation* han aparecido nuevas entidades que no se recogen en las clasificaciones clásicas descritas(46). Entre ellas cabe destacar: los linfomas tipo MALT (tejido linfoide asociado a mucosas)(19) (47), linfomas T postmicos(5) y un grupo de linfomas de célula grande inmunoblástica portadoras del antígeno Ki-1 con diferente pronóstico que los linfomas de alto grado(19) (48). Lo cual

obliga a una continua revisión y actualización de las clasificaciones histopatológicas del linfoma.

El estudio histopatológico constituye la base diagnóstica de los linfomas. Una alternativa discutida es la punción ganglionar seguida o no de biopsia-excisión del ganglio(49). Numerosos centros no disponen de técnicas inmunológicas, citogenéticas y de reordenamiento génico, por ello, es necesario un estudio morfológico preciso de las muestras biopsicas.

Tipo histológico	Patrón	Fenotipo		Comentarios
WF		B	T	
Linfocitos pequeños	Difuso	99	1	Variante nodal de LLC
Folicular de célula pequeña hendida	Folicular	100	0	
Folicular mixto	Folicular	100	0	
Folicular de célula grande	Folicular	100	0	
Difuso de célula pequeña hendida	Difuso	90	10	
Difuso mixto	Difuso	60	40	
Difuso de célula grande	Difuso	90	10	
Inmunoblástico,	Difuso	80	20	
Linfoblástico	Difuso	5	95	Leucemia asociada: LLA
Célula pequeña no hendida	Difuso	100	0	En tipo Burkitt es un subtipo; leucemizado produce FAB-L3

Tabla 1-6.- Histología e inmunofenotipo en linfomas.

Los estudio inmunohistoquímicos permiten completar los hallazgos histopatológicos de hematoxilina-eosina y Giemsa. Mediante las técnicas inmunológicas se pueden identificar, de forma rutinaria, los linfocitos B y T o sus subtipos(50) (51). Las técnicas que habitualmente se utilizan son: el estudio de cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas (alfa, gamma, mu, kappa, lambda) y el estudio de poblaciones linfocitarias con anticuerpos monoclonales (CD1, CD2, CD4, CD8, CD19, CD20, CD10, CD5, Ki-67, Ki-1, CD45 o antipanleucocitarios, antígeno membrano epitelial o EMA, anticitoqueratina, proteína S-100, etc.)(52) (53).

6.- Manifestaciones clínicas:

La gran heterogeneidad de los procesos incluidos en los linfomas se traduce en un amplio espectro de presentaciones clínicas, historia natural, pronóstico y respuesta al

tratamiento.

La forma mas frecuente de presentación clínica suele ser la presencia de adenopatías únicas o múltiples (multicentricidad) que, al inicio, son indoloras y rodaderas(54), aunque según algunas series, hasta de un 10 a un 50 % de los casos, el inicio puede ser extranodal(55) (57). Según el tipo de linfoma y la agresividad del tumor, la velocidad de crecimiento de las adenopatías es mayor o menor y, en algunos casos, la enfermedad se presenta como masas tumorales adheridas e incluso fistulizadas.

En las formas de comienzo ganglionar es frecuente la afectación de las áreas cervicales (35%), axilares e inguinales (30%) y supraclaviculares (20%). También pueden afectarse otras áreas de la economía como: auriculares, epitrocleares, femorales y poplíteas. La afección de los ganglios abdominales se presenta en aproximadamente un 50 % de los casos, siendo usualmente asintomática, aunque pueden producir distensión y dolor abdominal. La presencia de adenopatías mediastínicas se calcula en un 20% de los casos, excepto en el linfoma linfoblástico en que en más de la mitad de los casos se puede objetivizar una en el linfo gran masa mediastínica (1).

Una característica de los linfomas, sobretodo de los de bajo grado, es su rápida extensión por vía hematógena, reflejando el patrón circulatorio normal de los linfocitos(3). Por ello, pese a su apariencia clínica, menos del 20 % de los pacientes presentan enfermedad localizada.

La esplenomegalia está presente en el 30 ó 40 % de los casos. La hepatomegalia es menos frecuente, aunque aumenta su incidencia si se realiza exploración con tomografía axial computerizada o biopsia hepática.

Sólo aproximadamente el 20 % de los pacientes presentan síntomas constitucionales (pérdida de peso, sudación profusa o fiebre) en el momento del diagnóstico, siendo más frecuentes en las formas agresivas, enfermedad extendida o histologías difusas.

Entre los linfomas de inicio extraganglionar destacan, por orden de frecuencia, los del tracto gastrointestinal (36 %), cabeza y cuello (21 %) y cutáneos (16 %)(1). La afectación gastrointestinal puede producir dolor, masas que obstruyen o comprimen estructuras vecinas, e incluso, que el paciente se puede palpar o, a veces, se presenta como un síndrome de malabsorción con diarrea(58) (60). La afectación del anillo de Waldeyer es la segunda localización, en frecuencia, de afectación extranodal(61) (64) y se asocia con afectación gastrointestinal y viceversa(65). La afectación cutánea primitiva o metastásica puede presentarse, inicialmente, como lesiones eritematosas y, posteriormente, como lesiones palpables(66) (67). La invasión ósea y de la médula ósea puede provocar dolor en las zonas implicadas. En el caso de que haya afectación por parte del linfoma del sistema nervioso central suele haber cefaleas persistentes y, a veces, déficits neurológicos diversos(68). En los linfomas en que existe masa mediastínica puede aparecer un síndrome de compresión de la vena cava superior. Los linfomas que afectan ovario generalmente se presentan como una masa abdominal(69) (70).

El hallazgo de anemia puede deberse a invasión medular con abolición de serie nobles y subsiguiente fracaso de la hematopoiesis, hemorragias, trastornos en el almacenamiento y biodisponibilidad del hierro, hiperesplenismo o fenómenos autoinmunes. Algunos pacientes presentan trombopenias de carácter inmune, leucocitosis o trombocitosis(71).

Como ya se ha señalado, la mayor parte de los pacientes consultarán por el crecimiento de uno o varios ganglios, pero en raras ocasiones, los signos clínicos como fiebre de origen indeterminado, infecciones, esplenomegalia aislada o palidez pueden ser los primeros síntomas de un linfoma(72) (74). Cuando las manifestaciones son abigarradas y no se encuentran ganglios palpables, el linfoma puede simular cualquier otra enfermedad.

7.- Pruebas de laboratorio:

No hay alteraciones analíticas específicas de linfoma salvo que se observen células linfomatosas en sangre periférica en los casos de linfomas leucemizados.

A pesar, de la frecuente invasión de la médula ósea, los recuentos celulares sanguíneos suelen ser normales. En base a criterios morfológicos la invasión de sangre periférica se cifra de un 7 a un 17 % de los pacientes, pero con técnicas más sensibles, como la citometría de flujo, se demuestra exceso clonal linfocitario hasta en el 80 % de los casos en sangre periférica y en casi el 100% en tejido linfoide(75).

Las pruebas biológicas hepáticas, como la fosfatasa alcalina, pueden orientar, si están elevadas, hacia una invasión hepática, pero son muy inespecíficas. Cuando la carga tumoral es elevada puede estar aumentado el ácido úrico. La velocidad de sedimentación globular aumenta en los linfomas y sigue un cierto paralelismo con las cifras de LDH. La hipercalcemia se asocia a afectación ósea. La dosificación del receptor de la interleucina 2(76) (77), del factor de necrosis tumoral(78) y la de la beta-2-microglobulina(79) pueden tener interés ya que dan idea de la agresividad del linfoma y parecen tener valor pronóstico(80) (81). El estudio de las proteínas séricas puede revelar hipogammaglobulinemia y, menos frecuentemente, hipergamma-globulinemia monoclonal en los pacientes con linfoma y especialmente en el tipo linfoplasmocítico y linfoplasmocitoide.

La determinación bioquímica más importante y de obligada dosificación es la LDH. El aumento de la LDH es una alteración característica de linfoma que, cuando alcanza valores muy altos, sí puede sugerir neoplasia linfoide (ya sea linfoma o leucemia aguda). La LDH ha demostrado tener valor pronóstico, independientemente del tipo histológico, y es útil para el seguimiento del paciente, valoración de respuesta al tratamiento y detección de recaída(57) (81) (82).

8- Clasificación por estadios y diagnóstico de extensión:

Tras el diagnóstico clínico e histopatológico del linfoma debe realizarse un correcto diagnóstico de extensión que permitirá, además de seleccionar el tratamiento adecuado, la búsqueda de factores pronósticos y la valoración de la respuesta al tratamiento del linfoma.

La clasificación de extensión más ampliamente utilizada es la de Ann Arbor(13), aunque ésta fuera inicialmente concebida para la enfermedad de Hodgkin. La clasificación de Ann Arbor ha sido, durante 20 años, una fórmula válida para un tratamiento racional de la enfermedad de Hodgkin y aun se emplea con algunas actualizaciones(83).

La clasificación de Costwald, una actualización de la de Ann Arbor, clasifica a los linfomas en estadios en función de la extensión de la enfermedad linfomatosa. Se denomina estadio I cuando existe afectación de 1 sola región ganglionar o estructura linfática, el estadio II implica la afectación de 2 o más regiones linfáticas al mismo lado del diafragma (el mediastino se considera un único sitio, mientras que los ganglios hiliares son considerados bilateralmente), el estadio III es cuando existe afectación de regiones ganglionares o estructuras linfáticas a ambos lados del diafragma (en el estadio III se diferencia el estadio III1 en el que puede, o no, haber afectación de los ganglios esplénicos, hiliares, celíacos o portales y el estadio III2 que implica afectación de ganglios paraórticos, ilíacos y mesentéricos) y, por último, el estadio IV que se aplica cuando hay afectación de uno o más sitios extranodales además de un sitio para el que se ha usado la designación E.

Estadio I	Afección de una sola región ganglionar (I) o de un solo órgano o localización extralinfática (IE)
Estadio II	Afección de dos o más regiones ganglionares al mismo lado del diagrama (II) o afectación localizada de un órgano o localización extralinfática y de una o más regiones ganglionares al mismo lado del diafragma
Estadio III	Afección de regiones ganglionares a ambos lados del diagrama (III) a las que puede acompañar afectación localizada de órganos o localizaciones extralinfáticas (IIIE) o afectación del bazo (IIIS) o ambas (IIISE)
Estadio IV	Afección difusa o diseminada de uno o más órganos o tejidos E1 extralinfáticos con afección asociada de ganglios linfáticos o sin ella, motivo por el que se clasifica al paciente en estadio IV debe indicarse mediante el símbolo del órgano o tejido afecto
<p>Cada estadio se subdividirá en A o B según la ausencia o presencia de los siguientes síntomas generales:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- pérdida inexplicable de peso superior al 10% en los últimos 6 meses; 2.- fiebre inexplicada con temperaturas superiores a 38 grados, y 3.- sudores nocturnos 	

Tabla 1-7.- Clasificación del estadio clínico del linfoma (Ann Arbor, 1971).

Además del estadio se valoran designaciones que son aplicables a cualquier estadio, así A significa ausencia de síntomas, B indica la presencia de fiebre superior a 38 grados, sudoración profusa por la noche o pérdida inexplicable de más del 10 % del peso corporal en los 6 meses anteriores al diagnóstico, X significa enfermedad voluminosa y E implica la afectación de un único sitio extralinfático (contiguo o próximo a un sitio ganglionar conocido). Cuando el estadio se ha establecido mediante la historia clínica, la exploración física, y exploraciones complementarias incruentas se considera como estadio clínico y se designa como CS; se denomina estadiaje patológico, PS, cuando el estadio se ha establecido mediante laparotomía.

8.1.- Estudio de la extensión del linfoma:

La clasificación por estadios del linfoma presenta algunas limitaciones como el que una gran parte de los pacientes se encuentran en estadios avanzados, la dudosa importancia de los síntomas B en el linfoma no hodgkiniano y que no tiene en cuenta el concepto de carga tumoral(1); sin embargo, se siguen empleando de modo generalizado los estadios de Ann Arbor o sus versiones actualizadas en el linfoma no hodgkiniano.

Historia clínica	Anamnesis y examen físico territorios ganglionares
Valoración histopatológica	Biopsia, morfología. Fenotipo inmunológico Biopsia medular/mielograma
Valoración hematológica	Hemograma completo, VSG, reticulocitos. Coombs directo y pruebas de hemólisis en casos necesarios Examen de sangre periférica
Valoración bioquímica	Bioquímica general. Función renal y hepática, proteínas totales, proteinograma, calcemia, LDH y ácido úrico
Valoración radiológica	Rx de tórax, Rx simple de abdomen TAC abdominal. Si posible: linfografía Si afectación torácica: TAC torácico, tomografías de pulmón
	Si está indicado: estudio <i>cavum</i> , gammagrafía ósea, ecografía abdominal, pielografía, estudios radiológicos del aparato digestivo
Otras valoraciones	Biopsia confirmativa de recidivas Afectación SNC: recuento diferencial, bioquímica, citocentrífuga de LCR En casos seleccionados: laparotomía para determinación del estadiaje

Tabla 1-8.- Exploraciones utilizadas en el estadiaje de los linfomas malignos.

	Estadio clínico (%)				Estadio patológico (%)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Nodular	8,3	11,7	66,1	13,9	6,2	9,6	34,8	49,4
Difuso	10,6	19,5	31,1	38,9	7,6	18,2	17,9	56,3

Tabla 1-9.- Estadio de 473 enfermos del N.C..I.

Los pasos a seguir para determinar la extensión de la enfermedad, después del diagnóstico histopatológico de linfoma, varían según los protocolos y disponibilidades de cada centro. En general las exploraciones consisten en las siguientes(2) (84):

8.1.1.- Historia clínica y exploración física completa: se debe indagar acerca de la presencia de síntomas B que pueden sugerir enfermedad diseminada, aunque no hay que olvidar una anamnesis completa que oriente hacia localizaciones específicas del linfoma o hacia la existencia de un linfoma extranodal. En la exploración se debe buscar la presencia de adenopatías y visceromagalias.

8.1.2.- Aspirado y biopsia de médula ósea: que nos va a servir para valorar la infiltración linfomatosa de la médula ósea y que, si se realiza bilateralmente, aumenta su rendimiento en un 25 %.

8.1.3.- Hemograma y bioquímica completa: se debe realizar un recuento globular completo y es ineludible dosificar la LDH.

8.1.4.- Radiografía de tórax con la que se pretende visualizar el mediastino y que si es patológica se complementa con tomografías.

8.1.5.- Tomografía axial computerizada de abdomen o resonancia magnética y/o linfografía se considera mejor realizar tomografías axiales computerizadas o resonancias asociadas con la linfografía, pero puede ser suficiente con una de ellas sin linfografía.

8.1.6.- En casos seleccionados se indica biopsia hepática (cuando hay alteraciones clínico-analíticas que indique daño hepático y no esté claro que sea por infiltración). En ocasiones puede ser necesario realizar una laparotomía, generalmente, para obtener el diagnóstico histológico. El examen del líquido cefalorraquídeo es obligado en los linfomas infantiles y aconsejable en adultos.

9.- Características de los principales tipos de linfoma:

9.1.- Linfomas de bajo grado:

Los pacientes con linfoma linfocítico de célula pequeña tienen una proliferación difusa de linfocitos pequeños y bien diferenciados, algunos de los cuales, pueden tener cierto hábito plasmocitoide. Generalmente, se trata de proliferaciones tumorales de células B que son similares a las células B normales que se encuentran en la medular de los ganglios linfáticos(40). Las células neoplásicas tienen una alta tendencia a «escapar» hacia el torrente sanguíneo y, entonces, se constituyen en una leucemia linfática crónica. Este hecho se produce invariablemente, después de un lapso más o menos largo, por lo que se pone en duda la individualidad de este tipo de linfoma al que se le puede considerar como una contrapartida nodal a la leucemia linfática crónica(19).

El linfoma linfocítico bien diferenciado difuso es una enfermedad de personas con edad media-avanzada y se calcula que representa alrededor de un 5 a un 10 % de los linfomas(85). La enfermedad suele presentarse con adenomagalias generalizadas y con afectación de la médula ósea. El curso es indolente aun sin tratamiento y las complicaciones

terminales se deben a insuficiencia medular, hiperesplenismo o afectación linfomatosa del hígado o del sistema nervioso central. En un 20 % de los pacientes se constata la presencia de paraproteína en suero, mientras que la hipogammaglobulinemia afecta tan solo a un 5 % de los casos(40).

Cuando una neoplasia linfoide por linfocitos bien diferenciados se asocia a un linfoma difuso de célula grande al cuadro se le denomina Síndrome de Richter. Hay estudios que sugieren que este síndrome se debe a un aumento de la agresividad del mismo clon tumoral, mientras que otros autores han evidenciado que hay casos en que se trata de clones neoplásicos independientes(86).

Inmunológicamente están constituidos, en la gran mayoría de los casos, por células de tipo B con expresión monoclonal de inmunoglobulinas en la superficie y baja intensidad de expresión de IgM, con o sin IgD, con la misma cadena ligera e idiotipo. Las células son positivas para el antígeno pan-B CD19 y para un antígeno de línea T que se expresa en una subpoblación de células B que es el CD5(52).

Los linfomas constituidos por células B similares a las del linfoma linfocítico bien diferenciado difuso, pero que remedan cierto patrón nodular y algunas células hendidas, se denominan linfomas intermedios. Histológicamente, en el ganglio se aprecian centros germinales con una expansión de la zona del manto, lo que ha llevado al término de linfoma de la zona del manto. Los hallazgos inmunológicos son parecidos a los del linfoma linfocítico bien diferenciado difuso(87).

Se describe un linfoma con células citológicamente e inmunológicamente semejantes a las de la leucemia de células peludas que también expresan el antígeno CD11c que se ha denominado linfoma B monocitoide(88).

Los linfomas foliculares constituyen la mayoría de los linfomas de bajo grado y aproximadamente la mitad de todos los tipos de linfoma. Su frecuencia es máxima a partir de los 50 años de edad y suelen seguir un curso indolente. Dentro de este grupo se distinguen tres categorías diferentes en función del tipo celular predominante: linfoma de célula pequeña hendida, linfoma mixto de células hendidas pequeñas y grandes y, por último, linfoma de células grandes. Los dos primeros se consideran linfomas de bajo grado, mientras que el linfoma de células grandes que es más agresivo se engloba dentro de los linfomas de grado intermedio en la Working Formulation. Clínicamente son enfermedades de edades avanzadas, que se manifiestan como adenomegalias generalizadas y que cuando se diagnostican, frecuentemente, se encuentran con afectación de médula ósea y por lo tanto en estadios avanzados(89).

El linfoma folicular de células pequeñas hendidas está constituido por centrocitos o células hendidas de origen centrofolicular y de procedencia B. Inmunológicamente, los centrocitos expresan marcadores B en su superficie(19). Son CD5 negativos, CD10 positivos; y se les asocia la translocación t(14;18) que involucra al gen bcl-2.

El linfoma mixto de células pequeñas hendidas y células grandes (o centrocítico-centroblástico) representa la contra-partida tumoral del folículo linfoide secundario normal, y, por tanto, consta de todas sus células integrantes que en su mayoría son centrocitos y centroblastos. El linfoma mixto es folicular en un 70 % de los casos(19) y representa uno de los tipos de linfoma más frecuentes. Clínicamente la edad de máxima aparición corresponde a la sexta década de la vida. Se puede presentar en ganglios de localización infrecuente de linfoma (preauricular, occipital, epitroclear y mastoideo), y no es excepcional la afectación extranodal como en piel, tejido celular subcutáneo y amígdalas. Las células presentan gran movilidad, invaden la sangre periférica con rapidez, y en un elevado porcentaje de los casos se constata afectación de médula ósea de modo que la mayoría de los pacientes se encuentran en estadios avanzados de su enfermedad en el momento del diagnóstico. Inmunológicamente

las células son B y como rasgo distintivo son CD10 positivas(19).

WF	Freq. %	Edad media años	Extensión según estadio		M.O. afectada %	Estudio de supervivencia	
			I-II	III-IV		media	a 5 años
			%	%		años	%
A	3,6	60	11	89	71	5,8	59
B	22,5	54	18	82	51	7,2	70
C	7,7	56	27	73	30	5,1	50

Tabla 1-10.- Características de los linfomas de bajo grado.

En ocasiones, en el momento del diagnóstico, se obtienen patrones histológicos divergentes en distintos lugares de biopsia del mismo paciente(90). Probablemente la discrepancia entre patrón folicular y difuso refleja la tendencia, en el linfoma, que los clones de células grandes, más agresivas, se desarrollen más deprisa y conviertan a los linfomas foliculares en difusos con el paso del tiempo y el seguimiento del paciente. En la mayor parte de los pacientes en que se objetiva progresión del linfoma folicular, en la autopsia, se encuentra un linfoma difuso de célula grande(91).

El término de linfoma compuesto se aplica a los casos en que en el momento del diagnóstico se demuestra dos tipos de linfoma diferente de modo simultáneo y en el mismo tejido. El pronóstico del paciente parece que está determinado por el tipo histológico más agresivo(92).

9.2.- Linfomas de grado intermedio:

Dentro de los linfomas de grado intermedio se incluyen el linfoma folicular de célula grande y las formas difusas de los linfomas de células pequeña hendida, mixto y de célula grande(12).

El linfoma folicular de células grandes es una entidad poco frecuente que tiene un origen centrofolicular y cuyo componente más representativo son las células grandes o centroblastos que se hallan en una proporción variable entre el 25 y el 100 % de la celularidad total(19).

El linfoma difuso de células pequeñas hendidas es una enfermedad que incide en la séptima década de la vida, presentándose como un cuadro adenopático generalizado, con afectación precoz de la médula ósea y tendencia a la leucemización(93). El linfoma difuso, generalmente, sigue un curso evolutivo más agresivo que el folicular con afectación de órganos como el hígado, pulmones y médula ósea, con peor respuesta a tratamiento y mayor porcentaje de recidivas. Inmunológicamente, las células pequeñas hendidas son células B, CD5 positivas y CD10 negativas(19); y se les asocia la translocación t(11;14) que involucra al gen bcl-1. Actualmente, se le considera una entidad biológicamente distinta al linfoma folicular de célula pequeña hendida, dada sus diferencias inmunológicas y citogenéticas.

El linfoma difuso mixto es un grupo heterogéneo de linfomas, parte de los cuales pueden ser resultado de la evolución de linfomas foliculares, y muestran unas características clínicas e inmunológicas similares a su contrapartida folicular.

El linfoma difuso de célula grande representa una categoría de linfomas de agresividad intermedia-alta y supone aproximadamente el 20 % de los linfomas(40). Puede ser primario o derivar de un linfoma centrocítico-centroblástico previo(19). Hasta un 25 o 30 % de los pacientes pueden encontrarse, en el momento del diagnóstico, en estadios precoces (I-II) de su enfermedad. Los pacientes afectados de un linfoma extranodal localizado frecuentemente tienen un linfoma de célula grande. El pronóstico de éstos pacientes ha mejorado considerablemente con el tratamiento, según series, se pueden conseguir supervivencias libres de enfermedad a los 5 años de alrededor del 50 %(94).

Los linfomas T corresponden aproximadamente a un 20 % de la totalidad de los linfomas(95). Son un grupo heterogéneo que invariablemente produce un borramiento difuso de la arquitectura ganglionar y que generalmente se consideran dentro de los tipos de malignidad intermedia o alta(40). Dentro de ellos se describen el síndrome linfoma-leucemia de célula T del adulto, el linfoma T periférico, el linfoma de Lennert y el linfoma angioinmuno-blástico.

WF	Freq. %	Edad media años	Extensión según estadio		M.O. afectada %	Estudio de supervivencia	
			I-II %	III-IV %		media años	a 5 años %
D	3,8	55	27	73	34	3,0	43
E	6,9	58	28	72	32	3,4	33
F	6,7	58	45	55	14	2,7	38
G	19,7	57	46	54	10	1,5	35

Tabla 1-11.- Características de los linfomas de grado intermedio.

9.3.- Linfomas de alto grado:

Dentro de la *Working Formulation* se distinguen tres grupos de linfomas diferentes que se engloban dentro de la categoría de linfomas llamados de alto grado. Son el linfoma inmunoblástico, linfoblástico y linfoma de célula pequeña no hendida(12).

El linfoma inmunoblástico constituye el 10 % de la totalidad de los linfomas. De ellos, la inmensa mayoría son de origen B, de un 5 a un 10 % son de origen T (a los que se relaciona con los linfomas T periféricos) y sólo rara vez corresponde a linfomas histiocíticos verdaderos(7). Estos linfomas ocurren en adultos con edad superior a 50 años y, característicamente, se asocian a escasa respuesta a la quimioterapia y corta supervivencia.

Mención especial merece un linfoma constituido por células grandes que generalmente expresan fenotipo T, se trata del linfoma anaplásico Ki-1 positivo(48). Es un linfoma integrado por células atípicas cuyo aspecto puede simular fácilmente el de una metástasis carcinomatosa. Se distingue de una metástasis de carcinoma porque muestras positividad inmunohistoquímica al antígeno Ki-1 (CD30) y negatividad a la citoqueratina, siendo la positividad a CD45 de alrededor de un 80 %(19).

El linfoma linfoblástico es un linfoma de alto grado, usualmente T, que representa un 5 % del total de los linfomas. Es un linfoma que aparece en adolescentes y adultos jóvenes, aunque también hay casos en personas ancianas. El origen de esta neoplasia son linfocitos T que expresan un inmunofenotipo tímico más o menos maduro, suelen ser CD2, CD1a, CD38, CD3, CD4, y CD8(40). El índice de mitosis es muy elevado. Aproximadamente del 60 al 80

% de los pacientes con linfoma linfoblástico se presentan con una masa mediastínica anterior, sugiriendo de este modo, el origen tímico del tumor. Con cierta frecuencia se observa derrame pleural. Antes del desarrollo de los modernos programas de quimioterapia agresiva, la mayor parte de los pacientes presentaban una rápida diseminación con una buena respuesta inicial a la quimioterapia pero con recidivas precoces, con afectación de médula ósea, sangre periférica y sistema nervioso central (96).

Una proporción de los linfomas linfoblásticos son de estirpe B, puesto que los linfocitos neoplásicos expresan fenotipos propios de célula Pre-B o B, aunque histológicamente las células son indistinguibles de las de tipo T(97).

La última categoría de linfomas de alto grado que contempla la *Working Formulation* corresponde a los linfomas difusos de célula pequeña no hendida que constituyen aproximadamente el 5 % del total de linfomas. En ellos se incluye el linfoma de Burkitt.

El linfoma de Burkitt es endémico en Africa tropical y Nueva Guinea y se presenta en niños durante la primera década de su vida. Se manifiesta como masas tumorales en mandíbula, órbita, retroperitoneo, riñones, médula espinal y ovarios, con escasa o nula participación ganglionar o esplénica. Casos con similar aspecto histológico ocurren de forma no endémica fuera del continente africano, aunque éstos presentan algunos matices diferentes: la edad de aparición es más alta, menor afectación del esqueleto facial y mayor tendencia a la participación ganglionar y del tracto intestinal. En todos los casos africanos se detecta el virus de Epstein-Barr, mientras que en los casos fuera del continente africano no se suele demostrar el virus de Epstein-Barr(17). La mayoría de los linfomas de Burkitt tienen una de las tres translocaciones recíprocas t(8;14), t(2;8) o t(8;22), translocándose el oncogén c-myc que es activado en su nueva ubicación(19).

El tumor es una neoplasia agresiva de células B inmaduras en la que los antígenos CD10, CD19, CD20, CD24, CD38 e IgM de superficie suelen ser positivos. La célula es de tamaño mediano o pequeño, de núcleo redondo con cromatina laxa y varios nucleolos y el citoplasma es intensamente basófilo con vacuolas. La actividad mitótica es muy intensa. Si aparece leucemización, ésta se manifiesta como la variante L3 de la clasificación FAB de leucemias agudas linfoblásticas. La elevación de la LDH guarda una buena correlación con la extensión del proceso(16) (93).

WF	Freq.	Edad media	Extensión según estadio		M.O. afectada	Estudio de supervivencia	
			I-II %	III-IV %		media años	a 5 años %
H	7,9	51	51	49	12	1,3	32
I	4,2	17	27	73	50	2,0	26
J	5,0	30	44	66	14	0,7	23

Tabla 1-12.- Características de los linfomas de alto grado.

10.- Caracterización biológica de los linfomas:

El reconocimiento de los linfomas se ha basado, tradicionalmente, en la valoración bajo el microscopio de luz de muestras de tejido presuntamente neoplásico. El patólogo, basándose principalmente en las características morfológicas del tumor, establece un diagnóstico que se utilizará por el clínico para planificar un protocolo terapéutico y formarse una opinión pronóstica del enfermo.

Como ya hemos visto, existen varias clasificaciones histológicas de los linfomas y todas tienen como fundamento criterios citomorfológicos. La limitación principal de las clasificaciones anatomopatológicas radica en la subjetividad del diagnóstico y en que puede ser difícil para el patólogo distinguir entre un tipo celular u otro(19) (46). En vista de las limitaciones de la sola observación microscópica de las muestras de linfoma es conveniente aplicar otras metodologías de estudio que puedan aportar objetividad a la clasificación y, a su vez, ofrecer información acerca de la biología celular de la célula linfomatososa.

10.1.- Estudio con anticuerpos monoclonales:

Los estudios sobre tejido parafinado o fresco de muestras de linfoma mediante anticuerpos monoclonales o policlonales tienen como principal objetivo identificar la extirpe celular del linfoma(98) (100). Los estudios inmunológicos sobre parafina tienen la limitación de que no se dispone de tantos anticuerpos que soporten los procedimientos de fijación e inclusión del tejido en parafina como de los que se dispone en citometría de flujo, pero permiten visualizar las células y valorar la disposición espacial y arquitectural de las mismas(101) (102).

Actualmente, los estudios inmunológicos se han convertido en práctica rutinaria en los laboratorios de patología que manejan una cantidad razonable de linfomas. Estos estudios se realizan con baterías de anticuerpos que permiten identificar el origen de la célula tumoral, su estadio de diferenciación maduración y matizar el componente neoplásico y reaccional del tumor.

Un marcador interesante es el anticuerpo monoclonal Ki-1 que identifica un grupo de linfomas con un curso más agresivo y linfocitos activados, ya sean normales o neoplásicos(48).

La aplicación de las técnicas inmunológicas para el estudio de las neoplasias hematológicas, así como el inmunofenotipo característico de cada tipo de linfoma se ha tratado con anterioridad.

Los aspectos metodológicos de las técnicas inmunocitoquímicas y su aplicación general para el estudio del inmunofenotipo y la proliferación celular se abordan más adelante.

10.2.- Aplicación de la citogenética a los linfomas:

El estudio citogenético de los linfomas está adquiriendo cada vez mayor importancia, puesto que se ha demostrado, hasta en un 90 % de los linfomas, la presencia de alteraciones citogenéticas caracterizadas por anomalías cromosómicas que se correlacionan con la histología y el fenotipo inmunológico(103) (104). La falta de generalización del estudio citogenético se debe a la dificultad y tediosidad de la técnica para realizarlo, así como la difícil interpretación de los resultados(105).

Figura 1_3

En un 70 % de linfomas B se ha encontrado translocaciones de la banda 14q32, mientras que en los linfomas T se hallan reordenamientos que involucran 14q11, 7q35-36 o 7p15(103).

Las alteraciones del cariotipo que se observan en los linfomas se encuentran, en algunos casos, relacionadas con oncogenes específicos(106). Los hallazgos más relevantes son los que se describen a continuación(40) (107).

En el linfoma de tipo Burkitt la observación patogénica más frecuentemente descrita es la translocación t(8;14)(q24.1;q32.3) y la activación asociada de proto-oncogén c-myc.

Hasta un 80 % de los linfomas foliculares presentan la translocación t(14;18)(q32.3;q21.3). El lugar de la translocación es el gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina y causa el movimiento del proto-oncogén bcl-2 del cromosoma 18 al 14 con

la consiguiente activación del mismo y sobreproducción de proteína bcl-2. De forma global del 60 al 70 % de los linfomas presentan translocaciones que involucran la posición 14q32.3.

Anormalidad citogenética	Histología	Gen Loci	Oncogén
<p>Linfomas B</p> <p>traslocaciones</p> <p>8q24</p> <p>t(8; 14)(q24;q32)</p> <p>t(2;8)(p11-12; q24)</p> <p>t(8;22)(q24;q11)</p> <p>t(14;18)(q32;q2 1)</p> <p>t(11; 14)(q24;q3 2)</p> <p>t(14;19)(q32;q 13.1)</p> <p>t(3;22)(q27;q11)</p> <p>Trisomía 12;11q,14q</p> <p>alteraciones 1q 1q21-23</p> <p>alteraciones 6q21-25</p>	<p>célula pequeña no hendida y algunos de célula grande</p> <p>foliculares (célula pequeña hendida, mixtos y célula grande)</p> <p>linfoma intermedio difuso y del manto</p> <p>LLC-B</p> <p>difusos (célula pequeña hendida, mixtos y célula grande</p> <p>linfocitos, LLC-B, algunos de célula grande</p> <p>difuso de célula grande</p> <p>difuso de célula grande</p>	<p>IgH</p> <p>IgL</p> <p>IgK</p> <p>IgH</p> <p>IgH</p> <p>IgH</p> <p>IgH</p> <p>IgL</p>	<p>c-myc</p> <p>bcl-2</p> <p>bcl- 1</p> <p>bcl-3</p>
<p>Linfomas T alteraciones</p> <p>14q 11-14</p> <p>inv 14(q 11;q32)</p> <p>t(11; 14)(p 13;q 11)</p> <p>t(10;14)(q24;q 11)</p> <p>t(1; 14)(p32;q11)</p>	<p>variable</p> <p>LLA-T</p> <p>variable</p> <p>LLA-T</p>	<p>TCR-α</p> <p>TCR-δ</p> <p>TCR-δ</p> <p>TCR-δ</p>	<p>tcl-1</p> <p>tcl-2</p> <p>hox- 11 (tcl-3)</p> <p>sej (tall,tcl-5)</p>

alteraciones 7q35			
t(7;9)(q34-36; q32)	Linf linfobástico o LLA-T	TCR-β	tcl-4
t(7;14)(q34-36; q11)	variable	TCR-β	
t(7;19)(q34-36;p13)	LLA-T	TCR-β	lyl-1
t(2;5)(p23;q35)	linfoma anaplásico de célula grande (Ki-1 positivo)		

Tabla 1-13.- Correlación entre algunas alteraciones cromosómicas y linfoma.
 IgH: cadena pesada de la Ig; IgL: cadena ligera lambda de la Ig; IgK: cadena ligera kappa de la Ig; TCR: receptor de célula T.

En los linfomas linfocíticos B o en estadios intermedios de diferenciación y en la leucemia linfática crónica se encuentra la translocación t(11;14)(q13;q32.3) que involucra también al gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas que activa al gen bcl-1. Hasta un una cuarta parte de los linfomas linfocíticos se encuentran trisomías del cromosoma 12 y deleciones del 11q. En los linfomas de células T se puede hallar translocaciones del gen de la cadena alfa, beta o gamma del receptor de célula T que podrían activar a los proto-oncogenes tcl-1, tcl-2 o tcl-3 respectivamente.

En los linfomas difusos de célula grande y otros tipos, considerados agresivos histológicamente, se han visto asociadas deleciones tipo 6q21 o 6q15, con una sobreexpresión del proto-oncogén c-myb. También se han visto duplicaciones del 18q, trisomías del cromosoma 12 y trisomías del cromosoma 7.

Otros oncogenes implicados en los linfomas son el dbl, ret, N-ras, Blym-1 y Tlym-1.

10.3.- Biología molecular:

Actualmente se dispone de una serie de sondas capaces de detectar reordenamientos genéticos de los oncogenes conocidos, así como para otros genes no oncogénicos (genes de las cadenas pesadas, gen del receptor de célula T, etc.). Mediante las técnicas de Southern Blot y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede estudiar la presencia de reordenamientos en pequeñas poblaciones de células y reconocer el carácter neoplásico de las proliferaciones de linfocitos B o T(108).

La presencia de determinadas translocaciones cromosómicas también se pueden diagnosticar empleando sondas para bcl-2, c-myc y bcl-1, incluso cuando no se consigan obtener metafases valorables para estudios citogenéticos. También se dispone de sondas capaces de reconocer el genoma del virus de Epstein Barr(109).

Las técnicas de biología molecular también pueden ser útiles para demostrar monoclonalidad cuando no son aplicables, u ofrecen dudosos resultados, las técnicas habituales de inmunohistoquímica o citofluorometría(110) y para el estudio de enfermedad mínima residual(108) (111).

10.4.- Citometría de flujo:

La citometría de flujo puede aplicarse en el estudio de los linfomas para realizar el inmunofenotipaje de superficie de muestras frescas disgregadas y averiguar el tipo y el grado de diferenciación celular, estudio de enfermedad mínima residual, para el estudio del contenido en ADN o ARN y para el análisis de las fases del ciclo celular y de la fase proliferativa(112) (113).

Los principios básicos y el empleo de la citometría de flujo para el estudio del contenido en ADN y estudio del ciclo celular se tratan más adelante.

11.- Tratamiento de los linfomas:

El tratamiento de los linfomas está sometido a continua revisión y es objeto de discusión de numerosos artículos. Recientemente se ha publicado un trabajo que revisa los conceptos clásicos y actuales del tratamiento de los linfomas([114](#)).

Cuando se diseña un programa de tratamiento para un paciente diagnosticado de linfoma, el clínico debe valorar la edad del paciente, su estado general, la extensión del linfoma y el tipo histológico del tumor.

	Fármacos
Primera generación: COP, CVP CHOP CHOP-Bleo BACOP COMLA C-MOPP HOP	CTX, VCR, PRED CTX, ADR, VCR, PRED CTX, ADR, VCR, PRED, BLM BLM, ADR, CTX, VCR, PRED CTX, VCR, MTX-RF, ARA-C CTX, VCR, PRED, PROC ADR, VCR, PRED
Segunda generación: COP-BLAM ProMACE-MOPP M-BACOD	CTX, VCR, PRED, BLM ADR, PROC PRED, MTX-RF, ADR, CTX. ETP, MCL, VCR, PRED, PROC MTX-RF, BLM, ADR, CTX, VCR, DXM
Tercera generación: COPBLAM III ProMACE/ CytaBOM MACOP-13	CTX, VCRI, PRED, BLMI, ADR, PROC PRED, MTX-RF, ADR CTX, ETP, ARA-C, BLMA, VCR, MTX-RF MTX-RF, ADR, CTX, VCR, PRED, BLM

Tabla 1-14.- Esquemas quimioterápicos más utilizados en el tratamiento del linfoma.
 CTX: ciclofosfamida; VCR: vincristina; PRED: prednisona;
 ADR: adriamicina; BLM: bleomicina; MCL mecloretamina;
 MTX-RF: metotrexato-rescate folínico; ARA-C: citarabina,
 PROC: procarbacin; ETP: etopósido; DXM: dexametasona;

VCRI: vincristina en infusión; BLMi: bleomicina en infusión.

La mayor parte de los pacientes serán sometidos a regímenes de quimioterapia con o sin radioterapia acompañante. La cirugía puede ser curativa en los casos raros de linfoma extranodal localizado(60) (115), pero no debe emplearse como único tratamiento de la enfermedad(114).

11.1.- Enfermedad localizada:

Los pacientes con linfoma localizado, entendiendo como tal aquel que involucra un única localización o dos localizaciones adyacentes, de tamaño inferior a 10 centímetros y sin síntomas sistémicos, tienen buenas posibilidades de curación con la terapia adecuada. La elevada probabilidad de curación se asocia a todos los tipos histológicos, aunque ha sido estudiada sobretodo en linfomas de histología agresiva (E,F,G,H, y J de la *Working Formulation*)(116) y se ha demostrado que un subgrupo de los mismos pueden ser curados sólo con radioterapia. Sin embargo, los procedimientos de estadiaje necesarios para identificar, con certeza, a este subgrupo de pacientes no pueden ser aplicados a todos ellos que frecuentemente tienen edades avanzadas.

En los pacientes de los que sólo se dispone del estadiaje clínico, el uso de quimioterapia adyuvante después de la irradiación local, ha demostrado un incremento en el porcentaje de curación(117). Recientemente, con el uso de poliquimioterapia que incluya doxorubicina se ha conseguido un elevado porcentaje de curaciones (superior al 75 %) en pacientes con linfomas agresivos en estadio I o en estadio II, pero con baja carga tumoral.

Los pacientes en los que la radioterapia puede producir complicaciones importantes se pueden tratar con ciclos completos de quimioterapia. En los pacientes que renuncien a recibir quimioterapia, o bien, que por su estado general o edad se considere que la quimioterapia puede ser demasiado agresiva, puede emplearse radioterapia extendida, siendo en algunos subgrupos curativa(114).

11.2.- Enfermedad diseminada:

Se consideran enfermos con enfermedad diseminada aquellos en estadio II y con una elevada carga tumoral, en estadio III o en estadio IV(114).

Los pacientes que se encuentran asintomáticos en el momento del diagnóstico pueden ser seguidos de cerca sin tratamiento. En algunos pacientes con linfomas de bajo grado el tratamiento puede no ser necesario durante largos periodos de tiempo y, según algunas series, alrededor del 20 % de los pacientes puede presentar remisiones espontáneas de su enfermedad(118). De todos modos, estos pacientes deben ser seguidos y controlados a la búsqueda de progresión de la enfermedad y aparición de complicaciones indeseables que recomienden la instauración de tratamiento.

Los pacientes con linfoma de bajo grado que presentan síntomas en el momento del diagnóstico pueden ser mejorados con tratamiento. Para éstos pacientes las opciones de tratamiento incluyen radioterapia, quimioterapia o poliquimio-terapia, con o sin radioterapia acompañante(114).

Un subgrupo de pacientes con linfomas de grado intermedio o alto pueden ser curados con combinaciones de quimioterápicos(119). Varios equipos han estudiado en ensayos randomizados la eficacia de las diferentes pautas de poliquimioterapia con objeto de averiguar si alguna de ellas producía mejores resultados. Las opiniones son controvertidas, pero parece que no hay evidencia que un régimen sea claramente superior sobre los demás(119) (121).

El empleo de las dosis totales de fármaco de los protocolos de tratamiento parece ser de importancia. Los pacientes con avanzada edad o radioterapia extensiva en ocasiones

reciben dosis iniciales reducidas de quimioterapia, en ellos la respuesta al tratamiento se encuentra reducida y sin embargo algunos estudios demuestran que no se disminuye la toxicidad relacionada con el tratamiento(114) (122).

Con los programas de tratamiento disponibles en la actualidad se pueden obtener remisiones completas de un 60 a un 80 % de los pacientes adultos con linfomas agresivos en estadio II, III o IV. Además, pueden conseguirse largos periodos libres de enfermedad de un 30 a 50 % de los casos. La intensidad del tratamiento puede ser incrementada con el uso de factores de crecimiento hematopoyético, de modo, que se puede aumentar la dosis o acortar los intervalos de tratamiento, usar altas dosis de fármacos mieloablativos con o sin irradiación total y realizar trasplantes autólogos de médula ósea(123).

11.3.- Tratamiento en niños:

La mayor parte de linfomas en niños son de célula pequeña no hendida, linfoblásticos o difusos de célula grande. El porcentaje de curaciones en niños es superior al de los adultos que se encuentren en similares estadios de linfomas de iguales características histológicas(124). La explicación a éste fenómeno no está todavía aclarada. En general, los niños, reciben mayores dosis de tratamiento, pero puede que exista una diferencia intrínseca entre los linfomas que se producen en los niños y los que se observan en los adultos.

En los niños parece que la administración intratecal de quimioterapia es suficiente como profilaxis en los linfomas de alto grado. Además parece, en los casos de linfoma localizado, que la quimioterapia aislada puede ser tan efectiva como la quimioterapia más radioterapia(125).

11.4.- Tratamientos en los pacientes con edad avanzada:

En algunos estudios se ha demostrado que la edad se comporta como un importante factor pronóstico. El peor pronóstico de lo enfermos con más de 65 años parece relacionado con una pobre respuesta al tratamiento y un aumento de la toxicidad del mismo. Además, los fallecimientos no relacionados con la enfermedad linfomatosa o la terapia son frecuentes en los pacientes ancianos, aunque estas muertes no deben ser contabilizadas como tales en los estudios de supervivencia. Se han desarrollado regímenes específicos para los pacientes ancianos y parece que algunos de ellos pueden curarse del linfoma(114).

11.5.- Tratamiento en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana:

Los pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana desarrollan con más frecuencia linfomas. Usualmente son linfomas de célula grande de tipo B o linfomas de célula pequeña no hendida y que, no rara vez, pueden encontrarse en localizaciones extranodales infrecuentes como en el cerebro(31).

Algunos pacientes con buen estado pueden ser curados del linfoma, aunque la supervivencia se encuentra acortada por la quimioterapia agresiva y además su pronóstico a largo término sigue siendo malo debido a su infección por el virus de la inmunodeficiencia humana(126).

La elección de la quimioterapia sigue siendo controvertida(114) y hay grupos que prefieren regímenes agresivos, mientras que otros grupos han encontrado que la respuesta a la quimioterapia menos intensiva puede ser superior.

11.6.- Tratamiento de la enfermedad recurrente:

Más del 50 % de los pacientes diagnosticados de linfoma no van a ser curados de su enfermedad con el tratamiento inicial(114).

En los pacientes que recidivan de su linfoma, ésto no significa que no puedan volver a

responder al tratamiento standard inicial y obtener una segunda remisión(127).

En los pacientes con linfomas de grado intermedio o alto que no se consigue la remisión tras el primer tratamiento o que recidivan de su enfermedad el pronóstico empeora, a pesar de nuevas tandas de tratamiento. Parece ser que uno de los factores pronósticos más importantes en estos pacientes es la consecución de la remisión completa tras el primer tratamiento y la duración de la remisión(128).

El tratamiento con altas dosis de quimioterapia y el trasplante autólogo de médula ósea puede, en ocasiones, curar a estos pacientes. Desafortunadamente, este procedimiento sólo es aplicable a una minoría de los pacientes dada su edad y su poca tolerancia a tratamientos agresivos(128).

12.- Factores pronósticos en linfoma:

El objetivo de los sistemas de clasificación histopatológica, estadiaje y caracterización clínica, bioquímica y biológica de la enfermedad es identificar subgrupos de pacientes que tengan una buena respuesta al tratamiento y, por lo tanto, un buen pronóstico.

Se ha demostrado que la respuesta inicial al tratamiento y la consecución de la remisión completa son factores que pueden predecir la evolución del paciente(129) (130), pero, evidentemente, no es posible ensayar la respuesta del linfoma a los fármacos disponibles, antes del tratamiento, Por ello, es necesario poseer otros indicadores que permitan estimar el comportamiento del linfoma y el pronóstico de la enfermedad.

Algunos autores han demostrado que la edad avanzada es un factor que empeora el pronóstico del linfoma en subgrupos de pacientes(82) (131), aunque se ha sugerido que podría ser debido más que a la neoplasia en si misma a la toxicidad derivada del tratamiento con poli quimioterapia. En otros estudios la edad no ha resultado ser un dato que modificara el pronóstico de los enfermos(130).

La histología del tumor es básica para el diagnóstico del linfoma, pero además ha demostrado relación con el pronóstico de la enfermedad. Los enfermos con linfomas de bajo grado tienen mejor pronóstico que los de alto grado, aunque éstos últimos sean potencialmente curables(132). Las clasificaciones de Rappaport, Kiel, Lukes-Collins y la *Working Formulation* permiten separar eficazmente a los pacientes en subgrupos con implicación pronóstica(45). Se han establecido códigos en la *Working Formulation* para facilitar la comparación de resultados entre diferentes grupos(133).

El estudio de la extensión del tumor por medio del estadiaje, valoración de la carga tumoral, afectación de médula ósea, localización extranodal, LDH y beta-2-microglobulina reflejan, de modo indirecto, la capacidad de proliferación y diseminación del linfoma(114). El estadio ha sido considerado como un factor pronóstico clásico, aunque actualmente su valor es discutido(132) y se han intentado buscar otros parámetros que reflejen mejor, en el linfoma no hodgkiniano, la extensión del tumor. La carga tumoral es un importante factor pronóstico(82). Los valores elevados de LDH se relacionan con un peor pronóstico del linfoma por pobre respuesta al tratamiento y acortamiento de la supervivencia(57) (81) (82). Algunos estudios muestran que la beta-2-microglobulina puede comportarse como factor pronóstico en determinados tipos de linfomas(134).

Figura 1_4

El estudio de la biología celular de las células neoplásicas en el linfoma puede tener implicación pronóstica. El inmunofenotipo puede ser útil si se compara en subgrupos histológicamente o clínicamente homogéneos y algunos autores han demostrado que los linfomas B tienen mejor respuesta al tratamiento y supervivencia superior a los T(135) (136), otras series de enfermos no corroboran estos resultados. Se han realizado algunos estudios acerca del valor pronóstico del cariotipo en linfoma y se ha encontrado una importante

relación entre determinadas anomalías citogenéticas y la histología del tumor. Los resultados con controvertidos y, según algunos autores, por ahora las alteraciones citogenéticas no ofrecen información adicional al patrón histológico(114). El estudio de la ploidía y proliferación celular por medio de citometría estática o de flujo pueden ofrecer información suplementaria acerca del comportamiento del tumor. Los linfomas de elevada malignidad tienen mayor porcentaje de células proliferantes que los de bajo grado(137). Un elevado porcentaje de células en fase S ha sido asociado, por algunos autores, con mejor pronóstico del linfoma por mayor sensibilidad a la quimioterapia, mientras que otros estudios sugieren que una fase S elevada se asocia a peor pronóstico por recidiva precoz y acortamiento de la supervivencia(138). Algunos estudios sugieren que el índice de proliferación puede separar subgrupos pronósticos dentro de grupos homogéneos de linfomas, aunque son necesarios más estudios para determinar el verdadero valor de la ploidía y el índice de proliferación en el pronóstico de los linfomas(137).

La utilidad de la cuantificación del ADN, estudio de las fases del ciclo celular y de la proliferación celular, en el linfoma, se aborda al final de la revisión.

B.- Citometría de flujo:

1.- Introducción:

La técnica de la citometría de flujo fue desarrollada, en la década de los años sesenta, en los Estados Unidos y Alemania como un avance importante en la investigación de la biología celular(139). Pero es desde hace aproximadamente 10 años en que los recientes avances en inmunología, oncología y hematopatología, con el advenimiento de la tecnología de los anticuerpos monoclonales(140), han permitido la aplicación de la citometría de flujo a la investigación biomédica, tanto a nivel básico como clínico, de un modo generalizado.

Se define como citómetro de flujo al aparato que es capaz de medir componentes y propiedades de células y organelas celulares (partículas biológicas) que fluyen en una suspensión celular. Los sorters tienen las mismas prestaciones y posibilidades que los citómetros de flujo, pero con la capacidad adicional de separar partículas selectivamente de la suspensión líquida(139).

Los principios básicos de la citometría de flujo son sencillos(141). Es esencial disponer de una suspensión celular de modo que la dificultad para obtenerla es un factor limitante para el empleo de la técnica. La posibilidad de conseguir una suspensión celular individualizada varía con el tejido: la sangre y la médula ósea no necesitan casi procesamiento, el tejido linfóide precisa de una mínima disgregación mediante machacado, filtrado o pases por una jeringa con agujas de decreciente calibre, mientras que la mayor parte de los tejidos epiteliales y otros tumores sólidos necesitan una disgregación cuidadosa, usualmente con técnicas enzimáticas, seguidas de filtrado. Los tejidos pueden ser disgregados y teñidos en fresco o después de estar almacenados en congelación; también pueden ser recuperados a partir de bloques de parafina.

Las células o partículas (núcleos, organelas, cromosomas) son unidas a colorantes específicos fluorescentes que son capaces de excitarse con una fuente luminosa de alta energía.

La suspensión celular convenientemente procesada y teñida se inyecta en la cámara de flujo del citómetro de flujo que está hidrodinámicamente enfocada para que las células pasen individualmente una detrás de la otra en «fila india» a través de un punto en que éstas interactúan físicamente con un haz de luz monocromática dispersando la luz en todas las direcciones. La luz dispersada hacia adelante (llamada forward scatter a 0 grados) está relacionada con el tamaño de la célula. La que lo está a 90 grados del grado de refracción (denominada light scatter a 90 grados) está relacionada con la estructura interna y la

complejidad citoplasmática.

La excitación de los fluorocromos ocurre en el punto de interacción de la célula y el haz lumínico dando como resultado la emisión de una luz de longitud de onda diferente a la inicial. Esta luz es recogida a 90 grados, siendo dirigidas las longitudes de onda seleccionadas mediante espejos (dicróicos) adecuados a detectores fotomultiplicadores, mientras que las longitudes de onda no deseadas son bloqueadas por filtros ópticos. Si se dispone de múltiples fuentes de luz más de un fluorocromo puede ser unido a las células permitiendo, de este modo, medidas fluorescentes simultáneas de varios parámetros en una sola célula.

Las señales eléctricas analógicas son convertidas en señales digitales y son procesadas por un ordenador con el objeto de generar histogramas correlacionando los parámetros deseados y efectuar el análisis de los mismos.

Si se requiere una separación celular, entonces las propiedades de las células a ser seleccionadas son programadas en el computador. La partícula después de ser analizada abandona la cámara de flujo laminar y, en ese momento, por acción de las vibraciones de un cristal piezoeléctrico el flujo se rompe en gotitas. Si la gota contiene una célula de las características deseadas y programadas es cargada positiva o negativamente y posteriormente desviada por un campo electromagnético entre dos placas de alto voltaje a colectores que permiten una posterior investigación de sus propiedades. A este proceso de separación en el citómetro de flujo, en atención de las características fluorescentes de las células, se le conoce con el nombre de «sorting».

[Figura 1_5](#)

Las ventajas que proporciona la citometría de flujo frente a otros métodos que trabajan con fluorocromos incluyen la objetividad, elevada sensibilidad y velocidad de análisis, posibilidad de realizar mediciones simultáneas sobre una sola célula y separación celular en los sorters. Las desventajas y limitaciones son los altos costes de instrumentación y la incapacidad de visualizar las células que estamos analizando.

2.- Historia de la citometría de flujo:

La historia y desarrollo de la citometría de flujo, desde sus orígenes hasta la actualidad, ha sido motivo de revisión en tratados de citometría. En algunos de ellos me he basado para la redacción de este apartado [\(139\)](#) [\(142\)](#).

La citometría de flujo se inició, hace aproximadamente 25 años, con la intención de representar un avance en el proceso de contar y medir el tamaño de partículas o células en poblaciones no homogéneas.

1934	Moldavan	Contador de hematíes mediante sistema fotoeléctrico
1941	Kielland	Patenta un sistema similar al anterior
1949	Coulter	Contaje y medida del tamaño celular por cambios en la
1953	Crosland-	Diseñan la cámara de flujo laminar
1953	Parker-Host	Contaje diferencial de hematíes y leucocitos
1965	Katmentsky	Utilizando la cámara de Crosland y Taylor mide el contenido en ADN
1965-69 ¹	Fulwyler	Adapta un sistema de deflexión electrostática para separación celular
1965-69 ¹	Van Dilla	Diseño de la configuración ortogonal en citometría. Mide las fases del ciclo celular
1969	Hulet	Utiliza el sorting para separar células en función de su señal de
1975	Reinhertz	Aplicación de los anticuerpos monoclonales a la citometría de
1977	Loken	Medida simultánea de dos fluorescencias con un solo láser
1982	Oi	Introducción de la ficobiliproteínas para marcar anticuerpos
1983	Hardy	Medida simultánea de tres señales fluorescentes
1976-93	Varios	Desarrollo de técnicas y procedimientos para aplicar la citometría de flujo al estudio de la biología celular

Tabla 1-15.- Breve historia de la citometría de flujo.

En los años 30 se describen los primeros contadores celulares automatizados, pero los equipos que trabajan en éste campo de investigación se encuentran con importantes problemas técnicos. En 1953, Crosland y Taylor diseñan una cámara de flujo basada en la inyección de la muestra en el seno de un fluido de arrastre a través de un capilar que se estrecha y centra el flujo de la misma. Con este sistema se evitaban dos grandes problemas técnicos: el capilar tiene mayor diámetro con lo que su obstrucción es mucho más difícil y se permite mejor el enfoque de la muestra con la fuente de luz. Estos autores sentaron las bases de las cámaras que se usan en la actualidad.

Katmentsky, en 1965, usó la espectrofotometría (luz absorbida) dentro de sistemas de citometría de flujo para cuantificar ADN y también la medida multiparamétrica de luz dispersada para evaluar características de los núcleos. Fue el primero en emplear histogramas biparamétricos y algo más tarde desarrolló un sistema capaz de separar selectivamente partículas en función de datos citométricos; se trataba de un sorter neumático. Con el tiempo, se va introduciendo el empleo de sustancias fluorescentes que permiten una mejor señal/ruido que los colorantes de absorción.

En 1967-69, Van Dilla describe el primer citómetro de flujo con configuración ortogonal usando la cámara descrita por Crosland y Taylor. Demostraron la relación existente entre ploidía e intensidad de fluorescencia en la cuantificación de ADN y producen histogramas donde se pueden visualizar las fases del ciclo celular (G0G1, fase S, G2M).

Fulwyler describe el proceso de sorter electrostático en 1965, basándose en la tecnología de las impresoras por chorro de tinta. Es el sistema empleado en la actualidad por la mayoría de sorters.

Durante los años 60 y 70, se producen avances en la tecnología y su aplicación a la citometría de flujo, pero hasta final de los años 70 y principio de los 80 existían pocas aplicaciones de la citometría de flujo de interés biológico. Los esfuerzos se dirigían

principalmente en mejorar las prestaciones de los instrumentos que se estaban desarrollando. Desde los años 80 se han producido importantes avances en las aplicaciones de la citometría de flujo en la investigación médico-biológica.

3.- Características generales de los citómetros de flujo:

Para la lectura, por citometría de flujo, las células son teñidas con fluorocromos que se unen específicamente a uno o varios constituyentes celulares. Las células son inyectadas en un flujo líquido laminar y pasan, una a una, por un punto de medida iluminado con luz de alta intensidad (láser). Cada célula, en el punto de interacción, produce una señal fluorescente que es de intensidad proporcional a su contenido en fluorocromo. Uno o varios detectores recogen la fluorescencia emitida y transforman la señal a pulsos eléctricos. También se recoge la luz dispersada por la célula que es función del tamaño, forma y estructura de la misma(143).

A diferencia de otras técnicas, el citómetro de flujo mide características celulares individuales de un gran número de células (no una media de los resultados) y además permite medir características de poblaciones en muestras heterogéneas(144).

3.1.- El sistema óptico:

El sistema óptico está constituido por la fuente de iluminación (que puede ser un láser o una lámpara de arco voltaico), los filtros necesarios para discriminar la señal lumínica y llevarla al detector adecuado y, por último, los fotodetectores que se encargan de recoger la luz.

Existen láseres sintonizables o de emisión fija que pueden ser refrigerados por agua o aire. Actualmente, cada vez más, se emplean los láseres de argón de baja intensidad (10-15 mW) refrigerados por aire y que pueden ser usados en la mayor parte de aplicaciones citométricas. También se pueden usar lámparas de arco de mercurio o xenón, pero su emisión decrece con el tiempo y son menos estables. Las ventajas más importantes de los citómetros con láser frente a los de lámpara son un mejor rendimiento para FITC, posibilidad de iluminación con dos o más láseres y posibilidad de separación celular(145).

Los instrumentos basados en una fuente de iluminación láser tienen una configuración ortogonal, es decir, que en ellos son perpendiculares los ejes de iluminación, detección y paso de muestra. El láser por acción de lentes tiene una sección elíptica y la intensidad de la luz decrece hacia la periferia de forma gaussiana. Su grosor se considera hasta que su intensidad ha disminuido del centro del haz al valor $1/e(2)$, el cual es aproximadamente $100 \mu\text{m}$ de ancho(145). Algunos citómetros poseen dos o más láseres como fuentes de iluminación. La fluorescencia se recoge a 90 grados por lentes de alta apertura numérica. Recoge del 5 al 10 % de la fluorescencia emitida, pero con un espejo de diseño especial se puede llegar a recoger hasta el 90 %. Por la lente que recoge la señal fluorescente también se recoge la señal de la luz dispersada a 90 grados (right angle scatter) que es llevada, mediante espejos, a su detector específico y que es función de la refractividad y estructura celular. Entre la lente colectora y los fotodetectores se debe situar una placa con un agujero (pinhole) para aumentar la relación señal/ruido. Existe un detector para la luz dispersada hacia adelante o dispersión frontal de la luz (low angle scatter), que es función del tamaño celular(146).

La cámara de flujo puede ser cerrada o abierta según la lectura se realice en el seno de la cámara o una vez el líquido ha abandonado. Las cámaras cerradas producen menos señal de ruido que cuando la lectura es en aire.

Los instrumentos basados en lámparas de arco como fuente de iluminación emplean una lámpara de mercurio o xenón con objetivos de alta apertura numérica y epiluminación. En algunos casos pueden detectar la dispersión de luz frontal(139).

Se usan filtros ópticos para eliminar y separar la luz recogida y que, en definitiva, son los responsables de la especificidad de la lectura de los fotodetectores. En citometría de flujo se emplean los filtros coloreados o de absorción que se usan como filtros de paso largo o «long pass» y que se caracterizan porque absorben la luz de determinada longitud de onda. También se emplean los filtros de interferencia o dicróicos que reflejan la luz que tiene una longitud de onda superior o inferior a la que dejan pasar(147). Los filtros son los que seleccionan la longitud de onda que llega a cada fotodetector.

Figura 1_6

La luz producida por la fuente de iluminación, después de interaccionar con las partículas en la cámara de flujo, excita la fluorescencia de los fluorocromos unidos a ella y es dispersada. Esta es recogida por la lente colectora y mediante los filtros ópticos de la bancada óptica es llevada a los fotodetectores. Existen dos tipos de detectores de la luz: los fotomultiplicadores y los fotodetectores diodos o de estado-sólido(145).

Los fotomultiplicadores se usan generalmente para la detección de la señal de fluorescencia y luz dispersada a 90 grados. Tienen una buena relación señal/ruido, aunque se eficiencia cuántica es baja.

Los fotodetectores diodos se usan para detectar la dispersión frontal de la luz. Son muy resistentes y eficientes para señales fuertes, pero tienen una baja relación señal/ruido, lo que los hace poco útiles para señales débiles.

3.2.- Sistema hidráulico y electrónico:

Constituyen los componentes hidráulicos de los citómetros de flujo: la cámara de flujo, y el sistema de presión y de inyección de la muestra

Las cámaras de flujo son muy diferentes según sea la fuente de iluminación de aparato. Los citómetros con fuente de iluminación láser utilizan modificaciones del diseño de la cámara de flujo descrita por Crosland y Taylor. Hay dos tipos: las cerradas y las abiertas (detección en «chorro en aire»). Las cámaras cerradas consiguen flujos laminares con velocidades de flujo inferiores y producen menos ruido lumínico, en cambio no permiten una fácil eliminación de los coágulos o suciedad y en ningún caso sorter electrostático, aunque pueden separar células mediante dispositivos de tipo neumático(148).

El los citómetros con fuente de iluminación de arco hay varios sistemas de cámara, ya sean, abiertos o cerrados. Generalmente, los sistemas son más complejos que los de los citómetros basados en la iluminación tipo láser.

El sistema de presión y de inyección de la muestra se encarga de adquirir la muestra e inyectarla junto con el fluido de arrastre en la cámara de flujo. Es muy importante que la velocidad de inyección de la suspensión celular sea constante, si bien, la velocidad óptima depende de la aplicación, y las presiones estables. Hay dos sistemas fundamentales: por presión en la que se crea una presión en el tubo de la muestra que obliga a que ésta fluya hacia la cámara de flujo o por inyección isovolumétrica por jeringa en la que la muestra es aspirada por una jeringa que después la inyecta en la cámara de flujo. El sistema isovolumétrico permite velocidades de paso de muestra y contar las células si se conoce la cantidad de muestra inyectada, pero tiene un volumen de aspiración de muestra limitado(145).

3.3.- Componente electrónico:

Cuando la luz incide en los fotodetectores se produce una respuesta de los mismos en forma de señal eléctrica. Los pulsos detectados por los fotodetectores pasan a un amplificador y, después, son convertidos de señal analógica a digital (ADC). Se puede efectuar amplificaciones lineales a 256 canales (8 bits), 1024 canales (10 bits) o logarítmicas (3 ó 4

décadas)(149).

Existe la posibilidad de seleccionar un umbral de señal de modo que las señales inferiores al umbral sean deshechadas. Además, se pueden crear regiones selectivas de adquisición en que pueden ser evaluadas determinadas señales producidas por células que se encuentren dentro de rangos predeterminados de otras señales(150). Después del procesamiento informático de la señal se obtienen histogramas mono o biparamétricos(144).

Los datos obtenidos con la lectura por citometría de flujo pueden ser guardados en forma de histograma o como bases de datos en las que se registra en forma de lista para cada evento la señal producida para cada parámetro evaluado. A esta última forma de almacenar los datos se le denomina modo lista o «list mode».

3.4.- Prestaciones de los citómetros de flujo:

Las prestaciones de los citómetros de flujo se evalúan en función de varios parámetros(145):

3.4.1.- Sensibilidad cantidad mínima de moléculas de un fluorocromo determinado que pueden ser medidas con cierta precisión o resolución. Para la luz dispersada es el tamaño o índice de refracción menor que puede ser medido con cierta precisión. Depende de muchos factores, incluso del fluorocromo. Se puede decir que la sensibilidad aumenta si se disminuye la velocidad del flujo manteniendo constante el diámetro del flujo interno de la muestra.

3.4.2.- Resolución (expresado como coeficiente de variación o CV) es la reproductibilidad de la señal producida por idénticas células o partículas.

3.4.3.- Velocidad de medida es la velocidad media máxima a la que las células pueden ser medidas sin exceder de una frecuencia determinada de coincidencias, es decir, dos células detectadas como una sola. En los citómetros láser oscila alrededor de 5.000 células/segundo.

4.- Separación por citometría de flujo de partículas biológicas:

Los citómetros de flujo denominados «sorters» separan células individualizadas en función de características determinadas, cuando han pasado fluyendo por uno o más mecanismos detectores(151).

Tienen menor potencia que las técnicas de separación masiva(152) (centrifugación, etc.), pero permiten separaciones que estas técnicas no consiguen(153). Una alternativa a la separación por citometría de flujo es la separación celular mediante anticuerpos recubiertos con partículas magnéticas y la aplicación de campos magnéticos potentes que retienen las células a las que se les han unido específicamente los anticuerpos marcados(154).

La aplicación general de los sorters es la separación de subpoblaciones definidas por análisis citométrico(155).

4.1. Prestaciones de los sorters:

Para caracterizar a los sorters por sus prestaciones se emplean los términos de recuperación, pureza y eficiencia(156).

4.1.1.- Recuperación es el porcentaje de partículas sorteadas, recogidas en el colector, del total de partículas activadas por el sorter.

4.1.2.- Pureza es el porcentaje de partículas sorteadas recogidas que cumplen los criterios seleccionados en función del total sorteado.

4.1.3.- Eficiencia es el porcentaje de partículas activadas para sorter en función del total de partículas que cumplirían los requisitos que fluyen.

Los primeros tipos de sorters fueron los sorters neumáticos que empleaban jeringas o energía acústica para desviar el flujo líquido durante algunos milisegundos y con él la célula seleccionada. Actualmente, existen algunos aparatos comerciales que ofrecen esta alternativa

de separación celular. Son sistemas cerrados que son seguros en cuanto a contaminación y evaporación, son poco complicados, baratos y adaptables. En contraposición su velocidad es muy baja y sólo permiten separar una población seleccionada.

Los sorters de deflexión electrostática son sistemas complejos y necesitan de un gran soporte tecnológico e informático. Funcionan de un modo similar a las impresoras por chorro de tinta y son los de mayor difusión. El primero fue descrito por Fulwyler en 1965. Bonner fue, en 1972, el primero en aplicar el sorter en función de señales fluorescentes. El transductor para la formación de gotas es un cristal piezoeléctrico acoplado al vibrador; la energía que se usa es muy baja y no causa daño celular(157). El proceso de la ruptura del flujo es función de la velocidad de oscilación y del diámetro del orificio de sorter. Existen unos dispositivos para visualizar la formación de las gotas (cámara estroboscópica), compensación de carga de las gotas, detector de coincidencias y abortador de sorter(156).

Algunos centros especializados poseen sorters de alta velocidad que pueden reducir de 5 a 8 veces el tiempo necesario de sorter. Un sorter convencional produce aproximadamente de 20.000 a 40.000 gotas/segundo y procesa alrededor de 2.500 partículas/segundo; en los sorters de alta velocidad se producen hasta 200.000 gotas/segundo y se pueden procesar 16.000 partículas cada segundo. El aumento de la velocidad se consigue disminuyendo el diámetro del orificio de sorter, aumentando la frecuencia de vibración hasta 220 Hz y la velocidad del flujo hasta 50 metros/segundo. La situación descrita, en las cámaras de flujo convencionales, conduciría a la pérdida del flujo laminar, pero en los sorters de alta velocidad se mantiene con diseños especiales de las cámaras y con trayectos de alineamiento e interacción luz-célula muy cortos(158) (159).

5.- Procesamiento de las muestras:

Debido a las especiales características de los citómetros de flujo la muestra a analizar debe encontrarse en forma de suspensión monodispersa. Hay muestras como la sangre periférica, médula ósea o otros fluidos biológicos que precisan de un mínimo procesamiento; en cambio los tumores sólidos o las muestras parafinadas necesitan de una disgregación más o menos intensa (mecánica, enzimática, etc.). En función de la muestra biológica que deseemos teñir y analizar por citometría se aplican protocolos diferentes(160). En ocasiones, puede ser conveniente o necesario enriquecer la concentración celular(161) en la muestra antes de su procesamiento por citometría ya sea para obtener una concentración celular adecuada para la incubación con los reactivos o para acelerar el proceso de sorting.

5.1.- Preparación de suspensiones celulares/nucleares para citometría de flujo:

Un factor limitante, común en citometría de flujo, es la disponibilidad de una suspensión celular para estudiar sus características y relacionar o extrapolar sus resultados a fenómenos «in vivo». Para ello, la suspensión celular debe ser representativa del tejido, debe ser de alta calidad, con pocos agregados, pocos detritus y bajo coeficiente de variación de las señales en poblaciones homogéneas. Hay que preservar las características de los componentes celulares que deseemos estudiar y se necesita de suficiente muestra.

5.2.- Disgregación de material fresco (células):

Hay muestras como la sangre periférica o la médula ósea que no necesitan prácticamente procesamiento, salvo la destrucción de los hematíes, cuando éstos están presentes y no son objeto de estudio. Si el tejido es sólido se emplean métodos mecánicos o enzimáticos basados en tripsina, proteasas, colagenasas, hialuronidasas, ADNasa o cocktails de ellas. Todos estos procedimientos tienen limitaciones ya que producen cierta alteración de las características celulares o antígenos de membrana y varían, considerablemente, su

efectividad según el tipo de tejido. Si queremos analizar el inmunofenotipo de superficie debemos emplear sólo métodos mecánicos y si se desean estudiar antígenos intracelulares hay que permeabilizar la membrana celular para acceder al interior de la célula(162), aunque existen protocolos para conseguir simultáneamente el marcaje de antígenos de superficie e intracelulares(163) (167), así como, el doble marcaje de ADN y antígenos celulares. Sobre las suspensiones celulares obtenidas se puede, por citometría de flujo, realizar diversos estudios.

5.3.- Disgregación de muestras y tumores frescos para obtener núcleos para la cuantificación de ADN:

La preparación de suspensiones nucleares es una alternativa para el análisis del ADN. Vindelov fue el primero en desarrollar un procedimiento aplicable de forma rutinaria(168), aunque otros equipos habían puesto a punto métodos de tinción(169). Es importante hacer notar que los métodos líticos no conducen a una disminución del número de mitosis ya que éstas se retienen, puesto que ha sido comprobado por microscopía, por puentes inter cromosómicos(168).

5.4.- Disgregación de material parafinado:

Generalmente, son procedimientos basados en el método desarrollado por Hedley en 1983(170) (171). Se ha constatado que sirven para gran cantidad de tejidos y para muestras archivadas con más de 10 años de antigüedad. De un 10 a un 15 % de los casos se obtienen coeficientes de variación superiores al 10 % que no permiten el análisis del ciclo celular.

Figura 1_7

Se obtienen histogramas casi idénticos si el tumor es procesado en fresco o después de parafinización lo que indica que no hay pérdida celular selectiva durante el procesamiento, además, los índices de ADN son casi idénticos y sólo se advierte una disminución del porcentaje de aneuploidías en tumores con índices de ADN muy bajos (por el aumento del coeficiente de variación de los picos)(172); la existencia de falsas aneuploidías es excepcional(173). Se pueden procesar y estudiar las muestras con patrones internos de ploidía (hematíes de pollo) o células no tumorales(174) (175), pero en los tumores suele quedar algo de población normal residual que sirve de control de diploidía.

Para analizar los histogramas de ADN obtenidos partir de muestras parafinadas o frescas hace falta el uso de software especial que permita la discriminación de ruido continuo por núcleos cortados y una aproximación matemática para el cálculo de las fases, puesto que el histograma monoparamétrico que se obtiene presenta superposición entre las fases G0G1 y S, y entre S y G2M(176) (180).

6.- Fluorocromos para citometría de flujo:

Los fluorocromos ofrecen un método sensible para obtener información acerca de la estructura, función y vitalidad de las células.

Hay dos procedimientos para la obtención de marcadores fluorescentes empleables en citometría: uno es mediante la unión covalente del fluorocromo a moléculas que se unen específicamente a componentes celulares y, segundo, con fluorocromos que varían sus características en función del microambiente que les rodea.

Fluorocromo	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Láser (nm)
Fluoresceína	495	520	488 Argón
Ficoeritrina (R)	564,495	576	488 Argón
Rojo Texas	596	620	568 Kriptón
Aloficocianina	650	660	630 Helio-Neón
Tetrametilrodamina	543	570	568 Kriptón
Cumarina	357	460	U.V.
Ioduro de propidio	495,342	639	488 Argón
Bromuro de etidio	493,320	637	488 Argón
Naranja de acridina	503	530 (ADN) 640	488 Argón
Mitramicina	445	569	458 Argón
Cromomicina	430	580	457 Argón
Hoeschst 33342	395	450	U.V.
DAPI	372	456	U.V.
Rodamina 123	485	564	488 Argón
Fura-2	362	515	U.V.
Indo-1	349	480	U.V.

Tabla 1-16.- Longitud de onda de excitación y emisión máxima de algunos fluorocromos usados en citometría de flujo.

El fluorocromo ideal debería tener un alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación (probabilidad de absorber la luz), un alto rendimiento cuántico (emisión de luz), una elevada fotoestabilidad y un corto estado de excitación. Si el fluorocromo va a estar unido a otra molécula, por ejemplo un anticuerpo monoclonal que le confiera la especificidad de marcaje, el fluorocromo debe ser insensible a cambios de pH, polaridad y microambiente(181).

Cuando se ilumina a las células con longitudes de onda inferiores a 500 nm se produce, a parte de la excitación y emisión de luz por de los fluorocromos unidos a la misma, una alta autofluorescencia celular debido a las flavinas.

6.1.- Técnicas inmunofluorescentes: marcadores fluores-centes de unión covalente:

Son fluorocromos que reaccionan y se usan para marcar proteínas, lípidos, o bien otras moléculas biológicas. Deben ser suficientemente selectivos y reactivos. Se emplean cromóforos con grupos isotiocianato, clorotrizinil y ésteres de succinimida por su elevada capacidad de unión.

El fluorocromo más empleado es isotiocianato de fluoresceína (FITC). Otros que se han descrito y empleado son: rodamina, rojo texas, cianinas (láseres diodos), etc., pero el más famoso es la ficoeritrina (de la familia de las ficobiliproteínas) por su gran absorción,

rendimiento y fotoestabilidad; además, puede ser excitado a 488 nm, pero emite más allá del espectro de la fluoresceína, permitiendo el doble análisis con un solo láser.

Algunos avances recientes en el campo de los fluorocromos son el uso, en citometría de flujo, de sondas de ADN unidas a fluoresceína, los anticuerpos anti-bromodeoxiuridina para el estudio del ciclo celular(182) (184), los anticuerpos contra antígenos que aparecen en células en ciclo celular(184) (187) y la unión de anticuerpos a varios fluorocromos (ficoeritrina-rojo texas, ficoeritrina-Cy-3 o Cy-5, ficoeritrina-aloficocianina) de modo que con una láser de 488 nm se excita a la ficoeritrina, la cual emite luz que es captada por el segundo cromóforo, que a su vez emite en una longitud de onda superior y diferente a la de la ficoeritrina (por un fenómeno de transferencia de energía). Ello permite con un solo láser el estudio simultáneo de tres o más antígenos celulares(153) (188). Recientemente, se ha descrito la posibilidad de investigar, por citometría de flujo, la expresión de antígenos de superficie con anticuerpos marcados con oro coloidal en lugar de fluorocromos(189).

6.2.- Fluorocromos que se unen no covalentemente a estructuras celulares:

Son fluorocromos que debido a su especial composición molecular se unen a determinados componentes celulares, pero no de forma covalente.

6.2.1.- Marcadores del contenido en ADN y ARN según el tipo son más o menos específicos para el ADN, ARN o determinadas bases(190) (192). Se emplean el Hoescht, DAPI, DIPI, cromomicina A₃, olivomicina, mitramicina y otros. El naranja de acridina se une al ADN y ARN, pero tiene la particularidad de emitir en diferente longitud según al tipo de ácido nucleico al que está unido. De uso común es el yoduro de propidio que se excita con un láser de 488 nm y que se une al ADN por intercalación entre la doble cadena de bases.

6.2.2.- Marcadores del potencial de membrana son las cianinas y la rodamina 123(193). También son usados para marcar mitocondrias debido a la alta diferencia de potencial de su membrana.

6.2.3.- Marcadores de membrana y lípidos y marcadores que diferencian compartimentos con distinto pH. Son poco usados en citometría de flujo.

6.3.- Marcadores fluorescentes que son sensibles al microambiente que les rodea:

Ciertos fluorocromos pueden ser empleados para estimar las propiedades del ambiente en el que se encuentran puesto que varían su espectro de absorción o emisión en función de las características del microambiente que les rodea(193) (200). Se emplean para la determinación de diversos estados funcionales celulares: pH (6-carboxi-fluoresceína, 2,3-diciano-1,4-dihidroxi-benceno, hidroxipireno trisulfato), calcio (quin II, fura-2, indo-1), potencial red-ox (diclorofluoresceína, NADH, NADHP), actividad enzimática (substratos que por acción del enzima varían su fluorescencia o espectro), polaridad (anilino-naftalina-sulfato o ANS) y viscosidad/fluidez.

7.- Reproducibilidad y comparación de resultados: standards y controles:

7.1.- Standards o patrones de normalidad:

Un standard es un material estable que tiene unos valores determinados de fluorescencia o dispersión de luz. Se usan para alinear o calibrar las prestaciones del citómetro de flujo. Hay de comerciales o se los puede preparar uno mismo(201).

El uso de standards de alineamiento proporciona un buen método para detectar cambios y problemas en la configuración óptica y señal con el tiempo. El citómetro de flujo se considera alineado cuando se consigue una elevada fluorescencia o señal con un bajo coeficiente de variación para todas las señales o se llega a un compromiso entre ellas, porque a veces cuando una aumenta la otra disminuye.

Los citómetros de flujo ofrecen una información relativa, no absoluta. Para cuantificar hay que correlacionar los canales con resultados de muestras conocidas, es decir, calibrar y ajustar las escalas(202). El método más sencillo consiste en ajustar diariamente el voltaje del fotodetector y/o las ganancias para conseguir un pico de una intensidad determinada de un standard. Es el equivalente a reseleccionar el citómetro a una escala de intensidad relativa constante.

En las aplicaciones citométricas, con dos fluorescencias, nuestro objetivo es marcar las células con dos fluorocromos distintos que reflejen dos propiedades celulares diferentes y detectar la señal proporcional a la primera fluorescencia (FL1) en un detector y la de la segunda (FL2) en otro sin desviaciones producidas por interferencias de la señal. Los fluorocromos tienen espectros de emisión que en ocasiones se superponen y los filtros no son perfectos, por ello, los citómetros poseen un sistema informático de compensación o sustracción de señal(139).

Figura 1 8

El tiempo puede ser utilizado como control de calidad. En los citómetros que lo permiten se pueden hacer gráficas del número de células procesadas o del canal de fluorescencia a lo largo del tiempo. Se puede usar para ver la estabilidad de las mediciones del citómetro con el tiempo y detectar la presencia de algún problema en la adquisición o lectura.

La standardización del procedimiento de sorting persigue demostrar la validez de nuestras conclusiones que fundamentalmente dependen de la pureza del resultado ya que el tiempo sólo depende de la eficiencia del sorting. Se producen más gotas vacías que con células y generalmente se desvían tres gotas por evento activado. Si se desea mirar también la pureza se usan bolas de dos colores(203) y se establece una ventana de sorter sobre unas de ellas. Cuando el número de células a sortear debe ser preciso se pueden mezclar bolas con la muestra y calcular el porcentaje de recuperación de ellas, sabiendo éste, que se cuenta durante la separación, se asume que es el mismo que para las células y se calcula el número total de eventos a procesar para conseguir el número total de células deseadas. La monitorización en tiempo real de la velocidad de adquisición puede proporcionar información continuada de que no hay problemas en el correcto funcionamiento del citómetro y que no ha habido obstrucción parcial de la cámara o distorsión en la formación de las microgotas a separar(156).

Para poder comparar los resultados entre distintos centros o con el paso del tiempo hay que asegurarse que el citómetro funciona de modo continuado(204). Fundamentalmente, se emplean dos métodos: no variar las condiciones de lectura, registrar el canal medio del pico standard y hacer curvas de día a día o, como alternativa, fijar la posición constante del pico del standard variando las condiciones de lectura y hacer curvas de seguimiento.

7.2.- Controles:

Los controles son un material que produce unos resultados esperados o conocidos. Se usan para monitorizar las prestaciones o reproductibilidad de los reactivos y la calidad de los métodos de preparación celular. Los controles son importantes en los análisis de ADN e inmunofluorescencia. Generalmente, se usan controles de ploidía y controles de inmunofluorescencia positivos y negativos(201).

En la cuantificación de ADN y análisis de las fases del ciclo celular como control de ploidía se puede usar un control interno, procesado en el mismo tubo que la muestra, para descartar o asegurar aneuploidía y calcular el denominado índice de ADN, aunque también se pueden procesar el control y la muestra por separado, calcular las fases del ciclo celular del problema con la lectura de la muestra aislada y mezclar con el control para detectar

aneuploidía. Las mejores células de referencia son células diploides del mismo individuo e igual tejido, como alternativa se pueden usar células de diferente individuo pero igual tejido y, sinó, de diferente individuo y tejido(205). Si ninguna de las posibilidades anteriores es aplicable, por último, se pueden usar células de otra especie animal o partículas de látex.

Figura 1_9

Para realizar una buena lectura de ADN el citómetro de flujo debe hallarse en perfectas condiciones y el investigador debe ser cuidadoso en el proceso de preparación de la muestra y tinción, se deben usar controles(206) y el análisis e interpretación se debe realizar mediante el software adecuado(207).

En las técnicas de inmunofluorescencia el objetivo del análisis es el de identificar subpoblaciones celulares con una elevada especificidad. Se necesitan controles negativos para descartar unión inespecífica del fluorocromo y seleccionar el umbral de autofluorescencia. Son causas de tinción inespecífica los fragmentos Fc de la inmunoglobulinas, las células muertas y los restos celulares. Si se presentan problemas con el control negativo, se procurará procesar cuidadosamente las muestras preservando su viabilidad, utilizar fragmentos F(ab')₂, centrifugar el anticuerpo monoclonal para evitar agregados o eliminar las células muertas con doble marcaje con yoduro de propidio y diacetato de fluoresceína. Si a pesar de todo, se obtiene una distribución unimodal con considerable superposición entre el control negativo y el control positivo, podemos asumir que la tinción es específica pero de baja intensidad(208).

Los controles positivos son también esenciales para comprobar que la técnica funciona correctamente. Si no, cuando se obtienen unos resultados negativos en una muestra que se espera positiva puede ser que sea por alteración antigénica o un falso negativo por fallo de marcaje.

8.- El procesamiento de los datos:

Los citómetros producen una gran cantidad de información que puede ser guardada en forma de histogramas (histogramas monoparamétricos de 256 ó 1024 canales, histogramas biparamétricos de 64 x 64 = 4096 puntos) o en «modo lista» (list mode) que consiste en guardar toda la información obtenida para cada evento, de modo, que se pueden modificar las regiones de análisis y reconstruir los histogramas en función de nuevos parámetros de selección, así como, enviar y reanalizar la información con ordenadores externos al citómetro de flujo(209) (210). Para evitar interpretaciones subjetivas y aprovechar al máximo la información obtenida es necesario la ayuda informática y usar pruebas matemáticas estadísticas.

Los datos univariantes suelen ser representados como un histograma monoparamétrico. Un método rápido y sencillo de interpretación es la observación del histograma y la ayuda del soporte informático del citómetro para calcular el porcentaje de eventos en regiones seleccionadas(210).

Hay que tener en cuenta la resolución del histograma para la discriminación de la señal y el coeficiente de variación. Así, en un histograma de 100 canales con un coeficiente de variación del 2 % no se podrían discriminar 32 picos de señales de diferente intensidad. Cuando se desea una información precisa interesa un histograma con el mayor número de canales posibles. Para el estudio del inmunofenotipo, en que interesa positividad o negatividad, escalas pequeñas con pocos canales pueden ser suficientes.

Un problema especial, son las muestras con baja fluorescencia que se diferencian poco del negativo, aunque generalmente una subpoblación puede ser claramente identificada si tiene un elevado número de células o alta señal fluorescente. Para la interpretación se emplean métodos de normalización y sustracción de la señal con comparaciones de curvas

(Kolmogorov-Smirnov)(211).

La transformación o uso de escalas logarítmicas es útil en caso de que la señal sea muy amplia o se halle muy dispersa puesto que agrupa los canales de señal alta y permite diferenciar igualmente el control negativo.

En algunos casos, por la dificultad de interpretación de los datos y la elevada información que contienen, es necesario aplicar modelos matemáticos. En ellos se emplean conversiones matemáticas de los histogramas y sus datos a curvas o ecuaciones y se usan en el análisis de las distribuciones de ADN y modelos de cinética celular(212).

La representación de dos parámetros se realiza mediante histogramas biparamétricos con dos ejes y el número de eventos se representa como densidad de puntos, colores, o líneas isométricas.

En el análisis multiparamétrico, la principal dificultad es la limitación humana de poder manejar cómodamente y de forma comprensible información relativa a más de tres variables simultáneamente. Se necesitan modelos matemáticos de componentes principales, agrupación y clasificación para analizar la compleja información(211). La información se representa en forma de múltiples histogramas mono/biparamétricos, cubos tridimensionales(213) y matrices de datos.

9.- Aplicación de la citometría de flujo para la identificación de antígenos celulares, técnicas inmunofluorescentes e inmu-nofenotipaje:

Durante el proceso de diferenciación y maduración celular, se expresan genes que son necesarios para el correcto desarrollo y función celular. Algunos de los productos específicos del gen se expresan en la superficie celular, mientras que otros son intracelulares. El estudio, por citometría de flujo, de éstos productos permite caracterizar subpoblaciones celulares(214).

La respuesta inmune se desencadena cuando, en un animal, una sustancia extraña (antígeno) entra en el organismo. Una parte de los linfocitos B se estimulan y secretan unas proteínas llamadas inmunoglobulinas (anticuerpos) que neutralizan las sustancias extrañas(215). Las pruebas inmunológicas han experimentado un importante avance gracias al desarrollo de la tecnología de los anticuerpos monoclonales(140). Los anticuerpos tienen dos terminaciones: una responsable de la especificidad o Fab y otra región constante o Fc(215). Tienen una exquisita especificidad y pueden distinguir entre pequeñas diferencias de estructuras tridimensionales. El fluorocromo que se conjuga al anticuerpo actúa como un simple marcador con él que se pueden marcar distintos anticuerpos, lo que facilita la standardización del sistema óptico del citómetro.

La unión del anticuerpo a la célula no la destruye y permite separar células para posterior caracterización funcional o bioquímica en función de marcadores celulares de superficie(157).

Hay factores limitantes que deben ser tenidos en consideración cuando se aplican técnicas de inmunofenotipaje en citometría de flujo como que la frecuencia relativa de las células condiciona la estrategia de marcaje para su búsqueda(155) y la elevada diferencia de expresión en la superficie celular de los antígenos(216), incluso en poblaciones clonales(217). La estrategia del inmunofenotipaje también depende de lo precisos que deban ser los resultados(218) (221).

Los fluorocromos usados, mayoritariamente, en citometría son el isotiocianato de fluoresceína que se excita bien a 488 nm, la tetrametilrodamina y sus derivados. La tetrametilrodamina está siendo reemplazado por la ficoeritrina ya que la primera no se excita bien con láseres iónicos. La ficoeritrina es ideal para el doble marcaje con fluoresceína, aunque es de difícil conjugación con los anticuerpos. Otros fluorocromos son el rojo texas,

con un pico de absorción a 596 nm y alofocianina que absorbe a 650 nm y emite a 660 nm(181). Combinaciones de los cromóforos anteriores y otros se emplean para triple y cuadruple marcaje con uno o varios láseres(153) (188) (222) (223).

El principal factor limitante de las técnicas de inmunofluorescencia no suele radicar en el equipo sino en la muestra por marcaje inespecífico y autofluorescencia(208). El marcaje inespecífico se puede reducir utilizando sólo la parte F(ab')₂ de los anticuerpos evitando, en la muestra o en la adquisición de datos, la presencia de células muertas que captan el anticuerpo de modo inespecífico(224) (225). También es útil el procesamiento de controles negativos, la selección de la región de señal inespecífica y la corrección informática de solapamiento espectral en doble marcaje. La autofluorescencia depende del tipo celular y de sus estado de activación; se atribuye a las flavinas y otros coenzimas, aunque también depende de la longitud de onda del láser y se considera que disminuye al aumentar la longitud de onda de la fuente de iluminación.

Aumentar la frecuencia relativa de las células deseadas en una población heterogénea mejora su discriminación de las células restantes. Esto se puede conseguir purificando las células antes de su procesamiento por citometría (lisis de los hematíes(226), centrifugación(161) (227) (228), etc.) o bien con análisis multiparamétrico (emplear dispersión frontal y lateral de luz para diferenciar a los linfocitos(226) o células(229) (230), la resistencia eléctrica para discriminar en función de tamaño, yoduro de propidio para eliminar las células muertas(225), etc.).

La partículas o células deben ser analizadas inmediatamente después del marcaje inmunofenotípico o deben ser fijadas. Las células vivas se guardan en medios de cultivo y con un 0,1 % de NaH₃ a 4 grados para evitar cambios en las condiciones biológicas. Si se puede y no se precisa conservar la viabilidad celular, las células pueden fijarse en un 1 % de paraformaldehído en tampón fosfato y ser guardadas a 4 grados en oscuro, así, no disminuye la fluorescencia ni cambian las características de dispersión de la luz y se puede demorar la lectura varios días(208).

10.- Estudio del contenido en ADN y fases del ciclo celular por citometría de flujo: Figura 1 10

La medición del ADN ha sido una de las primeras y más empleadas aplicaciones de la citometría de flujo(142) (231). Las células malignas, en algunos tumores humanos, poseen frecuentemente alteraciones en el contenido de su ADN que pueden ser detectadas por citometría de flujo. El estudio del contenido en ADN y de las fases del ciclo celular son útiles para el estudio de la biología celular y han demostrado tener una relación diagnóstica y pronóstica en determinadas neoplasias humanas(143) (150) (160) (232) (237).

Se dispone de muchos fluorocromos que se unen específicamente a las bases del ADN. La señal fluorescente es proporcional a la unión del fluorocromo al ácido nucleico que es de tipo estequiométrico.

Los fluorocromos que se usan para la cuantificación de ADN por citometría de flujo se clasifican en función de su mecanismo de unión. Los intercalantes, como el bromuro de etidio, yoduro de propidio y naranja de acridina, se unen al material genético de doble cadena intercalándose entre las dos bases; los de unión preferente a las bases adenina-timina, como DAPI, DIPI y Hoescht y; por último, los de unión preferente a las bases citosina-guanina, como la mitramicina, olivomicina, y cromomicina A₃.

10.1.- Grupos generales de fluorocromos:

Se describen cuatro grupos básicos que tienen algunas diferencias, sobre todo en el espectro de absorción, lo que debe ser tenido en cuenta puesto la posibilidad de utilizarlos

viene limitada por la fuente de iluminación del citómetro. Los fluorocromos más ampliamente utilizados en la cuantificación de ADN y estudio de las fases del ciclo celular son los siguientes(190):

10.1.1.- Phenantidium son del tipo del bromuro de etidio y yoduro de propidio. Tienen especificidad por el ADN y ARN de doble cadena, de modo, que la muestra requiere de tratamiento con ARNasa si sólo se desea medir ADN(238). El espectro de excitación se encuentra en el azul/verde-rojo. Precisan de células muertas y fijadas puesto que no atraviesan membranas celulares íntegras. La intensidad de la señal y la especificidad de la unión de ve disminuida por la unión secundaria inespecífica a los grupos fosfato, incubación con proteasas, presencia de ADN en estructura Z y por el doble marcaje con bromodeoxiuridina. La tinción no se afecta por el pH del medio ni la composición de bases. El yoduro de propidio, al no atravesar membranas íntegras, puede emplearse también para discriminar células viables de no viables(225).

10.1.2.- Bismenimidazoles y afines son del tipo Hoescht, DAPI y DIPI. Tienen elevada especificidad por el ADN y se unen a las bases adenina-timina. Su excitación se produce en el ultravioleta-azul. Pueden teñir células vivas puesto que son capaces de atravesar membranas celulares íntegras. Disminuye la intensidad y especificidad de la tinción el pH ácido (que aumenta la unión secundaria a los grupos fosfato), la concentración de colorante en exceso y la presencia de bromodeoxiuridina. El DAPI y DIPI se usan para hacer las bandas cromosómicas.

10.1.3.- Cromomicina y similares como la cromomicina A₃, mitramicina y olivomicina. Se unen a las bases citosina-guanina del ADN. La excitación se produce en el espectro ultravioleta-azul/verde. Requieren del ion magnesio para la unión al ADN y pueden teñir células vivas. La tinción del ADN no se afecta por el pH. Se han usado en combinación con bismenimidazoles para realizar el cariotipo por citometría de flujo(239).

10.1.4.- Otros fluorocromos son la quinacrina (que es intercalante) y el naranja de acridina (unión al ADN y ARN bicatenario que, además, tiene la particularidad de que el espectro de emisión es diferente si está unido a ADN o a ARN).

Hay una serie factores que afectan a la unión del cromóforo al ADN(190). El tipo de muestra a analizar, dependiendo de la composición de bases del ADN, de la presencia de bases modificadas, como la bromodeoxiuridina o metilación y de la estructura del ADN, influyen en los resultados que se obtienen si se comparan tinciones con diferentes fluorocromos que tienen afinidad selectiva por determinadas bases.

Una unión fuerte entre las proteínas cromosómicas y el ADN dificulta la incorporación del fluorocromo al material genético. Determinados fluorocromos no atraviesan la membrana citoplasmática, como el yoduro de propidio, y otros tienen tendencia a unirse a componentes intracelulares. La química, cinética y equilibrio de la unión depende de la concentración de sales y de la fuerza iónica del medio. La cromomicina necesita la presencia de magnesio en el medio para unirse al ADN y el pH ácido favorece la unión secundaria inespecífica del Hoescht.

Para conseguir una tinción específica y correcta se requiere de especial cuidado en la concentración del fluorocromo y las condiciones y el tiempo de incubación.

10.2.- Estudio de la aneuploidía y del ciclo celular:

En el ciclo celular se distinguen varias fases: la fase de reposo (G₀), fase de síntesis proteica (G_{1a}), síntesis de ARN (G_{1b}), síntesis de material genético o ADN (fase S), de nuevo síntesis de proteínas (G₂) y, por último, división celular (M)(240). Según el tipo y función de la célula, ésta tiene más o menos actividad proliferativa y el ciclo puede variar según diversas condiciones: fármacos, radiaciones, etc.

Figura 1_11

10.2.1.- Técnicas para medir la síntesis de ADN; estudio del ciclo celular la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de fluorocromo que es proporcional a la cantidad de ADN de la célula(205). Hay cierta variación entre el resultado teórico y el obtenido debido a la variación biológica en la tinción y en la lectura, por ello, se define el coeficiente de variación (CV) que nos da una idea de la semejanza de los resultados obtenidos a la realidad y que hace necesario el empleo de programas informáticos para discriminar correctamente el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular.

A partir del histograma monoparamétrico de los canales de fluorescencia del cromóforo que se ha unido al ADN, para calcular la fase S se pueden emplear varios métodos informáticos: rectangular, lineal, polinomial, Gauss(207). Se puede hacer doble marcaje con yoduro de propidio y la técnica de la bromodeoxiuridina-antibromodeoxiuridina para conocer la síntesis real y el tiempo de duplicación(183).

10.2.2.- Detección de aneuploidía el término aneuploidía, por citometría de flujo, significa la presencia de una población con un contenido en ADN diferente a un control de células semejantes y en igual fase del ciclo celular(205). El término de aneuploidía citométrica no es semejante al de aneuploidía citogenética y la ausencia de aneuploidía por citometría de flujo no excluye la presencia de alteraciones citogenéticas que no conlleven a un aumento de la cantidad total de ADN (translocaciones balanceadas, etc.)(241).

Se define como Índice de ADN (ID) al cociente entre la moda del pico G0G1 de la población problema y la moda del pico G0G1 del control (en %). A partir de ahí, se define la siguiente terminología: diploide si ID igual 1, aneuploide si ID diferente de 1, hiperploide si ID superior a 1, hipoploide si ID inferior a 1, poliploide si ID es igual a 1.5, 2, 2.5, etc. y haploide si ID es igual a 0.5(160).

Un problema importante en la lectura de algunas muestras es la discriminación de dobles que interfieren y aumentan, artefactualmente, la fase de mitosis. La solución se debe buscar en el procedimiento técnico, en criterios de standardización y en soluciones citométricas del análisis de la señal(242). Hay citómetros que pueden mediante la señal de la altura, anchura y área del pico de fluorescencia discriminar entre células en G2M y dos células unidas en G0G1.

Se define como criterio de aneuploidía la presencia de dos picos en canales diferentes de fluorescencia con dos poblaciones en la muestra(205). Se acepta que el coeficiente de variación de la población aneuploide suele ser mayor que la euploide, de modo, que si se obtiene un histograma con dos picos y desconocemos cuál de ellos es el diploide se aceptará que se está ante la presencia de una población hiperploide o se escogerá como aneuploide el pico con un mayor coeficiente de variación. Ante un histograma dudoso se puede buscar la presencia de células en la región de G2M de la población problema dudosamente aneuploide, la existencia de proporcionalidad entre las fases de los ciclos celulares o comprobar la existencia de aneuploidía con diferentes técnicas.

Con una buena técnica y el citómetro en condiciones óptimas se pueden conseguir coeficientes de variación que permitan separar grupos de células con índices de ADN de 0,95 a 1,05; en su defecto al menos de 0,9 a 1,1, aunque, generalmente, se obtienen mejores histogramas con muestras frescas que parafinadas.

Figura 1_12

Figura 1_13

Figura 1_14

C.- Técnicas inmunológicas, inmunocitoquímicas y citomorfológicas para la identificación de antígenos celulares y estudio de la proliferación celular

1.- Técnicas inmunológicas:

1.1.- Introducción:

Las técnicas inmunológicas tienen como objeto la detección, identificación y localización de componentes celulares mediante el reconocimiento de la reacción entre éstos y los anticuerpos monoclonales o policlonales correspondientes, formando el complejo antígeno anticuerpo en el lugar de la reacción(243).

1942	Coons	Introduce la inmunofluorescencia
1961	Singer-Schich	Marcaje de anticuerpos con ferritina para estudio por microscopía eléctrica
1966	Nakane-Pierce Avrameas-Uriel	Marcan anticuerpos con peroxidasa se rábano
1969	Mason	Introduce el método del "puente" en las técnicas inmunohistoquímicas
1970	Stemberger	Describe la técnica de la peroxidasa anti-peroxidasa
1977	Heggeness-Ash	Localizan componentes celulares mediante la afinidad existente entre la avidina y la biotina
1978	Mason	Introduce la técnica de la fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina. Doble marcaje
1970-93	Varios	Desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica

Tabla 1-17.- Breve historia de la inmunohistoquímica.

Esta unión, en las técnicas inmunocitoquímicas, se visualiza por medio de una reacción citoquímica enzimática(215) (244) (250). Aprovechando la especificidad de las reacciones inmunes y la formación del complejo antígeno-anticuerpo existen otras técnicas que evidencian la reacción mediante marcadores no enzimáticos(98) (154) (247) (252) (fluorocromos, metales electrodenso, isótopos radiactivos, biotina, haptenos).

1.2.- Los anticuerpos:

Los anticuerpos son moléculas sintetizadas por los linfocitos B en respuesta a un estímulo antigénico y tienen la propiedad de unirse al antígeno que indujo su formación de una manera altamente específica.

Existen cinco clases de anticuerpos: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE y, dentro de cada clase, existen varias subclases. La estructura básica de todas ellas es común y está formada por cuatro cadenas polipeptídicas: 2 pesadas (H) idénticas y 2 ligeras (L), también idénticas y más cortas que las primeras. Las cadenas se ensamblan adoptando una configuración espacial en «Y». La secuencia de las cadenas pesadas es la que determina la clase y subclase de Ig. De cadenas ligeras sólo hay dos tipos, denominándose kappa y lambda(243).

Figura 1_15

Las cadenas pesadas y ligeras presentan una porción constante o segmento C y una

porción variable o segmento V. Las porciones variables que se encuentran en el extremo amino terminal son las responsables de la especificidad antigénica de los anticuerpos(253).

Las inmunoglobulinas pueden ser digeridas por enzimas proteolíticos obteniéndose diversos fragmentos que reciben distintos nombres. De la digestión con papaína se obtienen dos fragmentos iguales denominados fragmentos fijadores de unión con el antígeno (Fab) y un tercer fragmentos denominado fragmento cristalizante (Fc) que no se combina con el antígeno. De la digestión con pepsina se obtiene un fragmento $F(ab')_2$ que tiene capacidad de unirse al antígeno y un fragmento Fc' (215).

Cuando se induce una respuesta inmune la formación de anticuerpos es siempre policlonal, es decir, que se producen anticuerpos específicos contra el antígeno, pero con distintos sitios de combinación con los diferentes epitopos y con diferentes grados de complementariedad para cada uno de ellos(254).

1.2.1.- Anticuerpos policlonales son anticuerpos desarrollados frente a diferentes determinantes antigénicos de un mismo antígeno. Son producidos por inmunización activa con antígenos altamente purificados en conejos, cerdos, etc.; se utiliza el suero de estos animales tras purificaciones destinadas a eliminar la probabilidad de uniones inespecíficas. El resultado es un antisero capaz de reconocer distintos epitopos de un mismo antígeno(215).

1.2.2.- Anticuerpos monoclonales con el fin de evitar los problemas que presentaba la producción y utilización de anticuerpos monoclonales se ha desarrollado la técnica de producción de anticuerpos monoclonales(140). Para ello se fusionan células procedentes de una línea mielomatosas de ratón con linfocitos B normales de ratón previamente inmunizados contra el antígeno contra el cual deseamos obtener el anticuerpo monoclonal. Las células resultantes de la fusión serán híbridos (o hibridomas) que habrán heredado de los linfocitos normales la capacidad de producir anticuerpos y de las plasmáticas tumorales su inmortalidad(140) y, de esta forma, disponen en grandes cantidades de anticuerpos específicos.

1.3.- Métodos de marcaje de anticuerpos:

Al enfrentar un anticuerpo a un determinado tipo celular, si éste presenta el antígeno correspondiente, se unirá a él formando un complejo antígeno-anticuerpo. Para poder detectar la unión deberemos utilizar marcadores que la hagan visible. El proceso de unión de los distintos marcadores al anticuerpo se denomina conjugación y los anticuerpos obtenidos unidos covalentemente al marcador anticuerpos conjugados(255).

Existen diversos tipos de marcadores y en función del que se emplee se definen las técnicas de inmunofluorescencia y citometría de flujo, inmunocitoquímicas, oro coloidal, autorradiografía, etc.. Todas las técnicas persiguen la localización de antígenos celulares y, salvo pequeñas diferencias, todas son útiles para la investigación de antígenos celulares contra los cuales dispongamos de anticuerpos específicos(154) (256) (259).

En las técnicas inmunohistoquímicas las enzimas más utilizadas son la peroxidasa(260) y la fosfatasa alcalina(261) (263) en forma de complejos PAP (peroxidasa-antiperoxidasa) y FAAFA (fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina), si bien en hematología y, sobre todo en muestras frescas no parafinadas, existe preferencia por la fosfatasa alcalina debido a que algunas de las células hematológicas presentan actividad de peroxidasa endógena que es preciso bloquear y éste bloqueo puede perjudicar a los antígenos celulares(264) (266). Con cada técnica puede identificarse un antígeno por muestra, pero se han descrito métodos inmunohistoquímicos que permiten la identificación simultánea de dos o más antígenos en la misma muestra citológica o corte histológico(267) (268), combinaciones de métodos citoquímicos e inmunocitoquímicos(269) y dispositivos automatizados para la técnica de la FAAFA(270).

Existen diversos métodos de marcaje. El método directo es el más sencillo en el que el anticuerpo primario (aquel que se une al antígeno) específico se encuentra conjugado con el marcador. Para visualizar si ha tenido lugar la reacción y con ello evidenciar que una célula determinada expresaba el antígeno que se investiga bastará desarrollar la reacción citoquímica correspondiente o visualizar si se expresa el marcador unido al anticuerpo. En el método indirecto, el anticuerpo primario no se halla conjugado; para visualizar si ha tenido lugar la formación de antígeno-anticuerpo se debe utilizar un segundo anticuerpo conjugado con el marcador dirigido contra el anticuerpo primario. En el método indirecto se evita la conjugación del primario con lo que no se ven alteradas la afinidad ni la especificidad contra el antígeno y se amplifica la reacción, con lo que se aumenta la especificidad y sensibilidad de método(243) (271).

[Figura 1_16](#)

Se recomienda el empleo de fragmentos $F(ab')_2$ como anticuerpo primario, secundario o puente para evitar la unión específica de anticuerpo por el fragmento F_c (112).

2.- Estudio de antígenos celulares:

2.1.- Introducción:

La aplicación de técnicas inmunológicas para la detección de componentes que se expresan de modo diferente en estirpes celulares diversas ha supuesto un gran avance en la caracterización celular y, sobre todo, en hematología. Actualmente, podemos determinar la línea celular y el grado de maduración(272) (273), la respuesta a estímulos o moduladores a determinados estímulos(274) y la presencia de aberraciones antigénicas en células tumorales(275) (277). Por ejemplo, a pesar de la uniformidad morfológica de los linfocitos, gracias a los métodos inmunológicos, es posible su diferenciación en varias subpoblaciones en diferente estado de diferenciación o función en base a la presencia de marcadores en la membrana o en el citoplasma diferentes(50) (278).

Se dispone de un gran número de anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra antígenos expresados en células hematológicas. Estos anticuerpos han sido estudiados en reuniones de trabajo (Workshops) celebrados en París (1982), Boston (1984), Oxford (1986) y Viena (1989). Actualmente se conocen 78 grupos de diferenciación antigénica (CD) que agrupan anticuerpos monoclonales de características similares y/o idénticas y que se han definido por un determinado número(279) (281).

La evaluación de los anticuerpos se realiza mediante técnicas inmunofluorescentes de marcaje de superficie y lectura, generalmente, por citometría de flujo, inmunoprecipitación de células marcadas e inmunohistoquímica de secciones tisulares. En cada reunión del grupo de trabajo de antígenos de diferenciación de leucocitos humanos se analizan anticuerpos enviados por laboratorios participantes de todo el mundo(282).

Un grupo o CD puede incluir una serie de anticuerpos que reconozcan distintos epitopos de una molécula y por tanto sus propiedades funcionales, bioquímicas; su reactividad con las células hematopoyéticas puede no ser idéntica. Los CD se distribuyen de la siguiente forma: 12 CD de antígenos linfoides T, 17 CD de antígenos linfoides B, 11 CD de antígenos mieloides, 10 antígenos megacariocíticos y plaquetares, 6 CD de activación, siendo el resto de CD contra antígenos no específicos o células NK.

	Expresión antigénica		Expresión antigénica
CD1a	LT común, sub LB, c. dendríticas	CD41	plat (gp IIb/IIa), MK plat (gp
CD1b	LT común, sub LB, c. dendríticas	CD42a	plaquetas (gp IX), MK
CD1c	LT común, sub LB	CD42b	plaquetas (gp Ib)
CD2	recp LFA-3, LT, algunos NK	CD43	LT, PMN, cerebro
CD2R	LT activados	CD44	LT, PMN, RBC, cerebro,
CD3	LT inmunocompetentes		
CD4	recp HLA-II, LT h/c, recp HIV	CD45	Panleucocitario (LCA)
CD5	LT, sub LB (LLC)	CD45RA	sub LT, NK, LB
CD6	LT	CD45RB	sub T, PMN, monocitos
CD7	LT	CD45RO	sub T, LB, PMN, monocitos
CD8	recp HLA-I, LT s/c	CD46	fibroblastos, leucos, plat,
CD9	pre-B, monocitos, plaquetas	CD47	pancelular (Ag asociado al
CD10	CALLA, PMN	CD48	Panleucoario
CD11a	LFA-1, LT, PMN, monocitos	CDw49b	plat activ, LT, colageno R
CD11b	LGL, recp C3br, PMN, monocitos	CDw49d	monos, LT, LB, timocitos, etc
CD11c	subpoblación de LB, NK, PMN,	CDw49f	plaquetas, laminina
CDw12	monocitos, PMN, plaquetas	CDw50	Panleucocitario
CD13	CFU-C, monocitos, PMN	CD51	plaquetas, cadena alfa VNR
CD14	monocitos, alg PMN	CDw52	leucos, epitelio, esperma
CD15	PMN, alg monocito	CD53	leucocitos MEM-1
CD16	recp IgG Fc, NK, PMN	CD54	monocitos, células de Kupffer,
CDw17	PMN, monocitos, plaquetas	CD55	DAF
CD18	leucocitos	CD56	NK
CD19	Pan-B	CD57	NK sub LT, sub LB, cerebro
CD20	LB	CD58	leucocitos, LFA-3
CD21	recp C3d, EBV, LB	CD59	LY6
CD22	LB, HCL	CDw60	sub T, etc
CD23	recp II IgE Fc, LB activados	CD61	plaquetas, gpIIIa
CD24	LB, PMN	CD62	plaquetas activadas
CD25	receptor de IL-2, LB activados,	CD63	plat activ, monos, lisosomas

CD26	LT activados	CD64	recp I IgG Fc, monocitos
CD27	sub LT	CDw65	PMN, monocitos
CD28	sub LT	CD66	PMN, fosfoproteínas
CD29	sub T4, LB, monocitos	CD67	PMN
CD30	c. Reed-Sternberg, LT y LB	CD68	macrófagos, macrof tisulares
CD31	PMN, monocitos, plat, LB, alg LT	CD69	AIM, activación LT
CDw32	recp II IgG Fc, monos, PMN, LB	CDw70	LB-LT activados, células de
CD33	progenitores mieloides	CD71	receptor de la transferrina,
CD34	progenitores mieloides	CD72	Pan-B
CD35	LB, PMN, monocitos	CD73	Pan-B (débil), alg LT
CD36	monocitos, plaquetas	CD74	Pan-B, monos (débil)
CD37	LB, alg macrofagos y LT	CDw75	LB maduros, sub LT
CD38	timocitos, LT activ, plasmáticas	CD76	LB maduros, sub LT, PMN
CD39	sub LB, macrófagos	CD77	LB activados,
CD40	LB, carcinomas	CDw78	Pan-B, monocitos

Tabla 1-18.-CD definidos en la última reunión de trabajo celebrada en Viena.

Existen otros marcadores no agrupados dentro del sistema CD y que también son útiles en la caracterización celular hematológica e identificación de procesos oncohematológicos(52) (283) (289). Hay excelentes revisiones sobre el empleo de anticuerpos monoclonales para la caracterización de neoplasias hematológicas y numerosos equipos han aplicado las técnicas inmunológicas en oncohematología(52) (87) (276) (277) (290).

2.2.- Marcadores de diferenciación linfoide T:

El método clásico de identificación de linfocitos T consiste en la formación de rosetas espontáneas con hematíes de carnero(19). Actualmente se conoce ligando de la unión (LFA-3) y se ha caracterizado como la molécula de receptor CD2(280). Además, otros marcadores altamente asociados con diferenciación T son CD1, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8(94) (100) (102) (276). El HLA-DR no es específico de la línea T, pero indica inmadurez o activación celular(280).

El antígeno más precoz de célula T es el CD7 y se expresa durante toda su maduración, calificándose como pan T, pero también puede encontrarse en células mieloides inmaduras(276) (290).

La expresión de CD3 en citoplasma es anterior a su aparición en membrana y se considera un antígeno muy específico de línea celular T(276) (291) (292).

2.3- Marcadores de diferenciación linfoide B:

El método clásico de identificación de linfocitos B es la detección de inmunoglobulinas de superficie que aparecen en la membrana de los linfocitos B en estadios intermedios de su diferenciación(19).

El CD19 se considera como un antígeno pan B que aparece en estadios precoces de la diferenciación, persistiendo hasta la célula plasmática(293) (294) que expresa como marcadores característicos el CD38 e inmunoglobulinas en su citoplasma(295) (297). Otros marcadores propios de línea B son CD10, CD20, CD21, CD22, CD24. HLA-DR se encuentra durante toda la maduración de los linfocitos B excepto en las células plasmáticas(285) (298) (299).

CD34 se halla en estadios muy inmaduros(272) (300). CD 5, a pesar de ser un pan T en sangre periférica, se expresa en una subpoblación de células B y en los linfocitos B neoplásicos de la leucemia linfática crónica(19) (278).

2.4.- Marcadores de diferenciación de células mielomonocíticas, eritroides y megacariocíticas:

Los antígenos CD13, CD41/CD42 y la glicoforina A son marcadores asociados a la serie monomiocítica, megacariocítica y eritroide respectivamente(301) (303). El CD13 se considera un marcador temprano pan mielomonocítico; a lo largo de la diferenciación monocítica aparecen y desaparecen otros marcadores como CD15, CD11b, CD14, CD11c y en la serie mieloide aparecen CD15 y CD11c(304) (306).

En estadios muy precoces se expresan los antígenos CD33, CD34 y HLA-DR, desapareciendo con posterioridad de todas las líneas celulares, excepto HLA-DR que persiste en la serie monocítica- macrofágica hasta los elementos maduros(301).

[Figura 1_17](#)

[Figura 1_18](#)

3.- Estudio de la proliferación celular

3.1.- Introducción:

En el ciclo celular se distinguen varias fases: la fase de reposo (G0), fase de síntesis de proteínas y ARN (G1), fase de síntesis de material genético (fase S), nueva fase de síntesis de proteínas y preparación a la división (fase G2) y, por último, división celular (fase M). Según el tipo y función de la célula, ésta tiene más o menos actividad y proliferación(307).

Para el estudio de la proliferación celular se pueden emplear métodos morfológicos o inmunológicos. Los métodos inmunocitoquímicos para estudiar la proliferación celular se basan en el uso de anticuerpos que identifican antígenos que aparecen o incrementan su expresión durante todas o algunas fases del ciclo celular y que no se encuentran presentes en células fuera de ciclo (en fase G0)(308). No todos los anticuerpos miden el mismo componente del ciclo celular, sino que varía según el anticuerpo empleado y el antígeno contra el cual van dirigidos. Generalmente, las técnicas inmunocitoquímicas van a ofrecer información estática acerca del estado de proliferación de las células tumorales o no tumorales, pero no proporcionan información de la velocidad a que tiene lugar el ciclo celular y por lo tanto de la velocidad de proliferación(309).

[Figura 1_19](#)

Alguno de los métodos que se pueden utilizar para analizar la actividad proliferativa de una población celular son los siguientes:

3.2.- Contaje de figuras de mitosis:

Contar las figuras de mitosis es el método morfológico más antiguo, tradicional y fácil para cuantificar la proliferación celular.

El principal problema de este método barato, sencillo y poco sofisticado es la falta de standardización y reproductibilidad que presenta por el hecho de que solo identifica una pequeña proporción del total del compartimento proliferante de la población (fase de

mitosis) y de que está sometido a varios factores que pueden sesgar los resultados: interpretación subjetiva de las figuras de mitosis, preparación de la muestra (fijación, corte y tinción), limitación en el número de células contadas, heterogeneidad de la muestra, etc. Una forma de aumentar la reproductibilidad del método consiste en la evaluación de las mitosis en campos seleccionados al azar y en expresar el grado de proliferación celular como una razón entre las figuras de mitosis contadas por cierto número de campos de gran aumento, mitosis por área o bien mitosis por determinado número de células tumorales (índice mitótico)(308).

La cuestión de cómo expresar el grado de proliferación celular es común a todos los métodos morfológicos, posiblemente, el método más reproductible es precisar la proporción de células positivas para el marcador que identifica proliferación celular activa entre el total de células evaluadas(310).

A pesar de la baja reproductibilidad del método, éste aun es empleado como estudio morfológico de proliferación celular debido a su sencillez y es un componente de algunos sistemas de clasificación tumoral(310) (311).

3.3.- Marcaje con timina tritiada:

El uso del marcaje con timina tritiada (3H-TdR) permite evaluar directamente, bajo el microscopio, la proliferación celular debido a la incorporación de éste precursor durante la síntesis de ADN. Es un método directo y específico de síntesis activa durante la fase S de ADN y, además, permite realizar estudios dinámicos y medir la duración del ciclo celular(308).

Únicamente las células que están llevando a cabo síntesis activa de ADN incorporan 3H-TdR y, por lo tanto, aparecerán como positivas en el revelado final. Esta particularidad hace que esta técnica sea altamente específica de síntesis de ADN y ello la diferencia de las técnicas estrictamente morfológicas (contaje de mitosis), inmunológicas (Ki-67, PCNA, etc.) o que miden indirectamente las fases del ciclo celular (colorantes que se unen estequiométricamente al ADN). Este método es el procedimiento de referencia para evaluar proliferación celular.

Brevemente, la técnica consiste en incubar células o tejido fresco y viable con 3H-TdR durante una o dos horas (pulso de timina) en ambiente hiperbárico y con 5-fluorouridina o 2'-deoxi-5-fluorouridina (bloqueadores de la timidilato sintetasa para evitar la síntesis en incorporación endógena de timina). Después de una semana de exposición se revelan las autorradiografías y se cuentan las células positivas en las que se ha impresionado la emulsión fotográfica. El índice de marcaje con timina (labeling index) se expresa como el porcentaje de células positivas por el total de células contadas(312).

Los inconvenientes del método son que se necesitan células viables, es un método lento y complejo y está sometido a las variaciones propias de los métodos morfológicos (subjetividad, lentitud, heterogeneidad de la muestra, etc.). La necesidad de emplear isótopos radiactivos es otro problema adicional importante de la técnica(313).

3.4.- Bromodeoxiuridina:

La 5-bromodeoxiuridina (BrdU) es un análogo de la timina y puede ser utilizada para la evaluación de la proliferación celular(183).

La técnica es similar a la anterior y precisa de células viables que deben ser incubadas con BrdU en cámara hiperbárica y con bloqueadores de la timina sintetasa, pero soluciona algunos de los problemas del empleo de la 3H-TdR como la necesidad de radioisótopos y autorradiografía(313). Un paso crucial del procedimiento es la concentración de BrdU y el tiempo de incubación y, actualmente, se están llevando a cabo estudios para unificar criterios para poder comparar los resultados. Las células que están sintetizando activamente ADN

(fase S) incorporan BrdU en el lugar de la timina.

Gratzner, en 1982, desarrolló un anticuerpo monoclonal específico contra la BrdU de modo que las células que han incorporado BrdU a su ADN, al encontrarse sintetizando activamente ADN durante su incubación con el análogo de la timina, pueden ser identificadas mediante una reacción de inmunofluorescencia o inmunoenzimática. Si se emplea un revelado inmunoenzimático el conteo se realiza al igual que los otros métodos morfológicos y la positividad se expresa como el porcentaje de células positivas del total de células contadas, pero si se utiliza una reacción de inmunofluorescencia el conteo puede ser realizado por citometría de flujo(182) (184). El análisis por citometría de flujo proporciona objetividad, rapidez y reproductibilidad al conteo(182).

Diversos estudios han demostrado la correlación de los resultados de proliferación celular obtenidos ya sea por medio de la técnica de la 3H-TdR o de la BrdU-antiBrdU(314), así como la correlación del índice de marcaje con BrdU con la expresión de otros antígenos de proliferación(315). La técnica de la BrdU-antiBrdU se ha empleado con éxito en neoplasias hematológicas y extrahematológicas, demostrándose de utilidad para el estudio de la proliferación celular en muestras frescas de sangre periférica, médula ósea y tejido linfoide(315) (319).

Actualmente se han puesto a punto métodos que permiten, mediante el marcaje con BrdU y yoduro de propidio, realizar estudios por citometría de flujo de la duración del ciclo celular de poblaciones no sincronizadas(183).

3.5.- Ki-67:

En 1983, el equipo de Gerdes desarrolló un anticuerpo monoclonal llamado Ki-67 y que estaba dirigido contra una línea humana L428 desarrollada a partir de células de enfermedad de Hodgkin. El epítipo que reconoce el anticuerpo Ki-67 no es conocido todavía, pero hay estudios que sugieren que el antígeno forma parte de la matriz nuclear(320).

La inmunorreactividad aparece en la fase G1-media y persiste durante toda la fase S, G2 y M del ciclo celular. Las células en fase G0 o fase G1 temprana no son reactivas(321). Dada la especificidad de expresión de Ki-67 en las células que están en ciclo celular, la inmunotinción con Ki-67 proporciona información acerca de la fracción proliferante de una población tumoral(185).

La mayor parte de los estudios que investigan proliferación celular mediante Ki-67 se han empleado sobre secciones de tejido fresco y han demostrado una fuerte correlación entre la reactividad con Ki-67 y los índices de marcaje con 3H-TdR y BrdU-antiBrdU, así como con la proporción de células en fase S por citometría de flujo y otros marcadores de proliferación celular(310) (322) (325).

Otros autores encuentran discrepancias entre el índice de marcaje con Ki-67 y BrdU en tejidos humanos(326).

Algunas series han demostrado el valor pronóstico del índice de positividad con Ki-67 en tumores(325).

3.6.- Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA):

El PCNA o ciclina es una proteína nuclear no histónica de un peso molecular de 36.000 D que actúa como cofactor de la ADN polimerasa delta(327) (328). Varios grupos identificaron la misma proteína y le dieron diferentes nombres. En 1978, Miyachi, Fritzler y Tan describieron la identificación de un autoanticuerpo en el suero de pacientes afectados de lupus eritematoso sistémico que reaccionaba con antígenos nucleares de células que estaban proliferando(329). Independientemente, el equipo de Celis, en 1984, caracterizó por electroforesis bidimensional en gel a la ciclina, una proteína nuclear relacionada con el ciclo

celular en células quiescentes y proliferantes(330). Posteriormente, Mathews y otros equipos comprobaron que el PCNA y la ciclina eran unas proteínas nucleares idénticas(308). Desde entonces se han descritos varios AcMo dirigidos contra distintas formas de PCNA/ciclina(186) (331).

PCNA es una proteína reguladora de ciclo celular que aparece durante el ciclo celular y cuya velocidad de síntesis se corresponde directamente con la velocidad de proliferación celular(328). Autores han investigado la expresión de PCNA a lo largo del ciclo celular de células de cultivos sincrónicos y poblaciones asincrónicas y han demostrado el incremento de los niveles de PCNA durante la fase G1 precoz y fase S temprana con una fase de «plateau» hasta la fase G2M. Los niveles de PCNA aumentan rápidamente durante la fase G1, se mantienen elevados durante la fase S y empiezan a decrecer durante la fase G2M. El nivel es mínimo durante G0(187) (330).

Se describen dos tipos de PCNA que pueden ser distinguidos por su diferente solubilidad. Existe un PCNA que corresponde al antígeno presente en bajas cantidades en células no ciclantes pero con capacidad de división. Este PCNA es muy soluble, de fácil extracción por detergentes y no puede ser detectado en células fijadas con disolventes orgánicos. La forma insoluble de PCNA se asocia a estructuras nucleares específicas presentes en los lugares en que se lleva a cabo la replicación del ADN y parece que juega un papel fundamental en la síntesis de ADN en las células eucariotas(332). Esta segunda forma de PCNA puede ser detectada en tejidos y células fijadas y aparece como una tinción granular intranuclear.

Los primeros AcMo dirigidos contra PCNA sólo eran reactivos en muestras congeladas no fijadas o fijadas en alcoholes. Algunos estudios realizados sobre tumores han demostrado correlación entre la reacción positiva para PCNA y el índice mitótico(333). Actualmente se dispone de AcMo comerciales contra PCNA que son reactivos en secciones de tejidos fijados con formoles y embebidos en parafina.

Se han realizado estudios por citometría de flujo en los que se compara la expresión de PCNA con las fases del ciclo celular. Algunos grupos no han encontrado relación entre el índice de marcaje con PCNA y la fracción de células en fase S + G2M, mientras que otros grupos han descrito la presencia de relación significativa entre la marcaje con PCNA y la fracción de células en fase S o en fase S + G2M. En general, en neoplasias hematológicas existe una concordancia entre los dos métodos, aunque es frecuente la descripción de aumento del número de células PCNA positivas frente al porcentaje de células en fase S. La explicación de este fenómeno podría ser debida a una subestimación del porcentaje de células en fase S por citometría de flujo o persistencia de positividad para PCNA en células que no se encuentran en fase S(308).

También existen estudios que comparan la expresión de PCNA, marcaje con BrdU-antiBrdU y Ki-67, en general, se observa concordancia de los resultados entre los tres métodos.

Anticuerpo	Clon	Aplicación	Antígeno	Expresión en el ciclo celular
PCNA	PC10 19A2 19F4	Parafina Parafina, fresco Parafina	Proteína ácida de 36 KD	↑ G1 máxima S ↓ G2M
Ki-67		Fresco	Núcleo	↑G1 media S G2M
ADN polimerasa alfa	CL22-4-42 B	Fresco	Enzima nuclear 140 KD	G1 S G2M
p105	780-3	Parafina, fresco	proteína núcleo 105 KD	G1 S G2M

Tabla 1- 19.- Marcadores inmunocitoquímicos de proliferación celular.

Parece ser que el marcaje con PCNA puede variar de un modo significativo en células proliferantes de diferentes líneas celulares(333), también se han descrito diferencias en el epítipo del PCNA detectado por los diversos anticuerpos monoclonales disponibles(186). Esto puede producir disparidad y falta de reproductibilidad de resultados en diferentes estudios. Otro factor de variabilidad que debe ser considerado es que PCNA tiene una vida media relativamente larga de 20 horas, lo cual puede conducir a una sobrestimación de la proporción de células proliferantes en determinadas líneas o poblaciones celulares en las que las células hayan abandonado recientemente el ciclo celular y en las que se pueda detectar PCNA no degradada residual(334).

La expresión de PCNA está regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional y sus niveles se ven afectados por la estabilidad del ARNm. Se ha postulado que el exceso de PCNA encontrado en algunos tumores respecto a otras técnicas para evaluar la proliferación celular podría deberse a que en ciertos tumores la expresión de PCNA se encontrara disregulada por factores de crecimiento autocrinos y/o paracrinos(335).

3.7.- Alfa ADN polimerasa:

La alfa ADN polimerasa (DPA) es una enzima clave relacionada con el ciclo celular en la síntesis de ADN de las células eucariotas. DPA se expresa durante la fase S, G2 y M del ciclo celular, no detectándose en fase G0(308).

El epítipo que reconocen los anticuerpos monoclonales disponibles no sobrevive la fijación y los procedimientos histológicos de rutina por lo que marcaje debe realizarse sobre muestras de tejido congeladas.

En estudios sobre hepatocitos se ha demostrado una correlación positiva significativa

entre la expresión de DPA y PCNA, si bien el índice de marcaje de PCNA era de 2 a 3 veces superior al de DPA(336).

3.8.- p(105):

p105 es un antígeno nuclear asociado a proliferación celular. Aunque la función precisa de p105 aun no es completamente conocida, parece que pueda tener una función reguladora en la producción de cadenas de ARNt.

La expresión de p105 aumenta durante la fase S, G2 y M, pudiendo ser detectado en bajos niveles durante G0. La expresión de p105 estaría presente durante todas las fases del ciclo celular pero con diferente intensidad de expresión.

p105 puede ser detectado por citometría de flujo y en tejidos frescos o embebidos en parafina(337). Dada la inmunorreactividad de p105 en células G0, la lectura por citometría de flujo y sistema morfométricos de análisis de imagen son más sensibles que la única observación por microscopía óptica, puesto que una dificultad de éste método es la situación del umbral de negatividad(308).

3.9.- Ag-NOR:

Las regiones organizadoras nucleolares (NORs) son bucles de ADN que se encuentran en los nucleolos de las células en las cuales se está llevando a cabo síntesis de ARN ribosómico. Los genes son transcritos en ARN por la ARN polimerasa I y todo el conjunto es de importancia vital para la síntesis final de proteínas por parte de la célula. El número y conformación de los NORs refleja la actividad general de la célula(338).

Los NORs han sido estudiados y pueden ser demostrados mediante técnicas argirófilas (Ag-NOR) sobre cromosomas en metafase o sobre cortes histológicos de muestras parafinadas. El método del Ag-NOR tiñe las proteínas asociadas a los NORs y proporciona un buen método para examinar la estructura y variaciones en la actividad de los nucleolos. El número de Ag-NORs también refleja la actividad nuclear y un aumento de los mismos se ha asociado a proliferación celular, sin embargo, la utilidad de los Ag-NORs para la evaluación de la proliferación celular es controvertida(324) (325) (339) (341).

D.- Estudio del contenido en ADN y de la proliferación celular en linfoma:

El término genérico de linfoma se refiere a un grupo heterogéneo de neoplasias que tienen su origen en los linfocitos de los ganglios linfáticos o de otras estructuras extraganglionares.

Los procesos incluidos en los linfomas tienen un amplio espectro de presentaciones clínicas, historia natural, pronóstico y respuesta al tratamiento, puesto que bajo la misma denominación se engloban tanto neoplasias de rápido crecimiento y elevada agresividad, como otras de curso evolutivo lento y bien toleradas durante años.

La caracterización de los linfomas se basa en la microscopía de luz. El patólogo establece un diagnóstico en base a las características citomorfológicas del tumor y éste diagnóstico es empleado para planificar el tratamiento y ofrecer una opinión pronóstica al enfermo.

Con objeto de implementar la información clínica y patológica numerosos equipos han trabajado y trabajan en el reconocimiento de factores pronósticos, clínicos y analíticos que discriminen, en el linfoma, subgrupos con diferente pronóstico o que puedan beneficiarse de procedimientos o tratamientos específicos dentro de grupos clínicamente o patológicamente homogéneos. Otros grupos dirigen sus esfuerzos en proveer información acerca de las características y comportamiento biológico de las células neoplásicas linfomatosas. Así, los estudios inmunológicos, citométricos, citogenéticos y de biología

molecular pretender aportan datos que nos permitan conocer mejor al linfoma.

Los estudios sobre el contenido de ADN y la proliferación celular, ya sea mediante citometría de flujo o de imagen o técnicas inmunocitoquímicas, de las células linfomatosas se enmarcan dentro de la investigación sobre la biología celular en el linfoma.

1.- Perspectiva histórica:

Siguiendo al desarrollo de las aplicaciones de la citometría de flujo que tuvieron lugar durante los años 60 y 70, el estudio del contenido en ADN en los linfomas fue abordado desde el punto de vista citométrico. Los primeros estudios incluían series de linfomas junto con otros tumores hematológicos y extrahematológicos, aunque, posteriormente, el campo de los linfomas se individualizó del resto de tumores sólidos y del resto de las neoplasias hematológicas.

Hay equipos que han estudiado la fase proliferativa en los linfomas mediante el índice de marcaje con timina tritiada. Resultado de las investigaciones con las dos técnicas se demostró la correlación entre los valores de la fase proliferativa por citometría de flujo y el índice de marcaje y la relación de ambos con el pronóstico de la enfermedad(342).

La disponibilidad de determinados anticuerpos (Ki-67), algunos de reciente aparición (PCNA), que se expresan, más o menos selectivamente, en células en determinadas fases del ciclo celular mediante técnicas inmunohistoquímicas ha permitido estudiar la proliferación celular en los linfomas desde un punto de vista diferente al de la citometría de flujo(308), aunque, generalmente, se encuentra una buena correlación entre los resultados por citometría de flujo e inmunohistoquímica(322) (325).

Actualmente, el interés del estudio del contenido en ADN y la proliferación celular en los linfomas se centra en el análisis de la importancia pronóstica de los resultados dentro de grupos homogéneos o bien en el estudio del comportamiento biológico de la célula linfomatosa.

2.- Introducción:

Mediante colorantes que se unen específicamente a los ácidos nucleicos, la citometría de flujo o de imagen nos puede proporcionar información sobre el contenido de ADN y de las propiedades proliferativas de las células(181). Los métodos inmunológicos pueden ser empleados para estudiar la proliferación celular mediante anticuerpos que identifican antígenos que aparecen o aumentan su expresión en determinadas fases del ciclo celular(308).

Los resultados citométricos obtenidos a partir de muestras frescas o parafinadas son prácticamente idénticos en cuanto al índice de ADN y el porcentaje de fases del ciclo celular y sólo se advierte una disminución en el porcentaje de aneuploidías en tumores con índices de ADN muy cercanos a 1,00(172). También ofrecen resultados comparables los análisis por citometría de flujo de muestras de linfomas obtenidas por biopsia tisular o por punción y aspiración percutánea de material neoplásico por aguja fina(343). Cuando la cuantificación de ADN y estudio de la fase proliferativa no puede realizarse por citometría de flujo una alternativa puede ser el empleo de técnicas de citometría de imagen sobre cortes finos o improntas de muestras de linfoma(344).

Sin embargo, a pesar de la correlación entre los resultados entre las diferentes muestras y métodos, hay equipos que han evidenciado discrepancias de resultados(345) ya sea en función del método de obtención de la suspensión celular(346), lectura por el citómetro de flujo o análisis informático de las fases del ciclo celular(347).

Recientemente se ha celebrado una conferencia sobre el empleo de la citometría de flujo para el estudio del ADN en neoplasias humanas(348) en la que se recomienda, en todos los estudios, indicar el método utilizado para la obtención y tinción de la muestra, comprobar

que la suspensión celular contiene material representativo del tumor y emplear técnicas de calidad para el análisis de los histogramas resultantes (técnicas de sustracción de agregados y núcleos cortados, modelos informáticos de cuantificación de la fase S, etc.)[\(349\)](#). Debido a la posible variabilidad de los resultados entre los diferentes laboratorios también se recomienda que cada centro realice estudios para establecer sus propios rangos de normalidad[\(349\)](#).

Un histograma no aneuploide por citometría no excluye la presencia de alteraciones citogenéticas puesto que es conocido que la citometría de flujo no puede resolver ganancias o pérdidas muy pequeñas en material genético, así como, es insensible a la presencia de translocaciones balanceadas[\(241\)](#). En los linfomas, varios estudios han demostrado discordancias entre el cariotipo y la citometría de flujo[\(350\)](#) [\(351\)](#). En general, parece que la gran mayoría de los casos aneuploides por citometría de flujo tienen cariotipos anómalos, mientras que una proporción de entre un 50 a un 70 % de los linfomas citométricamente diploides muestran cariotipos alterados siendo más elevada la proporción en las muestras provenientes de tejido desparafinado que en las muestras de tejido procesado en fresco[\(351\)](#).

Recientemente han aparecido en el mercado anticuerpos monoclonales dirigidos contra PCNA que, además, resisten el proceso rutinario de fijación e inclusión en parafina y, por lo tanto, pueden ser empleados para investigar proliferación celular en muestras frescas o de archivo de neoplasias humanas. Se ha demostrado una excelente correlación entre la fase proliferativa, en cultivos de linfoma, obtenida mediante marcaje con Ki-67 o PCNA, por citometría de flujo, por lo que los anticuerpos dirigidos contra PCNA podrían ser útiles para estudiar proliferación celular en linfoma[\(352\)](#). También se ha demostrado correlación entre la expresión de Ki-67 y PCNA en linfomas T y B de alto y bajo grado empleando técnicas de citometría de análisis de imagen[\(353\)](#). Otros autores han demostrado un aumento de expresión de PCNA en muestras histológicas diagnosticadas de hiperplasia folicular en enfermos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida[\(354\)](#), pero todavía hay muy pocas publicaciones que investiguen el papel de PCNA en linfomas[\(355\)](#).

3.- Contenido de ADN y proliferación celular en linfomas:

Los primeros estudios acerca del contenido en ADN y proliferación celular en linfoma datan de finales de los años 70 y principios de los 80.

Barlogie, en 1980, publica un trabajo en el que estudia el contenido celular en ADN, por citometría de flujo, en pacientes con neoplasias hematológicas. En 26 pacientes con linfoma encuentra un global de un 50 % de los casos con aneuploidía, siendo ésta más frecuente en los entonces llamados linfomas difusos histiocíticos (78 %) que en los linfomas nodulares linfocíticos (43 %). El autor señala que la incidencia de aneuploidía puede variar si ésta se analiza por citometría de flujo o por cariotipo[\(350\)](#).

Poco después, Diamond, del equipo de Rappaport, midió por citometría de flujo el contenido en ADN y la dispersión de la luz en 103 pacientes, de los cuales, 43 eran linfomas no hodgkinianos. Analizó las muestras tras tinción hipotónica con yoduro de propidio usando como control interno hematíes de pollo. Los datos obtenidos por citometría de flujo se compararon con el diagnóstico morfológico de acuerdo con la *Working Formulation*. Los autores encuentran alteraciones en el contenido de ADN en el 47 % de los linfomas de bajo grado, 71% de los linfomas de grado intermedio y en un 90% de los linfomas de alto grado. El porcentaje medio de células en fase S de los linfomas de bajo grado era de un 2,2 % que fue significativamente inferior al de los linfomas de grado intermedio, un 12,2 % y, ésta a su vez, significativamente inferior a los de alto grado que era de un 22,6 %. Los autores concluyen que las tres categorías pronósticas designadas por la *Working Formulation* pueden ser distinguidas por datos citométricos, además, los pacientes que tenían una fase S menor de un 5 % presentaron supervivencias mayores que aquellos con una fase S superior al 5 %. La

dispersión de la luz no resultó ser de utilidad para discriminar las poblaciones celulares normales de las neoplásicas(356).

Barlogie y otros autores, en 1983, realizan una revisión sobre la utilidad de la citometría de flujo en las neoplasias humanas. En los pacientes con linfoma la presencia de aneuploidía varía, según las series, entre un 29 y un 70 %, lo que supone sobre un total de 360 pacientes revisados una media de 53 % de casos aneuploides. La presencia de aneuploidía es un excelente marcador de malignidad y es más frecuente en los linfomas de alto grado, así como una fase S elevada también se asocia a linfomas de alto grado(357).

En 1985, Sheibani apunta la posibilidad de que en los pacientes con linfoma, en los que se desarrolla una enfermedad más agresiva, la cuantificación de la actividad proliferativa de las células tumorales puede ser de ayuda diagnóstica y que los diferentes porcentajes de proliferación pueden ser correlacionados con la supervivencia, dependiendo el pronóstico final del comportamiento de la enfermedad más agresiva(358).

Un año más tarde, Christensson realiza el análisis del contenido en ADN de muestras frescas de 154 pacientes con linfoma no hodgkiniano y correlaciona sus resultados con la clasificación de Rappaport y con la *Working Formulation*. El autor encuentra que los pacientes asociados con un pronóstico desfavorable tienen una fase S significativamente superior a aquellos con pronóstico favorable. La proporción de células en fase S también es significativamente diferente entre los grupos de malignidad baja, intermedia y alta. Tanto la aneuploidía como una fase S elevada son factores asociados a pronóstico desfavorable, pero en el análisis discriminante la fase S demuestra ser mejor discriminante que la aneuploidía para clasificar los linfomas en buen o mal pronóstico(359).

Crocker y Nar aplican, sobre 90 linfomas B, la técnica de la tinción argéntica de los NORs. Demuestran una diferencia significativamente estadística entre el número de Ag-NORs presentes en los núcleos de las células en los linfomas de bajo grado (con una media de 1 a 1,5 por núcleo) y los presentes en los núcleos de células de linfomas de alto grado (con una media de 4,4 a 6,8 por núcleo)(339).

En 1987, Wain realiza un estudio en que investiga la relación entre la fase S y el inmunofenotipo de 106 casos de linfoma. Inmunofenotípicamente 98 casos eran B y 8 T; y los tumores B se subdividieron en función de la expresión de antígenos de superficie. Entre los tumores de célula B no se encontró relación entre el grado de aneuploidía y el fenotipo, pero mostraron una mayor proporción de alteraciones en el contenido de ADN que los tumores de célula T. No se encontró diferencias significativas entre la fracción de células en fase S de los tumores B o T, sin embargo, el CD 71 (receptor de transferrina) era más frecuentemente expresado cuando la fase S era superior al 5 %. Las conclusiones del estudio apuntan a que los linfomas tipo B y T difieren en el porcentaje de aneuploidías y que el inmunofenotipo de superficie y la ploidía de ADN definen, independientemente, subgrupos de linfomas de células B(360).

Griffin, en 1988, publica un trabajo en el que investiga la actividad proliferativa y su potencial pronóstico en 60 casos de linfomas centrocíticos-centroblásticos. Se evalúa la ploidía, el índice de proliferación (fase S + fase G2M), el índice mitótico y porcentaje de centroblastos en la muestra. Encuentran que los tumores con una fase S superior al 18 % o aneuploides tienen una supervivencia significativamente inferior. También se asocia a mal pronóstico un índice mitótico elevado. En el análisis multivariante mantienen su capacidad de predicción pronóstica el índice de proliferación y el índice mitótico(361).

Hall, Crocker y otros autores comparan en 80 casos de linfoma la expresión de Ki-67 y los Ag-NORs. La proporción de células Ki-67 positivas y el número medio de Ag-NORs presentan una relación lineal ($r=0,86$) significativa (p inferior a 0,001) y se comportan como buenos discriminadores entre linfomas de bajo y alto grado. Los autores sugieren que el

número medio de Ag-NORs puede reflejar la cinética celular del tumor y ser de utilidad en el diagnóstico y pronóstico del linfoma, con la ventaja adicional que es una técnica que puede aplicarse a muestras rutinariamente fijadas y procesadas (parafinadas) para anatomía patológica(325).

En 1989, Felman y colaboradores publican sus observaciones en las que se pone de manifiesto que la citometría de flujo y la citometría de imagen ofrecen resultados comparables en cuanto a la cuantificación de ADN en linfomas(344).

Cowan estudia el contenido en ADN en linfomas de grado intermedio y alto. Entre 197 casos encuentra un 14 % de casos casi diploides, un 28 % de casos aneuploides y un 7 % de linfomas tetraploides. Un dato interesante del trabajo de este equipo es que señalan que hasta en un 16 % de los casos han encontrado variaciones intratumorales del contenido en ADN, puesto que aunque esta posibilidad se conoce en tumores de colon(362), mama(363) y de origen genitourinario(364) (365) prácticamente no se describe en los linfomas. En 72 casos, dentro del mismo tumor, hay variaciones del índice de proliferación de hasta un 5 %. No se encuentra relación entre la ploidía y el grado histológico, estadio, extranodalidad ni pronóstico en el linfoma; sin embargo, el índice de proliferación se relaciona con la clasificación de Kiel y cuando éste es inferior o igual al 20 % con un menor porcentaje de remisiones completas tras el tratamiento. En el análisis multivariante de la ploidía y el índice de proliferación y 20 factores más el contenido de ADN y la proliferación, por citometría de flujo, no se comportan como factores pronósticos independientes. Los autores, en contra de la opinión de otros estudios, afirman que el estudio citométrico del ADN en linfomas no hodgkinianos no aporta información pronóstica significativa(137).

Recientemente, algunos autores han dirigido sus investigaciones hacia el valor de técnicas clásicas para el estudio de la proliferación celular en el linfoma. Silvestrini ha estudiado el índice de marcaje mediante la técnica de la timina tritiada en 175 pacientes adultos diagnosticados de linfoma. El índice de marcaje es significativamente diferente entre los grupos pronósticos de la clasificación de Kiel y la *Working Formulation* con valores de 1,8 y 10,4 y, en la *Working*, de 1,7, 4,8 y 14,2 respectivamente, pero no se relaciona ni con la edad ni con el estadio de Ann Arbor. Cuando se añade los resultados del estudio de la proliferación celular a los modelos pronósticos se consigue un aumento importante en la capacidad de discriminación de pacientes con diferente riesgo(366).

Otro estudio, del mismo año, que investiga en linfomas foliculares el valor pronóstico del conteo de las células grandes, la expresión de Ki-67 y el número de Ag-NORs es el publicado por Cibull. Los autores obtienen que con cualquiera de los tres métodos se identifican subgrupos de pacientes con peor pronóstico, pero que ninguno de ellos parece ser superior al resto y, de hecho, las subdivisiones de los pacientes que se obtienen son similares a las que produce la clasificación histológica de los tumores según la *Working Formulation*. Los autores sugieren que, al menos en su serie, el uso de los Ag-NORs o Ki-67 no ofrecen ventajas al empleo barato y sencillo del conteo de células grandes en la muestra y la clasificación histopatológica de la *Working Formulation*(324).

Drach y colaboradores describen un método para doble marcaje, por citometría de flujo (muestras frescas), con antígenos de superficie y Ki-67. Estudian diversas neoplasias hematológicas y dentro de ellas algunos casos de linfoma con expresión hemoperiférica. El mejor método es la fijación con una solución de periodato-lisina-paraformaldehído a -10 grados durante 15 minutos. Además, se demuestra que existe una excelente correlación entre la actividad proliferativa evaluada por tinción de Ki-67 o por estudio de las fases del ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio(185).

Turner, también en 1989, estudia la expresión de un antígeno asociado a proliferación celular, el p105 y el contenido en ADN en 80 suspensiones nucleares obtenidas a partir de

muestras parafinadas de linfoma. Los linfomas de alto grado, a pesar de grandes variaciones entre los subtipos histológicos, tienden a expresar mayor p105 y, en un mismo caso, las células aneuploides tumorales presentan mayor expresión de p105 que las células diploides(367).

Christensson estudió material biopsico, previo a ningún tratamiento, de 234 pacientes con linfoma. Compara la clasificación de Kiel con la medida citométrica del contenido en ADN y la fase S. El porcentaje de células en fase S es significativamente superior en los linfomas de alto grado que en los de bajo grado (p inferior a 0,001) y los pacientes de alto grado con valores de fase S bajos obtienen remisión completa de modo más frecuente y tienen supervivencias más largas. En los linfomas de bajo grado la fase S no muestra correlación pronóstica. La fase S tiene correlación con la supervivencia en los linfomas linfocíticos y derivados de células centrofoliculares, pero no en linfomas con células blásticas (linfoblástico, inmunoblástico y Burkitt). La aneuploidía se asocia a pobre respuesta terapéutica y corta de duración de la remisión en los linfomas de bajo grado, pero no se asocia con supervivencia. En el análisis multivariante la fase S se muestra como un potente predictor de la supervivencia(368).

Fruto del creciente interés por el empleo de la citometría de flujo en medicina clínica, la ASCP celebra en julio de 1989 una reunión dedicada a las aplicaciones clínicas de la citometría(160). Se revisa la utilidad del estudio del contenido en ADN y de la proliferación celular en el linfoma y se exponen los resultados de la revisión de los conocimientos hasta el momento. La ploidía y la fase S muestran correlación con el grado histológico del tumor; la ploidía es asociada por algunos autores con mal pronóstico, mientras que otros, encuentran asociación entre aneuploidía y una evolución favorable de los pacientes. La fase S se muestra, en algunas series, como un factor pronóstico independiente en los enfermos con linfoma(160).

Aine, en 1990, estudia la aneuploidía en una serie de 28 pacientes con linfoma folicular de célula grande. Encuentra un 39 % de casos aneuploides con índices de ADN que varían de entre 1,14 a 2,28, siendo un 25 % de los casos tetraploides. No se encuentra relación entre ploidía y pronóstico. El porcentaje de células en fase S es de 2,0 a 30,5 % y los pacientes con una fase S superior a 9,7 % presentan un acortamiento de la supervivencia, aunque la diferencia no es significativa(369).

Lakkala y colaboradores estudian la ploidía de 48 pacientes con linfoma, para ello emplean la citometría de flujo y el estudio del cariotipo. Citométricamente, en 24 linfomas de bajo grado encuentran un 17 % de casos aneuploides, en 19 de grado intermedio, un 23 % de aneuploidías y en 5 de alto grado, sorprendentemente, no encuentran ningún caso aneuploide. El índice medio de ADN es de $1,58 \pm 0,71$. Cuando comparan los resultados con la citogenética encuentran alteraciones cromosómicas clonales en un 92 % de los casos, si bien en la mayor parte el número de cromosomas es de 46. Generalmente, los tumores con número de cromosomas entre 45 y 49 ofrecen histogramas citométricos diploides y todos los casos con un número de cromosomas superior a 50 presentan aneuploidía por citometría de flujo(370).

Rehn investiga la relevancia pronóstica de la medición del contenido de ADN en 106 linfomas de tipo B en relación con la clasificación de Kiel, estadio, edad y presencia de síntomas B. La fase S media (4,4 %) de los 76 linfomas de bajo grado resulta ser significativamente inferior a la de los 30 linfomas de alto grado (13,0 %). Una fase S elevada se asocia a un peor pronóstico global y dentro de los linfomas de alto grado. En el subgrupo de los linfomas centrocíticos-centroblásticos, la fase S es capaz de discriminar entre dos grupos de diferente pronóstico. En el estudio multivariante la fase S se comporta como un factor pronóstico independiente(371).

Joensuu, Klemi y Jalkanen estudian los cambios en la ploidía y actividad proliferativa de 37 linfomas al diagnóstico y durante la evolución de la enfermedad. En aquellos casos que recidivan de la enfermedad emplean muestras parafinadas, del diagnóstico y durante la recidiva, para realizar un estudio comparativo de seguimiento. En este estudio se evidencia que los linfomas de bajo grado pueden transformarse en linfomas de alto grado y que linfomas de alto grado pueden evolucionar a formas más agresivas durante su evolución. La medición de la fase S es útil en la monitorización de la evolución de los linfomas y, se demuestra, que una fase S superior en un 6 % en la biopsia de la recidiva que en la biopsia al diagnóstico se asocia a un mal pronóstico(372).

En cuanto al estudio de la proliferación celular mediante el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos que se expresan en células proliferantes, durante el año 1990, varios grupos investigaron la expresión de Ki-67 y otros antígenos, en linfoma(373) (375).

J. Gerdes revisa los marcadores de actividad proliferativa en inmunohistoquímica con especial énfasis en Ki-67. El antígeno Ki-67 se encuentra presente en células activamente involucradas en el ciclo celular, pero no en células en fase G0. Con Ki-67 es posible la determinación de la fracción de células en crecimiento en el melanoma maligno, carcinoma de mama y linfoma; y, en ellos, se comporta como un factor pronóstico independiente(373).

Bookman estudia 23 pacientes diagnosticados, desde 1963 a 1988, de linfoma difuso intermedio. Se tratan de linfomas B, algunos de los cuales expresan CD5. El único factor significativamente asociado a supervivencia acortada es la afectación linfomatosa del hígado (confirmada por biopsia). Aunque la serie es pequeña, dada la escasa frecuencia de los linfomas linfocíticos difusos de diferenciación intermedia, parece que los casos con alta expresión de Ki-67, ausencia de los antígenos de membrana CD9 y CD10 y morfología blástica tienen peor pronóstico(374).

Slymen, también en 1990, publica su trabajo en el que investiga la importancia del estudio de la biología celular en 105 pacientes con linfoma difuso de célula grande. Los autores demuestran, mediante análisis multivariante, que la expresión de Ki-67 es capaz de discriminar subgrupos con diferencia significativa en su supervivencia dentro de grupos clínicamente homogéneos(375).

En 1991, Landberg sugiere que los anticuerpos contra PCNA pueden ser empleados, en muestras de linfoma, para la cuantificación de la proliferación celular(109), y Sneige comprueba que tanto las muestras biópsicas, como las obtenidas por aspiración ganglionar, de enfermos con linfoma, son útiles y ofrecen resultados comparables en cuanto al resultado de la cuantificación de ADN(100). Beaugard compara varios modelos matemáticos de resolución de fase S en histogramas monoparamétricos obtenidos por citometría de flujo con los índices de marcaje por citometría de imagen obtenidos por la técnica de la bromodeoxiuridina anti-bromodeoxiuridina. El autor encuentra una elevada correlación entre la fase S y el índice de marcaje; y en su serie, muestra mejor correlación el modelo rectangular que el polinomial para la cuantificación de la fase S(104).

McDunn, a partir muestras parafinadas de 22 pacientes con linfomas asociados al virus de la inmunodeficiencia humana y 125 casos de linfomas de grado intermedio y alto, investiga el contenido en ADN y expresión de p105 por citometría de flujo. Los linfomas de grado intermedio no asociados al síndrome de inmunodeficiencia adquirida poseen mayor fase S que éstos (24,0 % vs 10,4 %). En los linfomas alto grado ocurre lo mismo (24,8 % vs 19,0 %), aunque en este caso las diferencias no llegan a ser significativas. El porcentaje de aneuploidía es menor en los linfomas asociados al síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mientras que la expresión de p105 no ofrece diferencias significativas entre los dos grupos(376).

Rehn estudia 106 casos de linfomas de tipo B, encontrando correlación entre la fase S y el índice mitótico ($r=0,7$). Ambos parámetros se encuentran asociados al pronóstico de la enfermedad, pero, en su serie, el autor halla que el índice mitótico es mejor factor pronóstico de los linfomas de bajo grado, mientras que el porcentaje de fase S es mejor factor pronóstico en los linfomas de alto grado(377).

Macartney realiza un estudio retrospectivo con 83 casos de linfomas foliculares de célula pequeña hendida o mixtos en los que miden la ploidía y la fase S por citometría de flujo. La aneuploidía es infrecuente (16 de 83 casos) y no se relaciona con pronóstico o progresión del linfoma. La fase S media es de 3,6 %; una fase S elevada (superior al 5 %) se asocia con menor supervivencia y aumento de riesgo de recidiva o progresión del linfoma. Una fase S superior al 5 % y la presencia de síntomas B son factores asociados a menor supervivencia en linfomas foliculares de bajo grado(378).

Joensuu, en un estudio de 1991, analiza el valor pronóstico de la fase S de muestras parafinadas de 245 linfomas. Tanto la actividad proliferativa, como la clasificación de Kiel y la *Working Formulation* se asocian con supervivencia. Dentro de los linfomas de alto grado de la Working se pueden reconocer grupos con diferente pronóstico en función de la fase S(379).

En una revisión sobre el empleo de la citometría de flujo para la caracterización del linfoma, Andreeff afirma que la aneuploidía, cuando está presente, es un excelente marcador de malignidad y que es más frecuente en los linfomas de grado avanzado. La medición de la proliferación puede ayudar a determinar la agresividad del linfoma en casos individuales, ya sea medida por citometría de flujo o por inmunohistoquímica. Revisa 34 series de enfermos con linfoma en los que se ha estudiado la cinética celular y ploidía por citometría de flujo, con un total de 2916 pacientes; y aunque hay opiniones diversas, en general, existe asociación entre los datos citométricos con la histología y el pronóstico(138).

Nº casos	aneuploidía	Relación proliferación histología	Relación ploidía histología	Relación proliferación pronóstico	Relación ploidía pronóstico
208	29%	sí			
115	33%	p<0,01	p<0,002		
74	61%	sí		no	
50	62%			sí	no
52	80%	sí		sí	
65		sí			
52	56%			p<0,02	p<0,01
27				sí	
80		sí			
88				sí	
40		sí			
28		sí			
27				p=0,01	
15		sí			
64		sí			
69		p=00,02		p=0,015	
17	59%	sí		sí	
81		sí			
105		sí		no	
65	22%			P<0,0004	no
123		sí		sí	
69				sí	
140				sí	
154				sí (alto grd)	
101		sí		sí	
177		sí		sí	
96		sí	sí	no (RNA	sí
220		sí			
26		sí			

279				sí	
80				sí	
49		sí			
58				no	
22		sí			
2916					

Tabla 1-20.- Citometría de flujo y pronóstico en linfoma.

Kotel'nikov aplica la citomorfometría sobre muestras citológicas o cortes de parafina de 60 linfomas no hodgkinianos. Encuentra una alta correlación entre la actividad proliferativa (fase S + G2M) medida en las muestras citológicas o cortes de parafina ($r=0,98$) y con el grado histológico de malignidad del tumor. Los pacientes con una actividad proliferativa superior al 3 % se asocian a supervivencias significativamente acortadas(380).

Woods, estimulado por los estudios previos que demuestran correlación entre varios marcadores de proliferación celular y el grado histológico, aplica sobre muestras parafinadas de 31 linfomas intestinales una técnica inmunohistoquímica para estudiar la expresión de PCNA (anticuerpo monoclonal PC10) y, además, evalúa la actividad proliferativa, de las mismas muestras, por citometría de flujo. Encuentra una buena correlación entre el índice de PCNA y el grado histológico del tumor y una relación significativa con la fase S + G2M ($r=0,62$). En 23 casos disponibles para estudio de supervivencia, una elevada expresión de PCNA se asocia a peor pronóstico. En conclusión, el estudio del porcentaje de células PCNA positivas, en los linfomas gástricos, podría ser útil para evaluar la actividad proliferativa(355).

Durante 1991 algunos equipos publicaron sus estudios acerca de proliferación celular, estudiada por inmunocitoquímica, mediante anticuerpos dirigidos contra Ki-67 y contra otros antígenos asociados a proliferación celular. Mitani estudia la expresión de Ki-67, alfa ADN-polimerasa y el receptor de la transferrina en 40 linfomas T cutáneos y 35 linfomas T nodales. Existe correlación entre los marcajes obtenidos con los tres anticuerpos, y entre ellos y el grado histológico del tumor; sin embargo no hay diferencia significativa entre la actividad proliferativa de los linfomas cutáneos y nodales. Una elevada expresión de alfa ADN polimerasa se asocia a peor pronóstico en los linfomas T, tanto cutáneos como nodales(381).

Calet, en un estudio similar al anterior, investiga la expresión de Ki-67 en 46 linfomas de tipo T. Utilizando sistemas de análisis de imagen encuentra relación significativa entre el área de marcaje con Ki-67 y el grado histológico según Kiel y, en el estudio univariante, asociación con pronóstico en los linfomas de bajo grado(382).

A pesar de que la mayoría de estudios asocian a una actividad proliferativa elevada un peor pronóstico, Kossakowska, en 1991, estudia 22 casos de linfomas difusos de célula grande e inmunoblásticos mediante el anticuerpo Ki-67 y encuentra que, en su serie, una actividad proliferativa elevada (superior al 40 %) se asocia con mayor tiempo de supervivencia libre de enfermedad. Los pacientes que tienen una actividad proliferativa menor al 40 % presentan un acortamiento de la supervivencia(383).

Heimann determina la síntesis de ADN de neoplasias hematológicas y compara los resultados obtenidos por citometría de flujo e inmunohistoquímica de la detección de la

incorporación de la iododeoxiuridina, un análogo de la timina. Concretamente, compara el índice de marcaje con la técnica de la iododeoxiuridina anti-iododeoxiuridina determinada por citometría de flujo con tinción simultánea con ioduro de propidio, con el porcentaje de células en fase S + G2M analizadas por citometría de flujo con el naranja de acridina. Los datos indican una fuerte correlación entre los métodos y concluye que la tinción con ioduro de propidio, por citometría de flujo, de muestras de neoplasias hematológicas es un método adecuado para el estudio de la cinética celular(384).

En la XXVII reunión del Club de Linfomas Español, de la Sociedad Española de Anatomía Patológica, algunos investigadores presentaron sus resultados acerca de estudios que analizaban marcadores de proliferación celular y contenido en linfomas. Marcos compara, por citometría de imagen, la expresión de Ki-67 y PCNA en linfomas de alto y bajo grado, tanto de tipo T como B(354). Ruiz Marcellan estudia la expresión de PCNA en células linfoides de 45 pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, y observan que en casos con hiperplasia folicular las células positivas y proliferantes se localizan preferentemente en la porción central de los folículos reactivos(353). Villuendas estudia la expresión de p53, una proteína involucrada en el control del crecimiento celular y codificada por el gen p53, en linfomas no hodgkinianos y en tejido linfoide reactivo. El autor encuentra relación entre el nivel de expresión de p53 y la agresividad del linfoma; y se pregunta si ésta elevada expresión en linfoma debe a la estabilización de la proteína al formar complejos con otras proteínas nucleares(385). Delgado pone de manifiesto las discrepancias citogenéticas y de aneuploidía por citometría de flujo al estudiar 36 linfomas nodales y extranodales; todos los linfomas con aneuploidía citométrica muestran cariotipos alterados, pero hasta en un 70 % de los casos diploides por citometría la citogenética es anormal(351).

Macartney y Camplejohn publican, en un capítulo de un libro dedicado a proliferación celular en linfoma, que la aneuploidía es variable según las series, pero que es por lo menos de un 30 % en global y que, su presencia, se ha visto asociada, por algunos investigadores, más frecuentemente a linfomas B y a grados de malignidad elevados, pero que su papel en el pronóstico del linfoma permanece indeterminado. Algunos autores no encuentran relación entre la ploidía y supervivencia, otros asocian aneuploidía con peor supervivencia y, otros, asocian la presencia de aneuploidía con supervivencias prolongadas. En general, la fase S, determinada por citometría de flujo, se correlaciona bien con el índice de marcaje, con la presencia de Ag-NORs y con la expresión de antígenos asociados a proliferación celular (Ki-67). En muchos, pero no todos, los estudios una baja tasa de proliferación se asocia a supervivencia más largas, pero su valor en la inducción de la remisión post-tratamiento es confuso(342).

Muy recientemente, se han publicado los resultados de una reunión de expertos acerca de la utilidad de la citometría de ADN en neoplasias hematológicas. Duque, Andreeff, Braylan, Diamond, y Peiper revisan los resultados de 19 estudios, correspondientes a 2213 pacientes afectados de linfoma. Según el comité, la ploidía de ADN se correlaciona con el grado histológico del tumor, pero el valor pronóstico de la misma, actualmente, todavía no está dilucidado. Se necesitan de estudios de calidad, con uniformidad en los criterios de aneuploidía, histogramas con bajos CV de los picos, empleo de modelos de sustracción de ruido y núcleos cortados en muestras parafinadas y, por último, uso de software de análisis de las fases del ciclo celular para poder resolver pequeñas variaciones en el contenido de ADN y esclarecer el valor pronóstico de éste parámetro en el linfoma. La fase S, a pesar de estudios que ofrecen resultados contrarios, se correlaciona con la supervivencia y quizás pueda proporcionar un método más objetivo para la gradación de los linfomas(386).

En resumen, si bien se observa un mayor número de aneuploidías en los linfomas de grado de malignidad avanzado que en los de bajo grado, el valor de las alteraciones del

contenido en ADN, detectadas por citometría de flujo, permanece sin determinar.

Linfoma	Aneuploidía de ADN(%)	Rango
Linfomas de bajo grado	19	11-15
Linfomas de alto grado	47	31-79
Linfomas de célula B	30	22-35
Linfomas de célula T	13	11-33
Linfomas no-Hodgkin en general	31	24-61
Folicular centrocítico-centroblástico	19	9-26
Linfoma linfocítico-LLC	10	3-18
Difuso de célula grande	60	53-70
Inmunoblástico	69	40-100
Linfoblástico	34	14-50

Tabla 1-21.- Aneuploidía en linfomas no hodgkinianos

Una actividad proliferativa alta, tanto estudiada por incorporación de timina o análogos de la misma (bromodeoxiuridina), por citometría de flujo (ioduro de propidio, naranja de acridina, doble marcaje de ADN y bromodeoxiuridina o antígenos de proliferación), como por la expresión de determinados antígenos asociados a proliferación celular (Ki-67), se ha relacionado, por algunos autores, con linfomas de alto grado de malignidad y a un peor pronóstico de la enfermedad, si bien su valor como parámetro pronóstico independiente es discutido.

Método	Linfoma de bajo grado	Linfoma de alto grado
Fase S	2,3 (0,1-11,0)	6,5 (0,1-34,0)
Fase S	2,2	22,6
Fase S	4,8	11,5
Fase S	1,0 (0,5-10,0)	27,0 (4,6-56,0)
Fase S	12,0	16,0
Fase S	4,3 (0,6-14,4)	11,7 (2,0-32,0)
Fase S	4,4	13,0 (3,9-32,5)
Fase S		10,0 (3,0-46,0)
Fase S		9,0 (0,5-32,0)
Fase S + Fase	4,7	26,2

G2M		
Fase S + Fase	15,7	24,2
G2M		
Fase S + Fase	21,0 (6,040,0)	
G2M		
Fase S + Fase		14,1 (1,748,5)
G2M		
Fase S + Fase		18,8
G2M		
Fase S + Fase		14,0
G2M		

Tabla 1-22.- Actividad proliferativa en linfomas.

Autor	Año	Resultado
Srigley	1985	Asociación entre alta actividad proliferativa y remisión pero con peor supervivencia.
Bauer	1986	Baja actividad proliferativa asociada a mejor supervivencia, no efecto en la remisión
Young	1987	La actividad proliferativa es el factor pronóstico más significativo asociado a peor supervivencia
McLaughlin	1988	proliferación asociada a supervivencia.
Wolldridge	1988	Baja actividad proliferativa asociada a mayor frecuencia de remisión y mejor supervivencia.
O'Brien	1989	Baja actividad proliferativa asociada a mejor supervivencia.
Cowan	1989	Una actividad proliferativa baja se asocia a un aumento en la inducción de la remisión pero no con supervivencia. En estudio

Rehn	1990	Relación entre proliferación y
		supervivencia

Tabla 1-23.- Pronóstico y actividad proliferativa en linfomas de alto grado.

Se debe buscar una unificación de criterios técnicos y de interpretación para poder comparar los resultados de diferentes equipos; las investigaciones deben dirigirse hacia la búsqueda del valor de la proliferación celular dentro de grupos clínicamente o patológicamente homogéneos. Hay muy pocos trabajos que evalúen el valor de la expresión de PCNA en linfomas, pero es posible de que pueda ser un buen marcador de proliferación celular en linfomas y tener correlación diagnóstica y pronóstica, con la ventaja adicional de trabajar con muestras parafinadas.

II.- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A.- Justificación del trabajo:

Los linfomas no hodgkinianos constituyen un grupo heterogéneo de tumores anatomopatológicamente diferentes que tienen su origen en el sistema linforreticular. La gran variabilidad de los procesos incluidos en los linfomas se traduce en un amplio espectro de presentaciones clínicas, historia natural, respuesta al tratamiento y pronóstico(1).

Bajo el término genérico de linfoma se engloban, tanto neoplasias de rápido crecimiento y gran agresividad, como otras de curso evolutivo lento y muy bien toleradas durante años. La heterogeneidad en el comportamiento de la enfermedad obliga a profundizar en el estudio de la célula linfomatosa con el objeto de aumentar nuestros conocimientos sobre la misma; y a buscar sistemas que permitan objetivizar el diagnóstico y pronóstico de los enfermos afectados de linfomas no hodgkinianos(1).

La caracterización de los linfomas se ha basado tradicionalmente en la microscopía de luz. Valorando las características morfológicas, y en ocasiones inmunofenotípicas, del tumor, el patólogo establece un diagnóstico(4). Este diagnóstico es empleado por el clínico para formarse una opinión pronóstica y planificar, junto con los datos clínicos, el tratamiento del paciente(114).

Numerosos esfuerzos se han empleado en estratificar a los enfermos afectados de linfomas en grupos con distinto pronóstico en función del tipo histológico del mismo, la extensión de la enfermedad y la capacidad de crecimiento del tumor. Recientemente, se han comenzado a incorporar, a los hallazgos anteriores, resultados derivados del estudio del comportamiento biológico de las células neoplásicas que pueden ser de gran ayuda para el reconocimiento de nuevos subgrupos de riesgo dentro de grupos clínicamente o histológicamente homogéneos.

El estudio y la puesta a punto de métodos que aporten objetividad en la clasificación del linfoma puede ser de gran utilidad para unificar criterios y superar la limitación que supone la interpretación fundamentalmente citomorfológica(19) (46).

Las investigaciones acerca de la biología celular de las células neoplásicas proliferantes en los síndromes linfoproliferativos nos pueden ayudar a comprender la historia natural de la enfermedad y proporcionar información útil sobre la respuesta al tratamiento y el pronóstico del linfoma(1).

Algunos equipos han estudiado la utilidad de la citometría en la clasificación del linfoma y la relación de la ploidía y el ciclo celular con las características histocitológicas y el pronóstico en los enfermos con linfomas no hodgkinianos.

Los valores de dispersión de la luz no han demostrado ser de utilidad en la clasificación de los linfomas(356), aunque, con la mejora de las configuraciones y componentes de los citómetros actuales, quizá el estudio de la dispersión de la luz en los linfomas no hodgkinianos pueda ser de ayuda en la clasificación de los mismos.

Parece ser que los tumores de alto grado presentan con mayor frecuencia alteraciones en el contenido de ADN(138) (342) (386), pero existe controversia en cuanto a su utilidad como factor pronóstico, habiéndose descrito desde la ausencia de relación entre la ploidía y la supervivencia hasta la relación de la aneuploidía con tiempos de supervivencia alargados y acortados(160) (386).

El porcentaje de células en fase S, a pesar de estudios que ofrecen resultados contrarios, se acepta que aumenta con el grado histológico del linfoma y posiblemente con la agresividad celular. Existe una gran controversia acerca de la utilidad de la fase S para reconocer subgrupos diferentes dentro de los grupos histológicos clásicos, así como predictor de respuesta al tratamiento; aunque un aumento de la fase S se asocia a un peor pronóstico en

los linfomas(137) (138) (342) (386). Es posible que una población celular muy proliferante se muestre más sensible al tratamiento quimioterápico, pero existe la posibilidad de que la persistencia de enfermedad mínima residual sea mayor y ello conlleve a un peor pronóstico final de la enfermedad.

Actualmente, las investigaciones se encaminan hacia la determinación del valor del estudio del contenido en ADN y de las fases del ciclo celular para mejorar el conocimiento de la biología celular en el linfoma, objetivizar la clasificación de los mismos y reconocer subgrupos con diferente pronóstico dentro de grupos clínicamente, o bien patológicamente, homogéneos(386).

El estudio de la expresión de PCNA ha demostrado ser de utilidad para la investigación de la actividad proliferativa en algunas neoplasias humanas(328) (330), pero hay escasísimos trabajos que evalúen el valor de la expresión de PCNA en neoplasias hematológicas, concretamente en los linfomas(354) (355). Es una cuestión en discusión que el cálculo del índice de marcaje con PCNA pueda ser útil para el estudio de la actividad proliferativa en los linfomas y tener correlación diagnóstica y pronóstica en la enfermedad. El estudio de la expresión del antígeno PCNA quizás pueda ser empleado como una alternativa a los procedimientos citofluorométricos para el estudio de la proliferación celular.

B.- Hipótesis del estudio:

Las hipótesis que se plantean en el estudio son las que describen a continuación:

1.- Hipótesis primera:

El estudio, por citometría de flujo, del contenido en ADN de suspensiones celulares de muestras de linfoma presenta correlación con el tipo histológico del tumor y puede discriminar subgrupos pronósticos dentro de grupos homogéneos.

2.- Hipótesis segunda:

El estudio por citometría de flujo, de las fases del ciclo celular de muestras de linfoma tiene relación con el grado histológico del tumor y puede discriminar subgrupos pronósticos dentro de los linfomas no hodgkinianos.

3.- Hipótesis tercera:

El estudio, mediante técnicas inmunohistoquímicas, de la expresión del antígeno PCNA es útil para el estudio de la actividad proliferativa celular en los linfomas no hodgkinianos.

4.- Hipótesis cuarta:

El estudio, por citometría de flujo, de la dispersión de luz de suspensiones celulares es útil para la clasificación de los linfomas no hodgkinianos.

C.- Objetivos del estudio:

Los objetivos del estudio se han subdividido en uno de general y en varios de específicos:

1.- Objetivo general:

Demostrar que el análisis del contenido en ADN y de la proliferación celular por citometría de flujo o inmunohistoquímica (PCNA) es útil para el estudio de la biología celular del linfoma y proporciona información diagnóstica y pronóstica en los linfomas no hodgkinianos.

2.- Objetivos específicos:

2.1.- Primero: valorar, por citometría, los resultados de la dispersión frontal y lateral de luz en los linfomas no hodgkinianos y comprobar su utilidad en el diagnóstico de los mismos.

Se estudiarán el valor del canal medio de dispersión frontal de luz, dispersión lateral de luz, DS de dispersión frontal de luz y DS de dispersión lateral de luz y se analizarán estadísticamente las diferencias entre los diferentes grupos de malignidad histológica.

2.2.- Segundo: cuantificar, por citometría de flujo, el contenido de ADN en los linfomas no hodgkinianos y comprobar si existe relación con la clínica, respuesta al tratamiento, y si hay diferencias entre los diferentes grupos histológicos de malignidad empleando la *Working Formulation* y la clasificación de Kiel.

Se medirá la existencia de aneuploidía citométrica en las muestras de linfoma y se valorará estadísticamente la relación entre la ploidía y la presentación clínica, respuesta al tratamiento y grado de malignidad.

2.3.- Tercero: valorar si el estudio del contenido en ADN por citometría de flujo discrimina subgrupos con diferente pronóstico dentro de grupos homogéneos de diagnóstico y de malignidad histológica.

Se medirá la existencia de aneuploidía citométrica en las muestras de linfoma y se valorará estadísticamente la relación entre la ploidía y el tiempo libre de enfermedad y el tiempo de supervivencia en grupos clínicamente o citomorfológicamente homogéneos.

2.4.- Cuarto: medir, por citometría de flujo, el porcentaje de células que se encuentran en proliferación y comprobar si existen diferencias entre los subgrupos clínicos e histopatológicos en los linfomas no hodgkinianos.

Se medirá el porcentaje de células en fase S y se estudiará la relación con parámetros que valoren extensión del tumor, respuesta al tratamiento y malignidad histológica.

2.5.- Quinto: valorar si el porcentaje de células en proliferación celular, medido por citometría de flujo, identifica subgrupos pronósticos en los linfomas no hodgkinianos.

Se medirá el porcentaje de células en fase S y se estudiará la relación con el tiempo libre de enfermedad y tiempo de supervivencia.

2.6.- Sexto: cuantificar mediante técnicas inmunohisto-químicas el porcentaje de células que expresan el antígeno PCNA en los linfomas no hodgkinianos y valorar si dicha técnica es útil para el estudio de la proliferación celular en los mismos.

Aplicando una técnica inmunohistoquímica y lectura por planimetría se calculará el índice de marcaje con PCNA y se correlacionará con los valores de proliferación celular obtenidos por citometría de flujo.

2.7.- Séptimo: cuantificar mediante técnicas inmunohisto-químicas el porcentaje de células que expresan el antígeno PCNA y valorar si dicha técnica proporciona información pronóstica en los linfomas no hodgkinianos.

Se medirá el índice de marcaje con PCNA y se intentará estratificar a los enfermos en subgrupos pronósticos.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

A.- Material y métodos:

1.- Planteamiento metodológico:

Desde enero de 1975 hasta marzo de 1991, se hallan registrados en el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida, según consta en los archivos del mismo, un total de 169 pacientes diagnosticados de linfoma, de los cuales 115 corresponden a linfomas no hodgkinianos. Se seleccionaron los casos adecuados para el estudio y, a partir del historial clínico, se han recogido datos clínico-patológicos del momento del diagnóstico, así como, de la evolución de los enfermos. Las laminillas con las muestras histológicas de todos los enfermos incluidos en el estudio han sido revisadas por dos patólogos experimentados, sin conocimiento de datos clínicos, para su clasificación histopatológica; en el caso de discordancia de opiniones las muestras han sido discutidas en reunión con un tercer patólogo para realizar, mediante consenso, el diagnóstico definitivo. De los bloques de muestra tumoral parafinada se han realizado cortes para tinción con hematoxilina-eosina y procesamiento inmuno-histoquímico para inmunofenotipaje y estudio de proliferación celular (PCNA), así como, cortes gruesos para procesamiento por citometría de flujo y estudio del contenido en ADN (ploidía y fases del ciclo celular). Los resultados del índice de marcaje con PCNA se evaluaron por planimetría y los histogramas citométricos del contenido en ADN se analizaron mediante un programa informático para el cálculo de las fases del ciclo celular y, de existir aneuploidía, el índice de ADN. Los datos clínicos, patológicos, inmunohistoquímicos y citométricos han sido guardados en forma de base de datos informatizada y con ellos se han realizado los estudios estadísticos para alcanzar los objetivos y comprobar o rechazar las hipótesis planteadas.

Se trata, en definitiva, de un estudio longitudinal de cohortes históricas que aprovecha el material obtenido en el momento del diagnóstico y que puede ser procesado para estudiar la actividad proliferativa y contenido en ADN de las células tumorales. Las ventajas de un estudio es este tipo son la disponibilidad, en las enfermedades poco frecuentes, de un elevado número de casos en un corto tiempo y la posibilidad de realizar un largo seguimiento temporal de los pacientes(388).

[Figura 3_1](#)

2.- Muestra del estudio:

2.1.- Criterios de inclusión:

Constituyen objeto del estudio todos aquellos enfermos mayores de 14 años diagnosticados, por estudio anátomo-patológico, de linfoma no hodgkiniano que constan en el archivo del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida, desde 1975 hasta marzo de 1991, y que no presenten ningún criterio de exclusión.

2.2.- Criterios de exclusión:

Se consideran como excluidos del estudio los siguientes: (1) enfermos que en la revisión histopatológica no se confirme el diagnóstico de linfoma no hodgkiniano; (2) enfermos con linfoma cuyo estudio y valoración diagnóstica inicial se haya realizado fuera del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Arnau de Lleida; (3) enfermos menores de 14 años; (4) enfermos con linfomas relacionados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida; y (4) enfermos de los que no se dispone de muestra histológica parafinada fijada en formol.

Del total de 115 linfomas no hodgkinianos disponibles, se incluyeron en el estudio 78 casos. De éstos, no se consideraron 14 casos por presentar algún criterio de exclusión del estudio, lo que supone una muestra final de 64 casos. De la muestra final, dos pacientes

presentaron una progresión del grado de malignidad, según la *Working Formulation*, de su linfoma durante la evolución de su enfermedad. Cada uno de estos casos fue dividido en dos: el primero desde el diagnóstico inicial hasta el cambio de grado histológico, considerándose como perdido a partir de entonces; y el segundo desde la confirmación del cambio de grado histológico hasta la última fecha de control. El tamaño final de la muestra es de 66 casos.

3.- Procedimientos, técnicas e instrumentos utilizados

3.1.- Recogida de los datos:

Todos los datos correspondientes a las variables objeto de estudio fueron consignadas en una «hoja de recogida de datos» precodificada diseñada para este fin.

3.2.- Corte de los bloques histológicos para procesamiento por citometría de flujo e inmunohistoquímica

Se realizan cortes con el microtomo de los bloques parafinados para el diagnóstico histológico, procesamiento inmunohistoquímico y por citometría de flujo.

3.2.1.- Cortes para diagnóstico histológico: se cortan los bloques a 5 μm de grosor. El corte histológico es procesado para tinción con hematoxilina-eosina, y sobre él se ha realizado la comprobación de la presencia histológica de linfoma en la muestra.

3.2.2.- Cortes para citometría de flujo: se cortan 2 ó 3 cortes a 50 μm de grosor para disponer de suficiente cantidad de material para desparafinar, rehidratar y disgregar para obtener una suspensión celular que va a ser teñida con ioduro de propidio. La suspensión va a ser analizada por citometría de flujo con el fin de estudiar la ploidía y las fases del ciclo celular.

3.2.3.- Preparación de los portaobjetos para la realización del procesamiento inmunohistoquímico: los porta-objetos se recubren de una capa de gelatina para que el corte histológico con la muestra no se desprenda durante el proceso de inmunohistoquímica.

3.2.3.1.- Preparación de la solución de gelatina y cromo III y potasio sulfato:

a.- Se pone 1 litro de agua destilada a calentar (en microondas) hasta su ebullición.

b.- A su vez, se disuelven 3 gramos de gelatina (Gelatina, Difco Laboratories, 0143-01) en 100 mililitros de agua destilada. La disolución no se produce completamente.

c.- Se mezcla el litro de agua caliente con los 100 mililitros de agua con gelatina, y se agita hasta la completa disolución de la gelatina que ahora por la temperatura y el volumen de líquido se disuelve completamente. La disolución se deja enfriar a temperatura ambiente.

d.- Cuando la disolución anterior está atemperada se añade 0,55 gramos de cromo III y potasio sulfato (Cromo III y potasio sulfato, Panreac, 141284) y se disuelve por agitación.

e.- Se deja que la solución tapada a temperatura ambiente y se debe usar en el mismo día.

3.2.3.2.- Desengrasado y limpieza de los por-taobjetos para la realización de la inmunohistoquímica: se sumergen los portaobjetos en alcohol etílico absoluto por las dos caras y se dejan secar completamente.

3.2.3.3.- Recubrimiento de los portaobjetos: se sumergen los portaobjetos limpios en la solución de gelatina durante 4-5 minutos. Después se dejan secar a temperatura ambiente resguardados del polvo durante 24 horas; los portas no deben tocarse entre si puesto que se pegan entre ellos. Una vez secos, los portaobjetos pueden guardarse en cajas hasta su utilización.

3.2.4.- Cortes para inmunohistoquímica: se realizan un mínimo de 6 cortes a 5 μm de grosor (uno en cada portaobjetos con cola de gelatina) para el procesamiento inmunohistoquímico con anticuerpos: (1) negativo: ausencia de primario, (2) antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), (3) pan-B histológico y (4) pan-T histológico. Por

último, se realiza un último corte a 5 μm de grosor para una nueva tinción con hematoxilina-eosina y verificar la presencia de linfoma a lo largo del resto de los cortes histológicos anteriores.

3.3.- Análisis del contenido en ADN y fases del ciclo celular, por citometría de flujo, de núcleos obtenidos a partir de muestras parafinadas:

La medida del contenido en ADN por citometría de flujo proporciona información objetiva sobre la ploidía y la actividad proliferativa. La medida del contenido en ADN se basa en la capacidad de algunos marcadores fluorescentes (como en yoduro de propidio) que se unen específica y estequiométricamente al mismo. Los núcleos de las células teñidos con estos marcadores emiten fluorescencia en proporcional a su contenido en ADN(205).

El siguiente procedimiento se basa en modificaciones de la técnica descrita por Hedley y comprende la desparafinación y rehidratación de secciones parafinadas, la disgregación mecánica y enzimática de la muestra y, por último, la tinción con yoduro de propidio(170) (171). Además, se ha procesado tejido linfóide sano para disponer de controles de ploidía y de las fase del ciclo celular.

3.3.1.- Obtención y tinción de la suspensión nuclear a partir de muestra parafinada:

a.- Obtener secciones de tejido tumoral parafinado de 50 μm de grosor mediante un microtomo adecuado.

b.- Identificar y desparafinar las secciones (1 ó 2 secciones) sumergiéndolas en tubos de cristal con 10 mililitros de xilol durante 10 minutos. Decantar y repetir el paso con otros 10 mililitros de xilol. Decantar y eliminar los restos de xilol con lavados con alcohol absoluto.

c.- Rehidratar sumergiendo sucesivamente las secciones en 5 mililitros de:

- etanol 100 %: durante 5 minutos

- etanol 95 %: durante 5 minutos

- etanol 90 %: durante 5 minutos

- etanol 70 %: durante 5 minutos

- etanol 50 %: durante 10 minutos

- agua destilada: durante un mínimo de 10 minutos. En este punto, si es necesario, se puede parar el procedimiento durante 24 horas.

d.- Decantar el agua y disgregar las secciones mecánicamente con ayuda de unas tijeras o bisturí.

e.- Incubar con 4 mililitros de una disolución de pepsina (Pepsin, Sigma, P-7012) al 0,5 % en cloruro sódico al 0,9% en agua destilada, el pH se debe ajustar a 1,5. La incubación se realizará en baño a 37 grados y durante 30-45 minutos, realizando cada 10-15 minutos agitaciones con vórtex.

f.- Centrifugar 10 minutos a 2.000 r.p.m., decantar y resuspender con suero fisiológico o PBS.

g.- Filtrar con una malla de nylon de 50 μm de poro (Maisa) sobre tubos. El filtrado se realiza para remover agregados celulares y tejido insuficientemente disgregado que pudieran obstruir la cámara de flujo del citómetro.

h.- Determinar la concentración de suspensión de núcleos. Ajustar a un máximo de 20.000-30.000 células/ μl .

i.- Centrifugar, decantar e incubar el botón con 2 mililitros de solución de yoduro de propidio y RNAasa (DNA-prep Stain, Izasa-Coulter, PN 6604451). Incubar a temperatura ambiente y en oscuro durante 30-45 minutos.

j.- Leer por el citómetro de flujo.

3.3.2.- Controles: se someten a igual procedimiento secciones de ganglio no tumoral;

sirven para determinar el canal de diploidía en el histograma de ADN y comprobar la calidad del histograma obtenido. Además se emplean hematíes de pollo como control adicional de ploidía (Chicken Erythrocyte Nuclei, Izasa-Coulter, PN 6604453).

3.3.3.- Lectura de las muestras desparafinadas, disgregadas y teñidas con yoduro de propidio por el citómetro de flujo: durante el procesamiento anterior, los núcleos han adquirido determinada cantidad de fluorocromo en proporción a su contenido en ADN. Con el citómetro de flujo vamos a medir de una manera rápida y objetiva la fluorescencia que emiten los núcleos. A partir de los histogramas obtenidos se realiza el análisis de ploidía y de las fases del ciclo celular.

3.3.1.1.- Citómetro de flujo: se ha empleado un EPICS PROFILE I (Izasa-Coulter) implementado con el paquete «Power Pack» (cuarto fotomultiplicador, histogramas logarítmicos de cuatro décadas, discriminador de señal de pico), lo que equivale a convertirlo a PROFILE II (más otro fotomultiplicador)(389) (390). Es un citómetro de cámara cerrada sin sorter.

Se ha creado un test específico para la lectura de las muestras de linfoma. Los valores, por defecto, del test son los siguientes:

- Volumen de muestra aspirada: 190 μ l.
- Velocidad de inyección de la muestra: 10 μ l/minuto (velocidad baja).
- Presión del fluido de arrastre: 7,50 psi.
- Potencia del láser: 15 mW.
- Voltajes de los fotomultiplicadores: SS: 400 V, FL3: 725 V.
- No hay compensación de color al trabajar con una única fluorescencia.
- Parámetros seleccionados: LSS, LFS, FL3P, FL3, LFL3 (dada la configuración óptica del citómetro, la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio se recoge en el tercer fotomultiplicador).
- Ventanas de adquisición: No activadas; FL3: 102-1023, FL3P: 144-1023. Resto: 0-1023.
- Ganancias: FL3 =1/2 FL3P. Resto: 1.
- Discriminadores: para FL3 en el canal 50.
- Parada a los 50.000 eventos.
- Regiones amorfas (bitmaps) de adquisición: FL3-FL3P: para discriminación de dobles. LSS-LFS: adquisición en función de tamaño y complejidad celular.
- Histogramas: cuatro histogramas: 1 biparamétrico: LSS-LFS, 3 monoparamétricos: FL3 (uno sin bitmaps activados, otro activando bitmap de LSS-LFS, y otro activando bitmap de FL3-FL3P. Histograma biparamétrico de FL3 y LFS. para comprobar la calidad de la tinción (independencia del canal de FL3 y tamaño nuclear).
- Almacén de los resultados en forma de histogramas y en modo lista en un diskette.

Los valores por defecto son modificables en función de la posición del canal de ploidía del control (que se situará alrededor del canal 175-200 en un histograma de 1024 canales), posición de las poblaciones en los citogramas y velocidad de lectura de eventos (velocidad de paso de la muestra).

3.3.1.2.- Alineamiento del citómetro: antes de proceder a la lectura de las muestras, se ha realizado una calibración, del alineamiento del sistema, con bolas fluorescentes de látex (DNA-check, EPICS alignment fluorespheres for optical alignment of flow cytometers, Izasa-Coulter, PN 6603488).

3.3.1.3.- Lectura por el citómetro de flujo: una vez teñidas las muestras, éstas son analizadas por citometría de flujo mediante el test definido. La adquisición de los datos se realiza tras 60 segundos de inicio de paso de muestra para que se establezca el flujo. Se adquieren un total de 50.000 eventos.

3.4.- Estudio del inmunofenotipo y de la proliferación celular por técnicas inmunohistoquímicas:

3.4.1.- Desparafinación de los cortes histológicos: los cortes histológicos de linfoma que se encuentran en los portaobjetos con cola son introducidos de 30 a 40 minutos en una estufa con una temperatura de 60 grados. Después se sumergen sucesivamente:

- xilol 1: durante 10 minutos
- xilol 2: durante 10 minutos
- xilol 3: durante 10 minutos
- etanol absoluto 1: durante 3-5 minutos
- etanol absoluto 2: durante 3-5 minutos
- etanol absoluto 3: durante 3-5 minutos
- etanol 80 %: durante 3-5 minutos
- etanol 70 %: durante 3-5 minutos
- etanol 50 %: durante 3-5 minutos
- agua destilada 1: durante 5 minutos
- agua destilada 2: durante 5 minutos
- agua destilada 3: durante un mínimo de 5 minutos.

En cada cambio de cubeta se deben agitar unas cuantas veces las preparaciones para que al final se haya eliminado toda la parafina de las muestras.

Las preparaciones se secan sin tocar la muestra y se realiza un círculo alrededor de la misma con esmalte de uñas para evitar la diseminación de los reactivos del procedimiento de inmunohistoquímica.

3.4.2.- Técnica inmunohistoquímica: para el estudio del inmunofenotipo y determinación de la línea celular B o T del linfoma se han empleado los anticuerpos monoclonales L 26 (B cell, CD20 (DAKO-CD20, L26), Dako-Atom, M755) (pan-B histológico) y UCHL1 (T cell, CD45RO (DAKO-CD45RO, UCHL1), Dako-Atom, M742) (pan-T histológico).

El anticuerpo DAKO-CD20, L26 es un monoclonal IgG2a kappa de ratón obtenido del clon L26. Detecta células B normales y neoplásicas en cortes de criostato y de muestras fijadas en formol y embebidas en parafina. El anticuerpo reacciona con un epítipo intracitoplasmático designado como CD20(280).

El anticuerpo DAKO-CD45R0, UCHL1 es un monoclonal IgG2a kappa de ratón que se ha obtenido del clon UCHL1. Reacciona con células T maduras e inmaduras y es efectivo sobre muestras fijadas con formol y embebidas en parafina, por ello, se puede emplear como un marcador de células T normales y neoplásicas en muestras procesadas rutinariamente en anatomía patológica(280).

Para el estudio histológico de proliferación celular se ha utilizado el anticuerpo monoclonal PC10 (Proliferating Cell Nuclear Antigen (DAKO-PCNA, PC10), Dako-Atom, M879). Se trata de un anticuerpo IgG2a kappa de ratón que se ha obtenido a partir del clon PC10. Reacciona con células proliferantes siendo su expresión máxima en las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular(308). Este anticuerpo puede ser aplicado sobre muestras fijadas y procesadas para inclusión en parafina.

Para evidenciar la unión del anticuerpo al antígeno se ha empleado un kit basado en la afinidad de la avidina-biotina y que tiene como trazador a la fosfatasa alcalina (UltraProbe, Wide Spectrum Universal Phosphatase-Based Immunohistochemical Detection System, Biomedica Corp., 09-901). El sistema de detección es una técnica indirecta con tres pasos que se realiza sobre portaobjetos en posición horizontal; todas las incubaciones se efectúan en cámara húmeda a temperatura ambiente; y las muestras no deben secarse en ningún momento

del procedimiento. La técnica consiste:

- a.- Identificar, desparafinar y rehidratar las muestras.
- b.- Preparar, mientras se desparafinan y rehidratan las muestras, el tampón de lavado. Mezclar 9 partes de agua destilada con 1 parte de tampón de inmunoensayo (10X Automation Buffer/10X Immunoassay Buffer, Biomedica Corp., M30/M61).
- c.- Secar los portaobjetos alrededor de la muestra y dibujar con esmalte de uñas un círculo que la contenga. Dejar secar el esmalte durante 10 segundos.
- d.- Bloqueo de la peroxidasa endógena: la muestra se incubó con peróxido de hidrógeno al 2 % en agua destilada durante 5 minutos. Lavar con tampón durante 5 minutos.
- e.- Acondicionamiento de tejidos: se mezclan dos gotas del acondicionador de tejidos (Tissue Conditioner, Biomedica Corp.) con 2 mililitros. de tampón. Se incuban las muestras con la mezcla resultante durante 5 minutos. Lavar con tampón durante 5 minutos.
- f.- Incubación con el anticuerpo primario: se realiza la dilución del anticuerpo en un diluyente comercial (Primary Antibody Diluting Buffer, Biomedica Corp., M35): PCNA a 1/20, UCHL1 a 1/100 y L26 a 1/100. Se incuban las muestras durante 30 minutos. Lavar tres veces con tampón durante 5 minutos para eliminar el anticuerpo no fijado. Además, se han realizado controles negativos sustituyendo el anticuerpo monoclonal primario por tampón de lavado y, también, controles positivos al procesar simultáneamente secciones de amígdala.
- g.- Incubación con anticuerpo secundario: se incuban las muestras con el anticuerpo secundario biotinilado (Reagent 1A) durante 20 minutos. Lavar con tampón tres veces durante 5 minutos.
- h.- Incubación con los complejos avidina-fosfatasa alcalina: se incuban las muestras con la avidina-fosfatasa alcalina (Reagent 2) durante 20 minutos. Lavar con tampón tres veces durante 5 minutos.
- i.- Mezclar 5 mililitros. de agua destilada con 2 gotas del reactivo 3A (Trizma base: Reagent 3A), a la solución anterior añadir una tableta del reactivo 3B (Fast Red TR Salt: Reagent B) y agitar hasta la disolución y, por último, a la solución anterior añadir 1 gota del reactivo 3C (Naphtol Phosphate Dimethyl Formamide: Reagent 3C). Incubar las muestras con la solución durante 15 minutos. Lavar con abundante agua destilada.
- j.- Contrastar con hematoxilina acuosa (Reagent 4) durante 5-10 segundos y lavar sucesivamente con agua destilada, tampón y agua destilada.
- k.- Montar las preparaciones con un medio de montaje acuoso (Aquatex, Merck, 8562).

3.5.- Interpretación de los resultados de la lectura por citometría de flujo:

3.5.1.- Histogramas monoparamétricos del contenido en ADN: resultado de la lectura por citometría de flujo de las muestras de linfoma teñidas con yoduro de propidio se obtienen histogramas monoparamétricos con la distribución de fluorescencia proporcional al contenido en ADN de los núcleos analizados. Para la correcta cuantificación de las fases G0G1, S y G2M se ha empleado un programa informático específico para análisis del ciclo celular(242) (MULTICYCLE, Phoenix Flow Systems, 6414566) El programa, mediante procedimientos matemáticos, es capaz de realizar la sustracción de la señal debida a núcleos cortados y permite, en el caso de existir una población aneuploide, el cálculo del índice de ADN y las fases del ciclo celular de las células normales y del de las aneuploides.

En la lectura, por citometría de flujo, de las muestras: en el histograma biparamétrico de dispersión frontal y lateral de luz se seleccionaron los eventos correspondientes a núcleos celulares; y en el histograma biparamétrico de señal fluorescente de pico y área los eventos correspondientes a células aisladas (no dobletes ni agregados celulares). Los eventos que se encontraban en los dos regiones de selección mencionadas se representaron en un histograma

de 1024 canales de fluorescencia (contenido en ADN). En cualquier caso, se adquirió parte de la señal producida por núcleos cortados para una correcta sustracción de señal producida por los mismos a lo largo de todo el histograma por los modelos matemáticos del software de análisis.

3.5.1.1.- Análisis de los histogramas del contenido en ADN mediante el programa informático:

a.- Selección de los histogramas.

b.- Identificación de la presencia de uno o más picos correspondientes a células en fase G0G1. En caso de aparecer un solo pico se considera un histograma diploide y si aparecen más de uno, un histograma con presencia de aneuploidía (2 ciclos celulares)(205). En el caso de aneuploidía se ha considerado como pico diploide aquel más cercano al canal del control de referencia de linfocitos normales(205).

c.- Selección del modelo matemático para el cálculo del índice de ADN y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (fase G0G1, fase S y fase G2M). Modelo para el cálculo de la fase S: polinomial de un grado con sustracción de núcleos cortados.

d.- El programa, por iteraciones múltiples hasta obtener los valores mejor ajustados al histograma y con menor error, calcula: (1) en los histogramas diploides el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular y (2) en los histogramas con aneuploidía el índice de ADN y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular para cada una de las poblaciones (diploide y aneuploide).

3.5.2.- Histogramas de la dispersión de la luz perpendicular y a bajo grado: los histogramas biparamétricos de dispersión de luz han sido analizados mediante un programa informático(391) (EPICS ELITE Flow Cytometer Software, Izasa-Coulter, PN-4235932B) para el estudio del canal medio y desviación standard de los picos de forward y side scatter.

3.6.- Interpretación de los resultados de las técnicas inmunohistoquímicas para el estudio del inmunofenotipo y la actividad proliferativa:

3.6.1.- Inmunofenotipo de los linfomas: las muestras incubadas con los anticuerpos monoclonales L26 y UCHL1 fueron evaluadas por microscopía óptica y, en función de la expresión de uno u otro antígeno, se clasificaron los linfomas en inmunofenotípicamente B o T.

3.6.2.- Índice de marcaje con PCNA: un mínimo de 500 células fueron contadas por planimetría (MOP-VIDEOPLAN, Kontron) y clasificadas, en función de la presencia de precipitado de substrato coloreado, en negativas o positivas para PCNA. El índice de marcaje se expresa como el porcentaje de células positivas para el antígeno sobre el total de células contabilizadas(310).

4.- Variables del estudio

En la hoja de recogida de datos precodificada se han registrado las siguientes variables:

4.1.- Identificación de los casos:

4.1.1.- Número de orden: es una variable cualitativa con tantos valores como enfermos incluidos en el estudio. A cada caso se le ha asignado un número de orden que es el que ha sido utilizado, junto con los números de bloque parafinado de la muestra de linfoma, para identificar los pacientes durante la revisión anatomopatológica, valoración del inmunofenotipo y cuantificación citométrica e inmunohistoquímica del contenido en ADN y proliferación celular.

4.1.2.- Nombre: se ha consignado el nombre y los dos apellidos de los pacientes

incluidos en el estudio. Es una variable cualitativa que identifica el paciente en estudio.

4.1.3.- Número de historia clínica: es una variable cualitativa con tantas categorías como enfermos incluidos en el estudio y que corresponde al número de historia clínica que se asigna a todos los paciente atendidos en el Hospital Arnau de Vilanova de Lleida. Permite identificar al paciente y acceder a los datos e información que se dispone de los mismos.

4.1.4.- Número de bloque parafinado que contiene la muestra de linfoma: para cada enfermo se ha registrado el número de bloque de la muestra o muestras histopatológicas que se dispone del mismo del momento del diagnóstico de linfoma.

4.2.- Variables demográficas:

4.2.1.- Edad: variable cuantitativa que corresponde a la edad cronológica del paciente expresada como años cumplidos en el momento de realizarse el diagnóstico de linfoma.

4.2.2.- Sexo: variable cualitativa que puede tener dos categorías: hombre y mujer.

4.3.- Datos clínicos del diagnóstico y seguimiento:

4.3.1.- Fecha del diagnóstico: fecha en formato de mes/año en que se realizó el diagnóstico de linfoma. Se emplea como fecha de entrada en el estudio para el cálculo de tiempo libre de enfermedad y supervivencia.

4.3.2.- Diagnóstico histológico inicial: variable cualitativa que recoge el diagnóstico inicial del tipo histopatológico de linfoma según los criterios y clasificaciones empleados en el momento en que se estudió y diagnóstico el paciente. Además se recogió el grado histológico de malignidad del linfoma.

4.3.3.- Estadio clínico: variable cualitativa que recoge el estadio clínico, según Ann Arbor(13), en que se encontraba el enfermo en el momento del diagnóstico. Las posibles categorías de esta variable son cuatro: I, II, III y IV. Se denomina estadio I cuando existe afectación de 1 sola región ganglionar o estructura linfática, el estadio II implica la afectación de 2 o más regiones linfáticas al mismo lado del diafragma, el estadio III es cuando existe afectación de regiones ganglionares o estructuras linfáticas a ambos lados del diafragma y, por último, el estadio IV que se aplica cuando hay afectación de uno o más sitios extranodales.

4.3.4.- Síntomas B: variable cualitativa que recoge la presencia o ausencia de síntomas B, según la clasificación de Ann Arbor, del paciente en el momento del diagnóstico. Se considera como presencia de síntomas B la presencia de fiebre superior a 38 grados, sudoración profusa por la noche o pérdida inexplicable de más del 10 % del peso corporal en los 6 meses anteriores al diagnóstico(83).

4.3.5.- Inicio extranodal: variable cualitativa que recoge si el linfoma es de inicio nodal o extranodal. En el caso de el linfoma sea de origen extranodal se consigna la localización del mismo.

4.3.6.- Carga tumoral: variable cualitativa sobre la carga tumoral, según Cabanillas, que presenta el paciente en el momento del diagnóstico. Las tres categorías de la variable son baja, media y alta carga tumoral. Los criterios empleados para la determinación de la carga tumoral son los siguientes: pacientes con ninguna área nodal y hasta dos áreas extranodales afectadas extensivamente: baja carga tumoral; pacientes con una área nodal y hasta una área extranodal afectadas extensivamente: carga tumoral intermedia; y pacientes con dos o más áreas nodales y con tres o más áreas extranodales con afectación extensiva: alta carga tumoral. Los criterios para considerar una afectación extensiva nodal son: ganglios periféricos superiores a 7 cm., adenopatía mediastínica, masa abdominal palpable, afectación ganglionar para-aórtica y pélvica; los criterios para considerar afectación extensiva extranodal son: lesiones en cabeza y cuello con un TNM de T3-T4, masa tumoral superior a 7

cm., palpable o que produzca desplazamiento de órganos abdominales(392).

4.3.7.- Respuesta al tratamiento inicial: variable cualitativa que recoge la respuesta del linfoma al tratamiento inicial y que puede tener los siguientes valores: respuesta nula, respuesta parcial y remisión completa.

4.3.7.1.- Tiempo libre de recaída: en el caso que el paciente, tras el tratamiento inicial, entre en remisión completa se consigna el tiempo durante el cual permanece en remisión, es decir hasta la recaída o hasta la retirada o cierre del estudio. Es una variable cuantitativa temporal que se recoge en meses. Los pacientes que no llegan a alcanzar la remisión completa tienen como tiempo libre de recaída: 0 meses(393).

4.3.7.2.- Tiempo libre de enfermedad: en aquellos pacientes que han alcanzado la remisión completa y que en el momento de cierre o retirada del estudio todavía se encontraban en remisión completa, se ha considerado como tiempo libre de enfermedad al tiempo en meses transcurrido entre las dos circunstancias mencionadas.

4.3.8.- Fallecimiento: variable cualitativa que recoge si el paciente, el momento del cierre del estudio (junio 1993), ya ha fallecido o no por causa del linfoma. Aquellos casos en que se desconoce esta información son considerados como perdidos para el estudio de supervivencia. En caso de muerte se ha anotado la fecha en formato mes/año

4.3.8.1.- Tiempo de supervivencia: tiempo en meses desde el diagnóstico de linfoma hasta el fallecimiento del paciente, cierre del estudio o, en caso de pérdida de seguimiento del paciente o retirada del estudio, hasta la última fecha en que se dispone de información sobre el mismo(393).

4.3.9.- Progresión del linfoma: variable cualitativa que recoge si el paciente a lo largo de su seguimiento ha aumentado el grado de malignidad del linfoma. En caso de existir cambio de grado de malignidad histológica se consigna el nuevo diagnóstico y grado de malignidad histológico.

4.4.- Variables del estudio por citometría de flujo:

4.4.1.- Estudio de la dispersión de luz: en cada caso, a partir del histograma de dispersión frontal y lateral de luz se ha realizado una ventana de análisis sobre la zona de células y se han recogido las siguientes variables cuantitativas: (1) canal medio de los valores dispersión lateral de luz, (2) desviación standard de los valores de dispersión lateral de luz, (3) canal medio de los valores de la dispersión frontal de luz y (4) desviación standard de los valores de dispersión frontal de luz.

4.4.2.- Estudio del contenido en ADN y fases del ciclo celular: en cada caso, se han recogido las siguientes variables cuantitativas: en caso de existir un único pico de fase G0G1: se considera una muestra diploide y se recoge: (1) canal medio del pico G0G1, (2) CV del pico G0G1, (3) porcentaje de células en fase G0G1, (4) porcentaje de células en fase S, (5) canal medio del pico G2M, (6) CV del pico G2M y (7) porcentaje de células en fase G2M; (8) el índice de ADN se considera de 1,00; en caso de existir dos o más picos G0G1: se considera la presencia de aneuploidía y se recoge: (9) canal medio del pico G0G1 diploide de referencia, (10) CV del pico G0G1 diploide, (11) porcentaje de células en fase G0G1 de la población diploide, (12) porcentaje de células en fase S de la población diploide, (13) canal medio del pico G2M diploide, (14) CV del pico G2M diploide, (15) porcentaje de células en fase G2M de la población diploide, (16) canal medio del pico G0G1 aneuploide, (17) CV del pico G0G1 aneuploide, (18) porcentaje de células en fase G0G1 de la población aneuploide, (19) porcentaje de células en fase S de la población aneuploide, (20) canal medio del pico G2M aneuploide, (21) CV del pico G2M aneuploide, (22) porcentaje de células en fase G2M de la población aneuploide y, por último, el (23) índice de ADN de la muestra aneuploide.

4.5.- Estudio histológico e inmunohistoquímico:

4.5.1.- Diagnóstico histológico: tras la revisión del diagnóstico histológico se han clasificado las muestras según la *Working Formulation* y la clasificación de Kiel y se ha consignado el grado histológico de malignidad que les corresponde. Estos son los diagnósticos que van a ser empleados para el estudio estadístico.

4.5.1.1.- Según la *Working Formulation* se ha dividido a los linfomas en función del tipo citológico y el patrón ganglionar en 10 categorías diferentes y un grupo de miscelánea. Los 10 tipos son: (A) linfoma de linfocitos pequeños, (B) linfoma folicular con predominio de células pequeñas hendidas, (C) linfoma folicular mixto con células pequeñas hendidas y grandes, (D) linfoma folicular con predominio de células grandes, (E) linfoma difuso de células pequeñas hendidas, (F) linfoma difuso mixto con células pequeñas hendidas y grandes, (G) linfoma difuso de células grandes, (H) linfoma de células grandes inmunoblástico, (I) linfoma linfoblástico y (J) linfoma de células pequeñas no hendidas. Estos se han agrupado en 3 categorías de agresividad clínica: bajo grado (los tres primeros), grado intermedio (del cuarto al séptimo) y alto grado (los tres restantes)(12).

4.5.1.2.- Según la clasificación de Kiel se ha agrupado a los linfomas en dos grupos de alto y bajo grado de malignidad. Dentro de los linfomas de bajo grado se han incluido a los linfomas: linfocítico, linfoplasmocitario, plasmocitario y las formas nodulares y difusas de los linfomas centrocíticos y centrocíticos-centroblásticos; dentro de los linfomas de alto grado se ha incluido a los linfomas: centroblástico, linfoblástico e inmunoblástico(11).

4.5.2.- Inmunofenotipo: variable cualitativa que, según el resultado del procesamiento inmunohistoquímico, recoge si el linfoma es de estirpe B o T.

4.5.3.- Índice de marcaje con PCNA: variable cuantitativa resultado del cálculo del índice de marcaje con PCNA (células positivas/total de células contadas, expresado como porcentaje). La evaluación del resultado se efectuó por planimetría y se contaron un mínimo de 500 células en cada caso.

5.- Base de datos, tratamiento de la base de datos:

Toda la información recopilada de los casos se ha almacenado en un base de datos matricial e informatizada. Se ha empleado un sistema de filas y columnas capaz de ser leído por el programa informático SPSS/PC+ con el que se ha realizado el estudio estadístico: se ha empleado el procedimiento REVIEW del programa SPSS/PC+, dónde cada caso dispone de 3 filas y 80 columnas para introducir información y en función de la posición de la misma en la matriz de datos representa el valor de una variable determinada. Todos los datos, excepto el nombre, se han introducido como dígitos alfa-numéricos que en las variables cuantitativas representan el valor de la variable y en las cualitativas una determinada categoría de las mismas(394).

Se ha efectuado recodificaciones las categorías de algunas variables: (1) las categorías del estadio clínico se han recodificado en dos: estadio precoz (estadio I ó II) y estadio avanzado (estadio III ó IV); (2) la carga tumoral se ha recodificado en: carga tumoral baja (carga baja ó intermedia) y carga tumoral alta; (3) se ha calculado el llamado índice de proliferación que es igual a la suma de la proporción de células en fase S y en G2M.

6.- Estudio estadístico de los resultados:

El estudio estadístico de los resultados se ha realizado con la ayuda de diversos programas informáticos, especialmente el programa SPSS/PC+(SPSS Inc, 1985/Microsoft)(394). El empleo de uno u otro método estadístico depende del tipo de variables estudiadas y del cumplimiento de determinadas condiciones de aplicación de las pruebas(395) (399). El nivel de significación se ha establecido para una $p < 0,05$ (400).

Los métodos estadísticos utilizados más frecuentemente son los siguientes:

6.1.- Comparación de variables cualitativas:

Para el estudio estadístico de la relación entre variables cualitativas se ha empleado una prueba de independencia de X^2 . Cuando los efectivos calculados eran cercanos a 5 y alguna de las variables tenía más de 2 categorías se ha utilizado la prueba de X^2 con la corrección de Yates. Si los efectivos calculados eran inferiores a 5 o el número total de casos inferior a 20 en una tabla de 2x2 se ha empleado la prueba exacta de Fischer.

6.2.- Comparación de variables cualitativas y cuantitativas:

Para el estudio de relación entre variables cualitativas y cuantitativas se ha empleado la prueba de Kruskal-Wallis que es una prueba no paramétrica para la comparación de dos o más medias. En el caso de que se cumplieran las condiciones de aplicación se ha utilizado el análisis de la varianza.

6.3.- Comparación de variables cuantitativas:

Para el estudio de relación entre variables cuantitativas se han empleado modelos de regresión lineal simple. Para el estudio multivariante se han aplicado modelos de regresión múltiple.

6.4.- Estudio de series temporales:

Para el estudio de variables y series temporales se han confeccionado curvas de supervivencia según el método de Kaplan-Meier y se ha estudiado su relación con la prueba de Mantel-Haenszel.

Tipos de variables	Prueba estadística
Cualitativa Cualitativa	Prueba de independencia de X^2 $X^2 = \sum_{ij} \frac{(n_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}}$ siendo $e_{ij} = (n_{i.} \cdot n_{.j}) / n$ Prueba exacta de Fischer (tablas 2X2)
Cualitativa Cuantitativa	Comparación de k medias: Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis
Cuantitativa Cuantitativa	Regresión lineal: $r_{xy} = \frac{\sum (x-x)(y-y)}{\sqrt{\sum (x-x)^2 \sum (y-y)^2}}$
Tipos de variables	Prueba estadística

Series temporales	Estudio de la supervivencia: curvas de Kaplan-Meier Prueba de Mantel-Haenszel
-------------------	--

Tabla 3-1.- Pruebas utilizadas en el estudio estadístico.

7.- Estudio del contenido en ADN y fases del ciclo celular de tejido linfoide no neoplásico:

Se han procesado 67 muestras de tejido linfoide sano siguiendo exactamente el mismo protocolo de obtención de la suspensión celular, tinción, lectura y análisis por citometría de flujo que se ha utilizado para las muestras de linfoma.

Se ha consignado la presencia o no de picos aneuploides, y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G0G1, G2M y S).

IV RESULTADOS

A.- Resultados y Estadística descriptiva univariante

1.- Edad y sexo

1.1.- Edad:

La edad media de los pacientes estudiados es de 58,68 años, con una desviación standard (DS) de 15,53 años. La varianza es de 241,27. El apuntamiento es de 0,34 y la asimetría de 0,67. El valor mínimo es de 15 años y el máximo de 86 años; el rango es de 71 años.

[Figura 4_1](#)

	Variable EDAD		edad (años)
Media	58.682	E.S. Media	1.912
Dvs Std	15.533	Varianza	241.266
Kurtosis	.343	E.S. Kurt	.582
Skewness	-.672	E.S. Skew	.295
Rango	71.000	Mínimo	15
Máximo	86	Sum	3873.000
Observaciones válidas	66	Observaciones	0

Tabla 4-1.

1.2.- Sexo

De los 66 pacientes estudiados, 33 son hombre y 33 son mujeres, es decir, que cada uno de los sexo corresponde a la mitad de la muestra.

SEXO		sexo		Valid	Cum
Categorías:	Valor	Frecuenc.	Porcent	Porcent	Porcent
hombre	0	33	50.0	50.0	50.0
mujer	1	33	50.0	50.0	100.0
TOTAL		66	100.0	100.0	
Casos válidos	66	Casos perdidos	0		

Tabla 4-2.

2.- Clínica

2.1.- Estadio clínico:

En el momento del diagnóstico, 16 pacientes (24,62 %) se encuentran en estadio I, 7 (10,77 %) en estadio II, 8 (12,31 %) en estadio III y 34 (52,31 %) en estadio IV de su enfermedad. En un caso no se dispone de información acerca del estadio. Las 4 categorías del estadio clínico se agruparon en dos: estadio inicial (estadios I y II) y avanzado (estadios III y IV), de modo, que 23 enfermos (35,38 %) se encuentran en estadio inicial y 42 (64,62 %) en

estadio avanzado del linfoma en el momento del diagnóstico.

[Figura 4_2](#)

2.2.- Presencia de síntomas B:

Del total de 66 enfermos, en 65 casos se dispone de información acerca de la presencia de síntomas B en el momento del diagnóstico de linfoma. 45 enfermos (69,23 %) no presentan síntomas (estadio A) mientras que los 20 (30,77 %) restantes presentan síntomas (estadio B).

[Figura 4_3](#)

SINTB	síntomas B	Valid		Cum	
		Frecuenc.	Porcent	Porcent	Porcent
Categorías	Valor				
no	0	45	68.2	69.2	69.2
sí	1	20	30.3	30.8	100.0
.	.	1	1.5	PERDIDO	
TOTAL		66	100.0	100.0	
Casos válidos	65	Casos perdidos		1	

Tabla 4-3.

2.3.- Carga tumoral:

En el momento del diagnóstico, 32 enfermos (50,00 %) presentan una baja carga tumoral según los criterios de Cabanillas, 11 (17,19 %) una carga intermedia y 21 (32,81 %) una elevada carga tumoral. Si tan solo se distinguen dos categorías en la valoración de la carga tumoral: 43 (67,19 %) enfermos presentan una carga tumoral baja (baja-intermedia) y 21 (32,81 %) una elevada carga tumoral. En 2 pacientes no se dispone de suficiente información para averiguar la carga tumoral que poseían en el momento del diagnóstico.

[Figura 4_4](#)

CARGA	Valor	carga tumoral (Cabanillas)			
		Frecuenc.	Porcent	Valid	Cum
Categorías:					
baja	0	32	48.5	50.0	50.0
media	1	11	16.7	17.2	67.2
alta	2	21	31.8	32.8	100.0

	2	3.0	PERDIDO
	-----	-----	-----
TOTAL	66	100.0	100.0
Casos válidos	64		Casos perdidos 2

Tabla 4-4.

2.4.- Localización del linfoma:

De los 66 enfermos, 42 (63,64 %) estaban diagnosticados de linfoma de origen nodal y 24 (36,36 %) de linfoma de origen extranodal. De los 24 pacientes con linfoma extranodal: 5 son linfomas de amígdala, 1 de laringe, 5 de estómago, 2 de duodeno, 1 de yeyuno, 1 de íleon, 1 de intestino sin especificar, 1 de ovario, 3 de abdomen con afectación de retroperitoneo, 1 de origen mediastínico no nodal y 2 de piel.

[Figura 4_5](#)

2.5.- Respuesta al tratamiento:

Todos los pacientes fueron tratados con protocolos terapéuticos similares. 6 pacientes (10,00 %) no respondieron al tratamiento, en 27 (45,00 %) pacientes se consiguió una remisión parcial de la enfermedad y en los 27 (45,00 %) pacientes restantes se alcanzó la remisión completa. Se ha considerado que en 33 casos (55,00 %) la respuesta no consiguió la remisión completa mientras que en los 27 (45,00 %) restantes si.

En 6 pacientes no se dispone de información completa sobre la respuesta al tratamiento y la evolución posterior de la enfermedad.

[Figura 4_6](#)

REMISIÓN	Respuesta Tto				
	Valor	Frecuen c.	Porcent	Valid Porcent	Cum Porcent
no	0	6	9.1	10.0	10.0
parcial	1	27	40.9	45.0	55.0
completa	2	27	40.9	45.0	100.0
.	.	6	9.1	PERDIDO	
		-----	-----	-----	
	TOTAL	66	100.0	100.0	
Casos válidos	60		Casos perdidos	6	

Tabla 4-5.

2.6.- Tiempo libre de enfermedad:

De los 27 pacientes que alcanzaron la remisión completa tras el primer tratamiento, 14 enfermos (21,21 %) se encuentran en remisión completa al cerrar el estudio con un tiempo libre de enfermedad superior a los 30 meses de seguimiento.

CUR	t libre enf.>30 meses				
	Valo r	Frecuenc.	Porcent	Valid Porcent	Cum Porcent
no	0.0	52	78.8	78.8	78.8
sí	1.00	14	21.2	21.2	100.0
		-----	-----	-----	
	TOTAL	66	100.0	100.0	
Casos válidos	66		Casos perdidos	0	

Tabla 4-6.

2.7.- Mortalidad:

Durante el seguimiento de los pacientes, 26 (39,39 %) de ellos han fallecido por causas relacionadas con el linfoma, 21 (31,82 %) se encuentran todavía vivos en el momento de finalizar el estudio y 19 (28,79 %) han sido perdidos o retirados vivos durante el seguimiento.

[Figura 4_7](#)

2.8.- Tiempo de supervivencia:

Se han considerado 26 pacientes fallecidos y 40 retirados. El tiempo de máxima supervivencia es de 120 meses.

	MUERTOS	EXCLUIDOS	RIESGO	SUPERVIVE	ERRO
TIEMPO			N		ESTANDAR
2	0	5	61	1.0000	0.0000
4	3	0	61	0.9508	0.0270
5	1	1	57	0.9341	0.0318
6	1	1	55	0.9172	0.0356
7	1	0	54	0.9002	0.0387
8	2	1	52	0.8655	0.0440
9	0	1	49	0.8655	0.0453
11	1	0	49	0.8479	0.0472
12	1	0	48	0.8302	0.0494
13	0	1	46	0.8302	0.0504
14	1	0	46	0.8122	0.0519
15	3	0	45	0.7580	0.0556
16	1	0	42	0.7400	0.0582
18	1	0	41	0.7219	0.0595
19	0	1	39	0.7219	0.0610
20	1	1	38	0.7029	0.0622
21	1	0	37	0.6839	0.0632
22	0	1	35	0.6839	0.0650
23	0	1	34	0.6839	0.0659
24	1	0	34	0.6638	0.0660
26	1	1	32	0.6431	0.0679
29	0	1	30	0.6431	0.0701
30	1	1	29	0.6209	0.0710
31	1	0	28	0.5987	0.0717
34	0	1	26	0.5987	0.0744
36	0	1	25	0.5987	0.0759
37	1	0	25	0.5748	0.0750

40	0	1	23	0.5748	0.0782
41	0	1	22	0.5748	0.0790
42	1	0	22	0.5186	0.0786
44	1	0	21	0.5225	0.0788
47	1	1	10	0.4050	0.0807
49	0	2	16	0.4050	0.0870
51	0	1	15	0.4050	0.0908
52	0	1	14	0.4050	0.0940
57	0	1	13	0.4050	0.0976
59	0	1	12	0.4050	0.1015
61	0	1	11	0.4050	0.1061
72	0	1	10	0.4050	0.1112
81	0	1	9	0.4050	0.1173
83	0	1	8	0.4050	0.1244
85	0	1	7	0.4050	0.1330
89	0	1	6	0.4050	0.1436
91	0	1	5	0.4050	0.1573
97	0	1	4	0.4050	0.1750
103	0	1	3	0.4050	0.2031
111	0	1	2	0.4050	0.2487
119	0	1	1	0.4050	0.3518

Tabla 4-7. Estudio de supervivencia global de los enfermos. Se lista el tiempo de supervivencia ordenado de menor a mayor, la situación del enfermo al cerrar el estudio (muerto o retirado/vivo), los pacientes en riesgo para cada tiempo y la probabilidad de supervivencia.

[Figura 4 8](#)

3.- Anatomía patológica

3.1.- Diagnóstico histológico del linfoma según la *Working Formulation*:

Después de la revisión anatomopatológica de todos los casos, la distribución de diagnósticos según la *Working Formulation* es: 6 casos de (A) linfoma de linfocitos pequeños, 4 de (B) linfoma folicular con predominio de células pequeñas hendidas, 11 de (C) linfoma folicular mixto con células pequeñas hendidas y grandes, 0 de (D) linfoma folicular con predominio de células grandes, 5 de (E) linfoma difuso de células pequeñas hendidas, 9 de (F) linfoma difuso mixto con células pequeñas hendidas y grandes, 8 de (G) linfoma difuso de células grandes, 10 de (H) linfoma de células grandes inmunoblástico, 11 de (I) linfoma linfoblástico, 1 de (J) linfoma de células pequeñas no hendidas y 1 de miscelánea (Lennert).

[Figura 4 9](#)

3.2.- Grado histológico de malignidad del linfoma según la *Working Formulation*:

En función el diagnóstico histológico del linfoma según la *Working Formulation*, los linfomas se han dividido en los tres grados de malignidad que establece dicha clasificación. 22 enfermos (33,33 %) presentan linfomas de bajo grado, 22 (33,33 %) linfomas de grado intermedio y, también, 22 pacientes (33,33 %) presentan linfomas de alto grado de malignidad.

MALIG	MALIGNIDAD HISTOLÓGICA				
	Valo	Frecuenc.	Porcent	Porcent	Porcent
Categorías:					
BAJO	1.00	22	33.3	33.3	33.3
MEDIO	2.00	22	33.3	33.3	66.7
ALTO	3.00	22	33.3	33.3	100.0
		-----	-----	-----	
	TOTAL	66	100.0	100.0	
Casos	66	Casos perdidos	0		

Tabla 4-8.

3.3.- Grado histológico de malignidad del linfoma según la clasificación de Kiel:

Según la clasificación histológica de los linfomas de Kiel, éstos se han dividido en linfomas de alto y bajo grado de malignidad. En nuestra serie, 36 pacientes (54,55 %) se engloban dentro de los linfomas de bajo grado y 30 (45,45 %) dentro de los de alto grado.

[Figura 4_10](#)

3.4.- Tipo celular predominante:

Se clasificaron los casos en función del tipo celular predominante en la muestra histológica de linfoma. 7 casos son de linfocitos pequeños tipo LLC, 9 de células pequeñas hendidas, 20 mixtos de células pequeñas hendidas y células grandes, 8 de células grandes, 10 de inmunoblastos, 11 de linfoblastos y 1 de células tipo Burkitt.

3.5.- Patrón histológico:

De los 66 linfomas, independientemente del tipo celular predominante, 21 casos (31,82 %) presentan un patrón folicular, mientras que los 45 casos (68,18 %) restantes presentan un patrón difuso del linfoma.

[Figura 4_11](#)

4.- Citometría de flujo

4.1.- Dispersión lateral de luz:

El resultado medio de la media de distribución de los canales de dispersión lateral de luz es de 3,66 con una DS de 1,78. El valor mínimo es de 0,97 y el máximo de 9,99.

La media de la desviación standard de la distribución de canales de dispersión lateral de luz es de 2,60 con una DS de 1,71. El valor mínimo es de 0,53 y el máximo de 8,18.

4.2.- Dispersión frontal de luz:

La media de la distribución media de canales de dispersión frontal de luz es de 5,94, con una DS de 2,20. El valor mínimo es de 2,58 y el máximo de 9,90.

En cuanto a la media de la desviación standard de la distribución de canales de dispersión frontal de luz, ésta es de 5,79, con una DS de 2,02. El valor mínimo es de 2,40 y el máximo de 9,99.

Variable	Media	Dvs Std	Mínimo	Máximo	N	Nombre
SS	3.66	1.78	.97	9.99	64	disp.luz latera
SSD	2.60	1.71	.53	8.18	64	SD disp. luz la
FW	5.94	2.20	2.58	9.90	64	disp. Luz fronta
FWSD	5.79	2.02	2.40	9.99	64	SD disp. Luz fro
PG1	85.13	9.03	60.1	95.5	66	% fase G0G1
PG2	3.31	2.51	0.0	11.8	66	% fase G2M
PS	11.59	7.87	1.90	37.90	66	% fase S

Tabla 4-9.

4.3.- Análisis del ADN: fase G0G1 del ciclo celular:

El canal medio de los picos G0G1 es de 53,66 en un histograma de 264 canales o de 214,26 en un histograma de 1024 canales. La media de los CV los picos es de 4,73, con una DS de 1,36.

El porcentaje medio de células en fase G0G1 es de 85,13, con una DS de 9,03. El valor mínimo es de 60,10 y el máximo de 95,50.

[Figura 4_12](#)

4.4.- Análisis del ADN: fase G2M del ciclo celular:

El canal medio de los picos correspondientes a la fase G2M es de 105,66 en un histograma de 264 canales y de 422,06 en un histograma de 1024 canales. El valor medio del CV de los picos G2M es de 4,70, con una DS de 1,52.

El porcentaje medio de células en fase G2M es de 3,31, con una DS de 2,51. El valor mínimo es de 0,00 y el máximo es de 11,80.

[Figura 4_13](#)

4.5.- Análisis del ADN: fase S del ciclo celular:

El porcentaje medio de células en fase S es de 11,59, con una DS de 7,87. El valor mínimo de fase S es de 1,90 y el máximo de 37,90.

[Figura 4_14](#)

4.6.- Índice de proliferación:

El índice de proliferación (IP) es la suma del porcentaje de células en fase S y en fase G2M. El valor medio es de 14,90, con una DS de 9,03. El valor mínimo es de 4,50 y el máximo de 39,90.

4.7.- Aneuploidía; índice de ADN:

Presentan alteración en el contenido de ADN 19 casos (28,79 %), mientras que los 47 (71,21 %) restantes no muestran aneuploidía por citometría de flujo. 5 casos (26,32 % de los aneuploides y 7,58 % del total) de los 19 aneuploides son tetraploides.

IDNA		índice ADN		
Valor	Frecuenc.	Porcent	Valid Porcent	Cum Porcent
100	47	71,2	71,2	71,2
113	3	4,5	45	75,8
114	2	3,0	30	78,8
115	1	1,5	15	80,3
116	1	1,5	15	81,8
119	1	1,5	15	83,3
120	1	1,5	15	84,8
127	1	1,5	15	86,4
149	1	1,5	15	87,9
169	1	1,5	15	89,4
179	1	1,5	15	90,9
184	1	1,5	15	92,4
200	5	7,67	6	100,0

TOTAL	66	1000	1000	
Casos válidos	66	Casos perdidos	0	

Tabla 4-10

De las muestras aneuploides, el índice medio de ADN es de 1,50, con una DS de 0,38. El valor mínimo es de 1,13 y el máximo es de 2,00.

5.- Inmunohistoquímica

5.1.- Inmunofenotipo:

En 61 de los 66 casos estudiados se ha podido realizar el marcaje inmunohistoquímico del inmunofenotipo de las células neoplásicas del linfoma. 52 casos (85,25 %) resultan proliferaciones neoplásicas de linfocitos B y 9 (14,75 %) de linfocitos T.

IMF	inmunofenotipo			Valid	Cum
Categorías:	Valor	Frecuenc.	Porcent	Porcent	Porcent
B	0	52	78,8	85,2	85,2
T		1	13,6	14,8	100,0
.		5	7,6	PERDIDO	

TOTAL		66	1000	1000	

Casos válidos	61	Casos perdidos	5
---------------	----	----------------	---

Tabla 4-11.

5.2.- Índice de marcaje con PCNA:

El porcentaje medio de células PCNA positivas es de 16,98, con una DS de 16,56 y una varianza de 274,21. El apuntamiento es de -0.36 y la asimetría de 0.81. El valor mínimo es de 0,00 y el máximo de 61,72, con un rango de 61,72.

[Figura 4 15](#)

Variable	PCNA	PCNA	
Media	16976	E.S. Media	2275
Dvs Std	16559	Varianza	274213
Kurtosis	-361	E. S. Kurt	644
Skewness	807	E. S. Skew	327
Rango	61720	Mínimo	0
Máximo	6172	Sum	899730
Observaciones válidas	53	Observaciones pérdidas	13

Tabla 4-12.

[Figura 4 16](#)

[Figura 4 17](#)

[Figura 4 18](#)

[Figura 4 19](#)

[Figura 4 20](#)

[Figura 4 21](#)

6.- Citometría de flujo de la serie normal:

De las 67 muestras procesadas no hay ninguna que presente picos sospechosos de aneuploidía. Todos los histogramas poseen un único pico en la zona de canales correspondientes a G0G1 y, por lo tanto, deben ser considerados como diploides.

El porcentaje medio de células en fase G0G1 es de $93,17 \pm 3,48$; el de células en fase g2M es de $2,55 \pm 2,47$; y el de células en fase S es de $4,26 \pm 1,99$.

B.- Resultados II: Estudio estadístico:

1.- Comparación de las variables demográficas con el resto de variables:

1.1.- Edad:

Mediante la prueba de Kruskal-Wallis, una prueba de independencia no paramétrica para la comparación de variables cuantitativas y cualitativas, y el cálculo de coeficiente de correlación para el estudio de independencia entre variables cualitativas se ha analizado la relación entre edad y el resto de variables del estudio.

1.1.1.- Comparación entre la edad y el sexo: la edad media de los varones es de 58,48 años y la de las mujeres es de 58,88 años. No se ha encontrado diferencia significativa entre las medias de edad entre hombres y mujeres ($p=0,9540$).

1.1.2.- Comparación entre la edad y las variables clínicas: la edad media de los pacientes según el estadio es de 58,13 años en los casos de estadios precoces, mientras que es de 58,95 años en los estadios avanzados ($p=0,6906$).

Los pacientes sin síntomas B tienen una edad media de 58,62 años y los que tienen sintomatología B de 58,75 años ($p=0,8422$).

Los casos con baja carga tumoral tienen una media de edad de 57,60 años y los que tienen una carga tumoral elevada de 60,24 años ($p=0,5432$).

El origen nodal o extranodal del linfoma no tiene relación significativa con la edad ($p=0,7388$); los pacientes con un origen nodal de su linfoma tienen una edad media de 59,69 años y los que presentan un linfoma de origen extranodal de 56,92 años.

Los pacientes que no tienen buena respuesta al tratamiento tienen una edad media de 60,33 años, mientras que aquellos que alcanzan la remisión completa tras el tratamiento es de 54,07 años. No hay diferencia significativa entre la media de edad de ambos grupos ($p=0,2285$).

Los pacientes que presentan tiempos libres de enfermedad superiores a 30 meses son más jóvenes (edad media 50,64 años) que los que tienen tiempos libres de enfermedad inferiores a 30 meses (edad media de 60,85 años), pero sin que dicha diferencia alcance significación estadística ($p=0,0931$).

1.1.3.- Comparación entre la edad y el resultado de las variables histológicas: no existe diferencia significativa entre la media de edad de los pacientes con linfomas de bajo grado (60,00 años), grado intermedio (60,45 años) o alto grado (58,59 años) según la *Working*

Formulation (p=0,9959), ni entre la media de edad de los linfomas de bajo (60,83 años) y alto grado (56,10 años), según la clasificación de Kiel (p=0,6896).

La media de edad de los pacientes con un patrón folicular es de 59,48 años y la de los que tienen un patrón difuso es de 58,31 años (p=0,7202).

1.1.4.- Comparación entre la edad y el resultado del estudio por citometría de flujo: no se ha demostrado correlación lineal significativa entre la edad y ninguna de las variables cuantitativas resultado del estudio por citometría de flujo: dispersión lateral de luz (r=-0,00074, p=0,9954), DS de dispersión lateral de luz (r=-0,04617, p=0,7171), dispersión frontal de luz (r=0,02316, p=0,8559), DS de dispersión frontal de luz (r=-0,03530, p=0,7818), porcentaje de células en fase G0G1 (r=0,012216, p=0,3285), porcentaje de células en fase G2M (r=-0,03736, p=0,7659), porcentaje de células en fase S (r=-0,12884, p=0,3025), índice de proliferación (r=-0,12265, p=0,3265). La media de edad de los pacientes con histogramas diploides es de 58,08 y la de los pacientes con histogramas con aneuploidía de 60,16 años; tampoco no hay diferencia significativa entre los grupos (p=0,3043).

1.1.5.- Comparación entre la edad y el resultado del estudio por técnicas inmunohistoquímicas: los pacientes con linfomas inmunofenotípicamente B tienen una edad media de 58,06 años y los que tienen linfomas tipo T de 58,22 años (p=0,9028).

No se ha encontrado correlación entre los valores de índice de marcaje con PCNA y la edad de los enfermos (r=0,16947, p=0,2251).

Variable	Categorías	Edad	Significación (n)
Sexo	hombre	58,5	0,954
	mujer	58,0	
Estadio clínico	I-II	58,1	0,691
	III-IV	58,9	
Síntomas B	no	58,6	0,842
	sí	58,7	
Carga tumoral	baja	57,6	0,543
	alta	60,2	
Origen linfoma	nodal	59,7	0,739
	extranodal	56,9	
Remisión post-tratamiento	no	60,3	0,228
	sí	54,1	
Tiempo libre de enfermedad	< 30 meses	60,8	0,093
	> 30 meses	50,6	
Working Formulation	bajo grado	60,0	0,996
	grado	60,0	
	intermedio		
	alto grado	58,6	
Kiel	bajo grado	60,8	0,689
	alto grado	58,1	
Patrón	folicular	59,5	0,702
	difuso	58,3	
Dispersión de luz			no significativo
% células G0G1		r=0,012	0,781
% células G2M		r=-0,037	0,766
% células S		r=-0,029	0,302
contenido en ADN	diploide	58,1	0,304
	aneuploide	60,1	
inmunofenotipo	B	58,1	0,902
	T	58,2	
marcaje PCNA		r=0,169	0,225

Tabla 4-13 .Comparación de la edad y las otras variables.

Ninguna de las comparaciones realizadas ha mostrado diferencias significativas entre la edad media de los pacientes pertenecientes a las categorías de las variables cualitativas ni relación entre los valores de edad y las variables cuantitativas. Los subgrupos dentro de cada variable no

presentan diferencias significativa entre sus medias de edad, por lo tanto son comparables en cuanto la distribución de la variable edad.

1.2.- Sexo:

Se ha estudiado la asociación entre el sexo masculino o femenino y el resto de variables del estudio. Se he empleado la prueba de X^2 para comparar el sexo con las variables cualitativas y la de Kruskal-Wallis para comparar el sexo con las variables cuantitativas.

1.2.1.- Comparación entre el sexo y la clínica: 11 varones se encuentran con un estadio precoz del linfoma y 22 en estadio avanzado, de las mujeres, 12 se encuentran en estadio precoz y 20 en estadio avanzado ($p=0,7254$).

No hay diferencia significativa ($p=0,9341$) entre el porcentaje de hombres y mujeres con síntomas B (50,00 % vs 50,00 %) o sin síntomas B (51,11 % vs 48,89 %).

El porcentaje de hombres con una baja (57,58 %) o alta (42,42 %) carga tumoral no difiere significativamente ($p=0,1832$) del de mujeres con baja (75,00%) o alta carga (25,00 %).

Tanto el 36,36 % de los hombres como de las mujeres tienen el origen de su linfoma en un área extranodal ($p=1,0000$).

Tampoco se ha encontrado relación entre la respuesta al tratamiento y el sexo de los pacientes ($p=0,3112$) ni con un tiempo libre de enfermedad superior o inferior a 30 meses ($p=0,5470$).

1.2.2.- Comparación entre el sexo y la anatomía patológica: según la *Working Formulation*, dentro de los linfomas de bajo grado un 45,45 % son hombres y un 54,55 % son mujeres, dentro de los de grado intermedio un 54,55 % son varones y un 45,45 % son mujeres y, por último, dentro de los de alto grado un 50,00 % son hombres y otro 50,00 % son mujeres. La distribución de sexos no es significativamente diferente dentro de los grados histológicos de malignidad de los linfomas ($p=0,8338$).

Tampoco hay diferencia significativamente estadística ($p=0,6210$) entre el porcentaje de hombres (47,22 %) y de mujeres (52,78 %) con linfoma de bajo grado, según la clasificación de Kiel, y hombres (53,33 %) y mujeres (46,47 %) con alto grado.

La distribución de sexos en función del patrón nodular o difuso del linfoma no ofrece significación estadística ($p=0,7916$).

1.2.3.- Comparación entre el sexo y el resultado de la citometría de flujo: los estudios de comparación de medias entre hombres y mujeres de la dispersión lateral de luz ($p=0,3107$), DS de dispersión lateral de luz ($p=0,3139$), dispersión frontal de luz ($p=0,3976$), DS de dispersión frontal de luz ($p=0,4684$), porcentaje de células en fase G0G1 ($p=0,8827$), fase G2M ($p=0,9386$), fase S ($p=0,8726$) e índice de proliferación ($p=0,8676$) no muestran diferencias significativas.

Un 27,27 % de los varones y un 30,30 % de las mujeres presentan histogramas de ADN aneuploides ($p=0,7857$).

1.2.4.- Comparación entre el sexo y el resultado de la inmunohistoquímica: el índice de marcaje con PCNA, en media, en hombres (15,92 %) y en mujeres (18,25 %) no es diferente ($p=0,9929$).

28 hombres tienen linfomas inmunofenotípicamente B y 5 T, 24 mujeres tienen linfomas B y 4 T. No existe relación entre las dos variables ($p=0,9243$).

Ninguna de las comparaciones realizadas ha mostrado asociación estadística significativa entre el sexo y las variables estudiadas. Los grupos no son significativamente diferentes en cuanto a la distribución de sexos y por lo tanto pueden considerarse comparables en cuanto a la variable sexo.

		Sexo		
Variable	Categorías	hombre	mujer	Significación
Estadio clínico	I-II	11	12	0,725
	III-IV	20	20	
Síntomas B	no	23	22	0,934
	sí	10	10	
Carga tumoral	baja	19	24	0,183
	alta	13	8	
Origen linfoma	nodal	21	21	1,000
	extranodal	12	12	
Remisión post-tratamiento	no	14	19	0,311
	sí	15	12	
Tiempo libre de enfermedad	≤30 meses	27	25	0,547
	> 30 meses	6	8	
Working Formulation	bajo grado	10	12	0,834
	intermedio			
	alto grado	11	11	
Kiel	bajo grado	17	19	0,621
	alto grado	16	14	
Patrón	folicular	10	11	0,791
	difuso	23	22	
Dispersión de luz				no significativo
% células G0G1		m=85,2	m=85,0	0,883
% células G2M		m=3,2	m=3,4	0,939
% células S		m=11,6	m=11,5	0,873
contenido en ADN	diploide	24	23	0,786
	aneuploide	9	10	
inmunofenotipo	B	28	24	0,924
	T	5	4	
marcaje PCNA		m=15,9	m=18,2	0,993

Tabla 4-14. Comparación entre el resto y las otras variables.

2.- Comparación entre las variables clínicas y el resto de variables

2.1.- Comparación de las variables clínicas entre sí:

Mediante la prueba de X^2 se ha estudiado la relación entre sí de las variables: estadio clínico, sintomatología B, origen del linfoma y carga tumoral, respuesta a tratamiento y tiempo libre de enfermedad.

Un estadio clínico inicial o avanzado no se asocia significativamente con la presencia o ausencia de síntomas B ($p=0,0838$) aunque los pacientes con estadios III-IV presentan más

frecuentemente sintomatología B acompañante. Un estadio clínico avanzado se asocia de modo significativo con un inicio nodal del linfoma ($p=0,0154$), una elevada carga tumoral ($p<0001$), una mala respuesta al tratamiento ($p=0,0010$) y un tiempo libre de enfermedad inferior a 30 meses ($p=0,0107$).

La presencia de sintomatología B únicamente se asocia con significación estadística con un inicio nodal del linfoma ($p=0,0027$).

En los linfomas extranodales se consigue la remisión completa en mayor porcentaje que en los nodales (71,43 % vs 32,43 %, $p=0,0131$) y, también, mayor proporción de casos con tiempo libre de enfermedad superior a 30 meses (41,67 % vs 9,42 %, $p=0,0058$ aplicando la corrección de Yates).

Una baja carga tumoral se relaciona con un porcentaje superior de remisiones completas ($p=0,0155$) pero no con un tiempo libre de enfermedad superior.

Un 51,85 % de los 27 pacientes que alcanzan la remisión completa tras el tratamiento permanecen libres de enfermedad un mínimo de 30 meses de seguimiento al cierre del estudio; el 48,15 % restante recidiva de su enfermedad antes del cierre del estudio, si bien siguen sin enfermedad aparente linfomatosa pero con un seguimiento inferior a 30 meses.

2.2.- Comparación de las variables clínicas con las variables histológicas:

Con la prueba de X^2 se ha estudiado la relación entre el estadio clínico, sintomatología B, origen del linfoma, carga tumoral, respuesta al tratamiento y el tiempo libre de enfermedad con el grado de malignidad histológico según la *Working Formulation* y la clasificación de Kiel, y el patrón histológico.

El porcentaje de pacientes con linfomas de bajo grado en estadios precoces es de 23,81 %, de grado intermedio es de 27,27 % y de alto grado es de 54,55 %; aunque parece que los linfomas de alto grado presentan mayor porcentaje de casos en estadios precoces, la prueba no resulta significativa ($p=0,0673$). La misma situación ocurre si se emplea la clasificación de Kiel (25,71 % vs 53,85 %, $p=0,0782$). No hay relación entre el estadio y el patrón histológico ($p=0,2431$).

La presencia o ausencia de sintomatología B no se relaciona significativamente ni con la *Working Formulation* ($p=0,9037$), clasificación de Kiel ($p=0,5070$) ni con el patrón histológico ($p=0,9286$).

Los linfomas extranodales se presentan en mayor proporción con grado alto de malignidad, tanto utilizando la *Working Formulation* (13,64 % de linfomas extranodales de bajo grado vs 40,91 % y 54,55 % de linfomas extranodales de grado intermedio y alto, $p=0,0162$) como la clasificación de Kiel (16,67 % vs 58,33 %, $p=0,0355$). El porcentaje de casos difusos es superior en los linfomas de origen extranodal que en los de origen nodal ($p=0,0109$).

La carga tumoral no se relaciona con ninguna de las clasificaciones histopatológicas ni tampoco con el patrón histológico del tumor.

Ni la respuesta al tratamiento ni el tiempo libre de enfermedad se relacionan con la clasificación histopatológica del tumor ni el patrón.

		W F			Kiel		Patrón	
		baio	medio	alto	baio	alto	nodul	difus
Estadio	I-II	5	6	12	9	14	5	18
	III-IV	16	16	10	26	16	15	27
Sínt B	no	14	15	16	23	22	14	31
	sí	7	7	6	12	8	6	14
Carga	baia	15	12	16	22	21	14	29
	alta	6	9	6	12	9	6	15
Origen	nodal	19	13	10	27	15	18	24
	extra	3	9	12	9	15	3	21
Remis	no	12	11	10	20	13	11	22
	sí	7	9	11	12	15	7	20
T I. Enf	< 30m	19	18	15	30	22	18	34
	> 30m	3	4	7	6	8	3	11

Tabla 4-15.- Clínica e histología.

2.3.- Comparación entre las variables clínicas y los resultados de la citometría de flujo:

Las variable clínicas se han comparado las medias de las variables que recogen las fases del

ciclo celular y el índice de proliferación mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, así como con la presencia de aneuploidía por una prueba de X^2 .

No se ha estudiado la relación entre las variables clínicas y los resultados de la dispersión de la luz ya que no tiene sentido, puesto que los resultados citométricos reflejan únicamente, en todo caso, características físicas de las células tumorales.

Ni el estadio clínico, ni la sintomatología B, ni el origen del linfoma, ni la respuesta al tratamiento se asocian a diferencias significativas en los porcentajes, en valor medio, de las células en fase G0G1, fase S, fase G2M o con el índice de proliferación. Sin embargo los linfomas de origen extranodal presentan un valor medio de células en fase G0G1 inferior a los nodales (81,21 % vs 87,36 %, $p=0,0186$) y un valor medio de células en fase S superior a los nodales (15,14 5 vs 9,55 %, $p=0,0170$).

		% células fase G0G1 media	% células fase G2M media	% células fase S media	índice de proliferac. media
Estadio	I-II	83,3	3,4	13,5	16,7
	III-IV	85,9	3,4	10,6	14,1
Síntomas B	no	84,1	3,5	12,3	15,9
	sí	86,9	2,9	10,1	13,0
Carga tumor	baja	85,4	3,1	11,4	14,6
	alta	84,3	3,7	11,9	15,7
Origen linf.	nodal	87,1	3,0	9,5	12,6
	extranodal	81,2	3,7	15,1	18,8
Remisión	no	83,8	3,5	10,6	14,1
	sí	83,5	3,1	13,3	16,5
Tiempo libre enfermedad	≤30 meses	86,6	3,3	10,0	13,3
	>30 mes.	79,5	3,3	17,1	20,5

Tabla 4-16.- Clínica y citometría de flujo.

La respuesta al tratamiento o el tiempo libre de enfermedad no tienen relación con los resultados del ciclo celular.

No se ha encontrado relación significativa entre la presencia o ausencia de aneuploidía y el estadio clínico, sintomatología B, origen del linfoma, carga tumoral, respuesta al tratamiento o tiempo libre de enfermedad superior a 30 meses.

Tablas y estudio estadístico de la relación entre las variables clínicas y el contenido en ADN:

		Contenido en ADN		
		Diploide	Aneuploide	Significación
Estadio	I-II	15	8	0,466
	III-IV	31	11	
Síntomas B	no	32	13	0,928
	sí	14	6	
Carga tumor	baja	31	12	0,956
	alta	15	6	
Origen linfoma	nodal	29	13	0,607
	extranodal	18	6	
Remisión	no	23	10	0,481
	sí	21	6	
Tiempo libre de enfermedad	≤30 meses	38	19	0,519
	> 30 meses	9	5	

Tabla 4-17.- Clínica y contenido en ADN.

2.4.- Comparación de las variables clínicas con el resultado de la inmunohistoquímica:

El 85,71 % de los linfomas en estadios precoces son B y el 14,29 % son T, mientras que en estadios avanzados, el 84,61 son B y el 15,39 son T ($p=1,000$). La proporción de pacientes con síntomas B no difiere significativamente según si el linfoma es B o T (27,45 % vs 44,44 %). La proporción de linfomas B extranodales (37,25 %) no es significativamente diferente de los linfomas T extranodales (44,44 %). 35 enfermos tienen linfomas B con baja carga tumoral, 15 con alta carga tumoral, 6 tienen linfomas T con baja carga y 3 con alta carga ($p=1,000$).

El inmunofenotipo no se relaciona con la respuesta al tratamiento ni con el tiempo libre de enfermedad.

		B	T			B	T
Estadio	I-II	18	3	Origen	nodal	33	5
	III-IV	30	6		extrand	19	4
Sínt. B	no	37	5	Remis.	no	25	5
	sí	14	4		sí	22	4
Carga tumor	baja	35	6	T.L.	≤30 m	40	8
	alta	15	3	enferm.	>30m	12	1

Tabla 4-18.- Clínica e inmunofenotipo.

El valor medio del porcentaje de células positivas para el antígeno PCNA no es significativamente diferente entre los linfomas en estadio inicial o avanzado ($p=0,2502$), pacientes en estadio A o B ($p=0,6699$), linfomas de origen nodal o extranodal ($p=0,6373$), pacientes que alcanzan la remisión completa tras el tratamiento ($p=0,6305$) o, por último, enfermos con tiempo libre de enfermedad inferior o superior a 30 meses ($p=0,0689$).

3.- Comparación de las variables histopatológicas y el resto de las variables:

La comparación entre la histología y la clínica se ha realizado en el apartado anterior: no se ha

encontrado relación entre las variables de la situación clínica en el momento del diagnóstico y la histología excepto que: los linfomas extranodales se presentan en mayor proporción con grado alto de malignidad, tanto utilizando la *Working Formulation* (13,64 % de linfomas extranodales de bajo grado vs 40,91 % y 54,55 % de linfomas extranodales de grado intermedio y alto, $p=0,0162$) como la clasificación de Kiel (16,67 % vs 58,33 %, $p=0,0355$).

El porcentaje de casos difusos es superior en los linfomas de origen extranodal que en los de origen nodal ($p=0,0109$).

clasf	frec.	edad	sexo		estadio		remisión		t.Le.
			homb	mujer	I-II	III-IV	no	sí	
W.F.	%	años	homb	mujer	I-II	III-IV	no	sí	>30m
A	9,1	62,5	16,7	83,3	20	80	50	50	16,7
B	6,1	64,7	100	0	50	50	100	0	0,0
C	16,7	55,9	45,5	54,5	18	82	54	46	18,2
D#	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
E	7,6	60,6	60,0	40,0	20	80	40	60	40,0
F	13,6	63,0	44,4	55,6	33	67	75	25	11,1
G	12,1	57,5	62,5	37,5	25	75	43	57	12,5
H	15,2	55,3	60,0	40,0	50	50	50	50	40,0
I	16,7	59,5	36,4	63,6	54	4	50	50	18,2
J*	1,5	15	100	0	100	0	0	100	100
Mis*	1,5	71	0	100	0	100	100	0	0,0

Tabla 4-19.- Hallazgos según histopatología. Excepto la edad el resto de valores son porcentajes.
ningún caso, *sólo un caso.

Las variables histológicas no se comparan estadísticamente entre sí puesto que la valoración del patrón histológico interviene en la decisión para establecer diagnóstico histológico y el grado histológico de malignidad y la clasificación de Kiel y la *Working Formulation* son traducibles entre sí.

3.1.- Comparación de la histología con el análisis por citometría de flujo:

Se ha empleado una prueba de Kruskal-Wallis para comparar los valores medios de la dispersión de luz y fases del ciclo celular con las clasificaciones histopatológicas y el patrón histológico. Mediante la prueba de X^2 se ha estudiado la independencia entre la presencia de aneuploidía y la histología del linfoma.

3.1.1.- Variables de dispersión de la luz: los valores medios de la media del canal de dispersión frontal de luz o de la DS de la dispersión frontal de luz no se relacionan con ninguna de las variables histológicas.

		dispersión frontal luz	signif. (p=)	DS de disp. frontal luz	signif.(p=)
Working	bajo	6,07	0,953	5,43	0,625
	intermedi o	5,83		5,77	
	alto	5,84		6,16	
Kiel	bajo	6,02	0,614	5,63	0,737
	alto	5,83		5,98	
Patrón	nodular	5,93	0,988	5,27	0,200
	difuso	5,93		6,03	

Tabla 4-20.- Histología y dispersión de luz.

Aplicando la *Working Formulation*, los linfomas de bajo grado tienen unos canales medios de dispersión lateral de luz y de DS de dispersión lateral de luz inferiores que los linfomas de grado intermedio-alto (dispersión lateral en bajo grado: 2,97 vs dispersión lateral en grado intermedio-alto: 3,99, $p=0,0209$) (DS de dispersión lateral de luz en bajo grado: 1,74 vs DS dispersión lateral de luz en grado intermedio-alto: 3,02, $p=0,0009$).

Los linfomas difusos tienen unos valores medios de canales de dispersión lateral (4,03 vs 2,84, $p=0,0077$) y DS de dispersión lateral de luz (3,03 vs 1,64, $p=0,0002$) significativamente superiores a los linfomas foliculares.

Los linfomas de bajo grado de la clasificación de Kiel tienen canales medios de dispersión lateral de luz inferiores a los de alto grado, pero sin alcanzar significación estadística ($p=0,0714$), sin embargo si que tienen valores significativamente inferiores de DS de dispersión lateral de luz (2,23 vs 3,02, $p=0,0141$).

3.1.2.- Análisis del contenido en ADN y del ciclo celular: los diferentes grados de malignidad, tanto según la *Working Formulation* como la clasificación de Kiel, difieren significativamente en cuanto a la proporción de células en fase G0G1, G2M y S, así como en el índice de proliferación. El porcentaje medio de células en fase G0G1, fase G2M, fase S en los linfomas de bajo grado de la Working es respectivamente de 92,46 %, 2,55% y 5,03%; en los de grado intermedio es de 85,82 %, 2,52 % y 11,67 %; y en los de alto grado es de 77.10 %, 4,85 % y 18,07 % ($p < 0,0001$; $p=0,0144$; $p < 0,001$). El porcentaje de células proliferantes aumenta significativamente con el grado del linfoma.

Utilizando la clasificación de Kiel, los linfomas de bajo grado tienen un porcentaje medio de células en fase G0G1, G2M y S respectivamente de 90,22 %, 2,35 % y 7,45 %; y los de alto grado de 79,01 %, 4,45 % y 16,55 % ($p < 0,001$); $p=0,0035$; $p < 0,001$). La actividad proliferativa celular es significativamente superior en los linfomas de alto grado que en los de bajo grado.

El índice de proliferación, que se deriva de la suma de los porcentajes de células en fase S y G2M también aumenta significativamente con el grado de malignidad histológico del linfoma (Working: $p < 0,0001$).

Según la *Working Formulation*, el porcentaje de aneuploidía en los linfomas de bajo grado es de 18,18%, en los de grado intermedio es de 22,73% y en los de alto grado de 54,54 %. La aneuploidía es más frecuente en los linfomas de alto grado que en los de bajo o intermedio ($p=0,1011$). Si se utiliza la clasificación de Kiel, la proporción de linfomas aneuploides en los linfomas de bajo grado (16,67 %) es significativamente inferior a la de los de alto grado (43,33 %) con una $p=0,0172$. Los linfomas difusos presentan un porcentaje de células en fase G0G1 inferior a de los foliculares y un porcentaje de células en fase S superior a los mismos (14,63 % vs 5,06 %, $p < 0,0001$). Los tumores difusos presentan aneuploidía, por citometría de flujo, en el 55,17% de casos, mientras que los foliculares lo hacen en el 14,28% ($p=0,0755$).

3.2.- Comparación entre la histología y la inmunohisto-química:

Los linfomas B suponen, en la *Working Formulation*, un 90,00 % de los linfomas de bajo grado, un 100 % de los de grado intermedio y un 66,66 % de los de alto grado; mientras que los linfomas T son un 10,00 %, 0,00 % y 33,34 % respectivamente. En la clasificación de Kiel, el 93,75 % de los linfomas de bajo grado son B y el 6,25 % T; y el 75,86 % de los linfomas de alto

grado son B y el 24,14 % restante de tipo T. En función del patrón, 18 de 19 (94,73 %) linfomas nodulares y 34 de 42 (80,95 %) linfomas difusos son inmunofenotípicamente B, mientras que sólo 1 de 19 (5,27 %) foliculares y 8 de 34 (23,53 %) difusos son T. Ninguna de las comparaciones he resultado ser significativa, pero el número de casos tipo T es muy pequeño.

		Clasif. W.F.			Clasif. Kiel		Patrón	
		bajo	interm.	alto	bajo	alto	nodul.	difuso
IMF	B	18	20	14	30	22	18	34
	T	2	0	7	2	7	1	8

Tabla 4-21.- Histología e inmunofenotipo.

3.2.1.- Comparación de las variables histológicas con el índice de marcaje con PCNA: la media del los porcentajes de células PCNA positivas en los linfomas de bajo grado es de 3,99%, en los de grado intermedio es de 16,49% y en los de alto grado de 31,98 %; se observa un aumento significativo del índice de marcaje con el incremento del grado histológico de malignidad de la *Working Formulation* ($p < 0,0001$).

En el caso de la clasificación de Kiel, los linfomas de bajo grado tienen un índice marcaje medio de 8,04 % y los de alto grado de 28,03 %, resultando la diferencia con significación estadística ($p < 0,0001$).

Un patrón nodular (3,99 %) se asocia con valores del índice de marcaje con PCNA inferiores que un patrón difuso (24,23 %) con una $p < 0,0001$.

4.- Comparación del resultado del análisis por citometría de flujo con el resto de las variables:

En el análisis estadístico previo se ha demostrado relación significativa entre el grado histológico de malignidad (*Working Formulation*) y el patrón histopatológico con la dispersión lateral de la luz. En cuanto al estudio del ciclo celular existe relación entre el origen del linfoma, grado de malignidad histológico y patrón histológico con la actividad proliferativa. La frecuencia de aneuploidía es superior en los linfomas de alto grado según Kiel.

Los resultados del análisis por citometría de flujo no se han comparado estadísticamente entre si puesto que no creemos que tenga relevancia el estudio de la correlación entre los valores de la dispersión de luz y las fases del ciclo celular. Tampoco no se han correlacionado los valores de las diferentes fases del ciclo celular y el índice de proliferación con ellos mismos ya que la suma de todas las fases tiene un valor predeterminado del 100 % y el índice de proliferación se calcula del porcentaje de células en fase S y G2M.

Con una prueba de Kruskal-Wallis se ha estudiado la relación entre el inmunofenotipo y la citometría de flujo. Mediante el estudio del coeficiente de correlación lineal se ha estudiado la asociación entre los valores de citometría de flujo y el índice de marcaje con PCNA.

Los linfoma B y T no presentan diferencias significativas en los valores, como media, del canal medio de dispersión lateral de luz, DS de dispersión lateral de luz, dispersión frontal de luz, DS de la dispersión frontal de luz, porcentaje de células en fase G0G1, porcentaje de células en fase G2M, porcentaje de células en fase S, índice de proliferación, índice de ADN o presencia de aneuploidía.

		dispersión lateral	DS dispers. lateral	dispersión frontal	DS dispers. frontal
IMF	B	3,67	2,61	5,82	5,70
	T	3,83	2,56	5,74	5,82
Signific.	p=	0,7518	0,7043	0,6504	0,7200

Tabla 4-22.- Dispersión de luz e inmunofenotipo.

		%G0G1	%G2M	%S	I.P.	Ploidía	
						diploide	aneupl
IMF	B	84,75	3,30	11,95	15,26	39	13
	T	84,88	4,19	11,02	15,21	6	3
Signif	p=	0,9190	0,5689	0,9029	0,879	no signif	

Tabla 4-23.- Contenido en ADN-ciclo celular e inmunofenotipo.

4.1.- Comparación del resultado de la citometría de flujo y el índice de marcaje con PCNA:

El índice de marcaje con PCNA no se correlaciona con el valor del canal medio de la dispersión lateral de luz, DS de dispersión lateral de luz, dispersión frontal de luz o DS de dispersión frontal de luz.

El índice de marcaje con PCNA presenta una correlación significativa negativa con el porcentaje de células en fase G0G1 ($r=-0,69105$, $p<0,001$) ya que éste también presenta una importante correlación significativa con el porcentaje de células en fase G2M ($r=0,40081$, $p=0,0029$), porcentaje de células en fase S ($r=0,64649$, $p<0,0001$) y el índice de proliferación ($r=0,69067$, $p<0,0001$). El porcentaje de células positivas para el antígeno PCNA, por inmunohistoquímica, aumenta de modo significativo al aumentar el porcentaje de células en fase S, por citometría de flujo, con una recta de correlación igual a: " $y=1,33 + 2,53x$ " (siendo: y =índice de marcaje con PCNA y x =porcentaje de células en fase S).

La media del índice de marcaje con PCNA es superior en los tumores aneuploides que en los diploides (25,51 % vs 14,20 %, $p=0,0206$).

[Figura 4 22](#)

[Figura 4 23](#)

[Figura 4 24](#)

[Figura 4 25](#)

5.- Comparación de la inmunohistoquímica con el resto de variables del estudio:

El resultado del inmunofenotipaje no guarda relación significativa con ninguna de las variables del estudio.

El índice de marcaje con PCNA tiene relación significativa con el grado de malignidad histológico, el patrón histológico y la presencia o ausencia de aneuploidía. Una actividad proliferativa elevada medida por citometría de flujo se correlaciona con un aumento en el índice de marcaje de PCNA.

La media del índice de marcaje con PCNA no es significativamente diferente en los linfoma B o T.

----media de PCNA		PCNA			
Según tipo de IMF		inmunofenotipo			
Variable	Valor	Tipo	Media	Dvs Std	Casos
Para población global			169760	165594	53
IMF	0	B	150348	147208	46
IMF	1	T	297329	230759	7
Total Casos= 66					
Casos perdidos= 13 o:	19.7 PTC.				

Tabla 4-24.

C.- Resultados III: Estudio de supervivencia:

El estudio de supervivencia se ha realizado según el método de Kaplan-Meier y las curvas de supervivencia se han comparado con la prueba de Mantel-Haenszel.

La edad se ha agrupado en tres categorías que van de 1 a 49 años, de 50 a 59 años, y edad superior a 60 años. Las curvas de supervivencia de los tres grupos son similares y no hay

diferencia significativa entre ellas. Tampoco se ha encontrado diferencia significativa entre la supervivencia de los hombres y las mujeres ($p=0,6665$).

Los pacientes que se diagnostican en un estadio inicial del linfoma presentan supervivencias discretamente más largas que aquellos que se diagnostican en estadios avanzados, aunque no con significación estadística ($p=0,1255$). Los pacientes que tienen sintomatología B tienen tiempos de supervivencia significativamente inferiores que aquellos que no presentan sintomatología B ($p=0,0186$). Los pacientes diagnosticados de linfoma nodal o extranodal no presentan tiempos de supervivencia significativamente diferentes ($p=0,3561$). Tanto los pacientes con baja carga tumoral al momento del diagnóstico como aquellos que alcanzan la remisión completa tras el tratamiento inicial tienen supervivencias superiores que los que poseen una alta carga tumoral ($p=0,0045$) o no alcanzan la remisión completa ($p=0,0003$).

Los pacientes con linfoma presentan tiempos de supervivencia diferentes en función del grado histológico del linfoma según la *Working Formulation*. Los pacientes con linfomas de bajo grado sobreviven durante más tiempo que los de grado intermedio ($p=0,0030$) o alto grado ($p=0,0553$); en global los pacientes afectados de linfomas de bajo grado tienen supervivencias superiores que los enfermos con linfomas de grado intermedio o alto ($p=0,0105$). En la clasificación de Kiel, los enfermos con linfomas de bajo grado tienen supervivencias más largas que los de alto grado, pero sin alcanzar significación estadística ($p=0,1960$), pero los linfomas difusos tienen una supervivencia inferior a los nodulares ($p=0,0185$).

Una fase S igual o inferior al 9 % y una fase S superior al 9 % discriminan, en el estudio de supervivencia, dos grupos de diferente pronóstico. Los pacientes en los que citométricamente se objetiva un porcentaje de células en fase S igual o inferior al 9 % presentan tiempos de supervivencia superiores que aquellos que tienen un porcentaje de células en fase S mayor al 9 % ($p=0,0388$).

La presencia o ausencia de aneuploidía no se asocia con el pronóstico del linfoma en el estudio de supervivencia ($p=0,6587$).

Tampoco el inmunofenotipo B o T guarda relación con la supervivencia de los pacientes con linfoma ($p=0,4306$), aunque el tiempo medio de seguimiento de los pacientes con linfomas tipo T es más corto que los de tipo B.

No se ha encontrado ningún valor frontera del índice de marcaje con PCNA que discrimine dos grupos con pronóstico, en cuanto a supervivencia, diferentes. Estableciendo el corte en un 9 %, los pacientes con índices de marcaje con PCNA iguales o inferiores al 9 % no tienen tiempos de supervivencia significativamente diferentes que aquellos que tienen índices de marcaje superiores al 9 % ($p=0,3147$).

Estudio de supervivencia (Kaplan-Meier/ Mantel-Haenszel).							
	Edad	Sexo	Estadio clínico	Síntomas B	Carga tumor	Origen tumor	Respuesta tto.
Relación superviv	no	no	no	sí	sí	no	sí
	W.F.	Kiel	Patrón	% céls fase S	IMF	% céls PCNA	
Relación superviv	sí	no	sí	sí	no	no	

Tabla 4-25.

[Figura 4_26](#) [Figura 4_27](#) [Figura 4_28](#)
[Figura 4_29](#) [Figura 4_30](#) [Figura 4_31](#)
[Figura 4_32](#) [Figura 4_33](#) [Figura 4_34](#)
[Figura 4_35](#) [Figura 4_36](#) [Figura 4_37](#)
[Figura 4_38](#) [Figura 4_39](#) [Figura 4_40](#)

D.- Resultados IV: Contenido en ADN y proliferación celular

1.- Estudio del contenido de ADN:

El contenido en ADN no guarda relación, dentro de grupos homogéneos, con el resto de variables clínicas ni con el pronóstico del linfoma en enfermos con baja o alta carga tumoral, ni con mala o buena respuesta al tratamiento.

La presencia o ausencia de aneuploidía se asocia significativamente con el grado

histológico del linfoma. En la *Working Formulation*, los tumores de bajo grado-grado intermedio presentan menor porcentaje de aneuploidía que los de alto grado (18,75 % vs 45,45 %, $p=0,0345$). Aplicando la clasificación de Kiel, los linfomas de bajo grado también tienen menor porcentaje de alteraciones en el contenido de ADN que los de alto grado (16,67 % vs 43,33 %, $p=0,0172$).

1.1.- Contenido de ADN y *Working Formulation*:

Los pacientes de bajo grado de malignidad no presentan diferencia significativa en cuanto al porcentaje de pacientes con linfomas citométricamente aneuploides según el estadio clínico, sintomatología B, carga tumoral, remisión tras el tratamiento, tiempo libre de enfermedad, ni tampoco hay diferencia significativa entre el tiempo de supervivencia de los dos grupos.

W.F.:		Contenido en ADN		Significación prueba de Fischer (p=)
bajo grado		Diploide	Aneuploide	
Estadio	I-II	4	1	1,0000
	III-IV	13	3	
Síntomas B	no	12	2	0,8140
	sí	5	2	
Carga tumor	baja	13	3	1,0000
	alta	3	1	

Tabla 4-26.- Ploidía y clínica en linfomas de bajo grado.

W.F.: bajo grado		Contenido en ADN		Significación prueba de Fischer (p=)
		Diploide	Aneuploide	
Remisión	no	10	2	0,9499
	sí	5	2	
Tiempo libre enfermedad	≤30 m	17	2	0,1454
	>30m	1	2	
Histología	A+B	10	0	0,2481
	C	8	3	
Estudio de supervivencia	Mantel-Haenszel	Z=1,0870	p>0,05	no significativo

Tabla 4-27.- Ploidía y linfomas de bajo grado.

En los linfomas de grado intermedio de malignidad, la presencia de aneuploidía tampoco se relaciona con ninguna de las variables estudiadas ni con la supervivencia.

W.F.: grado intermedio		Contenido en ADN		Significación prueba de Fischer (p=)
		Diploide	Aneuploide	
Estadio	I-II	4	2	0,8389
	III-IV	13	3	
Síntomas B	no	12	3	1,0000
Carga tumor	sí	5	2	
	baja	8	4	0,8421
	alta	9	0	
Remisión	no	10	1	1,0000
	sí	7	2	
Tiempo libre enfermedad	≤30 m	14	4	1,0000
	>30m	3	1	
Histología	E	4	1	
	F	8	1	
	G	5	3	
Estudio de supervivencia	Mantel-	Z=0,4684	p>0,05	no significativo
	Haenszel			

Tabla 4-28.- Ploidía y linfomas de grado intermedio.

En los linfomas de alto grado de malignidad, la presencia o ausencia de aneuploidía no presenta relación con el estadio de la enfermedad, la presencia o ausencia de síntomas B, la carga tumoral, el tiempo libres de enfermedad ni el tipo de linfoma. Tampoco existe relación entre el contenido de ADN y el tiempo de supervivencia.

Con una prueba no paramétrica (Fischer) se encuentra que los pacientes con tumores aneuploides presentan remisión completa tras el tratamiento en un porcentaje significativamente inferior que los pacientes con tumores aneuploides.

W.F.:		Contenido en ADN		Significación prueba de
alto grado				Fischer
		Diploide	Aneuploide	(p=)
Estadio	I-II	7	5	1,0000
	III-IV	5	5	
Síntomas B	no	8	8	0,8341
	sí	4	2	
Carga tumor	baja	11	5	0,0867
	alta	1	5	
Remisión	no	3	7	0,0483
	sí	9	2	
Tiempo libre enfermedad	≤30 m	7	8	0,5356
	> 30 m	5	2	
Histología	H	5	5	
	I	6	5	
	J	1	0	
Estudio de supervivencia	Mantel-Haenszel	Z= 1,1466	p>0,05	no significativo

4-29.- Ploidía y linfomas de alto grado.

1.2.- Contenido de ADN y clasificación de Kiel:

Los linfomas de bajo grado no presentan diferencias significativas en el porcentaje de aneuploidía según el estadio, síntomas B, carga tumoral, respuesta al tratamiento, tiempo libre de enfermedad, tipo histológico del tumor ni la supervivencia.

Kiel:		Contenido en ADN		Significación
bajo grado				prueba de Fischer
		Diploide	Aneuploide	(p=)
Estadio	I-II	7	22	0,9868
	III-IV	2	4	
Síntomas B	no	29	3	0,3862
	sí	9	3	
Carga tumor	baja	18	4	0,8202
	alta	11	1	
Remisión	no	18	2	0,5213
	sí	9	3	
Tiempo libre enfermedad	≤30 m	27	3	0,0903
	> 30 m	3	3	

Histología	linf nodul	18	4	1,0000
	difusos	12	2	
Estudio de supervivencia	Mantel-Haenszel			no significativo

Tabla 4-30.- Ploidía y linfomas de bajo grado.

En la clasificación de Kiel, dentro de los linfomas de alto grado de malignidad tampoco hay diferencia significativa en cuanto al porcentaje de aneuploidía y estadio clínico, presencia de síntomas B, carga tumoral, tiempo libre de enfermedad. La ploidía tampoco tiene relación con la supervivencia.

Los enfermos con linfomas sin alteraciones del contenido de ADN consiguen una remisión completa de su proceso neoplásico más frecuentemente que aquellos con alteraciones citométricas del contenido de ADN ($p=0,0248$).

Kiel:		Contenido en ADN		x 2
alto grado				<i>se cumplen CA.</i>
		Diploide	Ancuploide	(p=)
Estadio	I-II	8	6	no significativo
	III-IV	9	7	
Síntomas B	no	12	10	no significativo
	sí	5	3	
Carga tumor	baja	13	8	no significativo
	alta	4	5	
Remisión	no	5	8	0,0248
	sí	12	3	
Tiempo libre enfermedad	≤ 30 m	11	11	no significativo
	> 30 m	6	2	
Histología	cblástico	5	3	no significativo
	resto	12	10	
Estudio de supervivencia	Mantel-Haenszel			no significativo

Tabla 4-31.- Ploidía y linfomas de alto grado.

2.- Estudio de la proliferación celular:

Se ha estudiado la relación entre el porcentaje de células en fase S y el porcentaje de células PCNA positivas y la respuesta al tratamiento y el tiempo libre de enfermedad en los pacientes con bajo o alta carga tumoral.

Tanto en los pacientes con baja o alta carga, la media del porcentaje de células en fase S o PCNA positivas es superior en los casos que alcanzan la remisión completa tras el tratamiento o con un tiempo libre de enfermedad superior a 30 meses, pero sin alcanzar significación estadística.

		% células fase S	% células PCNA +
tiempo libre de	≤30 meses	9,41 ± 5,64	13,30 ± 13,34
enfermedad	> 30 meses	16,75 ± 12,7	23,76 ± 16,87
remisión	no	9,69 ± 6,10	11,46 ± 12,44
	sí	13,45 ± 10,46	21,25 ± 15,82

Tabla 4-32.- Pacientes con baja carga tumoral.

		% células fase S	% células PCNA
tiempo libre de	≤30 meses	11,10 ± 5,48	18,90 ± 20,94
enfermedad	> 30 meses	19,85 ± 7,14	34,11 ± 0,00
remisión	no	11,58 ± 5,74	21,78 ± 21,09
	si	13,06 ± 7,53	11,54 ± 19,55

Tabla 4-33.- Pacientes con alta carga tumoral.

Dentro de los linfomas de origen nodal se ha establecido un corte en el porcentaje de células en fase S en el 9 % y en el porcentaje de células PCNA positivas en un 10 %. Los grupos con una fase S inferior o igual al 9 % y superior al 9 %, y los grupos con un índice de marcaje con PCNA inferior o igual al 10 % y superior al 10 %, son homogéneos en cuanto al resto de las variables del estudio. Los pacientes con linfomas nodales y fase S superior al 9 % o índice de marcaje superior al 10 % tienen supervivencias significativamente inferiores a los que tienen una fase S hasta 9 % ($p < 0,02$).

[Figura 4 41](#)

[Figura 4 42](#)

En los linfomas de origen extranodal existe una buena correlación entre el porcentaje de células en fase S y el índice de marcaje con PCNA ($r=0,548$, $p=0,01$). Ninguno de los dos marcadores de proliferación guarda relación con el estadio o la carga tumoral, pero el porcentaje de células en fase S es superior en los linfomas extranodales de alto grado ($p=0,026$) que en los de bajo grado de malignidad. No existe relación significativa entre los marcadores de actividad proliferativa y la supervivencia o el tiempo libre de enfermedad.

Los pacientes que alcanzan la remisión completa tras el tratamiento y que tienen un porcentaje medio de células en fase S superior al 8 % tienden a presentar un tiempo de supervivencia inferior (Mantel-Haenszel: $Z=1,0110$; $p=0,1562$). En aquellos pacientes en los que no se obtiene la remisión completa tras el tratamiento, una fase S hasta el 10 % o superior al 10 % discrimina dos subgrupos con diferente supervivencia (pronóstico): los pacientes con un porcentaje de células en fase S inferior o igual al 10 % presentan supervivencias significativamente más largas a los que tienen una porcentaje de células en fase S superior al 10 % ($p < 0,0009$).

[Figura 4 43](#)

Dada la dispersión de los valores del índice de marcaje con PCNA no hay ningún valor de corte que diferencie dos grupos con supervivencia significativamente distinta según la respuesta al tratamiento.

En el estudio bivalente, se ha encontrado relación significativa entre el tiempo libre de enfermedad y diversas variables clínicas, así como la tendencia de que los enfermos con una actividad proliferativa celular elevada tienen con mayor frecuencia un tiempo libre de enfermedad superior a 30 meses. En el estudio multivariante, únicamente conservan relación con un tiempo libre de enfermedad la respuesta al tratamiento y el porcentaje de células en fase S.

ESTUDIO MULTIVARIANTE

Ecuación Número 1 Dependent Variable.. CURA t libre enf.> 30 meses

Empezando por bloque: Número 1. Método: Stepwise

* * * * *

Ecuación Número 1 Dependent Variable.. CURA t libre enf.>meses

Variable(s) Entradas en paso Número

1	REMISIOC	REMISIÓN CODIFICADA
R múltiple		60698
R cuadrado		36842
Ajustado R cuadrado		35469
Error standard		32969

Análisis de la varianza

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	291667	291667
Residual	46	500000	10870

F= 26.83333 Signif F= .0000

* * * * *

Ecuación Número 1 Dependent Variable.. CURA t libre enf.> 30 meses

----- Variables en la Ecuación -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
REMISIOC	50000	9652	60698	5.180	.0000
(constant)	-50000	14479		-3.453	.0012

----- Variables no en la Ecuación -----

Variable	Beta In	Partial	Min Toler	T	Sig T
ESTADIOC	-13221	-14985	81128	-1017	3147
SINTB	-11757	-14659	98185	-994	3255
CARGAC	-6100	-7249	89196	-488	6282
PS	24381	30468	98628	2146	373
PCNA	15504	19402	98905	1327	1913

* * * * *

Ecuación Número 1 Dependent Variable.. CURA t libre enf.> 30 meses

Variable(s)	Entradas en paso	Número
2	PS	% fase S
R múltiple		.65349
R cuadrado		.42705
Ajustado R cuadrado		.40159
Error standard		.31749

Análisis de la varianza

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regresión	2	3.38081	1.69040
Residual	45	4.53586	.10080

F= 16.77041

Signif F= .0000

* * * * *

Ecuación Número 1 Dependent Variable.. CURA t libre enf> 30 meses

-----Variables en la Ecuación-----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
REMISIOC	47647	9359	57842	5091	0
PS	1311	611,007	24381	2146	373
(constant)	-.61855	14997		-4124	2

-----Variables no en la Ecuación-----

Variable	Beta in Partial	Min Toler	T	Sig T
ESTADIOC	-10422	12328	80169	-824 4144
SINTB	-10515	13746	97011	921 3623
CARGAC	-9561	11830	87103	790 4336
PCNA	69,362	716	60809	47 9624

* * * * *

Ecuación Número 1 Dependent Variable... CURA t libre enf.> 30 meses

* * * * *

Final del bloque Número 1 PIN= .050 alcanzado el límite de significación

2.1.- Proliferación celular y clasificación histopatológica:

La fase S media y el índice de marcaje con PCNA aumenta significativamente con el grado histológico del linfoma, y dentro de cada grado de malignidad aumenta con la agresividad del tipo histológico. También se ha encontrado un aumento significativo de la actividad proliferativa celular con el aumento de la agresividad de la celularidad predominante en el linfoma.

W.F.	% células en fase S		marcaje PCNA	
	media ± DS	n	media ± DS	n
A	3,95 ± 1,29	6	1,58 ± 1,68	6
B	3,85 ± 1,46	4	2,05 ± 0,52	4
C	6,12 ± 2,04	11	6,45 ± 6,84	9
D	-	-	-	-
E	10,60 ± 2,49	5	7,61 ± 6,59	3
F	11,64 ± 3,85	9	17,83 ± 15,05	8
G	12,36 ± 5,17	8	19,15 ± 12,20	6
H	19,80 ± 10,33	10	27,46 ± 13,59	7
I	14,797 ± 5,49	11	35,14 ± 17,22	10
J	34,80	1	-	-
Misc.	4,20	1	-	-
Kruskal-Wallis	p>0,0001		p=0,0002	

Tabla 4-34.- Proliferación celular e histología.

Celularidad predominante	% células fase S (n)	marcaje PCNA (n)
linfocitos	3,96 ± 1,18 (7)	1,58 ± 1,68 (6)
centrocitos	7,60 ± 4,07 (9)	4,43 ± 4,84 (7)
centrocitos-centroblastos	8,60 ± 4,04 (20)	11,81 * 12,52 (17)
centroblastos	12,36 ± 5,17 (8)	19,15 ± 12,20 (6)
inmunoblastos	19,80 ± 10,33 (10)	27,46 ± 13,59 (7)
linfoblastos	14,97 ± 5,94 (11)	35,14 ± 17,22 (10)
células tipo Burkitt	34,80(1)	-
Kruskal-Wallis	p<0,0001	p=0,0001
Signific. (p=)		

Tabla 4-35.- Proliferación y celularidad.

Los linfomas de células pequeña hendida nodulares o difusos, comparados con los linfomas de celularidad mixta nodulares o difusos, no presentan una actividad proliferativa medida como porcentaje de células en fase S o porcentaje de células positivas para PCNA significativamente diferente.

	% células fase S (n)	marcaje PCNA (n)
B+E linfomas de célula pequeña hendida foliculares o difusos	7,600±4,069 (9)	4,436±4,840 (7)
C+F linfomas de celularidad mixta foliculares o difusos	8,605±4,042 (20)	11,806±12,519 (17)
Significación (p=)	p=0,5556	p=0,1440

Tabla 4-36.- Proliferación celular e histología.

Dentro de los linfomas centrocíticos o de célula pequeña hendida, la media del porcentaje de células en fase S es significativamente inferior en los foliculares que en los difusos ($p=0,0143$) y el índice de marcaje con PCNA también es superior, aunque no alcanza significación estadística ($p=0,4795$).

Los linfomas centrocíticos-centroblásticos o de celularidad mixta (célula pequeña hendida y célula grande) foliculares tienen medias de fase S ($p=0,0016$) y de índice de marcaje con PCNA ($p=0,0675$) inferiores que su contrapartida difusa.

	% células fase S (n)	marcaje PCNA (n)
linfoma de célula pequeña hendida. Foliculares	3,8500 ± 1,4617 (4)	2,0550 ± 0,5205 (4)
linfoma de célula pequeña hendida. Difusos	10,600 ± 2,040 (11)	7,610 ± 6,5905 (3)
Significación (p=)	p=0,0143	p=0,4795

Tabla 4-37.- Proliferación celular e histología.

	% células fase S (n)	marcaje PCNA (n)
linfoma de célula pequeña hendida y célula grande. Foliculares	6,118 ± 2,04 (11)	6,45 ± 6,84 (89)
linfoma de célula pequeña hendida y célula grande. Difusos	11,64 ± 3,83 (9)	17,83 ± 15,05 (8)
Significación (p=)	p=0,0016	p=0,0675

Tabla 4-38.- Proliferación celular e histología.

2.1.1.- Proliferación celular y *Working Formulation*:

La actividad proliferativa celular aumenta de modo significativo con el grado histológico del linfoma.

Medias de % fase S
PS

por valores de GRADO y grado histológico
de

Variable	HIST Valor Categorías	WF Media	Des Sta	Casos
Para la población global		115879	78657	66
GRADO 0 bajo		50273	19840	22
HIST	1A	39500	12927	6
HIST	2B	38500	14617	4
HIST	3C	61182	20400	11
HIST	11	42000	0	1
GRADO 1 intermedio		116682	40168	22
HIST	5E	106000	2488	5
HIST	6F	116444	38351	9
HIST	7G	123625	51664	8
GRADO 2 alto		180682	90740	22
HIST	8H	198000	103303	10
HIST	9I	149727	59439	11
HIST	10J	348000	0	1
Total casos=	66			

Tabla 4-39.

Los pacientes con linfomas de bajo grado de malignidad no presentan porcentajes medios de células en fase S significativamente diferentes en función de la sintomatología B, carga tumoral, respuesta al tratamiento, tiempo libre de enfermedad. Los pacientes en estadios iniciales de su enfermedad tienen menor porcentaje de células en fase S que los que se encuentran en estadios avanzados ($p=0,0427$). El valor medio del índice de marcaje con PCNA no es significativamente diferente en función del estadio, carga tumoral, respuesta al tratamiento, tiempo libre de enfermedad; y sí lo es según la ausencia o presencia de síntomas B.

Los pacientes con linfomas linfocíticos o nodulares de célula pequeña presentan una actividad proliferativa inferior que los linfomas de celularidad mixta (fase S, $p=0,0411$; PCNA, $p=0,0411$).

Ni el porcentaje de células en fase S ni PCNA positivas se relacionan con supervivencia en los linfomas de bajo grado de la *Working Formulation*.

		% fase S	p=	índice PCNA	p=
Bajo grado					
Estadio	I-II	3,52 ± 1,54	0,042	5,49 ± 7,77	0,587
	III-IV	5,52 ± 1,96		3,68 ± 4,35	
Síntomas B	no	4,95 ± 2,06	0,793	5,24 ± 5,87	0,043
	sí	5,24 ± 2,12		1,44 ± 1,94	
Carga tumor	baja	4,47 ± 1,72	0,101	4,59 ± 5,80	0,242
	alta	6,50 ± 2,15		1,47 ± 1,47	
Remisión	no	5,22 ± 1,36	0,899	3,49 ± 4,55	0,427
	sí	5,50 ± 2,76		5,89 ± 6,75	
Tiempo libre enfermedad	≤30 m	5,01 ± 1,73	0,631	4,67 ± 5,69	0,371
	>30 m	5,13 ± 3,79		3,47 ± 1,94	
Histología	A+B	3,91 ± 1,28	0,044	1,77 ± 1,31	0,044
	C	6,12 ± 2,04		6,45 ± 6,84	
Estudio de supervivencia	Mantel-Haenszel	0-4%/>4%	N.S.	0-4%/>4%	N. S.
		0-5%/>5%	N.S.		

Tabla 4-40.- Proliferación celular en linfomas de bajo grado.

Los pacientes afectados de linfomas de grado intermedio de malignidad no presentan relación entre el porcentaje de células en fase S o PCNA positivas con el estadio, síntomas B, carga tumoral, respuesta al tratamiento, tiempo libre de enfermedad o subtipo histológico del linfoma. Tampoco existe relación entre la actividad proliferativa tumoral y la supervivencia de los pacientes.

grd		% fase S	p=	índice PCNA	p=
intermedio					
Estadio	I-II	9,90 ± 2,31	0,233	18,88 ± 15,37	0,792
	III-IV	12,33 ± 4,37		15,49 ± 12,52	
Síntomas B	no	11,04 ± 3,29	0,831	17,03 ± 12,93	0,832
	sí	13,01 ± 5,30		15,01 ± 14,84	
Carga	baja	11,31 ± 3,84	0,458	17,84 ± 14,07	0,598
tumor					
	alta	11,57 ± 4,29		13,24 ± 10,71	
Remisión	no	12,70 ± 4,31	0,082	13,61 ± 11,29	0,902
	sí	9,74 ± 3,17		19,72 ± 18,35	
Tiempo	≤30 m	11,66 ± 4,27	0,997	13,94 ± 11,57	0,053
libre					
enfermedad	>30 m	11,72 ± 3,13		35,63 ± 2,16	
Histología	E	10,60 ± 2,49	0,773	7,61 ± 6,59	0,552
	F	11,64 ± 3,83		17,83 ± 15,05	
	G	12,36 ± 5,17		19,15 ± 12,20	
Estudio de	Mantel-		N. S.		N.S.
supervivencia	Haenszel				

Tabla 4-41.- Proliferación celular en linfomas de grado intermedio.

La actividad proliferativa, ya sea estudiada por citometría de flujo o por inmunohistoquímica, en los linfomas de grado intermedio de malignidad según la *Working Formulation*, no se relacionan con ninguna de las variables clínicas estudiadas ni con el pronóstico de la enfermedad. Las células de los subtipos histológicos que se incluyen dentro del grado intermedio tienen una actividad proliferativa que no es significativamente diferente entre sí.

Si se consideran aisladamente los pacientes afectados por linfomas de alto grado de la *Working Formulation*, el porcentaje medio de células positivas para PCNA no es significativamente diferente entre los pacientes en estadio inicial o avanzado del linfoma, alta o baja carga tumoral, buena o mala respuesta al tratamiento, tiempo libre de enfermedad inferior o superior a 30 meses, o el subtipo histológico del linfoma. Tampoco el porcentaje medio de células en fase S guarda relación con ninguna de las variables anteriores, excepto con el tiempo libre de enfermedad: los pacientes que tienen una fase S elevada en la muestra tumoral al diagnóstico presentan más frecuentemente tiempos de supervivencia superiores ($p=0,0526$).

alto grado		% fase S	p~	índice PCNA	p=
Estadio	I-II	19,51 ± 10,91	0,843	29,36 ± 12,70	0,500
	III-IV	16,34 ± 6,37		34,92 ± 19,27	
Síntomas B	no	20,14 ± 9,48	0,077	37,32 ± 14,86	0,015
	sí	12,55 ± 5,10		19,14 ± 10,32	
Carga tumor	baja	18,12 ± 10,24	0,658	28,07 ± 14,13	0,114
	alta	17,92 ± 5,78		41,34 ± 17,33	
Remisión	no	14,76 ± 6,20	0,291	31,94 ± 19,94	0,773
	sí	21,36 ± 10,70		32,02 ± 10,95	
Tiempo libre	≤30 m	14,60 ± 5,37	0,052	31,45 ± 18,10	0,916
enfermedad	>30 m	25,48 ± 11,26		32,25 ± 10,05	
Histología	H	19,80 ± 10,33	0,162	27,46 ± 13,59	0,283
	I	14,97 ± 5,94		35,14 ± 17,22	
	J	34,80 ± 0,0			
Estudio de supervivencia	Mantel-Haens	0- 13 O/o/>	0,077	0-260/1/>26%	N.S.

Tabla 4-40.- Proliferación celular en linfomas de bajo grado.

Los pacientes con una fase S superior al 13 %, en los linfomas de alto grado, presentan supervivencias más acortadas que aquellos que tienen una fase S igual o inferior al 13 %, pero sin alcanzar el nivel de significación estadística del 0,05 (p=0,0770); aunque sólo uno de los 5 pacientes con un porcentaje de células en fase S inferior al 13 % ha fallecido a causa del linfoma (16,6 %), mientras que de los que tienen una fase S superior al 13 % han fallecido, por causas directamente relacionadas con el linfoma, un 56,25 % (9 de un total de 16 pacientes).

alto grado		% fase S	p=	índice PCNA	p=
Estadio	I-II	19,51 ± 10,91	0,843	29,36 ± 12,70	0,500
	III-IV	16,34 ± 6,37		34,92 ± 19,27	
Síntomas b	no	20,14 ± 9,48	0,077	37,32 ± 14,86	0,015
	sí	12,55 ± 5,10		19,14 ± 10,32	
Carga tumor	baja	18,12 ± 10,24	0,658	28,07 ± 14,13	0,114
	alta	17,92 ± 5,78		41,34 ± 17,33	
Remisión	no	14,76 ± 6,20	0,291	31,94 ± 19,94	0,773
	sí	21,36 ± 10,70		32,02 ± 10,95	
Tiempo libre	≤30 m	14,60 ± 5,37	0,052	31,45 ± 18,10	0,916
enfermedad	> 30 m	25,48 ± 11,26		32,25 ± 10,05	
Histología	H	19,80 ± 10,33	0,162	27,46 ± 13,59	0,283
	I	14,97 ± 5,94		35,14 ± 17,22	
	J	34,80 ± 0,0			
Estudio de supervivencia	Mantel-Haenszel	0-13 %/> 13%	0,077	0-260%/>26%	N.S.

Tabla 4-42.- Proliferación celular y linfomas de alto grado.

[Figura 4 44](#)

2.1.2.- Proliferación celular y clasificación de Kiel:

La actividad proliferativa, estudiada por citometría de flujo y medida como porcentaje de células en fase S, o por inmunohistoquímica y medida como porcentaje que expresan el antígeno PCNA, aumenta con el grado histológico de malignidad de modo significativo, y dentro de cada tipo de grado de malignidad es mayor en los linfomas difusos o con predominio de celularidad agresiva (célula pequeña-célula grande).

Media de	PS	% fase S			
por valores	KIEL	Kiel			
de					
y de	CÉLULA	CÉLULA			
Variable	Valor	Categoría	Media	Des Sta	Casos
Para la población en global			11.5879	7.8657	66
KIEL	1.00	bajo grado	7.4556	4.0077	36
CÉLULA	1.00	CENTROCITO	7.6000	4.0685	9
-					
CÉLULA	3.00	MIXTO	8.6050	4.0422	20
CÉLULA	4.00	LINFOCÍTICO	3.9857	1.1838	7
KIEL	2.00	alto grado	16.5467	8.5236	30
CÉLULA	2.00	CENTROBLASTO	12.3625	5.1664	8
-					
CÉLULA	5.00	INMUNOBLÁSTICO	19.8000	10.3303	10
CÉLULA	6.00	LINFOBLÁSTICO	14.9727	5.9439	11
CÉLULA	7.00	BURKITT	34.8000	0.0	1
Total Casos=	66				

Tabla 4-43.

Media de PCNA	PCNA				
por valores de KIEL		Kiel			
y de		CÉLULA	CÉLULA		
Variable	Valor	Categoría	Media	Des Sta	Casos
For Entire Population			16.9760	16.5594	53
KIEL	1.00	bajo grado	8.0410	10.5785	30
CÉLULA	1.00	CENTROCITO	4.4357	4.8405	7
-					
CÉLULA	3.00	MIXTO	11.8065	12.5197	17
CÉLULA	4.00	LINFOCÍTICO	1.5783	1.6847	6
KIEL	2.00	alto grado	28.6304	15.8039	23
CÉLULA	2.00	CENTROBLASTO	19.1467	12.1957	6
-					
CÉLULA	5.00	INMUNOBLÁSTICO	27.4586	13.5946	7
CÉLULA	6.00	LINFOBLÁSTICO	35.1410	17.2212	10
Total casos=	66				
Casos perdidos=	13 o: 19.7 PCT.				

Tabla 4-44.

Si consideramos los pacientes afectos de linfomas de bajo grado según la clasificación de Kiel, no se observan diferencias significativas en los valores medios del porcentaje de células en fase S o el índice de marcaje con PCNA en función del estadio, síntomas B, carga tumoral, respuesta al tratamiento o tiempo libre de enfermedad.

Agrupando los linfomas linfocíticos y los nodulares (centrocíticos y centrocíticos-centroblásticos) por un lado y los linfomas difusos (centrocíticos y centrocíticos-centroblásticos), en el estudio estadístico ambos grupos son comparables en cuanto a las variables clínicas y respuesta al tratamiento, pero se discriminan como dos grupos con diferencia significativamente estadística en cuanto a la actividad proliferativa celular, es decir, en los valores de fase S (5,03 vs 11,27; pvs 15,05; p=0,0111). Además, el primer grupo presenta supervivencias más largas que el segundo (p=0,0032).

Kiel: bajo grado		% fase S	p=	índice PCNA	p=
Estadio	I-II	4,32 ± 3,37	0,282	12,27 ± 13,90	0,305
	III-IV	7,96 ± 4,11		6,79 ± 9,10	
Síntomas B	no	7,12 ± 3,47	0,626	9,74 ± 11,78	0,334
	sí	3,33 ± 5,02		5,10 ± 6,79	
Carga tumor	baja	6,34 ± 3,40	0,077	8,06 ± 11,12	0,640
	alta	8,95 ± 3,91		7,28 ± 11,98	
Remisión	no	7,55 ± 3,79	0,846	6,90 ± 9,29	0,854
	sí	7,59 ± 3,56		10,57 ± 13,02	
Tiempo libre enfermedad	≤30 m	7,36 ± 4,02	0,734	7,45 ± 9,63	0,464
	>30m	7,92 ± 4,29		11,89 ± 6,92	
Histología	linf + nod	5,03 ± 1,98	0,000	3,98 ± 5,24	0,011
	difusos	11,27 ± 3,35		15,04 ± 13,79	
Estudio de supervivencia	Mantel-Haenszel	0-7%/>7%	0,017		N.S.

Tabla 4-45.- Proliferación celular y linfomas de bajo grado.

Figura 4 45

Los pacientes con una fase S media igual o inferior al 7 % presentan tiempos de supervivencia significativamente más largos que los que tienen una fase S superior al 7 % (p=0,0174).

Los valores de PCNA son muy dispersos y no hay ningún nivel de corte que discrimine subgrupos con supervivencia significativamente diferente.

Figura 4 46

En los linfomas que según la clasificación de Kiel pertenecen a un alto grado histológico de malignidad, el porcentaje medio de células en fase S o PCNA positivas no tiene relación con el estadio clínico, síntomas B, carga tumoral, respuesta al tratamiento, tiempo libre de enfermedad o subtipo histológico del linfoma, excepto que los pacientes con linfoma que tienen tiempos libres de enfermedad superiores a 30 meses presentan una media de células en fase S superior a los que tienen tiempos libres de enfermedad que no alcanzan los 30 meses (p=0,0348).

Los pacientes con valores de fase S iguales o inferiores a 15 % tienen supervivencias más largas que aquellos con porcentajes superiores al 15 %, pero sin llegar a alcanzar significación estadística (p=0,235).

Aplicando la clasificación de Kiel y estableciendo un punto de corte en la fase S en el 12 %, existe asociación estadística entre el grupo con baja o alta fase S y el grado bajo o alto de malignidad, tanto para el grupo en conjunto, como para los linfomas de origen nodal o extranodal de modo aislado.

tablas cruzadas:		KIEL	Kiel		
con PS	% fase S				
	Count	0-12%	>12%		
PS->				Fila	
		1.0	2.0		
KIEL	-----				
	1.00	32	4	36	
bajo grado				54.5	

	2.00	9	21	30	
alto grado				45.5	

	Column	41	25	66	
	Total	62.1	37.9	100.0	
Chi Square	D.F.	Significando	Min E.F.	Cells con E.F.< 5	

24.11629	1	.0000	(Before Yates Correction)		

tablas cruzadas:		PS	% fase S		
con KIEL	Kiel				
en el subgrupo de EXTRANOD					
<u>inicio extranod= 0 no</u>					
	Count	bajo grado	alto grado		
KIEL->		1.00	2.00	Fila	
PS	-----				
	1.0	25	5	30	
0-12%				71.4	
	2.0	2	10	12	
>12%				28.6	

	Column	27	15	42	
	Total	64.3	35.7	100.0	
Chi-Square	D.F.	Significando	Min E.F.	Cells con E.F. < 5	

13.81593	1	.0002	4.286	1 de 4 (25%)	
16.59259	1	.0000	(Before Yates Correction)		

tablas cruzadas:	PS	% fase S		
con KIEL	Kiel	en el subgrupo de EXTRANOD		
		<u>inicio extranod= 1 sí</u>		
	Count	bajo grado	alto grado	
KIEL->	1.00	2.00	Fila	
PS	-----			Total
	1.0	7	4	11
0-12%				45.8
	2.0	2	11	13
>12%				54.2

	Column	9	15	24
	Total	37.5	62.5	100.0
Chi-Square	D.F.	Significando	Min E.F.	Cells con E.F.< 5
-----	-----	-----	-----	-----
4.03916	1	.0445	4.125	2 de 4 (50.0%)
5.91888	1	.0150	(Before Yates Correction)	
Número de observaciones perdidas= 0				

[Figura 4 47](#)

Kiel: alto grado		% fase S	p=	índice PCNA	p=
Estadio	I-II	18,16 ± 10,65	0,884	26,18 ± 14,39	0,580
	III-IV	15,14 ± 6,14		30,88 ± 17,31	
Síntomas B	no	17,88 ± 9,13	0,205	31,48 ± 16,73	0,093
	sí	12,89 ± 5,47		20,54 ± 9,85	
Carga tumor	baja	16,82 ± 9,45	0,821	25,40 ± 14,12	0,142
	alta	15,91 ± 6,26		36,02 ± 18,06	
Remisión	no	15,31 ± 5,57	0,927	28,71 ± 18,31	1,000
	sí	18,01 ± 10,90		29,03 ± 14,60	
Tiempo libre enfermedad	30 m	13,78 ± 5,42	0,034	26,95 ± 17,51	0,327
	>30m	24,15 ± 11,08		33,39 ± 9,06	
Histología	cblasto	12,36 ± 5,16	0,166	19,14 ± 12,19	0,093
	resto	18,07 ± 9,07		31,97 ± 15,85	
Estudio de	Mantel- Haenszel	0-15%/> 15%	N.S.		N.S.

supervivencia				
---------------	--	--	--	--

Tabla 4-46.- Proliferación celular y linfomas de alto grado.

V.- DISCUSIÓN
A.- Discusión
1.- Introducción, aspectos metodológicos

La búsqueda de métodos de aumenten el conocimiento de las enfermedades que aquejan a la humanidad ocupa a muchísimos equipos de investigación experimental y clínica. En el campo de la oncohematología, y concretamente dentro de los síndromes linfoproliferativos, es lógico pensar que el estudio de la actividad celular, en cuanto a su proliferación, aporte conocimientos fundamentales sobre el comportamiento de los linfomas no hodgkinianos.

La citometría de flujo se desarrolló inicialmente durante los años 60 y 70, y una de las primeras aplicaciones fue el estudio de los ácidos nucleicos(142) (231). Sin embargo, la tecnología necesaria resultaba extremadamente complicada y cara, estando al alcance de sólo unos pocos equipos de investigación. El avance en la industria con el desarrollo de nuevas configuraciones en los aparatos, con la introducción de los láseres refrigerados por aire, sistemas ópticos y de lectura de elevada sensibilidad, abaratamiento de costes, instrumentos de manejo más fácil y mejores programas informáticos que posibilitan un análisis de los datos mejor y más rápido, ha permitido la difusión de la citometría de flujo en los laboratorios clínicos y de investigación.

Es de esperar que el desarrollo de los láseres y fotodetectores sólidos permita reducir espectacularmente el tamaño y precio de los citómetros de flujo(401) hasta el punto de convertir el análisis citométrico del ciclo celular en un procedimiento rutinario en medicina clínica.

Las principales ventajas de la citometría de flujo, frente a las técnicas clásicas, para la cuantificación de la proliferación celular son la objetividad y la capacidad de leer cientos de miles de eventos en poco tiempo(141). En contraposición, se debe ser muy cuidadoso y estricto en los aspectos técnicos y en la interpretación de los resultados. Para un análisis de calidad, a pesar de que hay equipos que metodológicamente no pueden hacerlo, es altamente aconsejable desechar las señales producidas por dobles y agregados celulares(242), adquirir un número suficiente de eventos y, si la muestra procede de tejido desparafinado, aplicar programas que calculan el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, pero restando las señales producidas por los núcleos cortados de células en cada una de las fases del ciclo(176) (180) (348).

En este estudio se han adquirido 50.000 eventos, una vez excluidos los dobles celulares, con el objeto de conseguir histogramas de calidad con un elevado número de células en cada fase del ciclo celular después de la sustracción de la señal inespecífica de los núcleos cortados; especialmente en la fase S de los linfomas con baja actividad proliferativa, de modo que el programa informático pueda ajustar, con fiabilidad, la forma en el histograma de la fase S a un ecuación polinómica(242).

Otro punto importante es la cuantificación del porcentaje de células de las fases del ciclo celular de los tumores aneuploides. Generalmente, en la muestra que se procesa y analiza por citofluorometría de flujo, entremezcladas o junto a las células tumorales, existe una cantidad variable de células no neoplásicas con un contenido diploide de dotación genética. El resultado es la obtención de histogramas en que hay representación de los ciclos celulares de ambas poblaciones, neoplásica y normal, con la superposición de los dos ciclos y de las fases de los mismos, más o menos solapada según el índice de ADN. La superposición de los dos ciclos supone una ventaja para el cálculo, con exactitud, del índice de ADN, puesto que la tinción de la células en fase G0G1 de la muestra diploide de referencia y la muestra problema se ha realizado de modo simultáneo, pero representa un problema para la cuantificación del porcentaje exacto de células en cada fase de los dos, a veces incluso tres, ciclos celulares(348). Actualmente, con el programa que hemos utilizado en este estudio y también con otros, mediante complejos modelos matemáticos se pueden resolver con bastante fiabilidad el porcentaje de células en cada fase de cada ciclo celular(242).

En las muestras sin alteraciones en el contenido en ADN, se acepta, si la proporción de células presumiblemente normales que contaminan la muestra neoplásica que se desea analizar es baja y la población normal tiene poca actividad proliferativa, que la proporción de células en fase S o G2M global representa la proliferación de células neoplásicas. En los linfomas se cumplen las dos premisas anteriores: los ganglios tumorales contienen una cantidad variable pero escasa de linfocitos y otras células no linfomatosas, las cuales, además, mayoritariamente no están proliferando de forma activa.

El análisis por citometría de flujo puede producir resultados discretamente diferentes si se realiza a partir de muestras frescas o parafinadas. Hay equipos que han estudiado cómo afecta la fijación de la muestra y su procedencia al resultado citométrico(173) (402), pero es de aceptación general que las muestras rutinariamente fijadas con formol y embebidas en parafina son un material perfectamente aprovechable para la cuantificación del contenido en ADN y el estudio del ciclo celular(170) (171).

Las técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas han demostrado ser una alternativa a los procedimientos clásicos de estudio de la proliferación celular(308) (309), pero el empleo de

los anticuerpos más frecuentes requieren de tejido fresco con una fijación mínima, lo cual dificulta la interpretación y resta comodidad a la técnica(185). Desde hace muy poco tiempo han aparecido en el mercado anticuerpos dirigidos contra PCNA procedentes de clones celulares en cultivo que resisten el proceso rutinario de fijación e inclusión de los laboratorios de anatomía patológica(308).

El estudio de la expresión de PCNA puede realizarse con anticuerpos comerciales aprovechando procedimientos inmuno-histocitoquímicos clásicos y modernos de reconocida eficacia para la valoración de la expresión de antígenos celulares(308).

PCNA es una proteína reguladora del ciclo celular que incrementa su expresión durante la fase G1, con una fase de meseta máxima durante la fase S y que empieza a decrecer durante la fase G2M; el nivel es mínimo en la fase G0(187) (328) (330). La forma insoluble de PCNA se asocia a proteínas intranucleares específicas y fundamentales relacionadas con la replicación del ADN(332), puede ser detectada en tejidos y células y aparece como la tinción granular intranuclear que se muestra en los resultados. En nuestro estudio, la tinción de las células positivas ha resultado ser suficientemente intensa como para permitir una fácil distinción entre las células negativas (en reposo) y las células proliferantes.

La cuantificación del resultado de la técnica inmunohistoquímica de la expresión de PCNA se ha efectuado por planimetría sobre un mínimo de 500 células contadas en campos seleccionados al azar. La valoración de la expresión de una característica celular como número de eventos por campos o campo de gran aumento, o como porcentaje de células positivas sobre un contaje inferior a 500 células nos parece sometida a importantes sesgos de muestreo que pueden conducir a errores en la interpretación de los resultados. Con los modernos y automatizados procesadores de imágenes se podrá agilizar la tediosidad del contaje microscópico.

2.- Composición y características de la muestra

La edad ha sido implicada como factor pronóstico en algunas series de linfomas(82) (131), por ello se han realizado las pruebas estadísticas pertinentes con el objeto de comprobar la comparabilidad de todos los grupos dentro de las variables estudiadas en cuanto a la edad media de los mismos. También la distribución del sexo ha sido estudiada en relación con todas las variables del estudio. La falta de comparabilidad entre los grupos en relación a las variables demográficas podría suponer un sesgo en la interpretación de los resultados del estudio, sobre todo si hubiera asociación significativa entre la edad o el sexo y la ploidía, ciclo celular o índice de marcaje con PCNA.

Como se demuestra en el resultado del estudio estadístico, se comprueba que todos los grupos son homogéneos en cuanto a la media de edad y la distribución del sexo, de modo que no se puede considerar que ninguna de las dos variables demográficas tenga relación con características clínicas, histológicas, ni tampoco con el resultado de la citometría de flujo o la inmunohistoquímica.

Los índices estadísticos y distribución de casos según la edad y el sexo, la situación clínica de los enfermos en el momento del diagnóstico del linfoma (en función del estadio clínico y la presencia o ausencia de sintomatología tipo B), la carga tumoral, el origen nodal o extranodal del linfoma y la respuesta esperada tras el tratamiento, así como de los hallazgos histológicos sobre la celularidad linfomatosa y el patrón folicular o difuso que han servido para el diagnóstico de la neoplasia según la *Working Formulation* o la clasificación de Kiel, se ajustan a lo descrito en la literatura que trata acerca de la epidemiología, situación clínica y diagnóstico histológico de los linfomas no hodgkinianos. En este sentido, nuestra serie de casos no presenta discrepancias importantes con otras series publicadas(12) (21) (40) (54) (55).

clasf.	frec.	edad	sexo		estadio		remisión		t.l.e.
			homb	mujer	I-II	III-IV	no	sí	
W.F.	%	años							>30m
A	9,1	62,5	16,7	83,3	20	80	50	50	16,7
B	6,1	64,7	100	0	50	50	100	0	0,0
C	16,7	55,9	45,5	54,5	18	82	54	46	18,2
E	7,6	60,6	60,0	40,0	20	80	40	60	40,0
F	13,6	63,0	44,4	55,6	33	67	75	25	11,1
G	12,1	57,5	62,5	37,5	25	75	43	57	12,5
H	15,2	55,3	60,0	40,0	50	50	50	50	40,0
I	16,7	59,5	36,4	63,6	54	46	50	50	1 2
J*	1,5	15	100	0	100	0	0	100	100

Tabla 5-1.- Hallazgos según histopatología. Excepto la edad el resto de valores son porcentajes.

El hecho anterior y el que factores de mal pronóstico ya conocidos (carga tumoral elevada(15) (82), mala respuesta al tratamiento(129) (130), histología de alto grado o difusa(45) (132)) se comporten como tales en nuestra serie, lo hemos considerado como un parámetro de bondad de la representatividad de la muestra de los linfomas estudiados.

3.- Dispersión de luz y linfoma

El empleo de las características de la dispersión de la luz producida por las células o los núcleos de las suspensiones celulares de muestras de linfoma ha sido estudiada por algunos equipos. El equipo de Rappaport, a principios de los 80, estudio la dispersión de luz en 43 linfomas y llegó a la conclusión de que la valoración de la dispersión de la luz no era de utilidad para discriminar las poblaciones normales de las neoplásicas ni para la clasificación de los linfomas(356). Desde entonces, este aspecto no había sido abordado en profundidad por otros grupos de investigación.

En nuestra serie, hemos encontrado que algunos de los valores de dispersión de luz sí que pueden ayudar en la clasificación de los linfomas, es decir que aprovechando únicamente la información obtenida de valorar la dispersión de luz de muestras de linfomas, sin teñir con yoduro de propidio o sin tener en cuenta los resultados del estudio del contenido en ADN y del ciclo celular, se puede aportar objetividad en las clasificación de los linfomas.

La explicación de que hace 10 años no se encontrara relación entre la dispersión de la luz y la clasificación de los linfomas y que ahora sí se demuestre, puede ser debido a varios factores:

a.- Diamond realizó la preparación de muestras frescas con una tinción hipotónica de yoduro de propidio(356), con lo que la membrana celular se rompe y, tras la técnica, en el citómetro de flujo, tan sólo se leen las características citométricas de dispersión de luz y de contenido en ADN de núcleos aislados(168). En nuestro estudio, al procesar tejido desparafinado, a pesar de la incubación con xilol, alcoholes, pepsina y RNAasa(170) (171), al final del proceso los linfocitos retienen parte de las características físicas de dispersión de la luz como células íntegras.

b.- El láser del citómetro de flujo utilizado por Diamond era de mayor potencia que el nuestro, sin embargo, la mejora en la configuración de los instrumentos va asociada a un aumento en la sensibilidad de la lectura que, actualmente, permite la distinción entre los tipos celulares pertenecientes a los linfomas de bajo y alto grado según la clasificación de Kiel, en la que los linfomas de bajo grado están constituidos por células de menor tamaño y agresividad.

Sorprendentemente, no es el resultado de la dispersión frontal de luz, que se relaciona con el tamaño y opacidad de las partículas, sino la dispersión lateral la que se correlaciona con la clasificación histológica de los linfomas. La media de los canales medios de dispersión de luz a bajo grado o de la desviación standard de los mismos es prácticamente igual en los linfomas de bajo y alto grado o en los nodulares y difusos; mientras que tanto la dispersión lateral como la DS de la dispersión lateral de luz tienen relación con la clasificación histológica y el patrón del linfoma.

		dispersión frontal luz	dispersión lateral luz	DS de disp. frontal luz	DS de disp. lateral luz
Working	bajo	6,07	2,97	5,43	1,74
	intermedio	5,83	3,67	5,77	2,76
	alto	5,84	4,30	6,16	3,26
Kiel	bajo	6,02	3,29	5,63	2,23
	alto	5,83	4,08	5,98	3,02

Tabla 5-2.- Histología y dispersión de luz.

Resultado de la interacción luz-célula se produce la dispersión de la luz en todas las direcciones del espacio, pero ésta se recoge en un fotodetector situado hacia adelante (dispersión frontal de luz o a bajo grado) que es función del tamaño y opacidad de las partículas y en un fotodetector situado perpendicularmente al haz de luz y al flujo de la muestra (dispersión lateral de luz o a 90 grados) que es función de la refractariedad y estructura de las partículas. Los valores de la DS de ambas dispersiones cuantifican el grado de agrupación u homogeneidad de las medidas, y pueden ser interpretadas como una medida de la homogeneidad o heterogeneidad de la muestra(144) (146).

Cabría esperar que existiera relación entre la dispersión frontal de luz, o su DS, con el grado histológico del tumor en cuanto que los tumores de bajo grado están constituidos por células de menor tamaño que los de alto grado, y que pudiera existir diferencia significativa entre la dispersión lateral de luz, o su DS, entre los grupos de malignidad histológica por diferencias en la refractariedad celular y en la compactación y disposición de la cromatina en el núcleo. Efectivamente, tras en análisis estadístico de los resultados se ha cumplido la segunda premisa, pero no la primera.

La falta de relación entre el tamaño celular y la dispersión frontal de luz pensamos que no puede obedecer a la falta de reproductibilidad de los resultados o a cambios en la escala relativa de los canales, ya que antes de cada lectura se han analizado standards y controles para calibrar el citómetro a una escala de intensidad relativa constante y asegurar el perfecto alineamiento del mismo. La obtención de los resultados que se presentan creemos que radica en el hecho que el fotodetector que recoge la señal de la luz hacia adelante, dada la configuración actual de nuestro citómetro, es un fotodiodo sólido. Los fotodiodos tienen gran resistencia a la luz y a señales de gran intensidad, pero tienen una baja relación señal ruido y son poco sensibles para discriminar diferencias sutiles entre las señales(145), como puede ser la diferencia de tamaño entre los diferentes tipos celulares involucrados en los linfomas. Muy recientemente, algunos aparatos comerciales tienen como opción la posibilidad de sustituir el fotodetector diodo de dispersión de luz frontal por fotomultiplicadores; la señal deberá ser atenuada y bien enfocada en el detector, pero la buena relación señal/ruido y la capacidad de diferenciar entre valores próximos en la intensidad de la señal a pesar de su baja eficiencia cuántica quizás pueda resolver las diferencias de tamaño de las células que forman los linfomas de bajo y alto grado.

Aplicando la *Working Formulation*, la dispersión lateral de luz es significativamente inferior en los linfomas de bajo grado que en los de grado intermedio-alto (2,97 vs 3,99, $p=0,0209$). Con la clasificación de Kiel, los linfomas de bajo grado tienen valores medios de dispersión lateral de luz inferiores que los de alto grado histológico de malignidad (3,28 vs 4,08, $p=0,0714$). También los valores medios de la DS de la dispersión lateral de luz son inferiores en los linfomas de bajo grado que en los de alto grado (*Working Formulation* bajo grado: 1,74, grado intermedio: 2,76, alto grado: 3,27, $p=0,0033$; Kiel bajo grado: 3,22, alto grado: 3,02, $p=0,0141$). Los linfomas con histología folicular tienen valores inferiores de dispersión y DS de dispersión lateral de luz. Interpretamos los resultados en el sentido de que las células y el patrón involucrados en los linfomas de bajo grado presentan una refractariedad menor que en los linfomas de alto grado de malignidad, y que es un parámetro objetivo a ser tenido en cuenta en el momento de la clasificación histológica del tumor. La razón de la diferencia de los valores de dispersión de luz a 90 grados es discutible, pero podría ser debida a una menor compactación y diferente estructura espacial de la cromatina, así como la presencia de nucleolos(19), en las células predominantes en los linfomas de grados avanzados de malignidad histológica que conllevarían a una mayor refractariedad para la luz del láser.

4.- Valor del estudio del contenido en ADN de los linfomas no hodgkinianos

Los primeros estudios del contenido en ADN de los linfomas datan de principios de los años 80. Barlogie y Diamond publican sus observaciones en las que afirman que el porcentaje de linfomas aneuploides es menor en los de bajo grado que en los de alto grado(350) (356).

Barlogie cifra la aneuploidía, en global, en un 50 %, siendo del 43 % en los linfomas linfocíticos foliculares (bajo grado) y del 78 % en los entonces llamados linfomas difusos histiocíticos (alto grado)(350). Por su parte, Diamond encuentra que un 47 % de los linfomas de bajo grado, un 71 % de los linfomas de grado intermedio y un 90 % de los linfomas de alto grado presentan alteraciones en el contenido de ADN(351). En 1983, Barlogie, en una revisión de los artículos publicados sobre el tema, recoge datos sobre un total de 360 casos y halla un porcentaje medio global de linfomas aneuploides del 53 %(357).

Estas cifras tan elevadas contrastan con los resultados obtenidos en nuestra serie, en la que la frecuencia de aneuploidía citométrica representa en la *Working Formulation*, un 18,18% de los linfomas de bajo grado, un 22,72% de los linfomas de grado intermedio y un 45,45 % de los de alto grado. Utilizando la clasificación de Kiel, un 16,66 % de los linfomas de bajo grado y un 43,33 % de los linfomas de alto grado tienen un contenido aneuploide de ADN. Sólo 5 de los 66 casos son tetraploides y, a diferencia de Aine(369) que refiere casos con un índice de ADN superior a 2, no hay ningún caso hipertetraploide.

Otros estudios, sobre todo los de los últimos 5 años, obtienen resultados más cercanos o similares a los nuestros(138) (366) (371) (376). La razón de la gran diversidad y mayor porcentaje de aneuploidía reportada en las primeras investigaciones se puede deber al empleo de diferentes criterios de definición de aneuploidía, así algunos autores(137) consideran como aneuploides los tumores que producen histogramas con picos asimétricos de fase G0G1, aun y sin observar dos picos claros de células en reposo. El término de tumor casi diploide, creemos que se debe reservar para los linfomas que produzcan un pico de fase G0G1 claramente distinto pero muy cercano al de las células de referencia y en los que hay cierta superposición en la base de los mismos.

Se está realizando un gran esfuerzo para definir y aunar los criterios de aneuploidía(160). Actualmente, se considera que para poder afirmar la presencia de aneuploidía citométrica es necesario la observación de dos picos claros, correspondientes uno a la población diploide de referencia y otro a la población aneuploide. Los estudios que aplican este criterio de aneuploidía, salvo excepciones, obtienen porcentajes más o menos similares de aneuploidía en los mismos subgrupos de malignidad histológica.

La verdadera importancia del estudio de la ploidía radica en si éste puede ayudar en la clasificación de los linfomas o si se asocia con el pronóstico de la enfermedad.

En el presente estudio, el contenido en ADN no guarda relación con la presentación clínica, respuesta al tratamiento o supervivencia en la globalidad de los pacientes afectos de linfoma. Sin embargo, la presencia de aneuploidía se asocia significativamente con los linfomas de grado intermedio-alto de malignidad y, por tanto, las tres categorías de malignidad de la *Working Formulation* y las dos de la clasificación de Kiel pueden ser discriminadas por el estudio del contenido en ADN por citometría de flujo. Si se usa la *Working Formulation*, un tumor aneuploide tiene una probabilidad del 21,05 % de pertenecer a un linfoma de bajo grado, del 26,31 % de ser de grado intermedio y del 52,64 % de ser de alto grado; mientras que si el linfoma es diploide, la probabilidad es del 38,30 %, del 36,17 % y del 25,53 %, respectivamente. Aplicando la clasificación de Kiel, un linfoma aneuploide en un 31,57 % pertenece a un bajo grado y en un 68,43 % a un alto grado; mientras que si el linfoma es diploide, en un 63,83 % será un linfoma de bajo grado y en un 36,17 % de alto grado de malignidad histológica.

La presencia de aneuploidía, independientemente de su frecuencia, se puede considerar como un excelente y fiable marcador de malignidad, puesto que en ninguno de las 67 muestras de ganglio y tejido linfoide no neoplásico y reactivo que se procesaron para poner la técnica a punto y como controles se ha hallado picos sospechosos de aneuploidía. El 100 % de los histogramas aneuploides de muestras de tejido linfoide corresponden a linfoma. Todas las muestras incluidas en el estudio estaban fijadas sólo con formol, que ha demostrado ser el fijador ideal para el posterior rescate de los bloques parafinados el estudio del contenido en ADN y del ciclo celular por citometría de flujo; parece ser que los distintos fijadores pueden producir diferentes resultados citométricos de contenido en ADN que dificultan la interpretación y comparabilidad de los resultados(402).

Al contrario de lo que publicó Wain en 1987, en nuestro grupo de enfermos no existe diferencia significativa entre el porcentaje de linfomas con alteración en el contenido de ADN y el inmunofenotipo B o T del mismo(360).

El valor de la ploidía como factor pronóstico es discutido. Wain y Christensson afirman que la

presencia de aneuploidía se comporta como un factor pronóstico desfavorable en series globales de linfomas(359) (360), aunque Christensson en un estudio posterior asocia la aneuploidía con peor respuesta al tratamiento y remisiones más cortas en los linfomas de bajo grado, pero no con supervivencia(368). Griffin, en una serie de linfomas centrocíticos-centroblásticos encuentra que la alteración en el contenido de ADN se asocia a un pronóstico desfavorable, pero dicha asociación desaparece al homogeneizar los grupos para el resto de variables de incluidas en su trabajo(361).

Otro grupo de investigadores, como Cowan, Aine, Rehn, etc., mencionan específicamente la ausencia de relación entre la ploidía y el pronóstico de los linfomas no hodgkinianos(137) (369) (371). Macartney tampoco encuentra relación entre la supervivencia y el contenido de ADN en los linfomas de bajo grado(378).

Nosotros no hemos encontrado relación entre la supervivencia de la serie global de linfomas y la ploidía, sin embargo, dentro de los linfomas de alto grado de la *Working Formulation* o de la clasificación de Kiel, los tumores citométricamente diploides consiguen una remisión completa de su enfermedad en un porcentaje significativamente mayor que los aneuploides.

Kiel: alto		Contenido en ADN		
grd		Diploide	Aneuploide	(p=)
Remisión	no	5	8	0,0248
	sí	12	3	

Tabla 5-3.- Ploidía y remisión en linfomas de alto grado.

Dados nuestros resultados, estamos de acuerdo con el segundo grupo de investigadores que opinan que la ploidía no tiene relación con la supervivencia, pero demostramos que sí tiene valor como marcador pronóstico en los linfomas de alto grado en relación con la consecución de la remisión completa tras el tratamiento inicial del linfoma.

La razón por la cual los linfomas aneuploides, dentro de grupos homogéneos de enfermos, pueden tener una diferente respuesta al tratamiento permanece sin dilucidar. Hay que tener en cuenta que un histograma no aneuploide, por citometría de flujo, no excluye la presencia de alteraciones citogenéticas ya que la citofluorometría no puede resolver ganancias o pérdidas muy pequeñas en el contenido en ADN, ni tampoco discrimina la presencia de translocaciones cromosómicas balanceadas(241). En general la mayoría de los casos citométricamente aneuploides tienen cariotipos anómalos, aunque se describen tumores aneuploides con cariotipos normales(350) (351).

El término «aneuploide» describe aspectos diferentes en citometría y en citogenética, por eso la comparación de los resultados entre las dos técnicas puede ofrecer datos muy dispares. Es muy interesante el trabajo de Lakkala y de su equipo en este aspecto, el autor establece el límite de la sensibilidad de detección de aneuploidía mediante la citometría de flujo en una variación en el número de cromosomas superior a 3(370).

En función del resultado del estudio del contenido en ADN, se puede diferenciar con elevada sensibilidad (72,73 %) y especificidad (70,59 %) un subgrupo de enfermos con un alto riesgo de no conseguir la remisión completa de su linfoma de alto grado con el tratamiento inicial de su enfermedad; y por lo tanto, dada la importante trascendencia de este hecho, sean susceptibles de un minucioso seguimiento tras el tratamiento o de ser sometidos a regímenes terapéuticos más agresivos.

5.- Valor del estudio de la proliferación celular por citometría de flujo

Para la valoración de la actividad proliferativa se ha empleado la cuantificación del porcentaje de células en fase S y el denominado índice de proliferación. Este último es el resultado de sumar el porcentaje de células en fase S y en fase G2M.

Ambos parámetros han demostrado ser válidos para la evaluación de la proliferación celular en neoplasias humanas, pero recientemente se ha sugerido que podría ser más fiable el uso del porcentaje de células en fase S que el índice de proliferación(349). Esta afirmación se basa en que se ha encontrado que existe una mayor variabilidad y dispersión en los resultados de la fase G2M que en los de la fase S tras el análisis por modelización matemática de los histogramas del ciclo celular. La variabilidad en la medición de la fase G2M puede provocar un aumento en la

dispersión de los valores del índice de proliferación y la pérdida de la significación de las pruebas estadísticas(348) (349).

En nuestro estudio se ha calculado tanto el porcentaje de células en fase S como el índice de proliferación. Dado que ambos parámetros se han comportado del mismo modo en el estudio estadístico y proporcionan la misma información, y basándonos en las recomendaciones anteriores, en la discusión de los resultados se hace referencia fundamentalmente al porcentaje de células en fase S. En este sentido, estamos de acuerdo con los autores que opinan que la valoración del índice de proliferación no aporta más información que el estudio de sólo la fase S. Las variables clínicas en el momento del diagnóstico no tienen relación con los resultados citométricos del ciclo celular, pudiendo considerar a los grupos homogéneos en este aspecto. Hemos encontrado que las muestras de linfomas extranodales poseen un porcentaje de células en fase S superior a los nodales, pero esto se debe a que los linfomas de origen extranodal se presentan más frecuentemente con grados histológicos de malignidad avanzados.

No nos sorprende la falta de relación entre las fase S y el estadio clínico, la presencia o ausencia de sintomatología B o la carga tumoral. El estadio y la carga tumoral miden la cantidad y grado de diseminación del linfoma de forma estática y en un momento determinado, y, aunque lo hacen bajo dos aspectos diferentes, están íntimamente relacionados(13) (392). Nuestro estudio, como otros, demuestra una asociación entre estadios avanzados, una elevada carga tumoral y la presencia de síntomas B acompañantes. Todas estas variables han sido medidas a la vez que se obtuvo la muestra histológica para el diagnóstico del linfoma, que es la que se ha utilizada para cuantificar la fase S y el índice de marcaje con PCNA.

El porcentaje de células en fase S mide la capacidad de proliferación y crecimiento de una población celular en concreto(384) y, por lo tanto, puede ayudar a predecir la evolución de un tumor en cuanto a su extensión y diseminación.

Es lógico pensar que dos cultivos con igual número de células linfomatosas o dos pacientes con linfoma no hodgkiniano con exactamente igual carga tumoral, pero con diferente proporción de células en fase S, al cabo de un tiempo, presenten diferente número de células o carga tumoral. Si las células de las dos muestras tienen semejante velocidad de ciclo celular, la que tenga una menor proporción de células en fase S multiplicará sus individuos de un modo más lento que aquella con mayor proporción de células en proliferación, y siguiendo ambas una progresión exponencial, al cabo de un tiempo la muestra con menor actividad proliferativa tendrán menos células que la otra. Teóricamente, esto supone que dos grupos de pacientes con el mismo tipo de linfoma e igual carga tumoral, pero uno con una media superior de proporción de células proliferantes, seguidos durante cierto tiempo (el tiempo sería una variable controlada e igual para todos los sujetos) y sin modificación de la actividad biológica celular, al final, el grupo con mayor actividad proliferativa se presentaría con mayor carga tumoral. El modelo es válido para el estudio de la fase S por citometría de flujo, pero también para otros marcadores de proliferación celular, incluido Ki-67, PCNA, etc..

En el presente estudio se conoce la actividad proliferativa del tumor en el momento del diagnóstico y la situación clínica con la que éste se presenta, pero evidentemente no conocemos el tiempo de evolución de la enfermedad desde su inicio. Linfomas con baja actividad proliferativa y poca agresividad, pero con mucho tiempo de evolución hasta su diagnóstico pueden, perfectamente, presentarse con una diseminación masiva y una elevada carga tumoral, al igual que linfomas con una mayor actividad proliferativa pero con menor tiempo de evolución. De hecho, es conocido que los linfomas de bajo grado se diagnostican en estadios avanzados de la enfermedad puesto que sus manifestaciones clínicas pueden pasar desapercibidas o no ser consideradas importantes por el paciente hasta pasado cierto tiempo, mientras que los linfomas de alto grado, dadas sus características, son diagnosticados en estadios más precoces y con una menor carga tumoral(12). Pensamos que las fases del ciclo celular, tal y como se demuestra en el estudio, tienen más relación con aspectos histomorfológicos y pronósticos del linfoma que con su presentación clínica.

Hemos encontrado que el porcentaje medio de células en fase S es significativamente distinto entre los diferentes grupos de malignidad histológica y en los linfomas nodulares o difusos. También se ha encontrado un aumento significativo de la actividad proliferativa con el aumento de la agresividad de la celularidad predominante. Estos hallazgos corroboran los de otros equipos que mediante otras técnicas para el estudio de la proliferación celular han encontrado que la actividad proliferativa de las células linfomatosas aumenta con la agresividad del linfoma.

Los linfomas foliculares tienen menor fase S que los difusos y los linfomas constituidos por células pequeñas menor que los de células grandes, pero esto está en relación con el hecho de que los linfomas foliculares y de células poco agresivas mayoritariamente se incluyen en los linfomas de bajo grado y los difusos y de células agresivas en los linfomas de alto grado.

Según la *Working Formulation*, los linfomas de bajo grado tienen una fase S media de 5,03 %, los de grado intermedia de 11,67 % y los de alto grado de 18,07 %. En la clasificación de Kiel los de bajo grado tienen una fase S media de 7,45 % y los de alto grado de 16,55 %. En ambos casos el porcentaje de células en fase S es capaz de discriminar los subgrupos de malignidad histológica. Estos datos están de acuerdo con los resultados de casi todos los equipos que han estudiado este tema: (1) Diamond, sobre muestras fresca, encuentra que la fase S media en los linfomas de bajo grado es de 2,2 %, en los de grado intermedio de 12,2 % y en los de alto grado de 22,6 %[\(356\)](#); (2) Rehn describe que la fase S media en los linfomas de bajo grado es de 4,4 % y en los alto grado de 13,0 %[\(377\)](#); (3) McDunn encuentra que los ganglios de linfomas no relacionados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida la fase S en los de grado intermedio es de 10,4 % y los de alto grado es de 19,0 %[\(376\)](#). En la Tabla 22 se exponen más resultados, pero se observa que generalmente no existe gran variación en los resultados de los diferentes equipos, y que éstos se aproximan bastante a los nuestros. El valor del estudio del ciclo celular para discriminar subgrupos dentro de los grupos de malignidad histológica es más controvertido[\(386\)](#).

En nuestra serie, la citometría de flujo es capaz de diferenciar entre subgrupos histológicos. Los linfomas de célula pequeña hendida o de celularidad mixta foliculares tienen menor fase S que su contrapartida difusa, ésta característica se mantiene si sólo se valoran los linfomas de célula pequeña hendida o los de celularidad mixta sin agrupar entre sí. Dentro de los linfomas de bajo grado de la *Working Formulation*, los linfomas linfocíticos o de célula pequeña presentan menor actividad proliferativa que los de celularidad mixta. En los linfomas de bajo grado de la clasificación de Kiel, los linfomas linfocíticos y los linfomas nodulares tienen menor porcentaje de células en fase S que los linfomas difusos. Nuestros hallazgos apuntan a que:

a.- El estudio de las fases del ciclo celular por citometría de flujo es de utilidad para la discriminación entre los diferentes grupos de malignidad histológica. Con el aumento de la malignidad histológica se constata un aumento de la actividad proliferativa, opinión que es compartida por la mayor parte de los investigadores, sin embargo, tal y como observa Cowan[\(137\)](#), si bien ésto es de ayuda en la objetivización de la clasificación de los linfomas no hodgkinianos, el peor pronóstico de los grupos de malignidad histológica avanzada es conocido y por lo tanto el estudio citométrico del ADN no aportaría información pronóstica significativa. En este aspecto, Cibull en su estudio sobre cortes histológicos de linfoma afirma que la subdivisión de los pacientes que se obtienen con el estudio inmunohistoquímico (Ki-67) o de los Ag-NORs es similar a la que produce la clasificación histológica de la *Working Formulation*, sin ofrecer superior información sobre el pronóstico que la histología[\(324\)](#). A pesar de todo, Silvestrini demuestra que cuando se añaden los resultados de la proliferación celular a los modelos pronósticos se consigue un importante aumento en la capacidad de discriminación entre pacientes con diferente riesgo.

b.- Dentro de grupos citológicamente homogéneos (linfomas de células pequeñas hendidas y linfomas de células pequeñas hendidas y células grandes), el patrón difuso se acompaña de una mayor actividad proliferativa que denota un comportamiento biológico diferente y que justificaría la separación de los linfomas de grado intermedio como una categoría diferenciada en la *Working Formulation*. En este sentido, la *Working Formulation* refleja de un modo más acertado, con sus tres categorías de malignidad, los distintos grupos de proliferación celular que la clasificación de Kiel.

Algunos autores han encontrado que una fase S elevada se correlaciona con una menor supervivencia en series globales de linfomas no hodgkinianos. En la serie de Diamond, los pacientes con una fase S menor del 5 % presentaron supervivencias mayores[\(356\)](#). Sheibani, Christensson, Rehn, Joensuu, Andreeff, Kotelnikov y otros están de acuerdo en que una bajo porcentaje de células en fase S se asocia a un mejor pronóstico, con supervivencias significativamente superiores, en los linfomas[\(138\)](#) [\(358\)](#) [\(359\)](#) [\(368\)](#) [\(371\)](#) [\(377\)](#) [\(379\)](#) [\(380\)](#). Griffin, en un estudio sobre 60 linfomas de celularidad mixta halla que los tumores con una fase S superior al 18 % tienen supervivencias acertadas[\(361\)](#). Aine en linfomas foliculares de célula grande encuentra que si la fase S es superior a 9,7 % el pronóstico vital del enfermos es menor, aunque la diferencia no es significativa[\(360\)](#).

En la serie global de enfermos de nuestro estudio, una fase S superior al 9% se asocia con una supervivencia significativamente inferior. Los valores de la fase S no tienen correlación con el resto de variables clínicas pronósticas de la serie (síntomatología B y carga tumoral), con lo cual se confirma que el porcentaje de células en fase S es un factor pronóstico independiente en los linfomas no hodgkinianos. Esto está de acuerdo con la opinión de la mayoría de los autores citados anteriormente.

[Figura 5_1](#)

Nosotros hemos analizado el valor de la fase S dentro de subgrupos con iguales características clínicas o histocitológicas y homogéneos para el resto de las variables, con el fin de dilucidar si una fase S aumentada se comporta como un factor de riesgo independiente y aporta mayor información que la mera clasificación clínica o histológica del linfoma. Los estudios de Rehn y Joensuu, que encuentran, que dentro de los linfomas de alto grado, una fase S elevada se asocia a peor pronóstico(377) (379); los de Macartney, que halla que una fase S superior al 5 % se relaciona con menor supervivencia en linfomas nodulares centrocíticos y centrocíticos-centroblásticos(378); así como los resultados de Griffin y Aine, muestran resultados satisfactorios en este aspecto(361) (369). Slymen, en 1990, publica su trabajo en que mediante análisis multivariante demuestra que también con antígenos de proliferación (Ki-67) se pueden discriminar subgrupos con diferencia significativa en su supervivencia dentro de grupos clínicamente homogéneos de linfomas difusos de células grandes(375); lo cual contradice los resultados de Kossakowska, que obtiene que una expresión de Ki-67 superior al 40 % en linfomas difusos de célula grande se asocia con un alargamiento de la supervivencia(383).

En los linfomas de origen nodal, los pacientes con un porcentaje de células en fase S superior al 9 % presentan supervivencias significativamente inferiores a los que tienen una fase S igual o inferior a dicho valor.

Un aspecto importante del estudio es que los pacientes que alcanzan la remisión completa tras el tratamiento y que tienen un porcentaje medio de células en fase S superior al 8 % tienen a presentar supervivencias inferiores, pero sobre todo, que gracias a la fase S, en los pacientes que no obtienen la remisión completa de su linfoma, se pueden estratificar dos grupos con diferente pronóstico vital. Los pacientes sin remisión y con fase S superior al 10 % tienen tiempos de supervivencia significativamente inferiores que los que tienen una fase S hasta el 10 %; ninguno de los pacientes con una fase S elevada sobrevive más allá de 4 años, mientras que la probabilidad de supervivencia de los otros es aproximadamente del 50 % a los 8 años de seguimiento. Este hallazgo no lo hemos encontrado recogido en la literatura y significa que la citometría de flujo es capaz de distinguir entre dos grupos pronósticos dentro de los enfermos con persistencia de enfermedad tras el tratamiento.

En la *Working Formulation*, el porcentaje de células en fase S no tiene relación con la supervivencia en los linfomas de bajo grado o grado intermedio. Sin embargo, en los linfomas de alto grado, los pacientes con una fase S superior al 13 % presentan tiempos de supervivencia más cortos ($p=0,07$).

En la clasificación de Kiel, los pacientes afectados de linfomas de bajo grado con una fase S media igual o inferior al 7 % presentan tiempos de supervivencia significativamente más largos que los que tienen una fase S superior a dicho valor. En los linfomas de alto grado, la fase S no se muestra capaz de discriminar dos grupos con diferente pronóstico.

Como se ha visto, en nuestro estudio, el análisis por citometría de flujo de muestras parafinadas de linfoma con la obtención de una proporción elevada de células en fase S del ciclo celular permite discriminar a subgrupos de pacientes con tiempos de supervivencia acortados en los linfomas nodales, en los pacientes que no alcanzan la remisión completa tras el tratamiento y en los linfomas de alto grado de la *Working Formulation* y en los de bajo grado de la clasificación de Kiel.

El valor de la cuantificación de la fase S como predictor de la respuesta al tratamiento en los linfomas no hodgkinianos es muy controvertido. Cowan afirma que una fase S igual o inferior al 20 % se asocia a una peor respuesta al tratamiento con un menor porcentaje de remisiones completas(137). En cambio, Christensson encuentra que una fase S baja se relaciona con una buena respuesta al tratamiento(368). Nuestro estudio no ha mostrado ninguna de las dos situaciones anteriores; los valores de la fase S no se asocian, ni en la globalidad de los enfermos ni en subgrupos homogéneos con la respuesta al tratamiento. Creemos que la explicación de nuestros hallazgos radica en que la respuesta al tratamiento del linfoma se debe a la sensibilidad del mismo a la terapéutica, pero, como es sabido, influye de modo decisivo la diseminación del tumor (estadio), la posibilidad y la cantidad de tumor (carga tumoral) en el momento del diagnóstico y de iniciar el tratamiento(114). En nuestra serie existe relación entre la respuesta al tratamiento y el estadio y la carga tumoral; los pacientes en estadio avanzado o con elevada carga tumoral consiguen con menor frecuencia la remisión completa tras el tratamiento; pero en estos grupos no hay relación significativa con la histología ni con el porcentaje de células en fase S. En el análisis multivariante, únicamente el estadio mantiene la relación significativa con la respuesta al tratamiento, con lo que podemos afirmar que, en nuestro estudio de investigación, la fase S no tiene relación con la consecución de la remisión completa tras el tratamiento.

Como hemos visto, varios investigadores se han ocupado de la relación de la supervivencia con la actividad proliferativa en los linfomas no hodgkinianos, pero pocos de la relación entre la fase

S y el tiempo libre de enfermedad. Kossakowska estudia, mediante la expresión de un antígeno de proliferación celular, la supervivencia en linfomas difusos de células grande y encuentra que una actividad proliferativa alta se asocia a mayor supervivencia(383). Estos resultados van en contra de los nuestros y de la opinión de otros autores. Sin embargo, este autor también encuentra relación entre una elevada actividad proliferativa y un mayor tiempo de supervivencia libre de enfermedad(383).

Los resultados de Kossakowska, en cuanto a supervivencia libre de enfermedad, están de acuerdo con los obtenidos con nuestros pacientes(383). Hemos encontrado que en el estudio estadístico bivalente que los enfermos en estadio clínico precoz, ausencia de síntomas B, baja carga tumoral, buena respuesta al tratamiento y poca actividad proliferativa presentan con mayor frecuencia un tiempo libre de enfermedad superior a 30 meses. La razón de establecer un límite diferencial en tiempo de 30 meses de seguimiento viene derivada del porcentaje de enfermos en remisión completa tras el tratamiento y los tiempos de seguimiento de nuestros pacientes. En el estudio multivariante, mantienen su relación significativa con el tiempo de supervivencia libre de enfermedad la obtención de la remisión completa tras el tratamiento y una fase S elevada.

Dentro de subgrupos homogéneos, en los linfomas de alto grado, una fase S elevada se asocia con mayor frecuencia de tiempos libre de enfermedad superiores a 30 meses.

La razón cierta por la que una fase S elevada se asocia, en series globales o subgrupos de pacientes con linfoma, a peor pronóstico vital es discutible; puede ser la misma que se baraja para otras neoplasias de la economía. Estamos de acuerdo en que posiblemente el mecanismo fundamental que hace que los pacientes con una fase S elevada presenten una progresión de su linfoma, que les produzca la muerte, es que el tratamiento utilizado no es capaz de detener la progresión de la neoplasia debido al alto porcentaje de células que se encuentran proliferando activamente. A pesar de que, generalmente, el tratamiento con fármacos antineoplásicos actúa preferentemente sobre las células involucradas activamente en el ciclo celular(17), una fase S demasiado elevada puede que se acompañe inicialmente de una buena respuesta al tratamiento, pero en el caso de que no se obtenga la curación del linfoma con la eliminación de todas las células neoplásicas, la mínima presencia de células neoplásicas con alta capacidad proliferativa tras el ciclo de quimioterapia hace que la enfermedad mínima residual en el periodo interciclo no sea eliminada por el huésped y que el linfoma no hodgkiniano rebrote de nuevo y en un tiempo más o menos corto se vuelva a manifestar la enfermedad.

De hecho, esta teoría explicaría también la causa por la que los linfomas con mayor fase S podrían conseguir tiempos de supervivencia libre de enfermedad superiores. Los pacientes con fase S elevada, globalmente y dentro de subgrupos homogéneos, no tienen diferente probabilidad de conseguir la remisión completa con el tratamiento ya que esto depende en gran parte del tipo del linfoma, biodisponibilidad de la quimioterapia, sensibilidad celular a los fármacos, y también de lo evolucionada que se encuentre la enfermedad(17). Sin embargo, los pacientes con fase S alta tienen mayor posibilidad de mantener la remisión completa conseguida, a lo largo de su seguimiento, más allá de 30 meses; tiempo a partir del cual la recidiva del linfoma es infrecuente. Estos corresponderían a los enfermos en los que el tratamiento ha destruido casi en su totalidad la población neoplásica y es posible que haya conseguido la curación del linfoma, gracias a que gran parte de las células linfomatosas se encontraban ciclando y eran sensibles a la terapéutica. Pero cuando no se haya conseguido la remisión completa o persista enfermedad mínima residual, si la actividad proliferativa de las células es alta, rápidamente el linfoma crecerá y puede poner en peligro la vida del enfermo, y en nuestra serie se demuestra que los pacientes sin respuesta completamente satisfactoria al tratamiento y con fase S superior al 10 % tienen una supervivencia acortada. Debe de existir un factor que podría tratarse de la sensibilidad celular al tratamiento y la posibilidad de adquirir resistencia al mismo que sería el responsable de que linfomas con semejante actividad proliferativa respondan de modo diferente al tratamiento y no obtengan la remisión completa. Estas premisas pueden cumplirse dentro de grupos homogéneos de linfomas y explicarían la utilidad de la fase S y el estudio de la proliferación celular ciertos subgrupos de linfomas no hodgkinianos.

En resumen e intentando unificar toda la información, el valor y la importancia del estudio de la proliferación celular en los linfomas se basa en que la cuantificación de la fase S ayuda en la clasificación del grado histológico de malignidad de los linfomas no hodgkinianos. El paciente recibirá tratamiento por su enfermedad y, aunque seguramente la actividad proliferativa de las células tumorales está en cierto modo relacionada con la respuesta al tratamiento, en nuestra serie, el porcentaje de células en fase S no es un parámetro que aisladamente permita predecir la misma. Algunos enfermos conseguirán la remisión completa del linfoma, mientras que en otros persistirá la enfermedad de forma activa. En aquellos que la enfermedad persiste y tienen un porcentaje de fase S alto, existiría la tendencia de que sufrieran una progresión más rápida de la

enfermedad y tuvieran unos tiempos de supervivencia acortados. En los que la remisión completa es un hecho, podríamos distinguir dos grupos:

a.- Pacientes con linfomas de bajo grado, en los que el objetivo primordial no es la curabilidad por quimioterapia del proceso(114). En ellos, caso de conseguir una remisión del linfoma existe una alta probabilidad de recidiva, y una actividad proliferativa elevada se asocia a una progresión más rápida del linfoma y a un acortamiento de la supervivencia.

b.- Pacientes con linfomas de alto grado de malignidad, en los que existe una asociación significativa entre una fase S alta y un tiempo de supervivencia libre de enfermedad superior a 30 meses. Si bien aquellos enfermos que no consiguen la remisión de su enfermedad y presentan una alta actividad proliferativa tienen un menor probabilidad de supervivencia.

A pesar de que hay factores propios de la biología celular que son desconocidos, y que influyen en el comportamiento de los linfomas no hodgkinianos, el estudio por citometría de flujo de las fases del ciclo celular ayuda a comprender la enfermedad.

Pensamos que la información obtenida con la técnica es suficientemente importante como para aconsejar el estudio por citometría de flujo del contenido en ADN y las fases del ciclo celular de forma rutinaria en los linfomas no hodgkinianos.

6.- Valor del índice de marcaje con PCNA para el estudio inmunohistoquímico de la proliferación celular en linfomas

En oncohematología, hay autores que han evidenciado que el estudio de la proliferación celular mediante el marcaje de antígenos asociados a proliferación (Ki-67, p105), tanto por citometría de flujo como por procedimientos inmunohisto-químicos, es útil para la valoración de la actividad proliferativa en los linfomas no hodgkinianos(185) (324) (325) (354) (373) (375) (381) (382).

Tras la identificación, a finales de los 70, por Miyachi, Fritzler y Tan de un autoanticuerpo en el suero de los pacientes con lupus eritematoso sistémico que reaccionaba con antígenos nucleares de células proliferantes(392), algunos equipos consiguieron identificar el antígeno como una ciclina que interviene de modo fundamental en la duplicación del material genético(332). Esta proteína reguladora del ciclo celular se conoce como PCNA y aumenta su expresión durante la fase G1, con un máximo en la fase S y decrece durante la fase G2M(187) (330).

Algunos autores han demostrado que el estudio de la expresión de PCNA se correlaciona con la actividad proliferativa de ciertos tejidos normales y neoplásicos(109) (110). La cuantificación del porcentaje de células PCNA positivas ofrece resultados similares a otras técnicas clásicas de evaluación de la proliferación celular y puede ser útil para el estudio de la misma(322) (325).

Landberg, en 1991, encuentra que los anticuerpos dirigidos contra PCNA pueden ser utilizados para la cuantificación de la proliferación celular(110). Ruiz Marcellan estudia la expresión de PCNA en células linfoides de muestras con hiperplasia folicular y encuentran que las células positivas se ubican en los folículos reactivos, es decir dónde se espera proliferación celular activa(353).

Un estudio interesante que estudia la expresión de PCNA por inmunohistoquímica y las fases del ciclo celular por citometría de flujo es el realizado por Woods sobre muestras de linfoma gástrico(355). El autor encuentra una buena correlación entre el índice de marcaje con PCNA y el porcentaje de células en fase S + G2M. Una elevada expresión de PCNA se asocia a un mayor grado histológico de malignidad y con un peor pronóstico. Pensamos que si el estudio de la expresión de PCNA ofrece información acerca de la actividad proliferativa en linfomas intestinales puede que sea de utilidad en los linfomas no hodgkinianos en global. Para demostrarlo se pueden considerar los resultados de la citometría de flujo como valor de referencia de la actividad proliferativa celular(342) (348), puesto que está probada la utilidad de la misma para el estudio de la proliferación en linfomas, y se comparan con los resultados de la inmunohistoquímica.

En nuestro estudio hemos obtenido que el índice de marcaje con PCNA presenta una correlación significativa negativa con el porcentaje de células en fase G0G1 y una correlación positiva significativa con el porcentaje de células en fase S ($r=0,65$, $p<0,0001$).

Figura 5 2

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Woods que obtiene un coeficiente de correlación entre la expresión de PCNA y el índice de proliferación de 0,62(355), si bien, nosotros obtenemos un coeficiente discretamente superior.

Se observa que tanto el porcentaje de células en fase S como el índice de proliferación se correlacionan con la expresión de PCNA, pero el coeficiente de correlación es mejor en el caso del índice de proliferación (0,69) que en la fase S (0,65), y la pendiente es más cercana a 1 si se valora la suma de las fase S y G2M. Una explicación de estos hallazgos puede ser que la

expresión de PCNA es máxima durante la fase S del ciclo celular, pero también se puede presentar en los momentos iniciales de la fase G2M ya que los niveles decrecen a lo largo de la misma(387). El índice de proliferación, al ser la suma de la fase S y G2M, podría reflejar mejor el patrón teórico de expresión del antígeno PCNA y explicaría una mejor bondad en la correlación. El porcentaje de células en fase S proporciona la mayor parte del peso del valor del índice de proliferación y es la fase de máxima expresión de PCNA, por lo tanto se correlaciona con los niveles de expresión del mismo. Generalmente, una mayor proporción de células en fase S se acompaña simultáneamente de un aumento en el porcentaje de células en fase G2M, puesto que las segundas son el resultado natural de ciclo celular de las primeras; ésta podría ser la explicación de que la pendiente de la ecuación de correlación de los valores de PCNA en función de la fase S tenga un valor cercano a 1,4, puesto que, para un tumor determinado, en el índice de marcaje de PCNA se engloban las células en fase S y algunas en fase G2M.

A la vista de los resultados, pensamos que el estudio de la expresión del antígeno PCNA sobre cortes histológicos de muestras de linfoma, fijadas con formol e incluidas en parafina según el procedimiento rutinario de los laboratorios de anatomía patológica, mediante técnicas inmunohistoquímicas es válido para el análisis de la actividad proliferativa en los linfomas no hodgkinianos.

Nuestro trabajo demuestra que el estudio de la expresión de PCNA puede ser una técnica alternativa para el estudio de la proliferación celular en los linfomas no hodgkinianos y puede ser empleada para dicho fin cuando no se dispongan o no se deseen utilizar técnicas como la citometría de flujo o cuando se quiera trabajar sobre muestra archivada ya que el antígeno Ki-67 y otros no resisten la fijación y parafinación del tejido.

7.- Valor del índice de marcaje con PCNA en los linfomas no hodgkinianos

Como se ha discutido con anterioridad, el estudio de la proliferación celular en los linfomas es de utilidad para comprender el comportamiento de la enfermedad. Puede ayudar en la clasificación del grado histológico de malignidad y discriminar subgrupos diferentes en cuanto a proliferación y pronóstico dentro de grupos homogéneos. En este aspecto, Woods encuentra, en los casos disponibles para estudio de supervivencia de su serie de linfomas intestinales, una elevada expresión de PCNA se asocia a un acortamiento de la supervivencia(355).

Pensamos que ya que los procedimientos inmunohisto-químicos para la cuantificación de la expresión de PCNA demuestran ser de utilidad para el estudio de la actividad proliferativa en linfomas, éstos pueden aportar información diagnóstica y pronóstica, al igual que lo hace la valoración citométrica de la fase S. Sin embargo, hay que hacer notar que la elevada dispersión de los porcentajes de células PCNA positivas obtenidos en nuestro estudio, dentro de linfomas de iguales características histocitológicas puede restar significación al valor de la técnica.

El índice de marcaje con PCNA aumenta significativamente con el grado histológico del linfoma y con el incremento de la agresividad de las células predominantes en el mismo. La cuantificación de la expresión de PCNA es superior en los linfomas foliculares de células pequeña hendida o celularidad mixta que en su contrapartida difusa; sin embargo, no puede discriminar de forma significativa entre linfomas nodulares o difusos de célula pequeña hendida.

En los linfomas de bajo grado de la *Working Formulation*, los linfomas linfocíticos o de célula pequeña hendida tienen un índice de marcaje con PCNA inferior a los linfomas foliculares de celularidad mixta; y en los linfomas de bajo grado de la clasificación de Kiel el grupo de linfomas linfocíticos y foliculares tienen menor porcentaje de células PCNA positivas que los linfomas difusos.

Los niveles de expresión de PCNA, ni en la serie global de linfomas ni en subgrupos clínicamente o histológicamente homogéneos, es capaz de estratificar a los pacientes en grupos con diferente pronóstico de su enfermedad. Si bien hemos observado que existe la tendencia que los enfermos con alta actividad proliferativa presenten un acortamiento de los tiempos de supervivencia, con una separación entre las curvas de enfermos con un índice de marcaje hasta 9 o superior a 9 %, el estudio estadístico no es significativo ($p=0,31$).

La pérdida en la capacidad de discriminación diagnóstica y pronóstica con el estudio de la proliferación por inmunohistoquímica respecto a la citometría de flujo puede obedecer a la variabilidad de los resultados del marcaje con PCNA, y quizás mejoraría con la estandarización del marcaje inmunológico o aumentando la objetividad y el número de eventos en el conteo de células para calcular el índice de marcaje; con ello se podrían evitar sesgos en el resultado(395). Para contar un mínimo de 500 células hemos invertido, en nuestro estudio, un mínimo de 5-7 minutos por caso, de modo que aumentar el número de células valoradas hasta 1000 ó 1500, creemos que supondría un alargamiento que restaría operatividad a la técnica. Con los modernos analizadores de imagen es posible que se pueda, mediante la selección de un umbral de color de

positividad y la automatización del conteo, realizar la valoración de un número elevado de células PCNA positivas o negativas y aumentar la reproductibilidad del índice de marcaje.

Se observa que el estudio de la proliferación con el índice de marcaje con PCNA discrimina entre los distintos grado histológicos de malignidad y entre algunos subtipos histológicos, pero no aporta información pronóstica en el linfoma. Como se apunta en el apartado anterior, los resultados de la inmunohistoquímica y citometría tienen una alta correlación, pero el estudio de las fases del ciclo celular por citofluorometría proporciona mayor información diagnóstica y pronóstica en el linfoma no hodgkiniano. No creemos que sea de interés clínico estudiar simultáneamente la proliferación celular por citometría de flujo y con el anticuerpo PCNA, y, caso de elegir un procedimiento, si es posible, emplear la citometría de flujo.

VI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

A.- Resumen

1.- Introducción y objetivos:

Los **linfomas no hodgkinianos** son un grupo heterogéneo de neoplasias del sistema linforreticular(1). Bajo el término genérico de linfoma se engloban neoplasias de rápido crecimiento y elevada agresividad, así como otras bien toleradas durante meses o años(40).

La heterogeneidad de los procesos incluidos dentro de los linfomas se traduce en una amplia variabilidad en la presentación clínica, historia natural y pronóstico de la enfermedad(57) (74).

La caracterización de los linfomas se ha basado fundamentalmente en la valoración histopatológica de biopsias de muestras de origen ganglionar o extraganglionar(4) (19). Dada la diversidad del comportamiento de los linfomas, se ha intentado estratificar a los enfermos afectados de linfoma(114) en grupos con distinto pronóstico en función de la clasificación histológica(7) (11) (12) (43) (45), de la extensión de la enfermedad(13) (82) (392), de la biología tumoral(57) (81) (82) (134), etc..

La investigación acerca de la biología de las células neoplásicas proliferantes en los síndromes linfoproliferativos puede ayudar en la comprensión de la historia natural de la enfermedad y aportar información útil sobre la respuesta al tratamiento y el pronóstico del linfoma no hodgkiniano(1). Por otra parte, el estudio y la puesta a punto de métodos que aporten objetividad en la clasificación del linfoma puede ser de utilidad para unificar criterios diagnósticos(19) (46).

La **citometría de flujo** es una técnica que permite cuantificar características de dispersión de luz y fluorescencia de partículas en suspensión(141). Las células son teñidas con fluorocromos que se unen específicamente a constituyentes celulares. Estas son inyectadas en «fila india» y obligadas a pasar a través de un punto sensible iluminado con luz láser, de modo que resultado de la interacción célula-luz, cada evento produce una señal fluorescente proporcional a su contenido en fluorocromo(250) y una dispersión de la luz en función de su tamaño, forma y estructura(143). Varios detectores recogen las señales de luz y mediante procesamiento informático se pueden representar gráficamente los resultados.

En el caso de que se empleen fluorocromos que se unen específicamente al ADN(190), por citometría de flujo, se puede estudiar, mediante programas informáticos(176)(180), el contenido en material genético y el porcentaje de células en determinadas fases del ciclo celular de poblaciones frescas o desparafinadas(212).

Otro modo de estudiar la actividad proliferativa celular, a partir de cortes histológicos, es el uso de **técnicas inmunohistoquímicas** en las que el anticuerpo primario se une selectivamente a células que se encuentran proliferando activamente o en una determinada fase del ciclo celular(308). En este sentido, un anticuerpo de reciente aparición y dirigido contra PCNA(186) (327) (331) (PC10) ha demostrado ser útil para el estudio de la proliferación celular en neoplasias humanas(320) (333). El antígeno PC10 tiene la ventaja que resiste el proceso rutinario de fijación y parafinación de los laboratorios de anatomía patológica(308).

Aplicando la citometría de flujo y/o la inmunohistoquímica, el estudio del contenido en ADN y de la proliferación celular en el linfoma puede aportar información diagnóstica y pronóstica.

De la **literatura** publicada se desprende que la ploidía se relaciona con el grado de malignidad del linfoma, de modo que los linfomas de alto grado presentan más frecuentemente alteraciones en el contenido de ADN, pero su valor pronóstico permanece sin determinar; y que una actividad proliferativa elevada se relaciona con un alto grado de malignidad, sin embargo, su valor como factor pronóstico independiente en los linfomas no hodgkinianos es controvertido(137) (138) (160) (342) (357) (386).

Hay muy pocos trabajos que evalúen la expresión de PCNA y su utilidad para el estudio de la actividad proliferativa(328) (333) (352) (354), así como su valor en el diagnóstico y pronóstico en los linfomas(355).

En el presente trabajo se pretende estudiar el contenido en ADN y el ciclo celular en los linfomas no hodgkinianos. El **objetivo** del mismo es demostrar que el análisis del contenido en ADN y de la proliferación celular, por citometría de flujo e inmunohistoquímica (PCNA), es útil para el estudio de la biología tumoral y proporciona una información significativa en cuanto al diagnóstico y pronóstico de los enfermos con linfoma.

2.- Material y métodos

Pacientes: desde enero de 1975 hasta marzo de 1991, constan en los archivos del Servicio de Hematología y Hemoterapia 115 pacientes diagnosticados de linfoma no hodgkiniano. Tras la búsqueda de muestra parafinada y la revisión anatomopatológica; de ellos, 66 se han considerado adecuados para el presente estudio.

De los enfermos, se han recogido los siguientes **datos**: (1) clínicos: edad, sexo, estadio clínico(13), presencia de síntomas B(83), origen nodal o extranodal, carga tumoral(392), respuesta al tratamiento inicial, tiempo libre de enfermedad y fallecimiento; y (2) histopatológicos: clasificación y grado histológico según la *Working Formulation*(12) y la clasificación de Kiel(11), patrón y tipo celular predominante.

Citometría de flujo: el estudio por citometría del contenido en ADN y ciclo celular de las 66 muestras parafinadas de linfoma y de 67 muestras no neoplásicas se ha realizado mediante una modificación de la técnica de Hedley(170) (171). Brevemente, la técnica consiste en la obtención de cortes de 50 μ m de grosor, desparafinación y rehidratación de los mismos por pases por xilol y alcoholes decrecientes, y posterior disgregación mecánica y enzimática con un solución de pepsina (Pepsin, Sigma, P-7012) en suero fisiológico al 0,5 %, a 37 grados durante 30-45 minutos. Tras la obtención de la suspensión celular, ésta se filtra, se lava y se incuba durante 30 minutos, a oscuras, con una solución de yoduro de propidio y ARNasa (DNA-Prep Stain, Izasa-Coulter, PN 660451), tras lo cual se analiza por un citómetro de rutina clínica (EPICS PROFILE, Izasa-Coulter), adquiriéndose un mínimo de 50.000 eventos(242). Los datos de dispersión de luz y fluorescencia se guardan en forma de lista en un diskette. Como controles se han empleado hematíes de pollo (Chicken Erythrocyte Nuclei, Izasa-Coulter, PN 6604453) y el tejido linfoide desparafinado normal(205).

Hemos estudiado los valores de dispersión de luz frontal y lateral de las células, así como sus desviaciones standards (EPICS ELITE Flow Cytometer Software, Izasa-Coulter, PN-4235922B). Los histogramas citométricos del contenido en ADN se analizaron mediante un programa informático específico(242) que calcula el porcentaje de células en las fases del ciclo celular y, de existir aneuploidía, el índice de ADN y las fases del ciclo celular de la población aneuploide (MULTICYCLE, Phoenix Flow Systems, 6414566). Para el estudio del ciclo celular se han desechado las señales producidas por dobletes y se ha empleado un sistema de corrección para la sustracción de señal producida por núcleos cortados(242).

Inmunohistoquímica: cortes histológicos de 6 μ m de espesor se han incubado con un anticuerpo anti-B (DAKO-CD20: L26, Dako-Atom, M755, dilución 1/100), anti-T (DAKO-CD45RO: UCHL1, Dako-Atom, M742, dilución 1/100) y anti-PCNA (DAKO-PCNA: PC10, Dako-Atom, M879, dilución 1/20). Para evidenciar la unión del anticuerpo al antígeno se ha empleado un método inmunohistoquímico de tres pasos (primario-secundario[biotina]-avidina) que tiene como trazador a la fosfatasa alcalina (UltraProbe, Wide Spectrum Universal Phosphatase-Based Immunohistochemical Detection System, Biomedica Corp., 09-901). La técnica inmunohistoquímica consiste en la desparafinación de los cortes por calor y xilol, hidratación por pases por alcoholes decrecientes; bloqueo de peroxidasa, acondicionamiento de tejidos, incubación con el anticuerpo primario durante 30 minutos, incubación con el secundario biotinilado durante 20 minutos, incubación con los complejos avidina-fosfatasa alcalina durante 20 minutos, tras cada uno de los pasos se realiza lavado con tampón (10XImmunoassay Buffer, Biomedica Corp., M30/M61, dilución 1/10). Seguidamente, se procede a la incubación con cromógeno durante 15 minutos y lavado con agua destilada; contrastar con hematoxilina acuosa y montar con un medio acuoso (Aquatex, Merck, 8562). Las preparaciones no deben secarse durante todo el proceso, por ello, las incubaciones se realizan en cámara húmeda.

Las células positivas presentan un precipitado rojizo. Para calcular el índice de marcaje con PCNA, un mínimo de 500 células fueron evaluadas por planimetría (MOP-VIDEOPLAN, Kontron) y clasificadas en positivas o negativas; el índice de marcaje se expresa como el porcentaje de células positivas para el antígeno sobre el total de células valoradas(308) (312).

Para el **estudio estadístico** se han empleado pruebas no paramétricas (Fischer, Kruskal-Wallis y regresión lineal). En caso de comparar variables cualitativas, una de ellas con más de 2 categorías y se cumplían las condiciones de aplicación, se ha aplicado la prueba de X^2 . Para el estudio de series temporales se ha utilizado la prueba de Mantel-Haenszel. El nivel de significación se ha establecido para una p (400).

3.- Resultados:

De las 67 muestras control (no neoplásicas) de tejido linfoide, no se ha obtenido ningún histograma aneuploide. El porcentaje medio de células en fase G0G1 es de $93,13 \pm 3,48$, en fase G2M es de $2,55 \pm 2,47$, y en fase S es de $4,16 \pm 1,99$.

Después de la revisión anatomopatológica de las 66 muestras de linfoma, se han considerado 22 (33,3 %) casos de linfoma de bajo grado, 22 (33,3 %) de grado intermedio y 22 (33,3 %) de alto grado según la *Working Formulation*; o 36 (54,5 %) de bajo grado y 30 (45,5 %) de alto grado aplicando la clasificación de Kiel.

Todos los grupos son comparables en cuanto a la edad y el sexo. Por lo demás, la distribución

de los casos en función de sus características clínicas e histológicas, así como la relación entre ellas, se ajusta a lo descrito en la literatura. En este sentido, nuestra serie de pacientes estudiados no presenta discrepancias importantes con otras series publicadas([12](#)) ([15](#)) ([18](#)) ([21](#)) ([40](#)) ([45](#)) ([54](#)) ([55](#)) ([114](#)) ([129](#)) ([130](#)) ([132](#)).

Citométricamente, la dispersión lateral de luz y la DS de dispersión lateral de luz es inferior en los linfomas de bajo grado que en los de grado intermedio-alto en la *Working Formulation* (2,97 vs 3,99, $p=0,0209$; 1,74 vs 3,02, $p=0,0009$), y en los de bajo que en los de alto grado aplicando la clasificación de Kiel (3,29 vs 4,08, $p=0,0714$; 2,23 vs 3,02, $p=0,0141$). Los valores de dispersión de luz no tienen relación con ninguna del resto de variables estudiadas.

El contenido en ADN, en nuestra serie, no guarda relación con la presentación clínica o evolución de la globalidad de los enfermos con linfoma no hodgkiniano. Sin embargo, los tumores de alto grado presentan con mayor frecuencia histogramas aneuploides que los de bajo grado (43,33 % vs 16,17 %, $p=0,0172$). Dentro de los linfomas de alto grado, los linfomas aneuploides tienen peor respuesta al tratamiento y alcanzan la remisión completa en un porcentaje significativamente inferior de casos ($p=0,0248$).

En el estudio de la proliferación celular por citometría de flujo se obtiene que el valor medio de la fase S aumenta con el grado de malignidad del linfoma (*Working Formulation*: bajo grado: 5,02 %, grado intermedio: 11,67 %, alto grado: 18,07 %, $p<0,0001$).

Los pacientes con linfoma nodular centrocítico tienen una fase S inferior que su contrapartida difusa (3,85 vs 10,60, $p=0,0143$), además, los enfermos diagnosticados de linfoma folicular centrocítico o linfoma folicular mixto, tienen una fase S significativamente inferior que el grupo de pacientes con linfoma difuso centrocítico o mixto (6,11 vs 11,64, $p=0,0016$).

Los pacientes con una fase S superior al 9 % tienen menor supervivencia que los que tienen una fase S hasta del 9 % ($p=0,0388$).

Dentro de grupos clínicamente homogéneos, la fase S también discrimina subgrupos pronósticos: los pacientes con linfoma de origen nodal y una fase S superior al 9 % tienen un acortamiento de la supervivencia ($p <0,010$). Los enfermos que tienen una fase S superior al 10% , pero no han alcanzado la remisión tras el tratamiento inicial ($p<0,0001$) tienen peor pronóstico vital. Los pacientes con una fase S superior al 8% y que alcanzan la remisión completa tras el tratamiento tienden a presentar el acortamiento de la supervivencia ($p=0,1562$).

Los pacientes afectados de linfomas de bajo grado según la clasificación de Kiel y que tienen un porcentaje de células en fase S superior el 7 % presentan un peor pronóstico vital ($p<0,050$). Sin embargo, dentro de los pacientes con linfomas de alto grado de malignidad y que respondieron satisfactoriamente al tratamiento inicial, una fase S superior al 15% se relaciona con un tiempo libre de enfermedad superior a 30 meses ($p=0,034$).

En el estudio multivariante, una fase S elevada se asocia a una mayor probabilidad de permanecer durante más de 30 meses libre de enfermedad. Junto, lógicamente, con que se haya conseguido la remisión completa con el tratamiento ($p<0,0001$), la valoración de la fase S es el factor pronóstico más importante para predecir si el enfermo se mantendrá libre de enfermedad linfomatosa un tiempo superior a 30 meses ($p=0,0373$).

El índice inmunohistoquímico de marcaje con PCNA presenta una correlación significativa con el porcentaje citométrico de células en fase S ($r=0,65$, $p<0,0001$).

El índice de marcaje con PCNA aumenta de modo significativo con el grado de malignidad histológica (*Working Formulation*: bajo grado: 3,99, grado intermedio: 16,49, alto grado: 31,98; $p<0,0001$. Kiel: bajo grado: 8,04, alto grado: 28,63; $p<0,0001$) y con la agresividad de la celularidad predominante en el linfoma ($p=0,0001$). Salvo en los pacientes con linfoma de origen nodal, en el que un índice de marcaje superior al 10% se asocia con un acortamiento significativo de la supervivencia ($p<0,02$), la valoración de la expresión de PCNA no se correlaciona con datos pronósticos en el linfoma no hodgkiniano.

4.- Discusión

Los valores de dispersión citométrica de la luz de las suspensiones de muestras de linfoma se relacionan con el grado de malignidad del mismo. Pensamos que únicamente con resultados de mediciones de características físicas de la muestras desparafinadas de linfoma se obtienen valores que pueden ser de utilidad en la clasificación del grado de malignidad. Nuestros resultados contrastan con los de otros autores que a principios de los años 80 sentaron la idea que la valoración de la dispersión de luz no era de utilidad en la clasificación de linfoma([356](#)). La razón de la discrepancia puede deberse en diferencias en el procedimiento técnico y en las mejoras introducidas en la configuración de los citómetros de flujo actuales.

Sorprendentemente, son los valores de dispersión lateral de luz (relacionados con la refractariedad celular) los que aumentan con la malignidad del linfoma, en lugar de los de

dispersión frontal (relacionados con el tamaño). La razón puede radicar en la diferencia en el tipo de fotodetector que recoge los dos tipos de señal: la dispersión lateral se recoge por fotomultiplicadores que son más sensibles que los fotodiodos que recogen la luz dispersada hacia adelante. La explicación de la diferencia, en función del grado de malignidad, de los valores de dispersión lateral de luz y DS de dispersión lateral de luz es discutible, pero podría ser debida a una menor compactación y distinta estructura espacial de la cromatina, así como por la presencia de nucleolos, en las células predominantes en los linfomas de grado de malignidad elevado; lo que conllevaría una mayor refractariedad para la luz del láser.

Es conocido que los linfomas de alto grado presentan con más frecuencia alteraciones citométricas en el contenido de ADN(386), lo que también se demuestra en nuestra serie. La presencia de aneuploidía, independientemente de su frecuencia, es un excelente marcador de malignidad, ya que en ninguna de las muestras neoplásicas se ha obtenido un histograma sospechoso de aneuploidía. Sin embargo, el valor de la ploidía como factor pronóstico es discutido(386).

En nuestra serie, se demuestra que, en los linfomas de alto grado, la aneuploidía se asocia con peor respuesta al tratamiento, si bien la razón de este hallazgo permanece sin dilucidar. En los pacientes con linfoma de alto grado, en función del resultado del estudio del contenido en ADN, se puede diferenciar (con una sensibilidad del 73 % y una especificidad del 71 %) un subgrupo de enfermos con un riesgo significativo de no conseguir la remisión completa de su linfoma de alto grado; y por tanto, susceptibles de un minucioso seguimiento tras el tratamiento o de ser sometidos a regímenes más agresivos.

En nuestra serie, tanto la fase S como la expresión de PCNA aumenta con el grado de malignidad histológica, este hecho está de acuerdo con los resultados de otros autores(137) (138) (160) (342) (356) (357) (376) (377) (386), de modo, que los dos parámetros pueden ser de ayuda en la clasificación del linfoma. Además, mediante la fase S, se pueden discriminar subtipos histológicos dentro de un mismo grado de malignidad. En este sentido, las variantes difusas de los linfomas centrocíticos y mixtos poseen una mayor actividad proliferativa que sugiere un distinto comportamiento biológico y que justificaría su separación en los linfomas de grado intermedio como una categoría diferenciada en la *Working Formulation*.

El resultado del estudio de la proliferación celular tiene relación con la evolución del linfoma, pero no mantiene relación con la presentación clínica del linfoma, puesto que ésta depende tanto de la capacidad de crecimiento del tumor como del tiempo de evolución de la enfermedad.

Una fase S superior a un 9 % se asocia a un acortamiento de la supervivencia en el grupo global de enfermos con linfoma. La fase S también es capaz de estratificar a los pacientes en subgrupos pronósticos dentro de grupos clínicamente o histológicamente homogéneos: una fase S elevada se asocia a un acortamiento significativo de la supervivencia en los enfermos con linfomas de origen nodal, linfomas de bajo grado (Kiel) y en los enfermos que no alcanzan la remisión completa tras el tratamiento. Sin embargo, una fase S alta, en los enfermos que consiguen la remisión completa tras el tratamiento, se asocia en el estudio multivariante con un alargamiento del tiempo libre de enfermedad.

El valor y la importancia del estudio de la proliferación celular en los linfomas se basa en que la cuantificación de la fase S ayuda en la clasificación del grado histológico de malignidad de los linfomas no hodgkinianos, pero sobre todo en su capacidad para identificar subgrupos pronósticos. El paciente recibirá tratamiento por su enfermedad y, aunque seguramente la actividad proliferativa de las células tumorales está en cierto modo relacionada con la respuesta al tratamiento, en nuestra serie, el porcentaje de células en fase S no es un parámetro que aisladamente permita predecir la misma. Algunos enfermos conseguirán la remisión completa del linfoma, mientras que en otros persistirá la enfermedad de forma activa. En aquellos que la enfermedad persiste y el porcentaje de fase S, al diagnóstico, sea alto existiría la tendencia de que sufrieran una progresión más rápida de la enfermedad y tuvieran unos tiempos de supervivencia acortados. En los que la remisión completa es un hecho, podríamos distinguir dos grupos:

(1) pacientes con linfomas de bajo grado, en los que el objetivo primordial no es la curabilidad por quimioterapia del proceso(114), en los que existe, aunque se alcance la remisión con el tratamiento, una alta probabilidad de recidiva, una actividad proliferativa elevada en el momento del diagnóstico predice una progresión más rápida del linfoma y a un acortamiento de la supervivencia.

(2) pacientes con linfomas de alto grado de malignidad también en remisión completa, en los que existe una asociación significativa entre una fase S alta y un tiempo de supervivencia libre de enfermedad superior a 30 meses. Aunque aquellos enfermos que no consiguen la remisión de su enfermedad y presentaban una alta actividad proliferativa tienen un menor probabilidad de

supervivencia.

El estudio, mediante técnicas inmunohistoquímicas, de la expresión de PCNA en cortes de linfoma, comparado con la citometría de flujo como método de referencia, es un método útil para el estudio de la proliferación celular, puesto que se demuestra una correlación significativa entre el índice de PCNA y el valor de la fase S ($r=0,65$) o el índice de proliferación ($r=0,69$). Que el mejor coeficiente de correlación sea entre el índice de PCNA y el índice de proliferación se podría explicar por que la suma de la fase S y G2M puede reflejar mejor el patrón teórico de expresión del antígeno PCNA(187) (330).

El índice de marcaje con PCNA aumenta con el grado histológico de malignidad. En los linfomas de origen nodal un índice de PCNA aumentado se relaciona con un acortamiento de la supervivencia, pero en el resto de subgrupos no aporta información pronóstica en el linfoma no hodgkiniano.

A pesar de que hay factores propios de la biología celular que todavía poco conocidos y que influyen en el comportamiento de los linfomas no hodgkinianos, el estudio por citometría de flujo de las fases del ciclo celular ayuda a comprender la enfermedad. Pensamos que la información obtenida con la técnica es suficientemente importante como para aconsejar el estudio por citometría de flujo del contenido en ADN y las fases del ciclo celular de forma rutinaria en los linfomas no hodgkinianos. El estudio inmunohistoquímico de la expresión de PCNA puede ser una alternativa para la valoración de la actividad proliferativa en los linfomas. En caso de tener que elegir entre el método citométrico o inmunohistoquímico para el estudio de la proliferación celular en los linfomas no hodgkinianos es más recomendable el empleo de la citometría de flujo junto con un análisis informático adecuado de los resultados puesto que proporciona una mayor información de la que se desprende una repercusión pronóstica.

B.- Conclusiones

1.- La aneuploidía de ADN, detectada por citometría de flujo, es un fenómeno relativamente frecuente en los linfomas no hodgkinianos. Su detección puede considerarse un excelente marcador de malignidad ya que no se ha observado en ninguna de las muestras de lesiones benignas o reactivas examinadas.

2.- La aneuploidía es significativamente más frecuente en los linfomas de alto grado de malignidad. En estos linfomas, la aneuploidía predice una peor respuesta al tratamiento, ya que los pacientes con linfomas de alto grado aneuploides consiguen una remisión completa de modo significativamente menos frecuente que los pacientes con tumores diploides.

3.- Existe una relación significativamente estadística entre el aumento del grado histológico de los linfomas no hodgkinianos, tanto según la *Working Formulation* como con la clasificación de Kiel, y el incremento de la actividad proliferativa celular, ya sea determinada por el porcentaje de células en fase S por citometría de flujo o por el estudio inmunohistoquímico de la expresión de PCNA.

4.- Los pacientes con linfoma no hodgkiniano que tienen en el momento del diagnóstico un elevado porcentaje de células en fase S presentan un acortamiento significativo de su supervivencia. El aumento de la fase S se comporta como un factor de riesgo independiente en grupos clínicamente o histológicamente homogéneos.

5.- En los pacientes diagnosticados de linfoma no hodgkiniano de origen nodal, un aumento de la actividad proliferativa, estudiada por citometría de flujo (fase S) o por inmunohistoquímica (PCNA), permite identificar un grupo de enfermos con peor pronóstico vital. Sin embargo, esta diferencia no se observa en los linfomas de origen extranodal.

6.- Un aumento de la fase S es un factor de mal pronóstico, en cuanto a tiempo de supervivencia, en los enfermos que no alcanzan la remisión completa tras el tratamiento. En los pacientes que consiguen la remisión completa, una fase S alta también se asocia a tiempos de supervivencia inferiores, aunque la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa.

7.- En los pacientes diagnosticados de linfoma de bajo grado, el estudio de la fase S permite discriminar dos grupos con distinto pronóstico vital. Un aumento de la fase S se asocia a un acortamiento significativo de la supervivencia.

8.- En los pacientes con linfoma de alto grado que alcanzan la remisión completa con el tratamiento, una fase S elevada se relaciona con un alargamiento significativo del tiempo libre de enfermedad. Por el contrario, en los pacientes que no se consigue la remisión completa, una fase S elevada se asocia a un acortamiento de la supervivencia, aunque no de modo estadísticamente significativo.

9.- El índice de proliferación celular (índice de marcaje), obtenido mediante el estudio inmunohistoquímico de la expresión de PCNA en cortes histológicos de muestras parafinadas de enfermos con linfoma no hodgkiniano, muestra una excelente correlación, estadísticamente

significativa, con el índice de proliferación y con el porcentaje de células en fase S obtenido por citometría de flujo. Sin embargo, la información pronóstica que proporciona el método inmunohistoquímico es menor que el de la citometría de flujo, dado que esta última es capaz de discriminar mayor número de subgrupos pronósticos en atención al resultado del estudio de la proliferación celular.

10.- Un aumento de los valores de dispersión lateral de luz, o de su desviación standard (DS), se asocia a un aumento significativamente estadístico del grado de malignidad del linfoma. La valoración de la dispersión frontal de luz no es útil para la clasificación de los linfomas no hodgkinianos.

VII.- ANEXO I

A.- Anexo I Variables y casos del estudio

1.- Lista de variables del estudio

Variable: NUM	Nombre de la variable: número
No hay categorías	Tipo: Cuantitativa Width: 2 Dec: 0
Variable: EDAD	Nombre de la variable: edad (años)
No hay categorías	Tipo: Cuantitativa Width: 2 Dec: 0
Variable: SEXO	Nombre de la variable: sexo
Las categorías son:	Tipo: Cualitativa Width: 1 Dec: 0
0.0	hombre
1.00	mujer
Variable: HIST	Nombre de la variable: WF
Las categorías son:	Tipo: Cualitativa Width: 2 Dec: 0
1.00	A
2.00	B
3.00	C
4.00	D
5.00	E
6.00	F
7.00	G
8.00	H
9.00	I
10.00	J
11.00	Miscelánea
Variable: MALIG	Nombre de la variable: MALIGNIDAD HISTOLÓGICA
Las categorías son:	Tipo: Cualitativa Width: 1 Dec: 0
0.0	bajo
1.00	intermedio
2.00	alto
Variable: PATRÓN	Nombre de la variable: NODULAR-DIFUSO
Las categorías son:	Tipo: Cualitativa Width: 8 Dec: 2
1.00	NODULAR
2.00	DIFUSO
Variable: CÉLULA	Nombre de la variable: CÉLULA
Las categorías son:	Tipo: Cualitativa Width: 8 Dec: 2
1.00	CENTROCITO
2.00	CENTROBLASTO
3.00	MIXTO
4.00	LINFOCÍTICO
5.00	INMUNOBLÁSTICO
6.00	LINFOBLÁSTICO
7.00	BURKITT
Variable: TAMAÑO	Nombre de la variable: tipo celular
Las categorías son:	Tipo: Cualitativa Width: 8 Dec: 2
1.00	cel pequeña
2.00	cel grande
Variable: KIEL	Nombre de la variable: Kiel
Las categorías son:	Tipo: Cualitativa Width: 8 Dec: 2
1.00	bajo grado
2.00	alto grado
Variable: ESTADIO	Nombre de la variable: estadio (Ann Arbor)
Las categorías son:	Tipo: Cualitativa Width: 1 Dec: 0
1.00	I
2.00	II
3.00	III
4.00	IV
Variable: ESTADIOC	Nombre de la variable: ESTADIO CODIFICADO
Las categorías son:	Tipo: Cualitativa Width: 1 Dec: 0
1.00	INICIAL

2.00 AVANZADO

Variable: SINTB Nombre de la variable: síntomas B
Las categorías son: Tipo: Cualitativa Width: 1 Dec: 0
0.0 no
1.00 sí

Variable: EXTRANOD Nombre de la variable: inicio extranodal
Las categorías son: Tipo: Cualitativa Width: 1 Dec: 0
0.01 no
1.00 sí

Variable: LOCALIZ Nombre de la variable: localización extranodal
Las categorías son: Tipo: Cualitativa Width: 2 Dec: 0
1.00 AMÍGDALA
2.00 DUODENO
3.00 ESTÓMAGO
4.00 ILEÓN
5.00 INTESTINO
6.00 LARINGE
7.00 YEYUNO
8.00 PIEL
9.00 RETROPERITONEO
10.00 MEDIASTINO
11.00 OVARIO

Variable: LOC Nombre de la variable: LOCALIZACIÓN CODIFICADA
Las categorías son: Tipo: Cualitativa Width: 2 Dec: 0
0.0 NODAL
1.00 ASOCIADO A MUCOSAS
2.00 RESTO

Variable: CARGA Nombre de la variable: carga tumoral (Cabanilla)
Las categorías son: Tipo: Cualitativa Width: 1 Dec: 0
0.0 baja
1.00 media
2.00 alta

Variable: CARGAC Nombre de la variable: CARGA CODIFICADA
Las categorías son: Tipo: Cualitativa Width: 8 Dec: 2
1.00 BAJA
2.00 ALTA

Variable: REMISIÓN Nombre de la variable: Respuesta Tto
Las categorías son: Tipo: Cualitativa Width: 1 Dec: 0
0.0 no
1.00 parcial
2.00 completa

Variable: REMISIOC Nombre de la variable: REMISIÓN CODIFICADA
Las categorías son: Tipo: Cualitativa Width: 8 Dec: 2
1.00 NO
2.00 SÍ

Variable: TIEMPRC Nombre de la variable: tiempo en RC (meses)
No hay categorías Tipo: Cuantitativa Width: 3 Dec: 0

Variable: MUERTE Nombre de la variable: fallecimiento
Las categorías son: Tipo: Cualitativa Width: 1 Dec: 0
0.0 no
1.00 sí
9.00 retirado

Variable: SUPERV Nombre del variable: supervivencia (meses)
No hay categorías Tipo: Cuantitativa Width: 3 Dec: 0

Variable: REM Nombre de la variable: estado final de remisión
1.00 en remisión
0.0 no remisión

Variable: CURA Nombre de la variable: t libre de enf. > 30 meses
Las categorías son: Tipo: Cualitativa Width: 8 Dec: 2
0.0 no
1.00 sí

4.68	0		6		2.00	1	2.00		3.00		1.00		1.00	2
1.00	0	1	1		1.00	0	1.00	2	2.00		29	1	30	
0.0			0.0	0	27.31		4.55	3.41	6.00		6.36	49.7	4.0	
89.1			9.0		10.90		3.00	99.4	4.0		1.9	1.00		1.00

5	36	1	3		1.00	0	1.00		3.00		1.00		1.00	4
2.00	0	0	0		0.0	1	1.00	1	1.00		0	9	120	
0.0			0.0	0	1.82		1.91	1.20	5.82		5.64	38.1	5.1	
91.5			4.6		8.50		1.00	75.2	5.4		3.9	1.00		1.00

6	46	1	7		2.00	1	2.00		2.00		2.00		2.00	4
2.00	0	0	0		0.0	1	1.00	1	1.00		0	1	4	
0.0			0.0	0	18.20		4.58	2.56	9.76		8.50	89.9	5.5	
84.7			15.3		15.30		3.00	179.8	5.5		0.0	2.00		2.00

7	53	1	5		2.00	1	2.00		1.00		1.00		1.00	4
2.00	0	1	3		1.00	0	1.00	2	2.00		39	0	39	
1.00			1.00	0		40.9		6.9	
86.3			11.9		13.70		3.00	83.3	7.1		1.8	1.00		1.00

8	86	1	9		3.00	2	2.00		6.00		2.00		2.00	1
1.00	0		0		0.0	0	1.00	1	1.00		0	9	8	
0.0			0.0	0	38.41		4.81	2.78	7.13		6.79	83.4	3.2	
91.7			6.7		8.20		1.00	165.0	3.2		1.5	1.84		2.00

9	55	0	5		2.00	1	2.00		1.00		1.00		1.00	4
2.00	0	1	3		1.00	2	2.00	2	200		24	1	42	
0.0			0.0	0	0.0		8.57	6.70	9.99		9.99	50.0	4.5	
86.5			11.5		13.50		3.00	101.0	4.7		2.0	1.00		1.00

10	85	0	2		1.00	0	1.00		1.00		1.00		1.00	1
1.00	0	0	0		0.0	0	1.00	.	.		0	9	50	
0.0			0.0	0	1.95		.	.	.		32.2		9.9	
95.0			2.0		5.00		1.00	56.9	9.9		3.0	1.00		1.00

11	50	0	2		1.00	0	1.00		1.00		1.00		1.00	4
2.00	0	0	0		0.0	0	1.00	1	1.00		0	9	51	
0.0			0.0	0	2.59		3.22	1.35	7.99		6.70	42.1	3.6	
94.0			4.3		6.00		1.00	82.7	3.7		1.7	1.00		1.00

12	67	1	6		2.00	1	2.00		3.00		1.00		1.00	2
1.00	1	0	0		0.0	0	1.00	1	1.00		0	1	6	
0.0			0.0	0	6.25		3.09	2.88	6.37		6.73	55.0	5.0	
91.5			4.4		8.50		1.00	110.0	5.0		4.1	1.00		1.00

13	66	1	6		2.00	1	2.00		3.00		1.00		1.00	1
1.00	0	1	3		1.00	0	1.00	2	2.00		35	0	35	
1.00			1.00	0	37.16		1.71	1.44	3.59		3.96	45.8	6.4	
87.0			12.8		13.10		3.00	94.6	7.6		.3	1.00		1.00

14	67	0	8		3.00	2	2.00		5.00		2.00		2.00	1
1.00	1	0	0		0.0	0	1.00	2	2.00		17	1	20	
0.0			0.0	1	.		8.32	4.80	9.99		9.99	36.7	5.1	
79.8			17.0		8.50		1.00	110.0	5.0		4.1	1.00		1.00

15	63	1	1		1.00	0	1.00		4.00		1.00		1.00	4
2.00	1	0	0		0.0	0	1.00	2	2.00		49	0	60	
0.0			0.0	0	1.16		1.25	.59	2.84		2.60	48.1	3.2	
93.3			4.6		6.70		1.00	93.9	2.9		2.1	1.00		1.00

16	46	0	3		1.00	0	1.00	3.00	1.00	1.00	4	
2.00	0	0	0		0.0	0	1.00	2	2.00	110	0	110
1.00			1.00	0	5.64		6.57	4.25	7.94	7.39	51.7	3.4
90.3		9.3			10.70		3.00	102.7	3.4	1.4	1.19	2.00

17	69	1	1		1.00	0	1.00	4.00	1.00	1.00	4	
2.00	0	0	0		0.0	1	1.00	1	1.00	0	1	31
0.0			0.0	0	.39		2.01	1.13	4.42	4.22	49.0	3.6
88.8		5.2			11.20		3.00	95.3	3.4	6.0	1.00	1.00

18	27	1	8		3.00	2	2.00	5.00	2.00	2.00	4	
2.00	0	1	3		1.00	2	2.00	2	2.00	58	0	58
1.00			1.00	0	.		6.14	7.89	6.79	9.43	64.6	4.0
67.7		24.9			32.30		3.00	125.4	4.0	7.4	1.13	2.00

19	64	1	6		2.00	1	2.00	3.00	1.00	1.00	4	
2.00	1	0	0		0.0	2	2.00	1	1.00	0	1	15
0.0			0.0	.	.		1.69	1.04	3.97	3.95	56.3	4.9
90.7		7.8			9.30		1.00	1110.0	5.0	1.5	1.00	1.00

20	50	1	1		1.00	0	1.00	4.00	1.00	1.00	3	
2.00	1	0	0		0.0	1	1.00	1	1.00	0	9	29
0.0			0.0	0	4.83		3.27	1.28	8.88	6.34	44.2	3.6
94.9		4.6			5.10		1.00	88.7	3.2	.5	1.00	1.00

21	67	1	8		3.00	2	2.00	5.00	2.00	2.00	4	
2.00	0	1	5		1.00	1	1.00	1	1.00	0	1	5
0.0			0.0	0	.		9.99	8.18	9.94	9.99	45.9	5.2
70.6		21.0			29.40		3.00	93.6	5.9	8.4	1.00	1.00

22	85	0	5		2.00	1	2.00	1.00	1.00	1.00	4	
2.00	0	1	1		1.00	1	1.00	1	1.00	0	9	4
0.0			0.0	0	11.40		4.35	5.13	5.11	6.19	49.6	4.8
83.1		13.5			17.00		3.00	97.4	5.4	3.5	1.00	1.00

23	74	1	8		3.00	2	2.00	5.00	2.00	2.00	2	
1.00	1	0	0		0.0	0	1.00	0	1.00	0	1	4
0.0			0.0	0	33.14		6.57	5.42	8.60	9.91	71.2	5.4
70.3		19.1			29.70		3.00	140.4	5.4	10.6	1.69	2.00

24	76	0	1		1.00	0	1.00	4.00	1.00	1.00	4	
2.00	1	0	0		0.0	1	1.00	.	.	0	9	1
0.0			0.0	0	.70		3.90	1.70	6.72	5.93	46.5	3.5
94.6		2.8			5.40		1.00	91.0	3.2	2.6	1.00	1.00

25	53	1	3		1.00	0	1.00	3.00	1.00	1.00	1	
1.00	0	0	0		0.0	0	1.00	2	2.00	36	0	48
0.0			0.0	0	19.35		4.39	3.13	8.67	8.27	49.5	7.4
93.1		4.0			6.90		1.00	97.8	6.6	2.9	1.00	1.00

26	57	0	3		1.00	0	1.00	3.00	1.00	1.00	4	
2.00	1	0	0		0.0	2	2.00	2	2.00	6	1	44
0.0			0.0	0	.50		4.10	2.61	5.89	5.54	41.0	7.0
87.2		9.2			12.80		3.00	84.2	7.4	3.6	1.00	1.00

27	60	1	5		2.00	1	2.00	1.00	1.00	1.00	2	
1.00	0	0	0		0.0	0	1.00	2	2.00	118	0	118
1.00			1.00	.	.		2.82	1.57	9.33	7.83	50.3	4.4
91.9		7.4			8.10		1.00	99.9	4.4	.7	1.14	2.00

28	43	1	7		2.00	1	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	4	
2.00	1	0	0		0.0	0	1.00	1	1.00	0	1	26	
0.0			0.0	0	27.54		2.84	2.22	3.52	3.62	49.3	4.4	
74.2			20.1		25.70		3.00	94.4	4.8	5.6	1.00	1.00	
29	68	1	8		3.00	2	2.00		5.00	2.00		2.00	1
1.00	0	1	7		1.00	1	1.00	2	2.00	56	0	56	
1.00			1.00	0	33.71		3.62	1.57	3.77	3.82	47.6	4.3	
60.2			39.8		39.80		3.00	97.2	6.0	0.0	1.00	1.00	1.00
30	80	1	9		3.00	2	2.00		6.00	2.00		2.00	4
2.00	0	1	8		2.00	2	2.00	1	1.00	0	9	7	
0.0			0.0	1	61.72		3.66	3.11	4.21	5.09	50.7	3.4	
83.6			13.8		16.40		3.00	100.1	3.4	2.6	1.79		2.00
31	65	0	2		1.00	0	1.00		1.00	1.00		1.00	4
2.00	0	0	0		0.0	2	2.00	1	1.00	0	1	24	
0.0			0.0	0	2.30		2.31	1.28	3.32	3.24	53.3	3.1	
93.9			3.6		6.10		1.00	103.6	2.9	2.5	1.00		1.00
32	43	1	7		2.00	1	2.00		2.00	2.00		2.00	1
1.00	0	1	1		1.00	0	1.00	2	2.00	5	9	5	
1.00			0.0	0	0.0		2.76	2.35	6.07	5.80	46.2	6.9	
90.8			7.7		9.20		1.00	94.7	8.3	1.5	1.00		1.00
33	60	1	1		1.00	0	1.00		4.00	1.00		1.00	.
.	0		0		0.0	0	0	91	
0.0			0.0	0	.50		1.94	.80	4.54	3.81	44.3	2.9	
94.1			4.6		5.90		1.00	87.1	2.5	1.3	1.00		1.00
34	76	0	8		3.00	2	2.00		5.00	2.00		2.00	4
2.00	0	0	0		0.0	2	2.00	1	1.00	0	1	12	
0.0			0.0	0	29.22		3.14	1.94	3.94	3.94	88.0	4.1	
80.6			15.4		19.40		3.00	173.2	4.1	4.0	2.00		2.00
35	71	1	3		1.00	0	1.00		3.00	1.00		1.00	4
2.00	1	0	0		0.0	2	2.00	1	1.00	0	9	71	
0.0			0.0		.	.	3.14	1.85	9.17	8.19	98.8	4.1	
91.7			6.9		8.30		1.00	196.1	4.1	1.4	2.00		2.00
36	24	0	9		3.00	2	2.00		6.00	2.00		2.00	1
1.00	1	0	0		0.0	0	1.00	2	2.00	6	1	8	
0.0			0.0	0	17.21		2.88	2.16	4.16	4.27	54.5	5.9	
87.8			9.9		12.20		3.00	108.7	6.2	2.3	1.00		1.00
37	60	1	3		1.00	0	1.00		3.00	1.00		1.00	4
2.00	0	0	0		0.0	2	2.00	1	1.00	0	0	40	
0.0			0.0	0	3.10		1.32	.66	3.67	3.38	46.6	4.5	
87.3			8.2		12.70		3.00	92.3	4.1	4.5	1.00		1.00
38	56	0	3		1.00	0	1.00		3.00	1.00		1.00	4
2.00	0	0	0		0.0	0	1.00	1	1.00	0	0	102	
0.0			0.0	0	15.00		2.55	1.47	4.93	4.45	48.3	4.2	
90.4			4.5		9.50		1.00	88.3	4.2	5.0	1.00		1.00
39	15	0	10		3.00	2	2.00		7.00	2.00		2.00	1
1.00	0	1	9		2.00	0	1.00	2	2.00	82	0	82	
1.00			1.00	0	.	.	6.17	4.44	7.68	8.09	50.2	5.5	
60.1			34.8		39.90		3.00	107.0	3.9	5.1	1.00		1.00

40	71	0	6		2.00	1	2.00	3.00	1.00	1.00	4	
2.00	1	0	0		0.0				0	9	1	
0.0			0.0	0	21.92		2.61	1.59	4.39	4.26	50.9	8.3
80.8			16.9		19.20		3.00	107.2	8.3	2.3	1.15	2.00

42	69	0	9		3.00	2	2.00	6.00	2.00	2.00	4	
2.00	0	0	0		0.0	2	2.00	1	1.00	0	1	15
0.0			0.0	0	48.45		2.79	2.30	4.41	4.74	88.9	3.5
68.4			25.7		31.60		3.00	176.5	3.5	5.9	2.00	2.00

44	62	0	7		2.00	1	2.00	2.00	2.00	2.00	4	
2.00	1	0	0		0.0	0	1.00	2	2.00	22	1	37
0.0			0.0	0			2.55	2.16	3.27	3.81	84.3	4.7
88.8			7.7		11.20		3.00	168.4	4.7	3.5	1.49	2.00

45	54	0	9		3.00	2	2.00	6.00	2.00	2.00	4	
2.00	0	1	9		2.00	2	2.00	1	1.00	0	1	18
0.0			0.0	1	4.01		2.37	1.69	3.33	3.74	50.6	4.6
73.6			14.6		26.40		3.00	98.1	5.6	11.8	1.00	1.00

46	60	0	7		2.00	1	2.00	2.00	2.00	2.00	2	
1.00	0	0	0		0.0	0	1.00			0	9	1
0.0			0.0	0	23.70		3.39	2.20	5.30	4.92	51.8	4.7
82.7			12.4		17.30		3.00	101.8	4.7	4.9	1.13	2.00

47	52	0	3		1.00	0	1.00	3.00	1.00	1.00	1	
1.00	0	1	2		1.00	0	1.00	2	2.00	90	0	90
1.00			1.00	0	2.87		1.74	.95	5.99	4.77	52.6	3.6
95.5			4.2		4.50		1.00	105.3	3.6	.3	1.13	2.00

48	65	1	9		3.00	2	2.00	6.00	2.00	2.00	1	
1.00	0	1	10		2.00	0	1.00	0	1.00	0	1	7
0.0			0.0	0	4.70		3.20	1.78	5.37	5.09	65.4	3.4
80.2			13.3		19.80		3.00	127.3	3.4	6.5	1.14	2.00

49	52	0	6		2.00	1	2.00	3.00	1.00	1.00	3	
2.00	1	1	1		1.00	2	2.00	0	1.00	0	1	8
0.0			0.0	0	6.41		5.56	6.91	4.71	5.52	53.0	5.5
88.3			10.0		12.00		3.00	110.0	4.0	2.0	1.00	1.00

50	48	0	7		2.00	1	2.00	2.00	2.00	2.00	4	
2.00	0	1	4		1.00	2	2.00	1	1.00	0	1	47
0.0			0.0	0	11.33		4.46	2.73	3.88	4.29	44.6	4.0
80.9			16.0		19.10		3.00	89.4	4.5	3.1	1.00	1.00

52	46	1	6		2.00	1	2.00	3.00	1.00	1.00	3	
2.00	0	0	0		0.0	2	2.00	1	1.00	0	1	15
0.0			0.0	0	37.70		4.10	2.67	7.16	7.63	56.5	7.7
85.4			11.9		14.60		3.00	116.5	6.8	2.7	1.00	1.00

54	67	0	9		3.00	2	2.00	6.00	2.00	2.00	1	
1.00	0	1	4		1.00	1	1.00	2	2.00	22	0	22
1.00			0.0	1	27.11		2.82	2.36	5.44	5.91	49.3	4.4
83.4			11.0		17.60		3.00	97.3	4.4	6.6	1.00	1.00

55	59	1	6		2.00	1	2.00	3.00	1.00	1.00	4	
2.00	0	0	0		0.0	0	1.00	0	1.00	0	9	12
0.0			0.0	0	1.75		3.82	1.44	7.53	5.91	43.8	4.2
89.9			7.8		10.10		3.00	85.9	3.9	2.3	1.00	1.00

56	27	0	8		3.00	2	2.00		5.00		2.00		2.00	1
1.00	0	1	1		1.00	0	1.00	2	2.00		46	0	46	
1.00			1.00	0	25.38		4.17	3.58	4.84		5.63	56.8		4.2
87.0			10.6		12.90		3.00	111.5	4.2		2.3	1.16		2.00

58	65	1	3		1.00	0	1.00		3.00		1.00		1.00	4
2.00	0	0	0		0.0	2	2.00	1	1.00		0	1	16	
0.0			0.0				4.05	2.64	9.59		7.41	40.1		4.7
89.1			6.7		10.90		3.00	79.5	4.3		4.2	1.00		1.00

59	70	1	9		3.00	2	2.00		6.00		2.00		2.00	1
1.00	0	1	8		2.00	0	1.00				0	9	18	
0.0			0.0				4.33	5.62	5.29		5.95	48.5		5.6
84.1			14.9		16.00		3.00	110.8	5.6		1.1	1.27		2.00

60	55	0	3		1.00	0	1.00		3.00		1.00		1.00	4
2.00	0	0	0		0.0	0	1.00	2	2.00		28	0	28	
1.00			0.0	0	9.81		.97	.53	2.58		2.40	51.8		4.4
94.4			5.3		5.70		1.00	104.8	3.5		.4	1.00		1.00

61	27	1	9		3.00	2	2.00		6.00		2.00		2.00	2
1.00	0	1	11		2.00	0	1.00	2	2.00		88	0	88	
1.00			1.00	0	36.67		2.46	1.24	7.84		6.86	43.8		3.2
67.8			24.8		32.20		3.00	95.5	3.5		7.4	1.00		1.00

62	74	0	6		2.00	1	2.00		3.00		1.00		1.00	4
2.00	1	0	0		0.0	2	2.00	0	1.00		0	9	1	
0.0			0.0	0	4.12		3.26	2.19	5.16		5.08	49.5		4.2
80.9			18.5		19.10		3.00	93.7	3.9		.6	1.00		1.00

63	55	1	9		3.00	2	2.00		6.00		2.00		2.00	3
2.00	1	0	0		0.0	1	1.00	2	2.00		84	0	84	
1.00			1.00	0	22.55		2.53	1.94	3.44		3.75	56.4		4.0
82.4			11.3		17.50		3.00	111.1	3.8		6.2	1.00		1.00

57	59	0	2		1.00	0	1.00		1.00		1.00		1.00	1
1.00	0	0	0		0.0	0	1.00	1	1.00		0	9	21	
0.0			0.0	0	1.38		2.66	1.29	6.03		5.01	42.0		3.6
93.4			5.5		6.50		1.00	84.3	3.4		1.0	1.00		1.00

71	50	0	5		2.00	1	2.00		1.00		1.00		1.00	4
2.00	0	0	9		2.00	2	2.00	1	1.00		0	1	18	
0.0			0.0	0	11.43		3.26	2.30	4.40		4.72	48.3		5.1
86.8			8.7		13.20		3.00	94.5	5.6		11.8	1.00		1.00

64	40	0	8		3.00	2	2.00		5.00		2.00		2.00	4
2.00	1	0	0		0.0	1	1.00	1	1.00		0	9	25	
0.0			0.0	1	4.50		5.80	3.65	9.04		8.34	47.9		3.6
94.1			4.9		5.80		1.00	102.9	2.9		.9	1.00		1.00

65	30	0	8		3.00	2	2.00		5.00		2.00		2.00	3
2.00	1	0	0		0.0	2	2.00	1	1.00		0	1	14	
0.0			0.0	1	18.32		2.15	1.50	3.79		3.72	99.3		4.5
84.9			13.1		15.10		3.00	218.1	4.5		2.0	2.00		2.00

66	79	0	7		2.00	1	2.00		2.00		2.00		2.00	3
2.00	0	1	9		2.00	2	2.00	2	2.00		19	9	19	
1.00			0.0	0			4.48	2.61	9.63		8.79	47.0		6.6
93.4			4.9		6.60		1.00	95.5	6.7		1.7	1.00		1.00

67	58	1	9		3.00	2	2.00		6.00	2.00		2.00	3		
2.00	0	0	0		0.0	0	1.00	2		2.00		16	1	21	
0.0			0.0	1	45.58		2.19	1.34	3.60			3.54	55.4	4.4	
74.4			18.7		25.60		3.00	108.8	4.1			6.9	1.00	1.00	

69	77	0	8		3.00	2	2.00		5.00	2.00		2.00		2.00	2
1.00	0	1	3		1.00	0	1.00	2		2.00		80	0	80	
1.00			1.00	0	47.94		4.49	2.55	7.14			7.04	51.5	5.6	
63.5			32.2		36.40		3.00	109.6	2.1			4.2	1.00	1.00	

70	79	0	7		2.00	1	2.00		2.00	2.00		2.00		2.00	4
2.00	0	0	0		0.0	2	2.00	2		2.00		33	0	33	
1.00			1.00	0	34.11		2.73	1.90	3.82			3.94	50.1	3.6	
78.7			14.8		21.20		3.00	98.3	3.8			6.4	1.00	1.00	

68	71	1	11		1.00	0	2.00		4.00	1.00		1.00		1.00	3
2.00	1	0	0		0.0	0	1.00	1		1.00		0	9	1	
0.0			0.0	1	.		5.53	3.68	8.91			8.78	52.1	3.4	
95.2			4.2		4.70		1.00	105.4	3.4			.5	1.20	2.00	

Total de casos listados: 66 casos.

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

A.- Bibliografía

- 1.- García-Conde, J., Pascual, A.: Perspectiva histórica, clasificación, diagnóstico clínico y extensión de los linfomas, perspectiva e interpretación histórica. En: Linfomas no Hodgkin. Editor: Cabanillas, F.: Monografías Clínicas en Oncología, Vol 1.: Director de la serie: Estapé, J.: Ediciones Doyma, S.A., Barcelona, 1988.
- 2.- Hernández García, M.T., Hernández Nieto, L.: Linfomas no Hodgkin. En: Tratado de Medicina Interna: Medicine: Hematología (IV). Número 14, Junio 1992. Idepasa Internacional de Ediciones y Publicaciones, Madrid, 1992.
- 3.- Sánchez Fayos, J., Calabuig, M.T.: Linfomas malignos-leucemias linfoides: un intento de interpretación biológica unitaria. Bol Fund Jiménez Díaz, 1982; 9:69-84.
- 4.- Ziegler, J.L.: Burkitt's lymphoma. N Engl J Med, 1981; 305:735-745.
- 5.- Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K., Uchino, H.: Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. Blood, 1977; 50:481-492.
- 6.- Ezdinli, E.Z., Costello, W., Wasser L.P., y otros: Eastern Cooperative Oncology Group experience with the Rappaport classification of non-Hodgkin's lymphomas. Cancer, 1979; 43:544-550.
- 7.- Lukes, R.J., Collins, R.D.: Immunological characterization of human malignant lymphomas. Cancer, 1974; 34:1488-1503.
- 8.- Huhn, D., Meister, P.: Malignant histiocytosis; morphologic and cytochemical findings. Cancer, 1978; 42:1341-1349.
- 9.- Basset, F., Nezelof, C.: Las histiocitosis. La Presse Medicale (edición española), 1984; 3(3):147-152.
- 10.- Rivas Manga, C., Oliva Aldamiz, H., Calleja Canelas, J.L.: Histiocitosis maligna. Presentación de un caso con estudio óptico, citoquímico y electrónico. Med Clin (Barc), 1978; 71:24-31.
- 11.- Lennert, K.: Linfomas no-Hodgkin: clasificación de Kiel. Editorial Espaxs, Barcelona, 1984.
- 12.- Rosenberg, S.A., National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas, summary and description of a Working Formulation for clinical usage. Cancer, 1982; 42:2112-2135.
- 13.- Carbone, P.P., Kaplan, H.S., Mushoff, K., Smithers, D.W., Tubiana, M.: Report of the Committee on Hodgkin's disease staging classification. Cancer Res, 1971; 31:1860-1861.
- 14.- Diaz-Pavon, J.R., Cabanillas, F.: Treatment of non-Hodgkin's lymphoma. Curr Opin Oncol, 1991; 3(5):830-837.
- 15.- Jagannath, S., Velasquez, W.S., Tucker, S.L., y otros: Tumor burden assesment and its implications for a prognostic model in advanced diffuse large-cell lymphoma. J Clin Oncol, 1987; 4:859-865.
- 16.- Fischer, R.I., Hubbard, S.M., De Vita, V.T., y otros: Factors predicting long-term survival in diffuse mixed, histiocytic or undifferentiated lymphoma. Blood, 1981; 58:45-51.
- 17.- Casciato, D.A., Lowitz, B.B.: Manual of Bedside Oncology. Little, Brown and Company. Boston/Toronto, 1983.
- 18.- Spinolo, J.A., Cabanillas, F.: Historia natural y manejo de los linfomas de bajo grado. En: Linfomas no Hodgkin. Editor: Cabanillas, F.: Monografías Clínicas en Oncología, Vol 1.: Director de la serie: Estapé, J.: Ediciones Doyma, S.A., Barcelona, 1988.
- 19.- S. Woessner, Lafuente, R., Florensa, LL. La citología óptica en la diagnóstico citológico. Editorial Medici, Barcelona, 1991.
- 20.- Fuentes Martín, M.T., Santolaria Fernández, F.J., Martín Herrera, A., González Reimers, E., Hernández Nieto, L.: Epidemiología de los linfomas malignos en la provincia de Santa Cruz de Tenerife. Estudio sobre 208 casos. Sangre, 1982; 27:872-881.
- 21.- Anderson, T., Chabner, B.A., Young, R.C., y otros: Malignant lymphoma I, the histology and staging of 473 patients at the National Cancer Institute. Cancer, 1982; 50:2699-2707.
- 22.- Montserrat, E.: Enfermedades ganglionares. En: Medicina Interna. Farreras-Rozman. Vol 2. Ediciones Doyma, Barcelona, 1992.
- 23.- Grogan, M.T., Warnke, R.A., Kaplan, H.S.: A comparative study of Burkitt's and non-Burkitt's «undifferentiated» malignant lymphoma. Cancer, 1982; 49:1817-1828.
- 24.- Broder, S., Bunn, P.A., Jaffe, E.S., y otros: T-cell lymphoproliferative syndrome associated with human T leukemia-lymphoma virus. Ann Intern Med, 1984; 100:543-557.
- 25.- Hattori, T., Uchiyama, T., Toibana, T., Takatsuki, K., Uchino, H.: Surface phenotype of japanese aduly T-cell leukemia characterized by monoclonal antibodies. Blood, 1981; 58:645-647.
- 26.- Hattori, T., Asou, N., Suzushima, H., y otros: Leukemia of novel gastrointestinal T-

- lymphocyte population infected with HTLV-1. *Lancet*, 1991; 447:76-77.
- 27.- Jarret, R.F., Gledhill, S., Qureshi, F., y otros: Identification of human herpesvirus-6-specific DNA sequences in two patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, 1988; 2:496-502.
- 28.- Torelli, G., Marasca, R., Luppi, M., y otros: Human herpes-virus-6 in human lymphomas: identification of specific sequences in Hodgkin's lymphomas by polimerase chain reaction. *Blood*, 1991; 77:2251-2258.
- 29.- Batista, N., Cabanillas, F.: Características de los linfomas asociados a síndromes de inmunodeficiencia y autoinmunidad. En: *Linfomas no Hodgkin*. Editor: Cabanillas, F.: *Monografías Clínicas en Oncología*, Vol 1.: Director de la serie: Estapé, J.: Ediciones Doyma, S.A., Barcelona, 1988.
- 30.- Michael, S., Reitnauer, P.J., Morrell, D., y otros: Breast and other cancer in families with ataxia telangiectasia. *N Engl J Med*, 1987; 316:1289-1294.
- 31.- Ziegler, J.L., Beckstead, J.A., Volderbing, P.A., y otros: Non-Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men. Relation to generalized lymphadenopathy and the acquired immunodeficiency syndrome. *N Eng J Med*, 1984; 311:565-570.
- 32.- Groopman, J.E., Sullivan, J.L., Mulder, C., y otros: Pathogenesis of B cell lymphoma in a patient with AIDS. *Blood*, 1986; 67:612-615.
- 33.- Kalter, S.P., Riggs, S.A., Cabanillas, F., y otros: Aggressive non-Hodgkin's lymphoma in immunocompromised homosexual males. *Blood*, 1985; 66:655-659.
- 34.- Lozano-Molero, M., Ribera, J.M., Nomdedeu, B., y otros: Linfomas malignos (no Hodgkinianos y enfermedad de Hodgkin) asociados a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Estudio de nueve casos. *Med Clin (Barc)*, 1989; 92:302-305.
- 35.- Buchsbaum, R.J., Schwartz, R.S.: Cellular origins of hematologic neoplasms. *N Engl J Med*, 1989; 322:694-696.
- 36.- Levine, E.G., Arthur, D.C., Frizzera, G., y otros: Chromosome analysis correlates with histology, immunologic phenotype and survival in 120 patients with non Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 1984;64:157a.
- 37.- Cabanillas, F.: Técnicas biológicas modernas para la caracterización de los linfomas. En: *Linfomas no Hodgkin*. Editor: Cabanillas, F.: *Monografías Clínicas en Oncología*, Vol 1.: Director de la serie: Estapé, J.: Ediciones Doyma, S.A., Barcelona, 1988.
- 38.- Bloomfield, C.D., Arthur, D.C., Frizzera, G., Levine, E.G., Peterson, B.A., Gajl-Peczalska, K.J.: Non-random chromosome abnormalities in lymphoma. *Cancer Res*, 1983; 43:2975-2984.
- 39.- Dewald, G.W., Noel, P., Dahl, R.J., Sprubeck, J.L.: Chromosome abnormalities in malignant hematologic disorders. *Mayo Clin Proc*, 1985; 60:675-689.
- 40.- Lester, E.P., Ultmann, J.E.: *Lymphoma*. En: *Hematology*. Editores: Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J., Lichtman, M.A.: McGraw-Hill Publishing Company, Nueva York, 1990.
- 41.- Wright, D.H.: The diagnosis and classification of malignant lymphomas. En: *Lymphoproliferative diseases*. Editor: Jones, D.B., Wright, D.H., *Immunology and medicine series*, Editor de la serie: Whaley, K.. Kluwer Academic Publishers, Londres, 1990.
- 42.- Schultz, H.B., Ersboll, J., Nisses, N.I., Hou-Jenses, K.: A simplified working formulation of non-Hodgkin's lymphomas based on quantifiable histologic criteria. *Cancer*, 1989; 64:2532-2540.
- 43.- Rappaport, H.: Tumors of the hematopoietic system. *Atlas of tumor pathology*. Sec. 3, Fasc. 8: Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1966. Citado en: Hernández García, M.T., Hernández Nieto, L.: *Linfomas no Hodgkin*. En: *Tratado de Medicina Interna: Medicina: Hematología (IV)*. Número 14, Junio 1992. Idepsa Internacional de Ediciones y Publicaciones, Madrid, 1992.
- 44.- Nathawani, B.N., Kim, H., Rappaport, H.: Malignant lymphoblastic lymphoma. *Cancer*, 1976; 38:964-983.
- 45.- Ersboll, J., Schultz, H.B., Hougaard, P., y otros: Comparación of the Working Formulation of non-Hodgkin's lymphoma with the Rappaport, Kiel and Lukes & Collins classifications. translational value and prognostic significance based on review of 658 patients treated at a single institution. *Cancer*, 1985; 55:2442-2458.
- 46.- S. Woessner, S., Sans-Sabrafen, J.: Linfomas malignos no Hodgkinianos. Clasificación histopatológica y citoinmunológica. Bases citoevolutivas y funcionales de las clasificaciones. Linfomas T, B y otros con personalidad clínica no contempladas en las clasificaciones morfológicas. En: *Hematología Clínica*. Editor: Sans-Sabrafen, J. Ediciones Doyma, Barcelona, 1991.
- 47.- Hernandez, J.A., Sheehan, W.W.: Lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue. Signet ring cell lymphomas presenting in mucosal lymphoid organs. *Cancer*, 1985; 55:592-597.
- 48.- Kadin, M.E., Sako, D., Berliner, N, y otros: Childhood Ki-1 lymphoma presenting with skin

- lesions and peripheral lymphadenopathy. *Blood*, 1986; 68:1042-1049.
- 49.- Woessner, S., Lafuente, R., Florensa, L.: Punción ganglionar: pasado, presente, futuro. *Med Clin (Barc)*, 1988; 90:422-425.
- 50.- Erber, W.N., Pinching, D.J., Mason, D.Y.: Immunocytochemical detection of T and B cell populations in routine blood smears. *Lancet*, 1984; i:1042-1045.
- 51.- Moir, D.J., Ghosh, A.K., Abdulaziz, Z., Knight, P.M., Mason, D.Y.: Immunoenzymatic staining of haematological samples with monoclonal antibodies. *Br J Haematol*, 1983; 55:395-410.
- 52.- Foon, K.A.: Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*, 1986; 68:1-31.
- 53.- Freedman, A.S., Nadler, L.M.: Immunologic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1991; 5:871-889.
- 54.- Martínez Santos, P., Jáuregui Ibabe, C., Pérez Carrión, R., y otros: Linfomas no Hodgkin: presentación de 129 casos. *Rev Clin Esp*, 1987; 181:190-196.
- 55.- Macià, J., Pla, R.P., Sanchez, C., Estibalez, A., Odriozola, J.: Localizaciones extraganglionares en linfomas no Hodgkinianos. *Sangre*, 1977; 22:837-845.
- 56.- Reddy, S., Pelletiere, E., Saxena, V., Hendrickson, F.R.: Extranodal non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer*, 1980; 46:1925-1931.
- 57.- García-Girón, C., Juárez Alonso, S., Ordóñez, A., y otros: Linfoma no Hodgkiniano de origen extraganglionar. Análisis de factores pronósticos. *Med Clin (Barc)*, 1988; 91:161-165.
- 58.- Fortún Pérez de Ciriza, M.T., Borda Celaya, F., Vidán Cruz, R., Martínez Martínez, B., Frauca Gorraiz, A.: Linfoma gástrico primario. Rendimiento diagnóstico y preoperatorio. *Gastroenterología y Hepatología*, 1988; 11: 289-293.
- 59.- Weingrad, D.N., Dacosse, J.J., Sherlock, P., y otros: Primary gastrointestinal lymphoma. *Cancer*, 1982; 49:1258-1265.
- 60.- Broock, J.J., Enterline, H.T.: Primary gastric lymphomas. A clinicopathologic study of 58 cases with long-term follow-up and literature review. *Cancer*, 1983; 51:701-711.
- 61.- Barton, J.H., Osborne, B.M., Bultler, J.J., y otros: Non Hodgkin's lymphoma of the tonsil. A clinicopathologic study of 65 cases. *Cancer*, 1984; 53:86-95.
- 62.- Yumanaka, N., Harabuchi, Y., Sambe, S., y otros: Non-Hodgkin's lymphoma of Waldeyer's ring and nasal cavity. Clinical and immunologic aspects. *Cancer*, 1985; 56:768-776.
- 63.- Banfi, A., Bonadonna, G., Ricci, S.B., y otros: malignant lymphomas of Waldeyer's ring: natural history and survival after radiotherapy. *Br Med J*, 1972; 3:140-143.
- 64.- García-Girón, C., Feliu Batlle, J., Ordóñez, A., González Barón, M.: Linfoma no Hodgkiniano de amígdala. A propósito de 8 casos. *Med Clin (Barc)*, 1987; 89: 525.
- 65.- Ree, H.J., Rege, V.B., Knisley, R.E., y otros: Malignant lymphoma of Waldeyer's ring following gastrointestinal lymphoma. *Cancer*, 1980; 46:1528-1535.
- 66.- Martí, R.M., Estrach, T.: Linfoma cutáneos (I): linfomas T. *Piel*, 1990; 5:437-482.
- 67.- Estrach, T., Martí, R.M.: Linfoma cutáneos (II): manifestaciones cutáneas de los linfomas B. *Piel*, 1990; 5:483-488.
- 68.- Young, R.C., Howser, D.M., Anderson, T., Fisher, R.I., Jaffe, E., DeVita, V.T.: Manifestaciones en el sistema nervioso central del linfoma no Hodgkiniano: posibilidades de tratamiento profiláctico. *Am J Med (edición española)*, 1979; 66:211-220.
- 69.- Chorlton, I., Norris, H.J., King, F.M.: Malignant reticuloendothelial disease involving the ovary as a primary manifestation. *Cancer*, 1974; 34:397-407.
- 70.- Osborne, B.M., Robboy, S.J.: Lymphomas or leukemia presenting as ovarian tumors. An analysis of 42 cases. *Cancer*, 1983; 52:1933-1943.
- 71.- Conlan, M.G., Armitage, J.O., Bast, M., Weisenburger, D.D.: Clinical significance of hematologic parameters in non-Hodgkin's lymphoma at diagnosis. *Cancer*, 1991; 67:1389-1395.
- 72.- Montalbán, C., Arechaga, S., Zapatero, A., y otros: Linfomas no Hodgkinianos abdominales con clínica sistémica y ausencia de adenopatías periféricas. *Med Clin (Barc)*, 1987; 89:583-587.
- 73.- Feliu, E., Ruiz-Marcellan, M.C.: Varón de 68 años con fiebre, patrón intersticial pulmonar y alteración funcional hepática. *Med Clin (Barc)*, 1989; 93:226-235.
- 74.- Plaza, V., Urbano Ispizua, A., Paz, M.A., y otros: Linfoma no Hodgkiniano de alto grado de malignidad que simula un carcinoma diseminado. Presentación de dos casos. *Med Clin (Barc)*, 1989; 92:344-346.
- 75.- Wienberg, D.S., Pinkus, G.A., Ault, K.: Cytofluorometric detection of B cell clonal excess: a new approach to the diagnosis of B cell lymphoma. *Blood*, 1984; 63:1080-1087
- 76.- Touw, I., Delwel, R., Bolhuis, R., Van Zannen, G., Lowenberg, B.: Common and pre-B acute lymphoblastic leukemia cells express interleukin 2 receptors, and interleukin 2 stimulates in vitro colony formation. *Blood*, 1985; 66:556-561.
- 77.- Erber, W.N., Mason, D.Y.: Expression of the interleukin-2 receptor (Tac antigen/CD25) in

- hematologic neoplasms. *Am J Clin Pathol*, 1988; 89:645-648.
- 78.- Parra, R., Pérez, B., Macià, J, y otros: Valor de la determinación de factor de necrosis tumoral (FNT) en pacientes afectos de linfoma no Hodgkin. *Sangre*, 1992; 37:414a.
- 79.- Cooper, E.H., Child, J.A.: Serum beta2-microglobulin in the assesment of lymphoid neoplasia: a review. *TumorDiagnostik*, 1981; 2:167-170.
- 80.- Litam, P., Swan, F., Cabanillas, F., y otros: Prognostic value of serum beta-2 microglobulin in low grade lymphoma. *Ann Intern Med*, 1991; 15:885-860.
- 81.- Swan, F., Velasquez, W.S., Tucker, S., y otros: A new serologic staging system for large-cell lymphomas based on initial beta-2-microglobulin and lactate dehydrogenase levels, *J Clin Oncol*, 1989; 7:1518-1527.
- 82.- Velasquez, W.S., Jagannath, S., Tucker, S.L., y otros: Risk classification as the basis for clinical staging of difuse large-cell lymphoma derived from 10-year survival data. *Blood*, 1989; 74:551-557.
- 83.- Hernández Nieto, L.: Enfermedad de Hodgkin. En: *Tratado de Medicina Interna: Medicine: Hematología (IV)*. Número 14, Junio 1992. Idepsa Internacional de Ediciones y Publicaciones, Madrid, 1992.
- 84.- Sans-Sabrafen, J., Besses, C.: Estadiaje y tratamiento de los linfomas malignos no Hodgkinianos. En: *Hematología Clínica*. Editor: Sans-Sabrafen, J. Ediciones Doyma, Barcelona, 1991.
- 85.- Ben-Ezra, J., Burke, J.S., Swartz, W.G., y otros: Small lymphocytic lymphoma: a clinicopathologic study of 268 cases. *Blood*, 1989; 73:579-587.
- 86.- Chubachi, A., Ohtani, H., Sakuyama, M., y otros: Diffuse large cell lymphoma occurring in a patient with Waldenström's macroglobulinemia. *Cancer*, 1991; 68:781-785.
- 87.- San Miguel, J., González, M., Orfao, A., López Borrasca, A.: Inmunopatología de las leucemias y linfomas. *MTA-Medicina Interna*, 1988; 6:9-46.
- 88.- Traweek, S.T., Sheibani, K., Winberg, C.D.: Monocytoid B-cell lymphoma: its evolution and relationship to other low-grade B-cell neoplasms. *Blood*, 1989; 73:573-578.
- 89.- Robbins, S.L., Cotran, R.S.: *Patología Estructural y Funcional*. Interamericana, México, 1985.
- 90.- Fischer, R.I., Jones, R.B., De Vita, V.T., y otros: Natural history of malignant lymphomas with divergent histologies at staging evaluation. *Cancer*, 1982; 47:2022.
- 91.- Hubbard, S.M., Chabner, B.A., De Vita, V.T., y otros: Histologic progresion in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 1982; 59:258-264.
- 92.- Mead, G.M., Kushlan, P., O'Neil, M., y otros: Clinical aspects of non-Hodgkin's lymphomas presenting with discordant histologic subtypes. *Cancer*, 1983; 52:1496-1501.
- 93.- Woessner, S.: Linfomas no Hodgkinianos. Rasgos generales y descripción de sus distintas variedades. En: *Hematología Clínica*. Editor: Sans-Sabrafen, J. Ediciones Doyma, Barcelona, 1991.
- 94.- Garcia-Conde, J., Vinolas, N., Estape, J.: ProMACE-CytaBOM vs CHOP in the treatment of unfavorable lymphomas: a randomized trial. *Blood*, 1991; 78:127a.
- 95.- S. Woessner, Sans-Sabrafen, J., Besses, C.: Introducción al estudio de la patología ganglionar. Poblaciones linfocitarias humanas y su caracterización. Precisión teórica del tipo linfocitario original en cada entidad linfoproliferativa. Síndromes linfoproliferativos T. En: *Hematología Clínica*. Editor: Sans-Sabrafen, J. Ediciones Doyma, Barcelona, 1991.
- 96.- Rodríguez, M.A., Cabanillas, F.: Evolución y manejo de los linfomas de alto grado. En: *Linfomas no Hodgkin*. Editor: Cabanillas, F.: *Monografías Clínicas en Oncología*, Vol 1.: Director de la serie: Estapé, J.: Ediciones Doyma, S.A., Barcelona, 1988.
- 97.- Cossman, J., Chused, T.M., Fischer, R.I., y otros: Diversity of immunological phenotype of lymphoblastic lymphoma. *Cancer Res*, 1983; 43:4486-4490. Citado en: Rodríguez, M.A., Cabanillas, F.: Evolución y manejo de los linfomas de alto grado. En: *Linfomas no Hodgkin*. Editor: Cabanillas, F.: *Monografías Clínicas en Oncología*, Vol 1.: Director de la serie: Estapé, J.: Ediciones Doyma, S.A., Barcelona, 1988.
- 98.- De Waele, M., Beesley, J.E.: Immunocytochemistry of blood and bone marrow cells. En: *Techniques in immunocytochemistry*. Vol. 4. Editores: Bullock, G.R., Petrusz, P.: Academic Press, San Diego, 1989.
- 99.- Banks, P.M., Caron, B.L., Morgan, T.W.: Use of imprints for monoclonal antibodies studies: suitable use of air-dried preparations from lymphoid tissues with an immunohistochemical method. *Am J Clin Pathol*, 198; 79:438-442.
- 100.- Li, C-Y., Ziesmer, S.C., Yam L.T., English, M.C., Janckila, A.J.: Practical immunocytochemical identification of human blood cells. *Am J Clin Pathol*, 1984; 81:204-212.
- 101.- Andrade, R.E., Wick, M.R., Frizzera, G., Gajl-Peczalska, K.J.: Immunophenotyping of

- hematopoietic malignances in paraffin sections. *Hum Pathol*, 188; 19:394-402.
- 102.- Chanarin, I.: *Laboratory haematology. An account of laboratory techniques.* Churchill Livingstone, Nueva York, 1989.
- 103.- Le Beau, M.M., Rwoley, J.D.: *Cytogenetics.* En: *Hematology.* Editores: Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J., Lichtman, M.A.: McGraw-Hill Publishing Company, Nueva York, 1990.
- 104.- Fifth International Workshop on Chromosomes in Leukemia-Lymphoma.: *Correlation of chromosome abnormalities with histologic and immunologic characteristics in non-Hodgkin's lymphoma and adult T-cell leukemia-lymphoma.* *Blood*, 1987; 70:1554.
- 105.- Solé Ristol, F., Caballín Fernández, M.R., Coll Sandiumenge, M.D.: *Técnicas citogenéticas.* En: *Técnicas en citología hematológica.* Editor: Woessner, S. Ediciones Medici, S.A., Barcelona, 1990.
- 106.- Sandberg, A.A.: *The chromosomes in human cancer and leukemia.* Elsevier, Nueva York, 1990.
- 107.- Heim, S.: *Cytogenetics in the investigation of haematological disorders.* En: *Ballière's Clinical Hematology.* Editor: Cavill, I.: Ballière Tindals, 1990; 3:921-976. Londres.
- 108.- Sociedad Española de Anatomía Patológica: XXVII Reunión del Club de Linfomas Español. Madrid, 1991.
- 109.- Montone, K.T., Budgeon, L.R., Brigati, D.J.: *Detection of Epstein-Barr virus genomes by in situ DNA hybridization with a terminal biotin-labeled synthetic oligonucleotide probe from the EBV NOT I and PST I tandem repeat regions.* *Modern Pathology*, 1990; 3:89-96.
- 110.- Chen, Y-T., Godwin, T.A., Mouradian, J.A.: *Immunohistochemical and gene rearrangement studies in the diagnosis of malignant lymphomas.* *Hum Pathol*, 1991; 22:1249-1257.
- 111.- Gribben, J.G., Freedman, A.S., Neuberg, D., y otros: *Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma.* *N Engl J Med*, 1991; 325:1525-1533.
- 112.- Campana, D., Coustan-Smitih, E., Janossy, G.: *Immunophenotyping in haematological diagnosis.* En: *Ballière's Clinical Hematology.* Editor: Cavill, I.: Ballière Tindals, 1990; 3:889-912. London.
- 113.- Hoy, T.G.: *Flow cytometry: clinical applications in haematology.* En: *Ballière's Clinical Haematology.* Editor: Cavill, I.: Ballière Tindall, Londres, 1990.
- 114.- Armitage, J.O.: *Treatment of non-Hodgkin's lymphoma.* *N Engl J Med*, 1993; 328:1023-1030.
- 115.- Shiu, M.H., Nisce, L.Z., Pinna, A., y otros: *Recent results of multimodal therapy of gastric lymphoma.* *Cancer*, 1986; 58:1389-1399.
- 116.- Cabanillas, F., Burgess, M.A., Bodey, G.P., Friereich, E.J.: *Sequential chemotherapy and late intensification for malignant lymphomas of aggressive histologic type.* *Am J Med*, 1983; 74:382-388.
- 117.- Nissen, N.I., Ersboll, J., Hansen, H.S., y otros: *A randomized study of radiotherapy versus radiotherapy plus chemotherapy in stage I-II non-Hodgkin's lymphomas.* *Cancer*, 1983; 52:1-7.
- 118.- Krikorian, J.G., Portlock, C.S., Cooney, P., Rosenberg, S.A.: *Spontaneous regression of non-Hodgkin's lymphoma: a report of nine cases.* *Cancer*, 1980; 46:2093-2099.
- 119.- Pavlosky, S., Santarelli, M.T., Erazo, A., y otros: *Resultados de un estudio randomizado en linfomas de grado intermedio y de alto grado no tratados previamente utilizando CHOP versus CNOP.* *Ann Oncol*, 1992; 5:349-354.
- 120.- Fischer, R.I., Gaynor, E.R., Dahlberg, S., y otros: *Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma.* *N Engl J Med*, 1993; 328:1002-1006.
- 121.- Cabanillas, F.: *CHOP o no CHOP... ¿Es ésa la cuestión?* *Ann Oncol*, 1992; 5:327-329.
- 122.- Tirelli, U.: *Management of malignant lymphoma in the elderly. An EORTC retrospective evaluation.* *Acta Oncol*, 1989; 28:199-210.
- 123.- Kessinger, A., Armitage, O., Smith, D.M., Landmark, J.D., Bierman, P.J., Weisenburger, D.D.: *High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for patients with lymphoma.* *Blood*, 1989; 74(4):1260-1265.
- 124.- Anderson, J.R., Wilson, J.F., Jenkin, D.T., y otros: *Childhood non-Hodgkin's lymphoma: the result of a randomized therapeutic trial comparing a 4-drug regimen (COMP) with a 10-drug regimen (LSA₂-L₂).* *N Engl J Med*, 1983; 308:559-565.
- 125.- Link, M.P., Donaldson, S.S., Bereard, C.W., Shuster, J.J., Murphy, S.B.: *Results of treatment of childhood localized non-Hodgkin's lymphoma with combination chemotherapy with or without radiotherapy.* *N Engl J Med*, 1990; 322:1169-74.

- 126.- Levine, A.M., Sullivan-Haley, J., Pike, M.C.: Human immunodeficiency virus-related lymphoma: prognostic factors predictive of survival. *Cancer*, 1991; 68:2466-2472.
- 127.- Cabanillas, F.: Tendencias actuales en el tratamiento de los linfomas. En: *Tópicos de actualidad en hospitales*. The Upjohn Company, 1988.
- 128.- Cabanillas, F.: Manejo de los pacientes con linfoma recurrente o refractario. En: *Linfomas no Hodgkin*. Editor: Cabanillas, F.: *Monografías Clínicas en Oncología*, Vol 1.: Director de la serie: Estapé, J.: Ediciones Doyma, S.A., Barcelona, 1988.
- 129.- Vitole, U., Bertini, M., Tarella, C, y otros: MACOP-B treatment for advanced stage diffuse large cell lymphoma: a multicenter Italian Study. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1989; 25:1441-1449.
- 130.- Bastion, Y., Berger, F., Bryon, P.A., Felman, P., Ffrench, M., Coiffier, B.: Follicular lymphomas: assesment of prognostic factors in 127 patients followed for 10 years. *Ann Oncol*, 1991; 2:123-129.
- 131.-Stein, R.S., Greer, J.P., Cousar, J.B., y otros: Malignant lymphomas of follicular centre cell origin in man. VII. Prognostic features in small cleaved cell lymphoma. *Hematol Oncol*, 1989; 7:381-391.
- 132.- Simon, R., Durrleman, S., Hope, R.T., y otros: The non-Hodgkin lymphoma pathologic classification project. Long-term follow-up of 1153 patients of non-Hodgkin lymphoma.
- 133.- Percy, C., O'Connor, G., Ries, L.G., Jaffe, E.S.: Non-Hodgkin's lymphomas: application of the international classification of diseases for oncology (ICD-O) to the Working Formulation. *Cancer*, 1984; 54:1435-1438.
- 134.- Swan, F.Jr., Velasquez, W.S., Tucker, S.: A new serologic staging system for large-cell lymphomas based on initial beta 2-microglobulin and lactate dehydrogenase levels. *J Clin Oncol*, 1989; 7:1518-1527.
- 135.- Armitage, J.O., Vose, J.M., Linder, J., y otros: Clinical significance of immunophenotype in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 1989; 7:1783-1790.
- 136.- Salter, D.M., Krajewski, A.S., Sheehan, T., y otros: Prognosis significance of activation and differentiation antigen expression in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol*, 1989; 159:211-220.
- 137.- Cowan, R.A., Harris, M., Jones, M., Crowther, D.: DNA content in high and intermediate grade non-Hodgkin's lymphoma - prognostic singnificance and clinicopathological correlations. *Br J Cancer*, 1989; 60:904-910.
- 138.- Andreeff, M.: Flow cytometry of lymphoma: En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
- 139.- Shapiro, H.M.: *Practical Flow Cytometry*. Alan R. Liss, Inc., Nueva York, 1988.
- 140.- Köhler, G., Milstein, C.: Continous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975; 256:495-497.
- 141.- Gómez Arbones, X.: Citometría de flujo. En: *Beca I.E.I.: Beca de col•laboració amb la Secció de Medicina*. Institut d'Estudis Ilerdencs, Lleida, 1990.
- 142.- Melamed, M.R., Mullaney, P.F., Shapiro, H.M.: An historical review of the developmentvof flow cytometers and sorters. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
- 143.- Laerum, O.D., Farsuna, T.: Clinical application of flow cytometry: a review. *Cytometry*, 1981; 2:1-13.
- 144.- Carter, N.P., Meyer, E.W.: Introduction to the principles of flow cytometry. En: *Flow Cytometry, a practical approach*. Editor: Ormerod, M.G.: IRL Press, Oxford University Press, Oxford, 1990.
- 145.- Steen, H.B.: Characteristics of flow cytometers. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
- 146.- Salzman, G.C., Singham, S.B., Johnston, R.G., Bohren, C.F.: Light scattering and cytometry. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
- 147.- Sears, F.W., Zemansky, M.W.: *Física General*. Aguilar, Madrid, 1979.
- 148.- Kachel, V., Fellner-Feldegg, H., Menke, E.: Hydrodynamic properties of flow cytometry instruments. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
- 149.- Hiebert, R.D.: Electronics and signal processing. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
- 150.- Lovett, E.J., Schnitzer, B., Keren, D.F., Flint, A., Hudson, J.L., McClatchey, K.D.: Application of flow cytometry to diagnostic pathology. *Laboratory Investigation*, 1984; 50:115-140.
- 151.- Flint, A., Kahn, L.E., Schnitzer, P., Lovett, E.J., Hudson, J.L., Restom, N.: The preparation

- of electronically sorted hematopoietic cell for visual analysis. *Am J Clin Pathol*, 1984; 82:201-202.
- 152.- Daugherty, D.F., Scott, J.A., Pretlow, G.: The separation of human palatine tonsillar cells in the reorienting gradient zonal rotor: a large-capacity enrichment of plasma cells. *Clin Exp Immunol*, 1908; 42:370-377.
- 153.- Sruor, E.F., Leemhuis, T., Brandt, J.E., Vanbesien, K., Hoffman, R.: Simultaneous use of rhodamine 123, phycoerythrin, texas red, and allophycocyanin for the isolation of human hematopoietic progenitor. *Cytometry*, 1991; 12:179-183.
- 154.- Skjonsberg, C.: Immunological typing of acute leukemias by roseting with immunomagnetic beads: comparison with immunofluorescence staining. *Scand J Immunol*, 1990; 31:567-573.
- 155.- McCoy, J.P., Chambers, W.H., Lakomy, R., Campbell, J.A., Stewart, C.C.: Sorting minor subpopulations of cells: use of triggering signal. *Cytometry*, 1991; 12:268-274.
- 156.- Lindomo, T, Peters, D.C., Sweet, R.G.: Flow sorters for biological cells. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
- 157.- Beverley, P.C.L., Linch, D., Delia, D.: Isolation of human haematopoietic progenitor cells using monoclonal antibodies. *Natura*, 1908; 287:332-333.
- 158.- Peters, D., Branscomb, E., Dean, P., y otros: The LLNL high-speed sorter: desing features, operational characteristics, and biological utility. *Cytometry*, 1985; 6:209-301.
- 159.- Keij, J.F., van Rotterdam, A., Groenewegen, A.C., Stokdijk, W., Wisser, J.W.M.: Coincidente in high-speed flow cytometry: models and measurements. *Cytometry*, 1991; 12:398-404.
- 160.- Riley, R.S., Mahin, E.J.: *ASCP Workshop #9072. ASCP Weekend of Pathology*. Seattle, Washington, 1989.
- 161.- Sharpe, P.T.: Methods of cell separation. En: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Editores: Burdon, R.H., van Knippenberg, P.H.: Elsevier, Amsterdam, 1988.
- 162.- Jacobberger, J.W., Foglemen, D., Lehman, J.M.: Analysis on intracellular antigens by flow cytometry. *Cytometry*, 1986; 7:356-364.
- 163.- Clevenger, C.V., Bauer, K.A., Epstein, A.L.: A method for simulteneous nuclear immunofluorescence and ADN content quantitation usiong monoclonal antibodies and flow cytometry. *Cytometry*, 1985; 6:208-214.
- 164.- Slaper-Cortenbach, J.C.M., Admirral, L.G., Kerr, J.M., van Leeuwen E.F., von dem Borne, A.E.G., Tetteroo, P.A.T.: Flow-cytometry detection of terminal deoxycucleotidyl transferase and other intracellular antigens in combination with membrane antigens in acute lymphoblastic leukemias. *Blood*, 1988; 72(5):1639-1644.
- 165.- Dent, G.A., Leglise, M.C., Pryzwansky, K.B., Ross, L.W.: Simultaneous paired analysis by flow cytometry of surface markers, cytoplasmic antigens, or oncogene expression with DNA content. *Cytometry*, 1989; 10:192-198.
- 166.- Schimd, I., Uittenbogaart, C.H., Giorgi, J.V.: A gentle fixation and permeabilisation method for combined cell surface and intracellular staining with improved precision in DNA quantification. *Cytometry*, 1991; 12:278-285.
- 167.- Drach, J., Gattringer, G., Huber, H.: Combined flow cytometry assesement of cell surface antigens and nuclear TdT for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Br J Haematol*, 1991; 77:37-42.
- 168.- Vindelov, L.L., Christensen, Nissen, N.I.: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometry DNA analysis. *Cytometry*, 1983; 3:323-327.
- 169.- Krishan, A.: A rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol*, 1975; 66:188-193
- 170.- Hedley, D.W., Frieland, M.L., Taylor, I.W., Rugg, C.A., Musgrove, E.A.: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem*, 1983; 31:1333-1335.
- 171.- Hedley, D.W.: Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: five years on. *Cytometry*, 1989; 10:229-241.
- 172.- Vindelov, L.L., Christensen, I.J., Nissen, N.I.: Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample storage, staining and internal standardization. *Cytometry*, 1983; 3:332-339.
- 173.- Joensuu, H., Alanen, K.A., Klemi, P.J., Aine, R.: Evidence for false aneuploid peaks in flow cytometric analysis of paraffin-embedded tissue. *Cytometry*, 1990; 11:431-437.
- 174.- Vindelov, L.L., Christensen, I.J., Nissen, N.I.: Standardization of high-resolution flow cytometry DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal

- reference standards. *Cytometry*, 1983; 3:328-331.
- 175.- Pegg, A.C., Hofland, I.: Cell kinetic analysis of mixed populations using three-color fluorescence flow cytometry. *Cytometry*, 1991; 12:445-454.
- 176.- Dean, P.N., Jett, J.H.: Mathematical analysis of DNA distributions derived from the flow microfluorometry. *J Cell Biol*, 1974; 60:523-527.
- 177.- Noguchi, P.D., Johnson, J.B., Browne, W.: Measurement of DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry*, 1981; 1(6):390-393.
- 178.- Dean, P.N., Gray, J.W., Dolbeare, F.A.: The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry. *Cytometry*, 1982; 3(2):188-195.
- 179.- Bagwell, C.B., Mayo, S.W., Whetstone, S.D., y otros: DNA histogram debris theory and compensation. *Cytometry*, 1991; 12:107-118.
- 180.- Lampariello, F., Sebastiani, G., Cordelli, E., Spanò, M.: Comparison of gaussian and T-distribution densities for modeling fluorescence dispersion in flow cytometric DNA histograms. *Cytometry*, 1991; 12:343-349.
- 181.- Waggoner, A.S.: Fluorescent probes for cytometry. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
- 182.- Gratzner, H.G., Leif, R.C.: An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry*, 1981; 1:385-389.
- 183.- Dolbeare, F., Selden, J.R.: Immunochemical quantitation of bromodeoxyuridine. Application to cell cycle kinetics. *Methods in Cell Biology*, 1993 (En prensa).
- 184.- Larsen, J.K., Christensen, I.J., Christiansen, J., Mortensen, B.T.: Washless double staining of unfixed nuclei for flow cytometric analysis of DNA and a nuclear antigen (Ki-67 or bromodeoxyuridine). *Cytometry*, 1991; 12:429-437
- 185.- Drach, J., Gattringer, C., Glassl, H., Schwarting, R., Stein, H., Huber, H.: Simultaneous flow cytometric analysis of surface markers and nuclear Ki-67 antigen in leukemia and lymphoma. *Cytometry*, 1989; 10:745-749.
- 186.- Kurki, P., Ogata, K., Tan E.M.: Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1988; 109:49-59.
- 187.- Dufour, M., Bertrand, L., Bolton, W.E., Laquerre, S., Lagacé, L., Chafouleas, J.G.: Flow cytometric analysis of the distribution of proliferating cell nuclear antigen during quiescence and cell cycle. *Genome*, 1988; 30:189.
- 188.- Delia, D., Martínez, E., Fontanella, E., Aiello, A.: Two and three-color immunofluorescence using aminocumarin, fluorescein, and phycoerythrin-labeled antibodies and single laser flow cytometry. *Cytometry*, 1991; 12:537-544.
- 189.- Tötterman, T.H., Festin, R.: Immunogold labeling for the single-laser FACS analysis of triple antibody-binding cells. En: *Colloidal Gold: principles, methods and applications*. Editor: Hayat, M.A. Vol. 2. Academic Press, San Diego, 1989.
- 190.- Langlois, R.G.: DNA stains as cytochemical probes for chromosomes. En: *Analytical Flow Cytology Series. Flow Cytogenetics*. Editor: Gray, J.W. Academic Press, Londres, 1989.
- 191.- Van Bockstaele, D.R., Peeterman, M.E.: 1-3'-diethyl-4,2'-quinolythiacyanine iodide as a «thiazole orange» analogue for nuclei acidstaining. *Cytometry*, 1989; 10:214-216.
- 192.- Davies, B.H., Bigelow, N.C.: Clinical flow cytometric reticulocyte analysis. *Pathobiology*, 1990; 58:99-106.
- 193.- Rabinovitch, R., June, C.H.: Measurement of intracellular ionized and membrane potential. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
- 194.- Valet, G., Raffael, A., Horoder, L., Wunsch, E., Ruhenstrotu-Bauer, G.: Fast intracellular pH determination in single cells by flow cytometry. *Naturwissenschaften*, 1981; 68:265-266.
- 195.- Valet, G., Raffael, A., Rüssmann, L.: Determination of intracellular calcium in vital cells by flow cytometry. *Naturwissenschaften*, 1985; 72:600-602.
- 196.- Treumer, J., Valet, G.: Flow-cytometric determination of glutathione alterations in vital cells by 0-phthaldialdehyde (OPT) staining. *Exp Cell Res*, 1986; 163:518-524.
- 197.- Burows, S., Valet, G.: Flow cytometric characterization of stimulation, free radical formation, peroxidase activity and phagocytosis of human granulocytes with 2,7-dichlorofluorescein (DCF), *Eur J Cell Biol*, 1987; 43:128-133.
- 198.- Cook, J.A., Fox, M.H.: Intracellular pH measurements using flow cytometry with 1,4-diacetoxy-2,3-dicyanobenzene. *Cytometry*, 1988; 9:441-447.
- 199.- Rothe, G., Oser, A., Valet, G.: Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften*, 1988; 75:354-355.
- 200.- Rotme, G., Valet, G.: Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes

- with hydroethidine and 2'-7'-dichlorofluorescein. *J Leuk Biol*, 1990; 47:440-448.
- 201.- Horan, P.K., Muirhead, K.A., Slezak, S.E.: Standards and controls in flow cytometry. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
- 202.- Duz, R., Kindler-Röhrborn, A., Lennartz, R., Ratewsky, M.F.: Calibration of fluorescence intensity to quantify antibody binding surface determinants of cell subpopulations by flow cytometry. *Cytometry*, 1990; 12:422-428.
- 203.- Flow Cytometry Standards Corporation: Monograph: fluorescent microbead standards. FCSC, 1988.
- 204.- Wheelless, L.L., Coon, J.S., Cox, C., y otros: Precision of DNA flow cytometry in inter-institutional analysis. *Cytometry*, 1991, 12:405-412.
- 205.- Hiddeman, W., Schumann, J., Andreeff, M., y otros: Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry*, 1984; 5:445-446.
- 206.- Coon, J.S., Landay, A.L., Weinstein, R.S.: Biology of disease. Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Laboratory Investigation*, 1987;57(5):453-479.
- 207.- Gray, J.W., Dolbeare, F., Pallavicini, M.B.: Quantitative cell-cycle analysis. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
- 208.- Loken, M.R.: Immunofluorescence techniques. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
- 209.- Cameron, M.J.: Macintosh graphics for the Epics flow cytometer user. *Cytometry*, 1990; 11:916-918.
- 210.- Pierrez, J., Métezau, P., Poncelet, P., Le Pichon, J-P.: L'apport de l'informatique à la cytométrie en flux. En: Métezau, P., Ronot, X., Noah-Merdrignac, G.L., Ratinaud, M.U.: *La Cytométrie en flux por l'etude de la cellule normale ou pathologique*. MEDSI-McGraw-Hill, París, 1988.
- 211.- Dean, N.P.: Data procesing. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
- 212.- Pierrez, J., Guerci, A.: Les modélisations mathématiques. En: *La Cytométrie en flux por l'etude de la cellule normale ou pathologique*. MEDSI-McGraw-Hill, París, 1988.
- 213.- Greimers, R., Rongy, A.M., Schaaf-Lafontaine, N., Bonivar, J.: CUBIC: a three dimesional colored projection of Consort 30 generated trivariate flow cytometry data. *Cytometry*, 1991; 12:570-578.
- 214.- Bray, R.A., Landay, A.L.: Identification and functional characterization of mononuclear cells by flow cytometry. *Arch Pathol Lab Med*, 1989; 113:579-590.
- 215.- Palacín Forgue, A.: Técnicas inmunohistquímicas: aspectos teórico prácticos. ATOM S.A., 2ª edición, 1986.
- 216.- Shah, V.O., Civin, C.I., Loken, M.R.: Flow cytometric analysis of bone marrow IV: differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. *J Immunol*, 1988; 140:1861-1867.
- 217.- King, M.A., Nelson, D.S.: Tumor cell heterogenety in multiple myeloma: antigenic, morphologic, and functional studies of cells from blood and bone marrow. *Blood*, 1989; 73:1925-1935.
- 218.- Gore, S.D., Kastan, M.B., Goodman, S.N., Civin, C.I.: Detection of minimal residual T cell acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1990; 132:275-286.
- 219.- Bender, J.G., Unverzagt, K.L., Walker, D.E., y otros: Identification and comparison of CD34 positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood*, 1991; 77:2591-2596.
- 220.- Shimazaki, C., Gotohm H., Oku, N., y otros: Detection of minimal residual myeloma cells by dual parameter analysis of DNA and cytoplasmic immunoglobulin. *Acta Haematol*, 1991;85:20-25.
- 221.- Ciudad, J., San Miguel, J.S., González, M., López Berges, M., Vidriales, B., Orfao, A.: Enfermedad mínima residual en LLA: análisis multiparamétrico por citometría de flujo. *Sangre*, 1992; 37:131-139.
- 222.- Terstappen, L.W.M.M., Loken, M.R.: Five dimensional flow cytometry as a new approach for blood and bone marrow differentials. *Cytometry*, 1988; 9:548-556.
- 223.- Segal, G.H., Edinger, M.G., Owen, M.: Concomitant delineation of surface Ig, B-cell differentiation antigens, and HLADR on lymphoid proliferations using three-color immunocytometry. *Cytometry*, 1991; 12:350-359.
- 224.- Riedy, M.C., Mulrhead, K.A., Jensen, C.P., Stewart, C.C.: Use a photolabeling technique to identify nonviable cells in fixed homologous or heterologous cell populations. *Cytometry*,

- 1991; 12:133-139.
- 225.- Sasaki, D.T., Dumas, S.E., Englemann.: Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry*, 1987; 8:413-420.
- 226.- Loken, M.R., Brosnan, J.M., Bach, B.A., Ault, K.A.: Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. *Cytometry*, 1990; 11:453-459.
- 227.- Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest*, 1968; 97:77-89.
- 228.- Rickwood, D.: *Centrifugation (2nd edition): a practical approach*. En: *Practical approaches in biochemistry series*. Editores: Rickwood, D., Hames, B.D. IRL Press, Oxford, 1987.
- 229.- Agrawal, Y.P.: Reticulocyte analysis by flow cytometry using a modified gating procedure. *Eur J Haematol*, 1992; 48:48:58-60.
- 230.- Terstappen, L.W.N.N., Mickaels, R.A., Dost, R., Loken, M.R.: Increased light scattering resolution facilitates multidimensional flow cytometric analysis. *Cytometry*, 1990; 11:506-511.
- 231.- Barlogie, B., Spitzer, G., Hart, J.S., y otros: DNA histogram analysis of human hematopoietic cells. *Blood*, 1976; 48:245-258.
- 232.- Melamed, M.R., Lindom, T., Mendelsohn, M.L.: *Flow Cytometry and Sorting*. Wiley-Liss, 1991.
- 233.- Quirke, P., Dyson, J.E.D.: *Flow cytometry: methodology and applications in pathology*. *J Pathol*, 1986; 149:79-87.
- 234.- Raber, M.N.: Clinical applications of flow cytometry. *Oncology*, 1988; 2:35-47.
- 235.- Andreeff, M.: *Clinical Cytometry*. *Annals of The New York Academy of Sciences*, Vol. 468. Comité editorial: Boland, B., Cullinan, J., Brennan, M.K. The New York Academy of Sciences, Nueva York, 1986.
- 236.- Métzéau, P., Ronot, X., Noah-Merdrignac, G.L., Ratinaud, M.U.: *La Cytométrie en Flux: pour l'étude de la cellule normale ou pathologique*. MEDSI-McGraw-Hill, París, 1988.
- 237.- Wersto, R.P., Liblit, R.L., Koss, L.G.: Flow cytometric DNA analysis of human solid tumors: a review of the interpretation of DNA histograms. *Hum Pathol*, 1991; 22:1085-1098
- 238.- Ormerod, M.G.: *Analysis of DNA: 4A. General methods*. En: *Flow Cytometry, a practical approach*. Editor: Ormerod, M.G.: IRL Press, Oxford University Press, Oxford, 1990.
- 239.- Vitale, M., Manzoli, L., Maraldi, N.M., Papa, S.: Chromosome karyotyping in flow. En: *Reunión Internacional de Citometría. Libro de Ponencias y Comunicaciones*. Salamanca, 1990.
- 240.- Bybee, A., Thomas, N.S.B.: Cell cycle regulation. *Blood Reviews*, 1991; 5:177-192.
- 241.- Shackney, S.E., Burholt, D.R., Pollice, A.A., Smith, C.A., Pugh, R.P., Hartsock, R.J.: Discrepancies between flow cytometric and cytogenetic studies in the detection of aneuploidy in human solid tumors. *Cytometry*, 1990; 11:94-104.
- 242.- Rabinovitch, P.S.: *Multicycle. A program for DNA content and cell cycle analysis*. Phoenix Flow Systems, San Diego, 1991.
- 243.- Marill Escudé, M.R.: *Técnicas inmunocitoquímicas*. En: *Técnicas en citología hematológica*. Editor: Woessner, S. Ediciones Medici, S.A., Barcelona, 1990.
- 244.- Rose, N.R., Friedman, H., Fahey, J.L.: *Manual of clinical laboratory immunology*. American Society for Microbiology. 3ª edición. Washington D.C., 1986.
- 245.- Filipe, M.I., Lake, B.D.: *Histochemistry in pathology*. Churchill Livingstone, Nueva York, 1983.
- 246.- Naish, S.J., Boenisch, T., Formilo, A.J., Stead, R.H.: *Immunochemical staining methods*. Dako corporation. 1989.
- 247.- Bullock, G.R., Petrusz, P.: *Techniques in immunocyto-chemistry*. Vol. 1. Academic Press, San Diego, 1982.
- 248.- Bullock, G.R., Petrusz, P.: *Techniques in immunocyto-chemistry*. Vol. 2. Academic Press, San Diego, 1983.
- 249.- Bullock, G.R., Petrusz, P.: *Techniques in immunocyto-chemistry*. Vol. 3. Academic Press, San Diego, 1985.
- 250.- Bullock, G.R., Petrusz, P.: *Techniques in immunocyto-chemistry*. Vol. 4. Academic Press, San Diego, 1989.
- 251.- De Waele, M.S.: Silver enhanced colloidal gold for the detection of leukocyte cell surface antigens in dark-field and epipolarization microscopy. En: *Colloidal gold: principles, methods, and applications*. Vol 2. Editor: Hayat, H.: Academic Press, San Diego, 1989.
- 252.- De Waele, M.: Leukemia and lymphoma immunophenotyping in cells smears with immunogold staining. *Blood*, 1990; 76:265a-265a.
- 253.- Johnstone, A., Thorpe, R.: *Immunochemistry in practice*. Blackwell Scientific Publications, 2ª edición, Oxford, 1987.
- 254.- Woessner, S.: *Técnicas en citología hematológica: morfología, citoquímica, inmunología,*

- ultraestructura, cultivos in vitro, citogenética, y biopsias medulares. Editorial Medici, Barcelona, 1990.
- 255.- Vives Corrons, J.L., Aguilar, J.L.: Manual de técnicas de laboratorio en hematología. Salvat, Barcelona, 1987.
- 256.- Wilks, D.: Characteristic immunophenotypic artefacts seen in patients with anti-mouse immunoglobulin antibodies. *Cytometry*, 1990; 11:318-319.
- 257.- Nilaver, G., Kozlowski, G.P.: Comparison of the PAP and ABC immunocytochemical techniques. En: *Techniques in immunocytochemistry*. Vol. 4. Editores: Bullock, G.R., Petrusz, P.: Academic Press, San Diego, 1989.
- 258.- Ly, B., Beiske, K., Larsen, N.: Immunological typing of acute leukemias: immunoenzymatic staining of fixed cells compared with immunofluorescence staining cells in suspension. *Eur J Haematol*, 1988; 41:147-155.
- 259.- Ly, C.Y., Lazcano-Villareal, O., Pierre, R.V., Yam, L.T.: Immunocytochemical identification of cells in serous effusions. *Am J Clin Pathol*, 1987; 88:696-706.
- 260.- Bourne, J.A.: Handbook of immunoperoxidase staining methods. Dako Corporation, U.S.A., 1983.
- 261.- Mason, D.Y.: Immunocytochemical labeling of monoclonal antibodies by the APAAP immunoalkaline phosphatase technique. En: *Techniques in Immunocytochemistry*. Vol. 3. Editores: Bullock, G.R., Petrusz, P.: Academic Press, San Diego, 1985.
- 262.- Ghosh, A.K., Erber, W.N., Hatton, C.R.S., y otros: Detection of metastatic tumor cells by immuno-alkaline phosphatase labeling with monoclonal antibodies. *Br J Haematol*, 1985; 61:21-30.
- 263.- Cordell, J.L.: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem*, 1984; 32:219-229.
- 264.- Yam, L.T., English, M.C., Janckila, A.J., Ziesmer, M.S.S., Li, C.Y.: Immunocytochemical characterization of human blood cells. *Am J Clin Pathol*, 1983; 80:314-321.
- 265.- Urbano Ispizua, A.: Técnica de inmunofosfatasa alcalina (FAAFA) aplicada a muestras hematológicas. *LAB 2000 (Revisiones en conjunto: hematología)*, 1985; 15-20.
- 266.- Erber, W.N., Mynheer, L.C., Mason, D.Y.: APAAP labeling of blood and bone marrow samples for phenotyping leukemia. *Lancet*, 1986; i:761-765.
- 267.- Pryzwansky, K.B.: Applications of double immunofluorescence. En: *Techniques in immunocytochemistry*. Vol 1. Editores: Bullock, G.R., Petrusz, P.: Academic Press, San Diego, 1982.
- 268.- Mason, D.Y., Wallston, R.E.: Double immunoenzymatic labeling. En: *Techniques in immunocytochemistry*. Vol 1. Editores: Bullock, G.R., Petrusz, P.: Academic Press, San Diego, 1982.
- 269.- Gloghini, A.: A combined cytochemical and immunocytochemical method for simultaneous visualization of cytoplasmic enzyme reactivity and cell surface antigens in cells suspensions. *Am J Clin Pathol*, 1989; 91:67-71.
- 270.- Stross, W.P., Jones, M., Mason, D.Y.: Automation of APAAP immunocytochemical technique. *J Clin Pathol*, 1989; 42:106-112.
- 271.- Vacca, L.L.: Double bridge techniques of immunocytochemistry. En: *Techniques in immunocytochemistry*. Vol 1. Editores: Bullock, G.R., Petrusz, P.: Academic Press, San Diego, 1982.
- 272.- Ferrero, D., Gabblanelli, M., Peschie, C., Lange, B., Rovera, G.: Surface phenotypes of human hemopoietic progenitor cells defined by monoclonal antibodies. *Blood*, 1985; 66:496-502.
- 273.- Falini, B., Martelli, M.F., Tarallo, F., y otros: Immunohistochemical analysis of human bone marrow trephine biopsies using monoclonal antibodies. *Br J Haematol*, 1984; 56:365-386.
- 274.- Stashenko, P., Nadler, L.M., Hardy, R., Schalssmana, S.F.: Expression of cells surface markers after human B lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78:3848-3852.
- 275.- Greaves, M.F., Chan, L.C., Furley, A.J.W., Watt, S.M., Holgaard, H.V.: Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation. *Blood*, 1986; 67:1-11.
- 276.- Catovsky, D., Foa, E.: *The Lymphoid Leukemias*. Butterworths. Cambridge, 1990.
- 277.- Catovsky, D.: Caracterización fenotípica de los procesos oncohematológicos: su utilidad como criterio de diagnóstico, como criterio pronóstico y para la detección de enfermedad residual. *Sangre*, 1992; 37:56-69.
- 278.- Zola, H., McNamara, P.A., More, H.A., y otros: Maturation of human B-lymphocytes, study with a panel of monoclonal antibodies against membrane antigens. *Clin Exp Immunol*, 1983; 52:655-664.

- 279.- Sánchez Madrid, F.: Informe sobre el III taller internacional de antígenos de diferenciación de leucitos humanos. *Inmunología*, 1987; 6:22-29.
- 280.- Knapp, W., Dörken, B., Gilks, W.R., Rieber, E.P., Schmidt, R.E., Stein, H., Van Dem Borne, A.E.G.Kr.: *Leucocyte Typing IV: White cell differentiation antigens*. Oxford University Press, Oxford, 1989.
- 281.- Sampalo Lainz, A., López Gómez, M.: Anticuerpos monoclonales y grupos de diferenciación antigénica: métodos de estudio y aplicaciones al diagnóstico clínico. *Med Clin (Barc)*, 1992; 99:30-36.
- 282.- *The CD System: Paris (1982), Boston (1984), Oxford (1986), Viena (1989)*. Dakopatts, Edita Dako-Atom. 1990.
- 283.- Kalász, V., Pap, T., Csanaky, G., Kelényi, G.: Endothelial cell receptors on leukemic plasma cells. *Leukemia Research*, 1989; 13:863-868.
- 284.- Nathan, P.D., Walker, L., Hardie, D., y otros: An antigenic study of human plasma cells in normal tissue and in myeloma: identification of a novel plasma cells associated antigen. *Clin Exp Immunol*, 1986; 65:112-119.
- 285.- Lavabre-Bertran, T., y otros: Quantitative expression of B markers, HLA molecules and leukocyte common antigen during human neoplastic B cells differentiation. *Blood*, 1990; 70:359a.
- 286.- Barlogie, B., Alexanian, R., Pershouse, H., Smallwood, L., Smith, L.: Cytoplasmic immunoglobulin content in multiple myeloma. *J Clin Invest*, 1985; 76:765-769.
- 287.- Bardales, R.H., Al-Katub, A.M., Carrato, A., Koziner, B.: Detection of intracytoplasmic immunoglobulin by flow cytometry in B-cell malignancies. *J Histochem Cytochem*, 1989; 37:83-89.
- 288.- Almansari, N.M., y otros: Flow cytometric analysis of terminal deoxynucleotidyl transferase. *Am J Clin Pathol*, 1991; 95:376-380.
- 289.- Erber, W.N.: Immunoalkalin phosphatase labeling of terminal transferase in hematologic samples. *Am J Clin Pathol*, 1987; 88:43-50.
- 290.- Cavill, I.: *Ballière's Clinical Haematology: international practice and research*. Vol. 3, Número 4, Octubre 1990. *Advancing Haematological Techniques*. Ballière Tindal, Londres, 1990.
- 291.- Zocchi, M.R., Marelli, F., Poggi, A.: Simultaneous cytofluorometric analysis for the expression of cytoplasmic antigens and DNA content in CD3-human thymocytes. *Cytometry*, 1990; 11:883-887.
- 292.- Deegan, M.J.: Membrane antigen analysis in the diagnosis of lymphoid leukemias and lymphomas. *Arch Pathol Lab Med*, 1989; 113:606-618.
- 293.- Anderson, K.C., Bates, M.P., Slaughenhaupt, B.L., Pinkus, G.S., Schollossman, S.F., Nadler, L.M.: Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B-cell differentiation. *Blood*, 1984; 63:1424-1433.
- 294.- Loken, M.R., Shan, V.O., Dattilia, K.L., Civin, C.I.: Flow cytometry analysis of human bone marrow II. Normal B lymphocyte development. *Blood*, 1987; 70:1316-1324.
- 295.- Alession, M., Roggero, S., Funaro, A., y otros: CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes and plasma cells. *J Immunol*, 1990; 145:878-884.
- 296.- Anderson, K.C., Cochran, M., Barut, B.A.: Phenotypic and functional characterization of normal and malignant terminal B (plasma) cells. *Eur J Haematol*, 1989; 43:19-26.
- 297.- Jackson, N., Ling, N.R., Ball, J., Bromidge, E., Nathan, P.D., Franklin, I.M.: An analysis of myeloma plasma cell phenotype using antibodies at the IIIrd international workshop on human leukocyte differentiation antigens. *Clin Exp Immunol*, 1988; 72:351-356.
- 298.- Zola, H., Melo, J.V., Zowtys, H.N., Nikoloutsopoulos, A., Skinner, J.: The leukocyte-common antigen (CD45) complex and B-lymphocyte activation. *Human Immunology*, 1990; 27:368-377.
- 299.- San Miguel, J.F., Caballero, M.D., González, M., Zola, H., López Borrassa, A.: Immunological phenotype of neoplasma involving the B cells in the last step of differentiation. *Br J Haematol*, 1986; 62:75-83.
- 300.- Terstappen, L.W.M.M., Huang, S., Safford, M., Lansdorf, P., Loken, M.: Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+ CD38-progenitor cells. *Blood*, 1991; 77:1218-1227.
- 301.- Terstappen, L.W.N.N., Safford, M., Loken, M.R.: Flow cytometric analysis of human bone marrow III: neutrophilic maturation. *Leukemia*, 1990; 4:657-663.
- 302.- Marti, G.E., Magruder, L., Schuette, W.E., Granlneck, H.R.: Flow cytometric analysis of platelet surface antigens. *Cytometry*, 1988; 9:448-455.
- 303.- Loken, M.R., Shah, V.O., Dattillo, K.L., Civin, C.I.: Flow cytometric analysis of human

- bone marrow I: normal erithroid development. *Blood*, 1987; 69:255-263.
- 304.- Lund-Johansen, F., Bjerknes, R., Laerum, O.D.: Flow cytometric assay for the measurement of human bone marrow phenotype function and cell cycle. *Cytometry*, 1990; 11:610-616.
- 305.- Terstappen, L.W.N.N., Hollander, Z., Heiners, H., Loken, M.R.: Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 1990; 48:138-148.
- 306.- Terstappen, L.W.N.N., Loken, M.R.: Myeloid cell differentiation in normal bone marrow and acute myeloid leukemia assessed by multi-dimensional flow cytometry. *Analytical Cellular Pathology*, 1990; 2:229-240.
- 307.- Tannock, I.F.: Principles of cell proliferation: cell kinetics. En: *Cancer: principles & practice of oncology*. Capítulo 1. Volúmen 1. Editores: De Vita, V.T., Hellman, S., Rosenberg S.D.: Lippincott, 3ª edición, 1989.
- 308.- Linden, M.D.: Clinical application of morphologic and immunocytochemical assesment of cell proliferation. *Am J Clin Pathol*, 1992; 97:s4-s13.
- 309.- Lokhorst, H.M., Boom, S.E., Terpstra, W., Roholl, P., Gerdes, J., Bast, B.J.E.G.: Determination of the growth fraction in monoclonal gammopathy with the monoclonal antibody Ki-67. *Br J Haematol*, 1988; 69:477-481.
- 310.- Di Stefano, D., Mingazzini, P.L., Scucchi, L., Donetti, M., Marinozzi, V.: A comparative study oh histopathology, hormone receptors, peanut lectin binding, Ki-67 immunostaining, and nucleolar organizer region-associated proteins in human bresat carcer. *Cancer*, 1991; 67:463-471.
- 311.- Coindre, J.M., Trojani, M., Contesso, G., y otros: Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma. *Cancer*, 1986; 58:306-309.
- 312.- Boccadoro, M., Gavarotti, P., Fossati, G., y otros: Low plasma cell 3(H) thymidine incorporation in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), smouldering myeloma and remission phase myeloma: a reliable indicator of patients no requiring therapy. *Br J Haematol*, 1984; 58:689-699.
- 313.- Durie, B.G.M.: Immunofluorescence method improves clinical utility of myeloma labeling indices. *Mayo Clin Proc*, 1987; 62:1057-1058.
- 314.- Raza, A., Preisler, H.D., Mayers, G.L., Bankert, R.: Rapid enumeration of s-phase cells by means of monoclonal antibodies. *N Engl J Med*, 1984; 310:991-991.
- 315.- Falini, B., Canino, S., Sacchi, S., y otros: Immunocytochemical evaluation of the percentage of proliferating cells in pathological bone marrow and peripheral blood samples with the Ki-67 an anti-bromo-deoxyuridine monoclonal antibodies. *Br J Haematol*, 1988; 69:311-320.
- 316.- Gertz, M.A., Kyle, R.A., Greipp, P.R.: The plasma cell labeling index: a valuable tool in primary systemic amiloidosis. *Blood*, 1989; 74:1108-1111.
- 317.- Lokhorst, H.M., Boom, S.E., Bast B.J.E.G., Ballieux, R.E.: Determination of the plasma cell labeling index with bromodeoxyuridine in a a double fluorescence technique. *Br J Haematol*, 1986; 64:271-275.
- 318.- Ffrench, M., Magaud, J.P., Duhaut, P., Bryon, P.A., Viala, J.J.: Determination of plasma cell labeling index with bromodeoxyuridine using a double immunoenzymatic technique. *Stain Technology*, 1990; 65:31-35.
- 319.- Boccadoro, M., Redoglio, V., Gavarotti, P., Pileri, A.: Multiple myeloma plasma cell kinetics: rapid and reliable evaluation using 5-bromo-deoxyuridine (BrdUrd) DNA incorporation detected by an anti-BrdUrd monoclonal antibody. *Tumori*, 1986; 72:135-137.
- 320.- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., Stein, H.: Cell cycle of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 1984; 133:1710-1715.
- 321.- Lopez, F., Belloc, F., Lacombe, F., y otros: Modalities of synthesis of Ki-67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry*, 1991; 12:42-49.
- 322.- Kamel, O.W., Franklin, W.A., Ringus, J.C., y otros: Thymidine labeling index and Ki-67 growth fraction in lesions of the breast. *Am J Pathol*, 1989; 134:107-113.
- 323.- Sasaki, K., Matsumura, K., Tsuji, T., y otros: Relationship between labelind indices af Ki-67 and BrdUrd in human malignant tumors. *Cancer*, 1988; 62:989-993.
- 324.- Cibull, M.L., Heryetm A., Gatter, K.C., Mason, D.Y.: The utility of Ki-67 immunostaining, nuclear organizer region counting, and morphology in the assesment of follicular lymphomas. *J Pathol*, 1989; 158:189-193.
- 325.- Hall, P.A., Crocker, J., Watts, A., Stansfeld, A.G.: A comparison of nuclear organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*, 1988; 12:373-381.

- 326.- Van Bockstaele, D.R., Lan, J., Snoeck, H-W., Korthout, M.L., De Bock R.F., Peetermans, M.E.: Aberrant Ki-67 expression in normal human bone marrow revealed by multiparameter flow cytometric analysis. *Cytometry*, 1991; 12:50-63.
- 327.- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A., Macdonald-Bravo, H.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 1987; 326:515-517.
- 328.- Prelich, G., Tan, C-K., Kostura, M., y otros: Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature*, 1987; 326:517-520.
- 329.- Takasaki, Y., Robinson, W.A., Tan E.M.: Proliferating cell nuclear antigen in blast crisis cells of patients with chronic myeloid leukemia. *JNCI*, 1984; 73:655-661.
- 330.- Celis, J.E., Bravo, R., Larsen, P.M., Fey, S.J.: Cyclin: a nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cell. *Leukemia Research*, 1984; 8(2):143-157.
- 331.- Ogata, K., Kurki, P., Celis, J.E., Nakamura, R.M., Tan, E.M.: Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associate with DNA replication. *Exp Cell Res*, 1987; 168:475-486.
- 332.- Bravo, R., MacDonald-Bravo, H.: Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol*, 1987; 105:1549-1554. Citado en: Linden, M.D.: Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessment of cell proliferation. *Am J Clin Pathol*, 1992; 97:s4-s13.
- 333.- Robbins, B.A., de la Vega, D., Ogata, K., Tan E.M., Nakamura, R.M.: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med*, 1987; 111:841-845.
- 334.- Dervan, P.A., Magee, H.M., Buckley, C., y otros: PCNA counts in formalin-fixed paraffin-embedded tissue correlate with Ki-67 results in fresh tissue. *Am J Clin Pathol*, 1992; 97:s21-s29.
- 335.- Hall, P.A., Woods, A.L.: Immunohistochemical markers of cell proliferation. *Cell Tissue Kinet*, 1990; 23:505-522.
- 336.- Kawakita, N., Seki, S., Yanai, A., y otros: Immunocyto-chemical identification of proliferating hepatocytes using anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) monoclonal antibody and comparison with immunocytochemical staining using anti-DNA polymerase alpha monoclonal antibody in serial sections. *Am J Clin Pathol*, 1992; 97:s14-s20.
- 337.- Yonemura, Y., Ohoyama, S., Kimura, M., y otros: The expression of proliferative-associated nuclear antigen p105 in gastric carcinoma. *Cancer*, 1991; 67:2523-2528.
- 338.- Ploton, D., Menager, M., Jeanneson, P., Himer, G., Pigeon, F., Adnet, J.J.: Improvement in staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J*, 1986; 18:5-14.
- 339.- Crocker, J., Nar, P.: Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol*, 1987; 151:111-118.
- 340.- Bryan, R.L., Janmohamed, R., Crocker, J., Leyland, M.J.: Nucleolar organiser regions in myeloma and benign paraproteinemia. *Cancer*, 1990; 61:645-645.
- 341.- Lloyd, S.N., Johnson, C.P., Brown, I.L., Kirk, D.: Nucleolar organizer regions in benign and malignant prostatic disease. *Histopathology*, 1991; 18:449-452.
- 342.- Macartney, J.C., Camplejohn, R.S.: DNA flow cytometry. En: *Cell Proliferation in Lymphomas*. Editor: Crocker, J. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993.
- 343.- Sneige, N., Dekmezian, R., El-Naggar, A., Manning, J.: Cytomorphologic, immunocytochemical, and nucleic acid flow cytometric study of 50 lymph nodes by fine-needle aspiration. *Cancer*, 1991; 67:1003-1007.
- 344.- Felman, P., Souchier, C., Ffrench, M., Ploye, H., Bryon, P.A.: DNA assesment in thin sections of lymphoma by densitometric and stereological methods: comparison with imprints and flow cytometric results. *Anal Cell Pathol*, 1989; 1:41-52.
- 345.- Tirindelli Tanesi, D., Spanò, M., Altavista, P.: Quality control study of the Italian group of cytometry on flow cytometry cellular DNA content measurements. *Cytometry*, 1993; 14:576-583.
- 346.- Tagawa, Y., Nakazaki, T., Yasutake, T., Matsuo, S., Tomita, M.: Comparison of pepsin and trypsin digestion on paraffin-embedded tissue preparation for DNA flow cytometry. *Cytometry*, 1993; 14:541-549.
- 347.- Beauregard, P., Witzig, T.E., Kurtin, P.J., y otros: Models of S-phase determination in lymphomas from flow cytometric DNA content histograms: comparison with the bromodoxuridine labeling method. *Hematol Pathol*, 1991; 5:177-183.
- 348.- Hedley, D.W., Shankey, V., Wheelless, L.L.: DNA cytometry consensus conference. *Cytometry*, 1993; 14:471.
- 349.- Shankey, T.V., Rabinovitch, P.S., Badwell, B, y otros: Guidelines for implementation of

- clinical DNA cytometry. *Cytometry*, 1993; 14:472-477.
- 350.- Barlogie, B., Latreille, J. Freireich, y otros: Characterization of hematologic malignances by flow cytometry. *Blood Cells*, 1980; 6:719-744.
- 351.- Delgao, R., Feijo, E., Benitez, J., y otros: Correlación entre citogenética y citometría de flujo en el análisis del DNA en linfomas. XXVII Reunión del Club de Linfomas Español, Sociedad Española de Anatomía Patológica, Madrid, 1991.
- 352.- Landberg, G., Roos, G.: Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in human malignant hematopoietic cells. *Acta oncol*, 1991; 30:917-921.
- 353.- Marcos, B., Sarasa, J.L., Echezarreta, G., y otros: Actividad proliferativa tumoral. Correlación entre los hallazgos obtenidos con Ki67 y PC10. XXVII Reunión del Club de Linfomas Español, Sociedad Española de Anatomía Patológica, Madrid, 1991.
- 354.- Ruiz-Marcellan, M.C., Moragas, A., Sans, M.: Dinámica proliferativa de la población linfoide en ganglios linfáticos de pacientes con SIDA. XXVII Reunión del Club de Linfomas Español, Sociedad Española de Anatomía Patológica, Madrid, 1991.
- 355.- Woods, A.L., Hall, P.A., Shepherd, N.A., y otros: The assesment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology*, 1991, 19:21-27.
- 356.- Diamond, L.W., Nathwani, B.N., Rappaport, H.: Flow cytometry in the diagnosis and classification of malignant lymphoma and leukemia. *Cancer*, 1982; 50:1122-1135.
- 357.- Barlogie, B., Raber, M.N., Schumann, J., y otros: Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res*, 1983; 43:3982-3997.
- 358.- Sheibani, K., Nathwani, B.N., Winberg, C.D., Scott, E.P., Teplitz, R.R., Rappaport, H.: Small lymphocytic lymphoma. Morphologic and immunologic progression. *Am J Clin Pathol*, 1985; 84:237-243.
- 359.- Christensson, B., Tribukait, B., Linder, I-L., Ullman, B., Biberfeld, P.: Cell proliferation and ADN content in non-Hodgkin's lymphoma. Flow cytometry in relation to lymphoma classification. *Cancer*, 1986; 58:1295-1986.
- 360.- Wain, S.L., Braylan, R.C., Borowitz, M.J.: Correlation of monoclonal antibody phenotyping and cellular DNA content in non-Hodgkin's lymphoma. The Southeastern Cancer Study Group experience. *Cancer*, 1987; 60:2403-2411.
- 361.- Griffin, N.R., Howard, M.R., Quirke, P., O'Brien, C.J., Child, J.A., Bird, C.C.: Prognostic indicators in centroblastic-centrocytic lymphoma. *J Clin Pathol*, 1988; 41:866-870.
- 362.- Bauer, K.D., Bagwell, C.B., Giaretti, W., y otros: Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in colorectal cancer. *Cytometry*, 1993; 14:486-491.
- 363.- Hedley, D.W., Clark, G.M., Cornelisse, C.J., Killander, D., Kute, T., Merkel, D.: Consensus review of the clinical utility of the DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Cytometry*, 1993; 14:482-485.
- 364.- Wheeless, L.L., Badalament, R.A., de Vere White, R.W., Fradet, Y., Tribukait, B.: Consensus review of the clinical utility of DNA citometry in bladder cancer. *Cytometry*, 1993; 14: 478-481.
- 365.- Shankey, T.V., Kallioniemi, O-P., Koslowski, J.M., y otros: Consensus review of the clinical utility of DNA content cytometry in prostate cancer. *Cytometry*, 1993; 14:497-500.
- 366.- Silvestrini, R., Costa, A., Giardini, R., y otros: Prognostic implications of cell kinetics, histopathology and pathologic stage in non-Hodgkin's lymphomas. *Hematol Oncol*, 1989; 7:411-422.
- 367.- Turner, R.R., Layfield, L.J., Bishop, P.C., Epstein, A.L., Parker, J.W.: Flow cytometric measurements of proliferation-associated nuclear antigen p105 and DNA content in non-Hodgkin's lymphomas. *Arch Pathol Lab Med*, 1989; 113:907-911.
- 368.- Christensson, B., Lindemalm, C., Johansson, B., Mellstedt, H., Tribukait, B., Biberfeld, P.: Flow cytometric DNA analysis: a prognostic tool in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Res*, 1989; 13:307-314.
- 369.- Aine, R., Lehtinen, T., Lehtinen, M., y otros: Flow cytometric analysis of DNA ploidy in large cleaved cell lymphomas. *Hematol Oncol*, 1990; 8:339-346.
- 370.- Lakkala, T., Laasonen, A., Franssila, K.O., Teerenhovi, L., Knuutila, S.: Comparison of DNA and karyotype aneuploidy in malignant lymphomas. *Am J Clin Pathol*, 1990; 94:600-605.
- 371.- Rehn, S., Glimelius, B., Strang, P., Sundstrom, C., Tribukait, B.: The prognostic relevance of flow cytometric studies in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol*, 1990; 8:1-12.
- 372.- Joensuu, H., Klemi, P.J., Jalkanen, S.: Biologic progression in non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer*, 1990; 65:2564-2571.
- 373.- Gerdes, J.: Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic

- and prognostic evaluations in human malignances. *Semin Cancer Biol*, 1990; 1:199-206. Abs.
- 374.- Bookman, M.A., Lardelli, P., Jaffe, E.S., Duffey, P.L., Longo, D.L.: lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation: morphologic, immunophenotypic, and prognostic factors. *J Natl Cancer Inst*, 1990; 82:742-748.
- 375.- Slymen, D.J., Miller, T.P., Lippman, S.M., y otros: Immunobiologic importance of immunobiologic factors in diffuse large-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 1990; 8:986-993.
- 376.- McDunn, S.H., Winter, J.N., Variakojis, D., y otros: Human immunodeficiency virus-related lymphomas: a possible association between tumor proliferation, lack of ploidy anomalies, and immune deficiency. *J Clin Oncol*, 1991; 9:1334-1340.
- 377.- Rehn, S., Glimelius, B., Sundstrom, C.: A comparative study of proliferation-associated parameters in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol*, 1991; 9:287-298.
- 378.- Macartney, J.C., Camplejhon, R.S., Morris, R., Hollowood, K., Clarke, D., Timothy, A.: DNA flow cytometry of follicular non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol*, 1991; 44:215-218.
- 379.- Joensuu, H., Klemi, P.J., Soderstrom, K.O., Jalkanen, S.: Comparison of S-phase fraction, working formulation, and Kiel classification in non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer*, 1991; 68:1564-1571.
- 380.- Kotel'nikov, V.M., Baidurin, S.A., Kaplanskaia, I.B., Grigor'eva, M.A., Kozinets, G.I.: [The parameters of tumor cell proliferation as a prognostic factor in lymphosarcomas]. *Ter Arkh*, 1991; 63:33-35. Abs.
- 381.- Mitani, S., Tango, T., Sonobe, Y., y otros: Expression of three cell proliferation-associated antigens, DNA polymerase alpha, Ki-67 antigen and transferrin receptor in nodal and cutaneous T-cell lymphomas. *Int J Hematol*, 1991; 54:385-393.
- 382.- Caulet, S., Brousset, P., Schoevaert, D., y otros: Quantitative study of Ki-67 antibody staining in 46-T cell malignant lymphomas using image analysis. *Hematol Oncol*, 1991; 9:323-335.
- 383.- Kossakowska, A.E., Huchcroft, S., Boras, V., Urbanski, S.J.: Prognostic significance of proliferative activity of diffuse large cell lymphomas. *Hematol Pathol*, 1991; 5:101-107.
- 384.- Heimann, A., Cramer, H., Patel, S., Gratzner, H.G., Katz, R.L.: Determination of the rate of DNA synthesis of human tumor cells obtained by fine needle aspiration. Comparison of flow cytometry and immunoperoxidase method for the detection of thymidine analogue incorporation. *Anal Quant Cytol Histol*, 1991; 13:371-378.
- 385.- Villuendas, R., Piris, M.A., Orradre, J.L., y otro: Expresión de proteína p53 en linfomas y tejido linfoide reactivo. XXVII Reunión del Club de Linfomas Español, Sociedad Española de Anatomía Patológica, Madrid, 1991.
- 386.- Duque, R.E., Andreeff, M., Braylan, R.C., Diamond, L.W., Peiper, S.P.: Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in neoplastic hemopathology. *Cytometry*, 1993; 14:492-496.
- 387.- Doménech, J.M., Ezpeleta, L.: Diseños de investigación. Documentos del Laboratori de Psicologia Matemàtica. Universitat de Barcelona. Editado por la Universitat de Barcelona, Barcelona, 1989.
- 388.- Jenicek, M.n Cléroux, R.: Epidemiología: principios, técnicas, aplicaciones. Salvat Editores, Barcelona, 1987.
- 389.- Product Reference Manual: Epics profile. Coulter Electronics, 1987.
- 390.- Reference manual: Epics profile. Coulter Corporation, Hialeah, 1989.
- 391.- Epics elite flow cytometer: operator guide. Coulter Corporation, Hialeah, 1992.
- 392.- Velásquez, W.S.: Manejo de los linfomas de células grandes en estudios I y II. En: Linfomas no Hodgkin. Editor: Cabanillas, F.: Monografías Clínicas en Oncología, Vol 1.: Director de la serie: Estapé, J.: Ediciones Doyma, S.A., Barcelona, 1988.
- 393.- Doménech Massons, J.M.: Introducción al análisis de la supervivencia. Documentos del Laboratori de Psicologia Matemàtica. Universitat de Barcelona. Editado por la Universitat de Barcelona, Barcelona, 1989.
- 394.- Quiroz Vieyra, G., Fournier García, M.L.: SPSS enfoque aplicado. McGraw-Hill, México.
- 395.- Schawrtz, D.: Métodos estadísticos para médicos y biólogos. En: Monografías de bioestadística y psicología matemática. Editor. Doménech Massons, J.N., Riba Lloret, M.D. Editorial Herder, Barcelona, 1988.
- 396.- Doménech, J.M., Riba, M.D.: Una síntesis de los métodos estadísticos bivariantes. En: Monografías de bioestadística y psicología matemática. Editor. Doménech Massons, J.N., Riba Lloret, M.D. Editorial Herder, Barcelona, 1987.
- 397.- Colton, T.: Estadística en medicina. Salvat Editores, Barcelona, 1979.
- 398.- Métodos estadísticos en ciencias de la salud. Documentos de trabajo del curso de postgrado «métodos estadísticos en ciencias de la salud, 1989-1990». Director: Doménech

Massons, J.M. Universitat Autònoma de Barcelona, 1989-1090.

399.- Armitage, P., Berrey, G.: Estadística para la investigación biomédica. Ediciones Doyma, Barcelona, 1992.

400.- Doménech i Massons, J.M.: Tablas de estadística. En: Monografias de bioestadística y psicología matemática. Editor. Doménech Massons, J.N., Riba Lloret, M.D. Editorial Herder, Barcelona, 1988.

401.- Doornbos, R.M.P., Hennick, E.J., Puyman, C.A.S., De Grooth, B.G., Greve, J.: White blood cell differentiation using a solid state flow cytometer. *Cytometry*, 1993, 14:589-594.

402.- Carr, R.F., Abaza, A.M.: False aneuploidy in flow cytometric DNA analysis of paraffin embedded tissue: effects of Carnoy's fixation. *Cytometry*, 1993, 14:668-672.