

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA**



**Expresión de Cadenas Ligeras Kappa y Lambda por  
Inmunohistoquímica e Hibridación In Situ, y Cadenas  
Pesadas Alfa, Gamma, Delta y Miu por  
Inmunohistoquímica en Linfomas de Alto Grado,  
Linfomas de Bajo Grado y Leucemias Linfocíticas  
Crónicas**

**TESIS DOCTORAL**

**Emérita Mercedes Berríos Bárcenas**

**Madrid 2012**



**FRANCISCO JAVIER ALVES FERREIRA, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DEL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ DE MADRID,**

**CERTIFICA QUE:** Dña. **Emérita Mercedes Berríos Bárcenas**, Licenciada en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación "**Expersión de cadenas ligeras kappa y lambda por inmunohistoquímica e hibridación in situ y cadenas pesadas alfa, gamma, delta y miu por inmunohistoquímica en linfomas de alto grado, linfomas de bajo grado y leucemias linfocíticas crónicas**", estudio que considero completamente satisfactorio para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid

Lo que firmo en Madrid a 3 de septiembre de 2012

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'F. Alves Ferreira', written in a cursive style.

Fdo.: Prof. Dr. Francisco Javier Alves Ferreira

## **Agradecimientos:**

*al Dr. Francisco Javier Alves, por sus enseñanzas como mentor en la patología de linfomas y por la constante ayuda científica y humana durante la dirección de este estudio.*

*al Dr. Javier Regadera, por su apoyo incondicional, por sus consejos y sobre todo por su sincera amistad y solidaria ayuda a Nicaragua.*

*al Dr. Manuel Nistal, por sus enseñanzas, y por su amabilidad que siempre me ha demostrado durante las estancias formativas en Patología Quirúrgica realizadas en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital La Paz de Madrid*

*al Dr. David Hardisson, por compartir conmigo sus conocimientos en todos los casos que le he consultado y por su cordialidad y facilidades para la culminación de esta Tesis.*

*al Personal del Laboratorio de Histopatología del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital La Paz por su valioso apoyo técnico.*

*a todos Patólogos del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital La Paz, por su amistad y formación en los casos consultados.*

*a mis Compañeros del Servicio de Patología y a las Autoridades Académicas de la UNAN-León que tan desinteresadamente me han apoyado en mis estancias en España y al Convenio con la UAM que ha facilitado la realización de esta Tesis*

## ***Dedicatoria:***

**A mi madre, *in Memoriam*,**  
por el amor y ejemplo que dejaste.

**A mi hija,**  
por ser mi mayor estímulo en esta vida.

**A mi padre y hermanos,**  
por apoyarme en todo.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	7
GENERALIDADES	8
CÉLULAS DEL SISTEMA LINFOIDE	9
GANGLIO LINFÁTICO	11
LINFOMAS	15
<i>Clasificación de los Linfomas según la OMS</i>	17
<i>Neoplasias de Células B</i>	18
<i>Neoplasias de Células T</i>	19
<i>Linfoma de Hodking</i>	20
INMUNOGLOBULINAS Y LINFOCITOS B	20
<i>Cadenas Ligeras</i>	22
<i>Cadenas Pesadas</i>	26
<i>Cadenas Ligeras Lambda</i>	33
MADURACIÓN Y DESARROLLO DEL LINFOCITO B	32
<i>Cadenas Ligeras Lambda</i>	37
MOLÉCULAS CD ASOCIADAS A LÍNEAS CELULARES	41
<i>Moléculas CD Expresadas Principalmente en Linfocitos B</i>	42
Molécula CD10	42
Molécula CD19	42
Molécula CD20	42
Molécula CD21	43
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	46
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	48
MATERIAL	49
MÉTODOS	50
<i>Método Inmunohistoquímico</i>	50
<i>Método de Hibridación</i>	51
Materiales	51
Pasos	52
Desproteínización	54
Incubación de la Sonda	55
Lavado de la Sonda	56
Revelado de la Sonda	56

---

<b>RESULTADOS</b>	61
LINFOMAS DE ALTO GRADO	64
LINFOMAS DE BAJO GRADO	67
LEUCEMIAS LINFOCÍTICAS CRÓNICAS	69
ICONOGRAFÍA	73
<i>Linfomas de Alto Grado</i>	74
<i>Linfomas de Bajo Grado</i>	79
<i>Leucemias Linfocíticas Crónicas</i>	83
<b>DISCUSIÓN</b>	87
<b>CONCLUSIONES</b>	104
<b>RESUMEN</b>	107
<b>SUMMARY</b>	109
<b>REFERENCIAS</b>	111

# **INTRODUCCIÓN**

## GENERALIDADES

En el organismo, el tejido linfoide es el encargado de la inmunidad; órganos como el Bazo, Timo, Ganglios linfáticos, Amígdalas palatinas, faríngeas, tonsilares y linguales, al igual que el infiltrado linfoide que se distribuye en la lámina propia de órganos huecos como el tracto respiratorio y digestivo (MALT). Este tejido linfoide para garantizar la defensa se encuentra amplia y estratégicamente ubicado. Además de los órganos las células de este sistema son los linfocitos que se subdividen en T y B, cada uno de ellos especializados para un tipo de inmunidad, pero además hay una población de células que participan interactuando como son las células plasmáticas, macrófagos, células presentadoras de antígenos, etc (13, 57, 61, 76, 125).

El ganglio linfático se encuentra estratégicamente ubicado en el organismo dentro de sus funciones esta; filtrar la linfa, esto lo hace sensible a padecimientos reactivos, pero además se afecta por procesos neoplásicos.

Las neoplasias que ocurren en este sistema principalmente son los linfomas y las leucemias linfocíticas y linfoblásticas (81), por estar íntimamente ligados en su etiología a la célula predominante del tejido linfoide como es el linfocito T o B según sea su expresión. Estas neoplasias de los ganglios linfáticos deben ser distinguidas histopatológicamente de otras enfermedades ganglionares no neoplásicas, incluyendo los procesos linfoproliferativos (105). Los linfomas y las leucemias son Neoplasias malignas caracterizadas por la proliferación de células nativas de los



tejidos linfoides, linfocitos, histiocitos, precursores y células derivadas de ella (37, 54, 92, 99).

Es necesario conocer a fondo y con detalle la histología, la citología y el funcionamiento de los órganos que forman este sistema, para entender la patología tumoral, centraremos el interés y la descripción en el ganglio linfático y en las células que se encuentran en este órgano.

### **CÉLULAS DEL SISTEMA LINFOIDE**

En la médula ósea se da la diferenciación de las diferentes células que formarán los elementos formes en sangre incluyendo los Linfocitos, así se diferencian en series: Serie Linfoide, Serie Mieloide, Serie Eritroide y las Plaquetas.

Las células participantes en la respuesta inmune específica son: linfocitos, macrófagos y células presentadoras de Antígeno, como células dendríticas, células de Langerhans, células NK.

Los linfocitos son de 2 tipos T y B:

**Linfocitos T:** tienen las moléculas TCR (receptores) CD3 (complejo pentamolecular asociado al TCR, es transductor de señales), CD2 (receptor para eritrocitos de carnero). Las células TCD8 y TCD4 constituyen mayormente a las células T, 19-48% las CD8 y de 50-65% las CD4. La mayoría de las CD4 y CD8 portan

receptores TCR con cadenas de alfa y beta, mientras que la minoría es con gamma y delta.

Sub poblaciones de CD4: Th0, Th1, Th2, Th3 y Tr1.

Sub poblaciones de CD8 son: CD8 de tipo 1 y CD8 de tipo 2.

Los CD8 tipo1, tiene actividad citotóxica conocidos como Tc

Los CD8 de tipo2 son reguladores.

CD4 (Th1): hipersensibilidad tardía, respuesta celular.

CD4 (Th2): Cooperación T - B, respuesta humoral.

CD8 (Tc1): citotoxicidad celular.

CD8 (Tc2): regulación.

### **Linfocitos B:**

Las sub poblaciones de células B.

B-1(CD5+IgM) y células B-2 (CD5- IgM).

Los B-2 abundan más y tienen marcadores de memoria.

Los linfocitos B según van madurando expresan o no marcadores moleculares (59, 65, 72).

**Pro Linfocito B**

- No producen Igs
- Expresan CD10 y CD19

**Pre Linfocito B**

- Sintetizan genes para producir Igs citoplasmáticas
- No reconocen ni responden al antígeno

**Linfocitos B inmaduros**

- Reordenan los genes para cadenas ligeras Kappa y Lambda

**Linfocitos B maduros**

- Expresan alguna cadena pesada asociada a cadenas ligeras (IgM, IgD)
- Son capaces de reconocer cualquier antígeno.
- Solo se activan aquellas que poseen receptores distribuidos clonalmente.

**GANGLIO LINFÁTICO**

El ganglio linfático muestra 2 zonas la corteza y la médula cada una presenta características histológicas y citológicas particulares.

La corteza del Ganglio Linfático: muestra agregados linfoides denominados folículos linfoides, que muestran una porción central más clara denominada Centro germinal (CG), y una zona más periférica denominada manto.

Los folículos sin Centro Germinal se denominan Folículos Primarios (FP) y los que presentan Centro Germinal son Folículos Secundarios (FS). Estos folículos son áreas ricas en Linfocitos B(40).

- **Los Folículos Primordiales** están constituidos por Linfocitos B predominantemente maduros y que no han sido estimulados recientemente por Antígenos. Expresan Ig de superficie ( $\lambda$  o  $\kappa$ ) con cadenas pesadas ( $\mu$  o  $\delta$ ).
- **Los Folículos Secundarios** se desarrollan en respuesta a la estimulación antigénica y en ellos los Linfocitos B proliferan y dan origen a una prole de células que producen Anticuerpos con una alta afinidad para los Antígenos.
- **El Centro Germinal** presenta una zona clara y una zona oscura:
- La zona oscura es la zona más cercana al área paracortical, es rica en centroblastos (células grandes).
- La zona clara, está generalmente polarizada hacia el sitio de entrada de Antígenos, como el seno subcapsular y es rica en centrocitos (células pequeñas hendidas), células dendríticas y linfocitos T CD4+ (helper /inductores). Ambas zonas poseen macrófagos con cuerpos tingibles.
- Las células dendríticas foliculares, que residen en los centros germinales, presentan los Antígenos sobre su superficie y su función es la de activar selectivamente los Linfocitos B para que se unan al Antígeno con una alta afinidad.

- Las células del Centro Germinal carecen de expresión de proteína bcl-2 pero si expresan CD10.
- Las células plasmáticas totalmente diferenciadas se desarrollan fuera de los centros germinales y pueden emigrar a otros tejidos fuera del Ganglio Linfático.
- **La zona del manto** está constituida por Linfocitos B de morfología y fenotipo similar a los linfocitos B del folículo primario. Son pequeñas, redondeadas, núcleo irregular, cromatina densa, escaso citoplasma, En contraste con los Linfocitos B del Centro Germinal, éstos expresan inmunoglobulinas de superficie, carecen de cadena J y presentan un bajo índice proliferativo. También expresan CD21, CD32, CD35 y bcl-2 y no expresan CD10 ni CD38. Las células de la zona marginal pueden ser más grandes Son células B y reaccionan con anticuerpo monoclonales (CD20, CD22, CD24) ellos expresan inmunoglobulina IgM e IgD en su superficie y son fosfatasa alcalina positiva, en el centro germinal se encuentran células distintas a linfocitos B (37, 112).

**Paracorteza:** las áreas Parafoliculares o Paracorteza son las situadas entre los folículos de células B y la médula del Ganglio Linfático y están ocupadas predominantemente por Linfocitos T, en su mayoría CD4+. En los Ganglios Linfáticos no estimulados, estas células T tienen la apariencia de Linfocitos pequeños y son citológicamente indistinguibles de los linfocitos B de los Folículos Primordiales o de los de la zona del manto de los Folículos Secundarios.

Cuando se produce la estimulación antigénica, el número de Linfocitos T grandes aumenta y la paracorteza muestra un aspecto moteado al examen con bajos aumentos. Con estimulaciones antigénicas intensas, como ocurre en la infección por el virus de Epstein-Barr, la paracorteza puede contener inmunoblastos B infectados por virus así como un número grande de células T inmunoblásticas reactivas.

También se encuentran vénulas de endotelio alto y células dendríticas interdigitantes (CDI), siendo estas últimas las encargadas de presentar los Antígenos al linfocito T helper nativo iniciando las respuestas de las células T a Antígenos proteicos que se encuentran en el ganglio. Las Células Dendríticas Interdigitantes tienen un núcleo irregular, pálido, vesicular y citoplasma abundante y claro que muestra interdigitaciones con linfocitos T a través de largos procesos citoplásmicos finos. Las Células Dendríticas Interdigitantes tienen un marcado parecido fenotípico con las células presentadoras de Antígenos de la piel (Células. de Langerhans). Derivan de la Médula Ósea, expresan numerosos marcadores mielomonocíticos y expresan una positividad nuclear fuerte para la proteína S-100 (112).

La médula del Ganglio Linfático es la porción más central y próxima al hilio. Los cordones medulares son la porción de la médula ocupada por linfocitos y que corresponden a la porción más central (medular) del componente linfoide del Ganglio Linfático donde predominan los linfocitos B y las células plasmáticas. También se observan senos linfáticos medulares, así como estructuras vasculonerviosas.

## LINFOMAS

Definición de Linfoma: término genérico que designa a un tumor maligno del sistema linfoide y específicamente de los linfocitos y células precursoras, con inmunofenotipo T y B o sus diferentes estadios (54, 99).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los linfomas utilizando características; morfológicas, inmunofenotípicas, genotípicas y clínicas, en cinco grandes categorías, separándolas de acuerdo a la célula de origen en 5 categorías:

1. Precursores de células B neoplasias (tumores de células B maduras)
2. Periféricos de células B neoplasias (tumores de las células B maduras)
3. Precursores de células T neoplasias (tumores de las células T inmaduras)
4. Periféricos neoplasias de células T y células NK (neoplasias de células T maduras y células NK)
5. El linfoma de Hodgkin (neoplasias de células Reed-Sternberg y sus variantes)  
(54, 65, 99).

Estos grupos se encuentran subdivididos en subcategorías, para su diagnóstico estas requieren en la actualidad no solo del diagnóstico histopatológico con preparaciones teñidas con la técnica convencional y de rutina Hematoxilina Eosina, si no de técnicas de biología molecular; PCR, Hibridación in situ e inmunohistoquímica, todo esto para sub clasificarlos e instaurar el tratamiento correcto (14, 25, 30, 33, 106, 109).

A través de la historia Los linfomas no Hodgkin (LNH) han cambiado su clasificación, la evolución de las técnicas de histoquímica, e inmunohistoquímica han promovido el permanente reagrupamiento de los distintos LNH así como la identificación de nuevas entidades creando nuevas clasificaciones.

Las Clasificaciones de los Linfomas No Hodgkin han sufrido en las últimas 4 décadas cambios debidas al desarrollo fundamentalmente inmuno biológico de las patologías tumorales.

Al inicio las clasificaciones eran estrictamente morfológicas, luego se fueron incorporando otras que ya agregaban aspectos funcionales basándose en la identificación, diferenciación y transformación del linfocito desde su célula precursora linfoblastos hasta la forma de linfocitos maduros, como en el caso del linfocito B memoria y célula plasmática. El aporte del estudio inmunofenotípico, de la citogenética y la biología molecular junto con la morfología y la inmunohistoquímica han logrado identificar entidades nosológicas que junto con los aspectos clínicos particulares, definen neoplasias con un perfil evolutivo y respuesta al tratamiento propios (29, 45, 50, 79, 121, 130).

Intentar hoy en día “agrupar” los linfomas en cuanto a grados de malignidad según criterios morfológicos y pronósticos evolutivos, no solo no es recomendable sino que tampoco es reproducible (54, 65, 99).



Hay que conocer más sobre cada uno de los distintos tipos de linfomas Li K,, sus características biológicas y su patrón clínico evolutivo antes de intentar como veníamos acostumbrados, a estratificar morfológicamente amplias franjas de patologías linfoides que ya poco tienen en común, y que han llevado a conclusiones engañosas, también hay que evaluar los trastornos hematológicos que producen los linfomas, así como las enfermedades hematológicas que predisponen o cursan, o evolucionan con el desarrollo de linfomas (39, 101).

Los linfomas corresponden a proliferaciones clonales neoplásicas de células B, T/NK en sus diferentes estadios de diferenciación (10, 102). En muchos casos recapitulan los grados de diferenciación y transformación normal del linfocito, antes o después de la exposición antigénica, con marcadores inmunofenotípicos y alteraciones citogenéticas características (65, 99).

### ***Clasificación de los Linfomas según la OMS***

La clasificación de estas patologías, según la OMS (85), se describe a continuación:

- Neoplasias precursoras de células B.
- Neoplasias de células B periféricas.
- Neoplasias de precursores de células T.
- Neoplasias de T periféricas y células NK.
- Linfoma de Hodgkin.

## ***Neoplasias de Células B***

### **Neoplasias de células precursoras B**

- Leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras

### **Neoplasias de células B maduras**

- Leucemia linfocítica crónica / linfoma de linfocito pequeño
- Leucemia prolinfocítica de células B
- Linfoma linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldenström
- Linfoma de células B de la zona marginal esplénica
- Leucemia de células peludas (hairy cell)

### **Neoplasias de células plasmáticas:**

- Mieloma de células plasmáticas
- Plasmocitoma
- Enfermedades con depósito monoclonal de inmunoglobulinas
- Enfermedades de cadenas pesadas

### **Linfoma de células B de la zona marginal extranodal (Linfomas MALT)**

### **Linfoma de células B de la zona marginal nodal**

- Linfoma folicular
- Linfoma de células del manto

- Linfoma difuso de célula B grande
- Linfoma de célula B grande mediastínico (tímico)
- Linfoma de célula B grande intravascular
- Linfoma primario de los derrames
- Linfoma/leucemia de Burkitt
- Granulomatosis Linfomatoide

### ***Neoplasias de Células T***

#### **Neoplasias de células precursoras T**

- Leucemia/linfoma linfoblástico de células T precursoras

#### **Neoplasias de células T/NK maduras**

- Leucemia prolinfocítica de células T
- Leucemia linfocítica de células T grandes granulares
- Leucemia agresiva de células NK
- Linfoma/leucemia de células T del adulto
- Linfoma de células T/NK extranodal, de tipo nasal
- Linfoma de células T, de tipo enteropático
- Linfoma de células T hepatosplénico
- Linfoma de células T subcutáneo pseudopaniculítico
- Linfoma blástico de células NK
- Micosis fungoides/síndrome de Sézary

**Procesos linfoproliferativos de células T CD30+, primarios cutáneos:**

- Linfoma anaplásico de células grandes, primario cutáneo
- Papulosis Linfomatoide
- Lesiones “borderline”

**Linfoma de células T angioinmunoblástico****Linfoma de células T periféricas, sin especificar****Linfoma anaplásico de células grandes*****Linfoma de Hodking***

- Predominio linfocítico nodular
- Esclerosis nodular
- Celularidad mixta
- Clásico rico en linfocitos
- Depleción linfocítica (4)

**INMUNOGLOBULINAS Y LINFOCITOS B**

Las inmunoglobulinas (anticuerpos) son glicoproteínas del tipo gamma globulina que actúan como anticuerpos. Pueden encontrarse circulando en sangre, en las secreciones o unidas a la superficie de las membranas de los linfocitos B.

Las inmunoglobulinas se producen como respuesta a la detección de moléculas extrañas en nuestro cuerpo. Estas moléculas extrañas desencadenan la producción de anticuerpos se denominan antígenos. La forma anclada se podría llamar inmunoglobulina de superficie o inmunoglobulina de membrana, forma parte del receptor del linfocito B (BCR), permite a este detectar un antígeno específico desencadenando la activación del linfocito B.

El BCR se compone de anticuerpos IgD o IgM unidos a la superficie de membrana y sus heterodímeros asociados Ig- $\alpha$  e Ig- $\beta$  que tienen capacidad de producir la transducción de señal del reconocimiento del anticuerpo a la célula. Un linfocito B humano típico tiene entre 50,000 y 100,000 anticuerpos unidos a su superficie. Tras el acoplamiento del antígeno, éstos se agrupan en grandes parches cuyo diámetro puede exceder de  $1\mu\text{m}$  en balsas lipídicas que aíslan los BCRs (receptores de la célula B) de la mayor parte de los restantes receptores de señalización celular. Estos parches podrían mejorar la eficiencia de la respuesta inmune celular. En los seres humanos, la superficie celular está libre de otras proteínas alrededor de los receptores de los linfocitos B en distancias de algunos miles de angstrom lo cual reduce de tal manera las influencias que compiten con su función, que incluso aísla a los BCRs.

Las inmunoglobulinas son proteínas que actúan como anticuerpos. Ambos términos se usan indistintamente: inmunoglobulinas para expresar estructura y

anticuerpos para expresar función. La estructura básica de las inmunoglobulinas es una unidad formada por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Estas unidades contienen dominios variables y dominios constantes. Los dominios variables de las cadenas L y H son responsables de la unión al antígeno, mientras que las regiones constantes de las cadenas pesadas son responsables de la activación del complemento y de la capacidad de algunas de estas unidades de formar polímeros (20, 65).

### ***Cadenas Ligeras***

En los mamíferos hay dos tipos de cadenas ligeras, llamados lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Una cadena ligera contiene dos dominios sucesivos: un dominio constante y un dominio variable. La longitud aproximada de la cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos. Cada anticuerpo contiene dos cadenas ligeras que son siempre idénticas. Sólo un tipo de cadena ligera,  $\kappa$  o  $\lambda$ , está presente dentro del mismo anticuerpo en mamíferos (94, 95, 115). Otros tipos de cadenas ligeras como la cadena iota ( $\iota$ ), se encuentran en los vertebrados inferiores como los condriictios y teleósteos. En base al tipo de regiones constantes, las cadenas ligeras también se clasifican en dos subclases: Lambda y Kappa. Cada molécula de inmunoglobulina contiene cadenas kappa o cadenas lambda, pero no ambas (24, 82, 83).

Las células B individuales expresan cadenas ligeras kappa o lambda, pero nunca ambas. En una población policlonal, la proporción entre células B que expresan

cadena kappa y células B que expresan cadena lambda es de 2:1, y la aparición de una mezcla de tipos de células portadoras de cadenas ligeras kappa y lambda sugiere policlonalidad y una proliferación reactiva o no neoplásica de células B (20).

Las enfermedades, tales como el mieloma múltiple Dispenzieri A, y el linfoma de células B, se caracterizan por la proliferación de plasmocitos neoplásicos monoclonales, que sólo producen un tipo de cadena ligera. Así, la demostración de una población de células que sólo expresan cadenas kappa o lambda es muy útil para el diagnóstico histopatológico de estas enfermedades (119).

La amiloidosis primaria (amiloidosis de forma AL, o de cadena ligera) es también un trastorno de los plasmocitos en el que la demostración de una cadena ligera kappa o lambda monotípica en los depósitos de amiloide es de importancia diagnóstica, diferenciando esta enfermedad de la amiloidosis secundaria (amiloidosis de forma AA), en la que no se producen depósitos de cadenas ligeras de inmunoglobulinas (69).

El estudio de la expresión de cadenas ligeras Kappa y Lambda en los linfocitos B permite definir patrones de clonalidad. En condiciones normales los linfocitos B maduros de los órganos linfoides expresan de forma excluyente cadena ligera Kappa y cadena ligera Lambda con una relación próxima a 2/1. El conocimiento de esta relación ha permitido definir conceptos como: 1) expansión B policlonal con una relación Kappa/Lambda adecuada como ocurre en las mujeres fumadoras HLA-Dr7+ y con una configuración policlonal del gen que codifica la cadena pesada de la

inmunoglobulina; 2) expansión B con restricción de cadena ligera Kappa o Lambda, como ocurre en los síndromes linfoproliferativos crónicos B (20, 31).

En citometría de flujo se define la restricción de cadena ligera Kappa cuando la relación Kappa/Lambda es igual o superior de 10/1, o restricción de cadena ligera Lambda cuando la relación Lambda/Kappa es superior de 3/1.

Los linfocitos B maduros por definición expresan cadena ligera, kappa o lambda, y por tanto también se considera patológica la ausencia de cadena ligera en linfocitos B circulantes o presentes en los órganos linfoides secundarios. En el estudio inmunofenotípico de médula ósea sí es habitual y normal encontrar células de línea B que no expresan cadenas ligeras (progenitores linfoides B, CD10+ en diferente grado de intensidad) (65).

Además de la definición de línea celular y de la detección de restricción de cadena ligera en el linfocito B y restricción TCR en el linfocito T, la presencia de determinados patrones fenotípicos en un contexto biológico determinado (citología, citogenética y biología molecular) colabora a la clasificación de las diferentes neoplasias hematológicas: por ejemplo la expresión de CD5, CD23, y expresión débil o negativa de CD79b y cadenas ligeras en linfocitos B ciclina D1 negativos es característica de la LLC-B; la expresión de CD5, CD79b, con negatividad de CD23 o expresión heterogénea en linfocitos B generalmente con restricción de cadena ligera Lambda y ciclina D1+ es característica del linfoma de la zona del manto (93, 103, 126).



La expresión de CD11c de alta intensidad, CD25, y CD103 en linfocitos B de mayor complejidad que los linfocitos B maduros normales de sangre periférica es típica de la tricoleucemia; la expresión de CD38 de alta intensidad con sobreexpresión de CD56 y negatividad de CD19 en células de tamaño y complejidad intermedio-alto es característico del mieloma múltiple; la expresión de CD8, CD56, CD57 y CD3 es característica de la leucemia de linfocitos grandes granulares de fenotipo T.

Estudios realizados han demostrado distintas translocaciones del cr.3q27 que expresa el gen bcl-6, estas translocaciones pueden realizarse con los cr.14q32, 2p11, 22q11 lo que une el gen bcl-2 al gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas o al de las cadenas livianas kappa o lambda.

La unión del gen bcl6 a los genes de las cadenas de las inmunoglobulinas bloquearía la maduración de las células B.

Desde el punto de vista pronóstico en un estudio realizado por Lossos et al (73), la sobre expresión del gene bcl-6 se asoció con mejor pronóstico independientemente de puntaje del índice pronóstico internacional. Se estudiaron 22 pacientes con LBDGC al diagnóstico, aquellos que presentaron alta sobre expresión del bcl-6 tuvieron una sobrevida promedio de 171 meses contra solo 24 meses en el grupo que no presentó sobre expresión del gene bcl-6 (73).

## ***Cadenas Pesadas***

Hay cinco tipos de Ig en mamíferos que se nombran por letras griegas:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ . El tipo de cadena pesada presente define la clase del anticuerpo. Estas cadenas se encuentran en los anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM respectivamente. Las distintas cadenas pesadas difieren en tamaño y composición:  $\alpha$  y  $\gamma$  contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que  $\mu$  y  $\epsilon$  poseen aproximadamente 550 aminoácidos

Diferentes isotipos. Las cadenas pesadas  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\delta$  tienen una región constante compuesta de tres dominios estructurales Ig en tándem y una región bisagra para proporcionarle flexibilidad. Las cadenas pesadas  $\mu$  y  $\epsilon$  tienen una región constante compuesta por cuatro dominios inmunoglobulina. La región variable de la cadena pesada difiere en los anticuerpos producidos en los diferentes linfocitos B, pero es lo mismo para todos los anticuerpos producidos por el mismo linfocito B o por su línea clonal. La región variable de cada cadena pesada es de aproximadamente 110 aminoácidos y está compuesto por un único dominio Ig.

Recientemente se ha podido determinar la topología in vivo del gen de la cadena pesada, Igh, siendo este uno de los primeros estudios en este campo. El resultado es que la cromatina se dispone formando giros sucesivos unidos por "linkers", dando lugar a formas similares a una flor. La posición relativa de los

distintos segmentos varía drásticamente a lo largo del desarrollo del linfocito B, permitiendo así un mayor rango de interacciones genómicas (69).

Estas cadenas difieren en el tipo de regiones constantes que cada una tiene; por ejemplo, las cadenas gamma son similares en sus regiones constantes, pero estas son diferentes a las regiones constantes de las otras clases de cadenas pesadas (62, 89).

Las inmunoglobulinas que contienen cadenas gamma se denominan **IgG**. Las moléculas de IgG están formadas por una unidad  $(LH)_2$ . Las Inmunoglobulinas G son las inmunoglobulinas más abundantes en el suero (600-1800 mg/dL). Estas inmunoglobulinas promueven la fagocitosis en el plasma y activan al sistema del complemento. Las IgG son el único tipo de anticuerpos que puede cruzar la placenta.

Las inmunoglobulinas que contienen cadenas alfa se denominan **IgA**. Las IgA se encuentran principalmente en las secreciones mucosas, en las lagrimas, el calostro y la leche materna. Estas inmunoglobulinas son la defensa inicial de las mucosas contra los agentes patógenos. Ellas aparecen usualmente como dímeros de unidades  $(LH)_2$ .

Las **IgM** contienen cadenas pesadas  $\mu$ . Los anticuerpos tipo IgM se expresan en la superficie de los linfocitos B y se encuentran fundamentalmente en el plasma. Estos son los primeros anticuerpos producidos en cantidades significativas contra un antígeno. Las IgM promueven la fagocitosis y activan al sistema del complemento. Aparecen usualmente como pentámeros de unidades  $(LH)_2$  con sus cadenas pesadas unidas por un pequeño péptido.

Las **Ig E** contienen cadenas pesadas tipo épsilon. La IgE, un monómero (LH)<sub>2</sub>, juega un importante papel en las reacciones alérgicas y posiblemente en la defensa contra infestaciones por algunos parásitos intestinales, ya que se encuentra aumentada en esas situaciones.

El papel fisiológico de las **IgD** (inmunoglobulinas con cadena pesada) se desconoce. Reconoce a los antígenos en los linfocitos B que no han sido expuestos. La estructura de las IgD corresponde también a un monómero (LH)<sub>2</sub>.

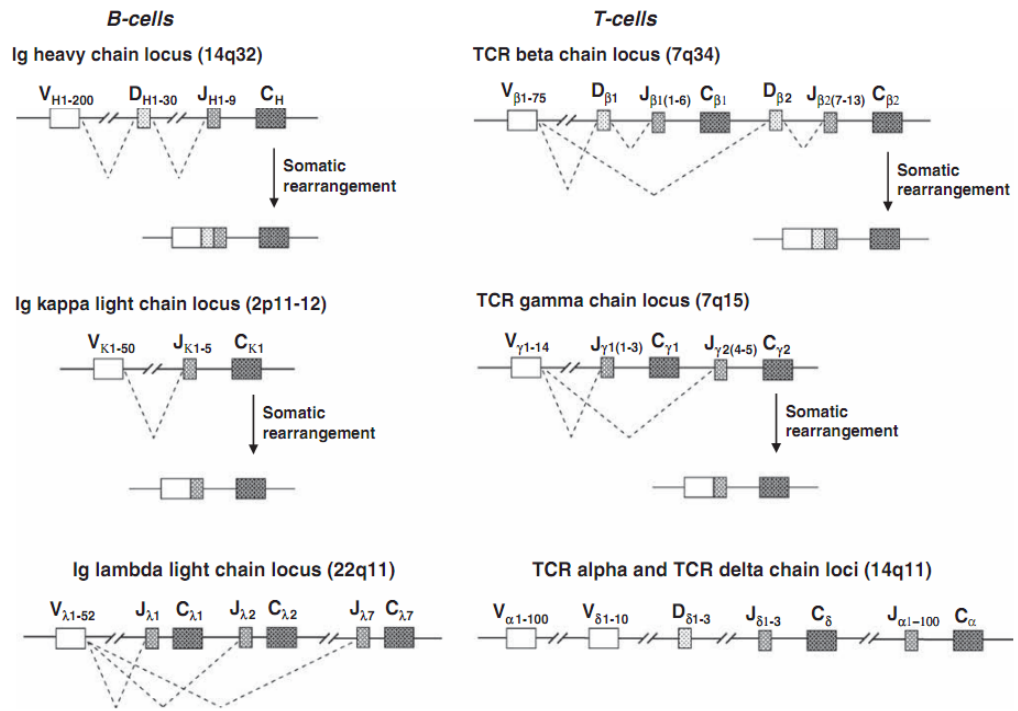
Las deficiencias de subclases de IgG representan posibles alteraciones de la respuesta inmune, aunque en diversos estudios se han demostrado bajas concentraciones en individuos asintomáticos. Se describe un grupo de enfermedades asociadas con niveles aumentados o disminuidos de subclases de IgG, así como las indicaciones para su medición.

Deficiencias de subclases de IgG indican alteraciones de la respuesta inmune, aunque niveles disminuidos de subclases de IgG se han observado en individuos asintomáticos. Diversos estados patológicos están asociados con niveles disminuidos o aumentados de las subclases de IgG.

La demostración de un nivel disminuido de una de las subclases de IgG no ofrece un diagnóstico definitivo, pero debe ser considerado como una indicación de una alteración del sistema inmune, lo que requiere profundizar en la investigación diagnóstica.

Debido a que el proceso de transformación maligna es consecuencia de la expansión clonal de una única célula progenitora, cualquier característica que nos permita identificar esa célula estará presente en todas las que deriven de ella permitiendo así el seguimiento de esta población celular. En el caso de las células linfoides esta característica es la secuencia específica que presenta cada una de ellas en los loci IG y TCR (ambos implicados en el desarrollo de los procesos inmunitarios) una vez reordenados. Durante el proceso de maduración linfoide, los loci IG/TCR llevan a cabo un proceso fisiológico de recombinación y mutación que dará lugar a secuencias de ADN específicas para cada célula. Este proceso es similar en las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de los genes IG y en las cuatro cadenas de los genes TCR (a, b, g, d). La configuración germinal incluiría varias regiones variables (V) distintas y varias regiones de diversidad (D, sólo aplicables en el caso de los loci IGH, TCRb y TCRd), de unión (J) y constantes (C)<sup>3</sup>. Durante el proceso de maduración, una región V se unirá a una D y a una J, produciéndose, además, fenómenos de mutación somática en las zonas de unión de estos segmentos. Esto da lugar a multitud de combinaciones posibles (base de la diversidad inmunológica), formando secuencias de ADN específicas de cada célula linfoide (una especie de huella identificativa). De esta manera, y dado que el proceso tumoral refleja una expansión clonal a partir de una célula progenitora, todas las células tumorales presentarán la misma secuencia a este nivel. Según este esquema, una población linfoide policlonal estaría caracterizada por una población heterogénea en cuanto a sus secuencias V-(D)-J en

estos loci y una población monoclonal (a veces, pero no siempre, asociada a un proceso maligno) estaría caracterizada por una homogeneidad manifestada en la existencia de una secuencia.

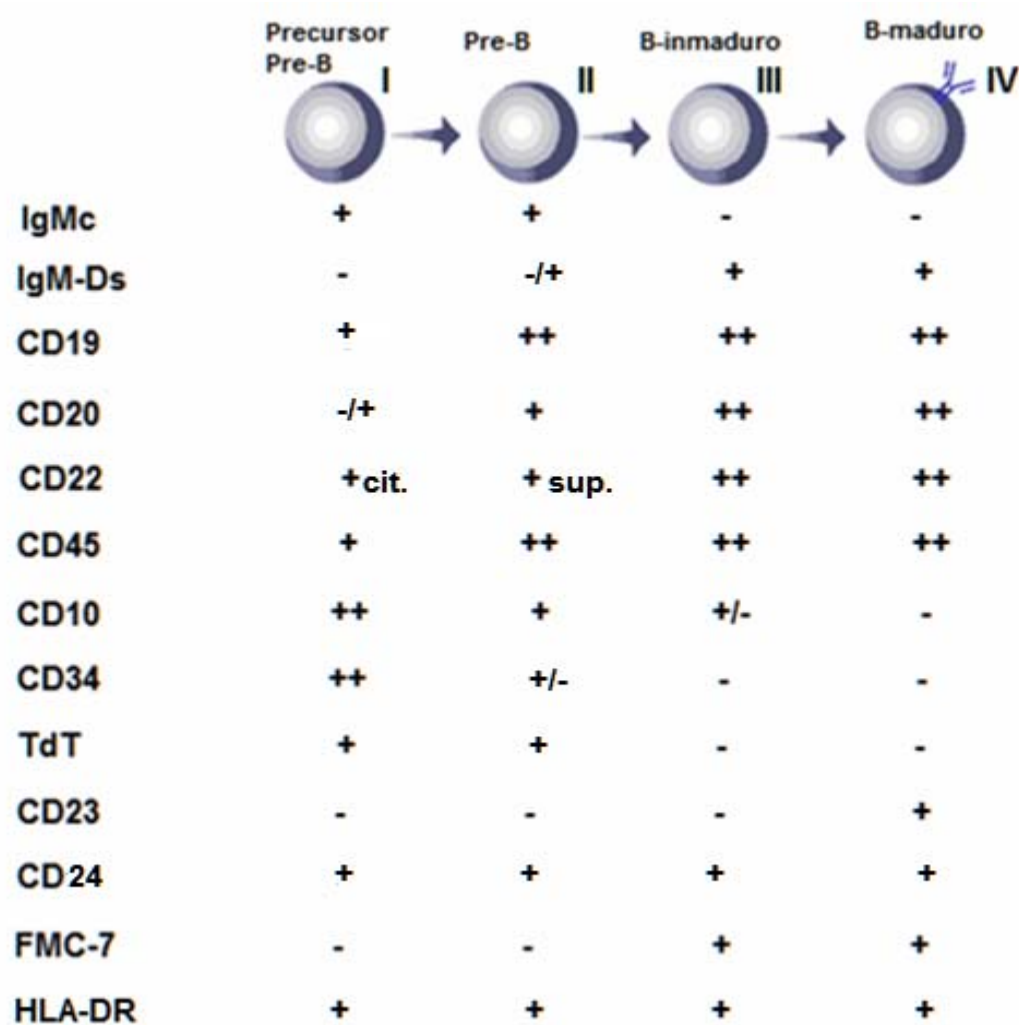


**Figura 1.** Estructura de los genes para evaluar la clonalidad linfocítica.

Según la figura la estructura de los genes para evaluar la clonalidad linfocítica el CIB, IGK, loci IGL se reorganizan en B, las células y los loci TCRB, TCRG y TCRA/TCRD se reorganizan en las células T. Linfoma linfoblástico (23) y en la Leucemia se pueden reorganizar. Cualquiera de estos loci, se expresan en la recombinación (TdT y las recombinaciones Rag) que luego se empalman con una de las 5 regiones constantes (C) durante la transcripción para crear una codificación única transcripción IgM / IgD , IgA, IgG o IgE.

En la Leucemia prolinfocítica (LPL) de origen B (LPL-B), el inmunofenotipo es CD5-; las células malignas expresan además cantidades normales de IgM de superficie (lo que los diferencia de la LLC de células B. Las alteraciones citogenéticas más reportadas han sido la 14q+ y la t (65); también se han identificado anormalidades en el gen p53 en cerca de 50 % de los casos, lo que puede generar fenotipo de resistencia a drogas. Puede tener un curso indolente en algunos casos, pero por lo general se comporta de forma agresiva. Sobre todo las que se han transformado de una LLC.

Aunque los linfomas malignos a veces conservan el fenotipo de superficie de la célula linfoide y particularmente de estadios de diferenciación, esta información es una pequeña consecuencia. Los llamados estadios de diferenciación de los linfomas malignos no predicen su historia natural. Ejemplo la Leucemia linfoide clínicamente más agresiva es la Leucemia de Burkitt, que tiene el fenotipo de una célula B centro folicular madura IgM. Las leucemias llevan en la superficie celular el fenotipo más primitivo de las células ej. pre B son CD 10 +, son menos agresivos y más susceptibles de tratamiento que las más maduras. La fase de diferenciación no refleja la etapa en que la lesión genética dio lugar a la malignidad. El valor principal del fenotipo de superficie celular es ayudar en el diagnóstico diferencial de tumores linfoides, que al microscopio óptico no se pueden diferenciar. Sin embargo, la demostración de que todas las células llevan el mismo isotipo de inmunoglobulina de la cadena sugiere que la masa es una proliferación clonal en lugar de una policlonal (72).



**Figura 2.** Expresión de marcadores durante la ontogénesis normal de células B.

## MADURACIÓN Y DESARROLLO DEL LINFOCITO B

La célula más precoz ya diferenciada hacia la estirpe B de la médula ósea es el linfocito pro-B. Los linfocitos pro-B no poseen inmunoglobulinas de superficie, sin embargo inician el reordenamiento (re arreglo DH-JH) del ADN de gen de la cadena pesada  $\mu$  gracias a que en este estadio se expresan por primera vez las proteínas RAG. Los linfocitos pro-B pueden ser identificados mediante inmunofenotipo, ya que



estas células expresan CD34, HLADR, CD10, CD19, CD24 y la enzima TdT . Si el reordenamiento es productivo se expresa la cadena pesada de la inmunoglobulina  $\mu$  en el citoplasma del linfocito como resultado de un reordenamiento VH-DH-JH productivo, denominándose entonces linfocito pre-B. En el estadio de linfocito pre-B existe todavía TdT y los antígenos CD10 y CD19, pero se pierde el antígeno CD34.

Algunas de las cadenas pesadas  $\mu$  de los linfocitos pre-B se asocian a un grupo de proteínas denominadas cadenas ligeras subrogadas que son estructuralmente homólogas a las cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$  pero invariables (es decir, son idénticas en todos los linfocitos B). Los complejos formados por  $\mu$  y las cadenas intermedias denominados receptores de linfocitos pre-B(pre-BCR) se expresan en poca cantidad en la superficie. Los pre-BCR productivos inhiben de forma irreversible el reordenamiento del locus de la cadena pesada del otro cromosoma. Si el primer reordenamiento no es productivo debido a las deleciones o cambios del marco de lectura, los genes del segundo cromosoma alélico pueden reordenarse asegurando que un linfocito B solo posea un reordenamiento productivo (exclusión alélica). Si ninguno de los dos reordenamientos es productivo el linfocito B muere por apoptosis. Los receptores pre-BCR se asocian a otras proteínas conocidas como  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  que actúan en la transducción de señales del receptor del linfocito B. Las señales transmitidas por el pre-BCR estimulan el reordenamiento de las cadenas ligeras. Las enzimas RAG reordenan (rearreglo V) inicialmente los genes de cadenas ligeras  $\kappa$ , si

no son productivos ninguno de los dos alelos se inicia el reordenamiento de las cadenas ligera  $\lambda$ .

En el humano la proporción  $\kappa/\lambda$  en la inmunoglobulina de superficie de los linfocitos B maduros es 1.5:1. Cuando se produce un re arreglo productivo y se produce la cadena ligera, ésta se asocia con la cadena pesada  $\mu$  sintetizada previamente para formar el receptor IgM. Cuando los linfocitos expresan el receptor de linfocito B IgM se denominan linfocitos inmaduros. Los linfocitos B inmaduros expresan los marcadores CD20, CD21, CD22, CD24 y CD40 e IgM de L -J L superficie pero disminuyen el nivel de CD10 y pierden el TdT. En ratones, se ha demostrado recientemente que los linfocitos B inmaduros que reconocen autoantígenos con alta afinidad en la médula ósea por medio de su receptor IgM no generan suficientes receptores de membrana para pasar al siguiente estadio madurativo (por ejemplo endocitando sus receptores inmediatamente cuando se expresan en la superficie) . Esto genera la re expresión de los genes RAG, promoviendo la edición del receptor (cambio de isotipo de la cadena ligera) para intentar cambiar su afinidad, y además sufren un proceso de des diferenciación (“back differentiation”) hacia estadios más primitivos como células pre-B o pro-B, reexpresando genes de estadios iniciales de diferenciación. El siguiente estadio madurativo es el de linfocito B maduro, en el que además de IgM de superficie se expresa la IgD .

Los linfocitos B maduros (IgM + IgD) salen de la médula ósea y migran hacia el bazo, donde continúan su maduración hasta convertirse en linfocitos B maduros vírgenes +. Los linfocitos B que salen de la médula y entran inicialmente en el bazo reciben el nombre de linfocitos B transicionales (T1). Los linfocitos T1 (IgM high , IgD low , CD21 ) deben pasar por un proceso de selección . Los linfocitos T1 que responden potentemente contra autoantígenos derivados del torrente sanguíneo son eliminados (selección negativa). Los linfocitos T1 que sobreviven se convierten en linfocitos T2 (IgM high , IgD high , CD21 high low , CD23. Los linfocitos T2 son rescatados si son capaces de reconocer antígenos con baja afinidad (selección positiva) . Los linfocitos T2 que no son capaces de reconocer antígenos mueren por apoptosis, CD23 + ). En humanos se ha detectado una población de linfocitos B transicionales o que han salido recientemente de la médula ósea que expresan el fenotipo CD10 + CD24 high CD38 high IgM high Bcl-2 negativo . Algunos linfocitos B maduros pueden expresar RAG y se asocian con la expresión de CD5 . Como resultado de esta selección solo del 1 al 3% de los linfocitos transicionales esplénicos se convierten en células maduras vírgenes.

Las células maduras vírgenes (“naive”) se dividen en dos grandes grupos de linfocitos B negativos para CD10: los linfocitos B marginales (IgM high , IgD low , CD21) y los linfocitos B foliculares (IgM high , IgD int, CD21) . Una vez que se completa este proceso de maduración, los linfocitos B recirculan y se localizan en los ganglios linfáticos, las placas de Peyer, el bazo y los tejidos linfoides asociados a mucosas

formando folículos. En general, los folículos se forman para responder a los antígenos dependientes de linfocitos T, por lo que requieren de la activación y cooperación de los linfocitos T. El bazo (pero no los ganglios linfáticos) contiene una zona marginal en el límite de la pulpa blanca en donde se localizan linfocitos B, macrófagos y células dendríticas, formando una región especializada en respuestas a antígenos independientes de células T. Los linfocitos B de la zona marginal esplénica pueden reconocer antígenos y convertirse en linfocitos B de memoria IgM + CD27. Los linfocitos B marginales se consideran la primera línea de defensa, y secretan principalmente IgM de baja afinidad contra antígenos bacterianos y contra autoantígenos (autoanticuerpos naturales). El papel de estos autoanticuerpos naturales es limpiar los autoantígenos de las células apoptóticas y transportarlos a la médula ósea para favorecer la tolerancia, o eliminar antígenos extraños que puedan desencadenar alteraciones (CD23 + ), enfermedades autoinmunes por mecanismos de mimetismo molecular. Un dato muy interesante es que los linfocitos B de la zona marginal pueden transportar antígenos hacia los folículos linfoides y depositarlos en las células dendríticas para que estas a su vez estimulen a linfocitos B foliculares. También se ha demostrado que los linfocitos B de la zona marginal esplénica juegan un papel importante en la defensa contra infecciones bacterianas y lipopolisacáridos (73, 87, 116).

### ***Cadenas ligeras Lambda***

Todas las inmunoglobulinas (Igs) comparten la misma estructura de cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas y dos ligeras. Los dos tipos existentes de cadenas ligeras (Kappa y Lambda) tienen un peso molecular de 22.5 kilo Dalton. Ambas cadenas ligeras tienen una región constante y una variable y pueden ser fácilmente distinguibles por las propiedades antigénicas de su región constante.

La expresión en tejidos normales: Como en el resto de las fracciones de Igs, la demostración de cadenas ligeras Lambda puede ser difícil por la existencia la gran cantidad de inmunoglobulinas presentes en el suero, que son causantes del fondo en la inmunotinción (28).

Las Igs son producidas por los linfocitos B maduros desde su estadio de linfocito pequeño virgen, a lo largo de todas sus fases de activación hasta la de célula plasmática, pero la cantidad de Igs en diferentes linfocitos B puede variar considerablemente. Los linfocitos no estimulados, vírgenes, contienen solo pequeñas cantidades de cadenas pesadas mu. Durante la maduración de los linfocitos en la zona del manto expresan IgM en la superficie y también IgD. Cuando las células se activan y se transforman en células plasmáticas, son capaces de acumular en el citoplasma y de secretar Igs, mientras que la expresión de membrana se pierde (52).

Las células plasmáticas producen un exceso de cadenas ligeras, que normalmente se secretan sin unirse a otras moléculas. La mayoría de las células B

activadas producen IgM, pero alrededor de un 10% acumulan y secretan otro tipo de Ig, principalmente IgG o IgA (113).

Las moléculas de Ig que contienen cadenas Kappa son ligeramente más frecuentes que las que contienen Lambda. Expresión en Neoplasias: Mientras que las proliferaciones reactivas de linfocitos B están compuestas por un número casi igual de células que producen cadenas ligeras Kappa o Lambda, las proliferaciones neoplásicas de linfocitos B muestran restricción de cadenas ligeras, es decir, son monoclonales, produciendo sólo cadenas Kappa o Lambda. Por lo tanto, la demostración de cadenas ligeras es un procedimiento muy importante en el diagnóstico de neoplasias de linfocitos B (linfomas y leucemias). La cantidad de Igs producida por cada linfocito suele ser pequeña, por lo que es necesaria una técnica de detección muy sensible (48, 52).

En las proliferaciones neoplásicas de células plasmáticas es mucho más fácil demostrar monoclonalidad, puesto que la cantidad de Igs acumuladas en su citoplasma es enorme y la técnica de detección no precisa tener una alta sensibilidad (113).

Utilidad: El marcador individual más importante de neoplasia de linfocitos B es la restricción de cadenas ligeras. La caracterización de plasmacitomas/mieloma múltiple exige demostrar también el perfil de restricción de cadenas pesadas y

ligeras. Sin embargo, debemos tener en cuenta que las neoplasias de precursores B no expresan Igs.

En algunas investigaciones realizadas y controles de calidad, El principal problema detectado ha sido la escasa sensibilidad de la técnica de visualización para cadenas e Igs, con una intensidad de la tinción o número de células inmunorreactivas inferior al esperable. La excesiva tinción de fondo ha sido un problema menor, ya que su intensidad no impide, en general, la interpretación de la técnica. Problemas menos frecuentes, han sido los artefactos técnicos generales y los debidos a un exceso de pretratamiento (9).

Se ha considerado en controles de calidad, los criterios para considerar óptima una tinción para Cadenas Ligeras Lambda son (3):

- Tinción fuerte y definida del 50% de las células B normales del manto.
- Fuerte tinción citoplasmática en las células plasmáticas
- Débil fondo general

El linfocito B experimenta cambios importantes en las estructuras linfáticas periféricas. Activa el mecanismo para acoplar cadenas pesadas y ligeras y sintetizar las primeras inmunoglobulinas (IgD e IgM) que quedan localizadas en el citoplasma o en la membrana celular donde actúan como receptores para los antígenos. Y experimenta mutaciones somáticas como respuesta a estímulos antigénicos; lo que genera una gran diversidad de moléculas-anticuerpo. Finalmente, controla los

reagrupamientos en las regiones constantes de las inmunoglobulinas para seleccionar el anticuerpo adecuado a cada situación. Así se configuran los cinco tipos de anticuerpos (IgD, IgM, IgG, IgA e IgE; algunos con varios subtipos) que se relacionan con efectores específicos (124).

Pero necesita dar un paso más para convertirse en célula plasmática, secretora de anticuerpos. Necesita desarrollar el mecanismo que permita la secreción de la inmunoglobulina adecuada a la respuesta antigénica. Las células de los linfomas secretores mantienen activo este mecanismo que funciona de forma autónoma. Además, presentan distintos tipos de fallos en el acoplamiento de las cadenas (129) y pueden afectar a:

- Moléculas completas de una determinada inmunoglobulina.
- Cadenas ligeras o pesadas.
- Fragmentos de esas cadenas

Los linfomas al derivar de células linfoides que se encuentran en distintas etapas de su desarrollo en órganos linfoides secundarios y que conservan las características biológicas de su contraparte celular normal. El análisis molecular de los genes de las inmunoglobulinas o del RCT permite determinar errores en la recombinación de distintos segmentos de estos genes que pueden causar translocaciones cromosómicas aberrantes y, que por lo general, se encuentran yuxtapuestas a una variedad de oncogenes. De este modo, se pudo establecer el origen de la célula



linfomatosa, y por lo tanto de los distintos tipos de linfomas B, en términos de su ubicación pre centro germinal, centro germinal o post centro germinal (18, 21, 26, 38).

Es importante determinar la estirpe celular y por eso se realizan diversos estudios de biología molecular entre ellos la determinación de los CD.

### **MOLÉCULAS CD ASOCIADAS A LÍNEAS CELULARES**

Una de las utilidades de las moléculas CD ha sido el reconocimiento del linaje celular y el estadio madurativo de las células hematopoyéticas, particularmente de los leucocitos. Así por ejemplo el antígeno CD3 identifica a los LT, CD20 a los LB, CD66 de los granulocitos y CD61 a las plaquetas. sin embargo la mayoría de los antígenos son expresados en diferente cantidad por varios tipos de células para la identificación de algunos tipos celulares se requiere la identificación de 2 o más antígenos, lo que actualmente se realiza por citometría de flujo (3, 53).

Hay moléculas CD asociados a la ontogenia de las células B y T. En el estudio de las leucemias agudas, linfomas e inmunodeficiencias es particularmente importante conocer la línea celular afectada (4, 108). Además de las moléculas CD asociadas, preferentemente a ciertas líneas en particular, se han identificado moléculas CD asociadas a la activación de Linfocitos B, Linfocitos T y plaquetas.

## ***Moléculas CD Expresadas Principalmente en Linfocitos B***

### **Molécula CD10**

La molécula CD10, también conocida como CALLA ("common acute lymphocytic leukemia antigen") tiene un peso molecular de 10 kDa y es miembro de una familia de peptidasas de superficie celular.

### **Molécula CD19**

La molécula CD 19 es una glicoproteína de transmembrana tipo I de 95 kDa (reducida). Es miembro (reducida). Es miembro de la SFlg, los dominios extracelulares que presentan son del tipo inmunoglobulinas. Su expresión está restringida a las células B normales y neoplásicos. Se expresa desde el estadio de célula pre-B a célula plasmática. Se asocia no covalentemente con CD21, CD81, y Leu - 3, formando un complejo que en forma independiente del BCR participa en la traducción de señales.

### **Molécula CD20**

La molécula CD20 se encuentra en todas las células B y en algunos precursores de LT. Es una fosfoproteína que se expresa en tres isoformas (33, 35 y 37 kDa) como consecuencia de una diferente fosforilación de las serina y treoninas existentes en los extremos de la molécula. Esta molécula presenta cuatro dominios transmembrana y los extremos amino y carboxilo se encuentran en el citoplasma. A pesar de su disposición en la membrana, esta molécula no integra la familia "tetra - spans". Su estructura sugiere que podría actuar como canal iónico, particularmente de  $Ca^{2+}$ .

## **Molécula CD21**

La molécula CD21 se expresa en una sub población de células B. Es una glicoproteína de transmembrana tipo I (140 kDa) que presenta 15 ó 16 dominios de 60 - 70 aminoácidos (extracelular), seguido por un dominio de transmembrana y 34 aminoácidos intra citoplasmáticos.

La molécula CD21 es el receptor de los fragmentos C3d (CR2), C3dg e iC3b del complemento. A través de un dominio de unión diferente actúa como receptor del virus Epstein - Barr. Es miembro de la familia génica de reguladores de la activación del complemento integrada también por las moléculas CD35, CD46 y CD55. También participa como ligando de CD23. Junto con CD19, CD81y Leu-3, forma parte de un complejo que traduce señales al interior de los LB.

En patología linfoides se puedan dar dificultades para llegar a un diagnóstico definitivo esto ocurre entre el 5 y el 10 %. Cuando los datos de inmunofenotipado no son suficientes, se pueden utilizar otros métodos adicionales, tales como el estudio de monoclonalidad mediante técnicas de biología molecular. La gran mayoría de las patologías linfoides (>98%) contiene reordenamientos idénticos (clonales) en los genes de inmunoglobulinas (IGH) (clonalidad linfoide B) y/o en los del receptor de células T (TCR) (clonalidad linfoide T). Los estudios de monoclonalidad mediante técnicas de biología molecular son útiles para confirmar el diagnóstico por ejemplo en:

- Cualquier sospecha de proliferación de células B, cuando la morfología y el inmunofenotipado no son concluyentes.
- Cualquier sospecha de proliferación de células T.
- Evaluación de la relación clonal entre dos patologías linfoides en un paciente, o discriminación entre una recidiva y una segunda patología.
- Linfoproliferaciones en pacientes inmunodeficientes, incluyendo pacientes postransplantados.
- Ocasionalmente, para conocer el estadio de un linfoma.

Generalmente se realiza estudio con PCR:

Para la determinación de monoclonalidad B se estudia el reordenamiento del gen de las cadena pesadas de inmunoglobulinas (IGH). Según estudios recientes, con este método se detecta la monoclonalidad en el 100% de los casos de linfoma de células del manto, leucemia linfoide crónica y linfoma marginal de zona nodal; y entre el 75 y 85% de los casos de linfoma folicular, linfoma de zona marginal extranodal y linfoma de células B grandes difuso (7, 34, 43, 96). También se puede estudiar el reordenamiento de los genes IGK e IGL, que ayudan a detectar la monoclonalidad en algunas ocasiones.

Para la determinación de la monoclonalidad T se estudia si existe reordenamiento monoclonal del gen del receptor gamma de células T (TCRG). Debido

a que el repertorio de reordenamientos de estos genes mucho más reducido que el de los genes IGH, en ocasiones se pueden producir falsos positivos con esta técnica.

También por PCR se puede determinar la presencia de las translocaciones t, que consiste en el reordenamiento BCL2/IGH, y la t (80) con el reordenamiento BCL1/IGH, características del linfoma folicular y del linfoma del manto respectivamente. Estas translocaciones específicas son buenos marcadores de monoclonalidad y de estudio de enfermedad mínima residual. se ha podido detectar la translocación BCL2/IGH en aproximadamente el 60% de los casos de linfoma folicular y <20% de los casos de linfoma B difuso de célula grande, y la translocación BCL1/IGH en aproximadamente el 50% de los casos de linfoma del manto (80).

La determinación de monoclonalidad mediante técnicas de biología molecular (74) puede ser una opción a considerar en casos de duda para confirmación de diagnóstico. La sensibilidad teórica de la técnica es de al menos  $10^{-2}$  para los estudios de monoclonalidad y de entre  $3 \times 10^{-2}$  y  $10^{-3}$  para la detección de las translocaciones BCL1/IGH y BCL2/IGH (80). Estos datos han de ser tenidos en cuenta si se solicita el estudio para determinar extensión en médula ósea o para determinar presencia de enfermedad mínima residual.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPOTESIS**

Los linfomas de bajo y alto grado al igual que las Leucemias linfocíticas crónicas expresan una disposición diferente a la normal de las cadenas livianas lambda y Kappa así como a las cadenas pesadas alfa, gamma, delta y miu.

## **OBJETIVOS**

**Primero.** El presente estudio pretende, identificar la expresión de cadenas ligeras Lambda y Kappa por inmunohistoquímica e Hibridación in situ.

**Segundo.** Determinar la presencia de las cadenas pesadas; alfa, gamma, delta y Miu, por método de Inmunohistoquímica en linfomas foliculares de bajo y alto grado, así como en Leucemias Linfocíticas crónicas.

**Tercero.** Correlacionar la expresión de estas cadenas ligeras y pesadas en los diferentes tipos de linfoma de bajo y alto grado, así como en leucemias linfocíticas crónicas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **MATERIAL**

En el presente estudio se utilizó un material constituido por bloques de parafina fijados en formol procedentes del archivo de Anatomía patológica del Hospital la Paz en Madrid España, correspondientes a Linfomas de bajo y alto grado y de Leucemias linfocíticas crónicas. Se analizó cada caso, que ya tenían diagnóstico e inmunohistoquímica posteriormente se realizó inmunohistoquímica para revelar cadenas livianas Lambda y Kappa. cadenas pesadas alfa, gamma, delta y miu; así como la Hibridación in situ para cadenas Kappa y Lambda.

Se analizaron 33 casos distribuidos de la siguiente manera:

- 11 linfomas de bajo grado.
- 11 linfomas de alto grado
- 11 LLC.

La selección de los casos fue al azar, se tomaron los casos que tuviesen; diagnóstico de linfoma B de alto grado, Linfoma B de bajo grado y LLC y que tuviesen análisis de inmunohistoquímica, que hubiese tejido en el bloque de parafina, para realizar los análisis posteriores y que el tejido fuese de origen ganglio linfático. Se excluyeron los que tenían tejidos diferente a ganglio linfático o que no tuviese el bloque cantidad de tejido para realizar los análisis posteriores.

## MÉTODOS

Los bloques que se usaron para el estudio presentaban diagnóstico histológico y se las había realizado inmunohistoquímica, para su tipificación, se revisaron los archivos, que tuviesen los datos, luego se procedió a realizar la tinción de inmunohistoquímica siguiendo el protocolo para cadenas ligeras.

### ***Método Inmunohistoquímico***

- Tejido fijados en formol tamponado é incluidos en parafina
- Cortes a tres micras en micrótopo y extendidos en baño termostático a 46º colocados en cristales comercializados (Dako)
- Cortes se colocan en estufa a 56 grados durante una hora.
- Kapa y Lambda, Desparifinación y recuperación antigénica en Dako PT Link.: 20 minutos a 95 grados, Flex TRS Low
- Tinción de los cortes en Dako Autostainer Plus
- Solución tampón .: (Was Buffer10X 0.05% Tween20, pH7.6) empapado de los cortes
- 100uL Envision Flex Peroxidase blocking,15 minutos
- Solución tampón, 10 minutos
- Ac primario. 20 minutos
- Solución tampón aclarado
- Envision Flex/HRP. 20 minutos

- Solución tampón .5 minutos
- Solucion tampón 5 minutos
- 200uL substrate working solution, 10 minutos
- Solución tampón .5 minutos
- Solución tampón .5 minutos
- Envision Flex hematoxylin, 5minutos
- Solución tampón .5 minutos
- H2O destilada pases en alcohol de 70%, 96% Y XILOL
- Montar con DPX (32).

### ***Método de Hibridación***

Todos los bloques utilizados en el presente estudio fueron fijados por inmersión en formol tamponado al 10 %. Todas las muestras fueron incluidas en parafina mediante la técnica utilizada en el hospital.

A cada caso se le realiza hibridación utilizando el siguiente protocolo:

### **Protocolo de Hibridación (Protocolo Cenbimo) (37):**

#### **Materiales:**

- Histosondas
- Proteína K
- Anticuerpo primario antidigoxina

- PBS pH 7.4
- Solución que bloquea la peroxidasa (0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en Metanol)
- Anticuerpo secundario Anti-ratón/conejo HRP/sistema de revelación DAB
- Hematoxilina
- Cestillas para los portaobjetos
- Cubetas de 250 ml para lavado
- Cámaras individuales de hibridación o una cámara húmeda
- Estufa de 62°C
- Xilol
- Entellan y cubre objetos
- Proteínas K 30µg/ml en PBS
- Anticuerpo primario Anti-digoxigenina o Anti-Digoxina.
- Portaobjetos silanizados.
- Pipeta Pasteur

**Pasos:**

- Cortar los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina a un espesor de 4 a 6 µm, los portaobjetos deben estar silanizados.
- Desparafinar el tejido.

- Bloqueo para peroxidasa endógena. Solución de inhibición mezclando en proporción 90/10 metanol y agua oxigenada para una concentración final de 0.3 % (25 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % en 225 ml de metanol).
- Añadir 65 µl de agua destilada al vial que contiene la histosonda, mezclar brevemente por vortex y centrifugar el vial según sea necesario. Si permanece un precipitado en la solución, introduzca el vial en una estufa a 62°C durante 15 minutos para disolverlo.
- Poner los portaobjetos en una placa caliente horizontal a 62°C o bien introduzca los portaobjetos en una cestilla dentro de una estufa a 62°C durante 10 minutos
- Sumerja los portaobjetos en las siguientes soluciones:
  - Xileno 10 minutos
  - Xileno 5 minutos
  - Alcohol absoluto (etanol o isopropanol) 1 minuto
  - Alcohol absoluto (etanol o isopropanol) 1 minuto
  - Alcohol 96 % 1 minuto
  - Alcohol 96 % 1 minuto
  - Alcohol 96 % 1 minuto
- Introduzca los portaobjetos en una solución de inhibición de la peroxidasa endógena durante 5 minutos.

- Lavar con agua, durante 30 ó 60 segundos y agitando los portaobjetos para lavarlos bien. Una vez lavados, déjelos en una cubeta con agua destilada durante un minuto.
- Inhibición de la unión inespecífica al ADN (paso opcional)
- Si el tejido a hibridar tiene gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares o de eosinófilos se debe poner la muestra a ebullición en agua destilada después de bloquear la peroxidasa y antes de la desproteización. Esto para prevenir que los eosinófilos se una de forma inespecífica al ADN.
- Colocar los porta objetos en una cubeta con 200 ml de agua destilada en un horno microondas hasta que el líquido hierva de manera uniforme. Como alternativa también puede introducir agua hirviendo durante 30 minutos.
- Retire los portaobjetos enseguida y llévelos a otra cubeta con agua a temperatura ambiente

Nota: este proceso tarda de 2 a 3 minutos en microondas a 800W.

### **Desproteización**

- Liberar al ARN de las proteínas y ribonucleoproteínas (ribosomas) que lo envuelven y que impedirían la unión de la sonda con su Diana.
- Retire los cristales del agua destilada y deje que se sequen al aire (aproximadamente 5 minutos)

- Cubra el tejido con la solución de proteína K durante 10 minutos exactos a temperatura ambiente. (en cámara húmeda)
- Lave con agua. No es necesario aplicar un inhibidor de enzimas.
- Introduzca los portaobjetos en una cubeta con PBS y manténgalos allí durante por lo menos 2 minutos.
- Observación: Si los cristales han recibido previamente calor en microondas utilizar la proteína K solo 5 minutos ya que el tratamiento térmico sensibiliza bastante los tejidos a esta enzima.
- Si los resultados son débiles prolongar el tiempo de incubación con la proteína K.

### **Incubación de la Sonda**

- Secar los bordes de los portaobjetos con un pañuelo de papel teniendo la precaución de no tocar el corte.
- Coloque cámara de hibridación individual alrededor del tejido asegurándose de que queda bien adherida al portaobjetos.
- Gotee los 65  $\mu$ l de la sonda dentro de la cámara de hibridación a lo largo de su borde inferior.
- Coloque el cubreobjetos de plástico sobre la cámara de hibridación evitando que queden burbujas y asegurándose de que queda perfectamente sellado alrededor del marco.

- Coloque los portaobjetos en posición horizontal dentro de una estufa o sobre una placa caliente a 62°C durante 30 ó 60 minutos. Retire el cubreobjetos de plástico y el marco de hibridación antes de lavar la sonda.

**En camara humeda:**

- Secar los portaobjetos con cuidado alrededor del corte y añada los 65 µl de la sonda, asegurándose de que cubre totalmente el tejido y evitando que queden burbujas.
- Coloque los portaobjetos en posición horizontal en una cámara húmeda, ciérrela bien e introdúzcala en una estufa a 62°C durante 30 - 60 minutos

**Lavado de la Sonda:**

- Con una pipeta Pasteur, gotee vigorosamente PBS sobre la superficie de corte para eliminar la Sonda, con cuidado de no dañar o eliminar el tejido.
- Agite los portaobjetos de PBS durante 5 minutos, tanto manualmente como usando algún tipo de agitador.
- Si se usa formamida no se necesita ningún tipo de lavado especial.

**Revelado de la Sonda:** Se visualiza la digoxienzima utilizada como marcador del ADN de la Sonda. Se hace Manuel o automático con un sistema de inmunohistoquímica.

**Manual:**

- Secar los bordes del tejido con un pañuelo de papel, teniendo cuidado de no tocar el tejido y de mantenerlo siempre húmedo.



- Gotee el anticuerpo primario Antidigoxigenina o Antidigoxina sobre el corte e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se recomienda usar cámara húmeda en este paso para evitar que seque el tejido.
- Usando la pipeta Pasteur, lave vigorosamente con PBS y luego agite durante un minuto en PBS.
- Seque los bordes del tejido con un pañuelo de papel.
- Incube con el polímero comercial antiratón/conejo (marcados con peroxidasa) durante 20 ó 30 minutos a temperatura ambiente. Se recomienda una vez más el uso de una cámara húmeda para este paso.
- Lave el corte vigorosamente con PBS y después agite en PBS durante 1 minuto, tal y como se describió anteriormente.
- Seque el corte por los bordes y aplique la diaminobenzidina comercial que usted utilice siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Lave bien con agua.
- Tiña el corte brevemente (2-3 segundos) con hematoxilina. Tomar en cuenta que los cortes desproteinizados se vuelven muy sensibles a este colorante.
- Lavar con agua, deshidratar y montar el portaobjeto con un cubreobjetos según.

Los bloques que se usaron para el estudio presentaban diagnóstico histológico y se las había realizado inmunohistoquímica, se procedió a realizar la tinción de inmunohistoquímica siguiendo el **protocolo para cadenas pesadas**:

- Tejido fijados en formol tamponado é incluidos en parafina
- Cortes a tres micras en micrótopo y extendidos en baño termostático a 46º colocados en cristales comercializados (Dako)
- Cortes se colocan en estufa a 56 grados durante una hora.
- IgA, IgM, IgG; Desparifinación y recuperación antigénica en Dako PT Link.: 20 minutos a 95 grados, Flex TRS High
- IgD Desparifinación y recuperación antigénica en Dako PT Link.: 20 minutos a 95 grados, Flex TRS low
- Tinción de los cortes en Dako Autostainer Plus
- Solución tampón .: (Was Buffer10X 0.05% Tween20, pH7.6) empapado de los cortes
- 100uL Envision Flex Peroxidase blocking,15 minutos
- Solución tampón, 10 minutos
- Ac primario. 20 minutos
- Solución tampón aclarado
- Envision Flex/HRP. 20 minutos
- Solución tampón .5 minutos
- Solucion tampón 5 minutos
- 200uL substrate working solution, 10 minutos
- Solución tampón .5 minutos
- Solución tampón .5 minutos

- Envision Flex hematoxylin, 5 minutos
- Solución tampón .5 minutos
- H2O destilada pases en alcohol de 70%, 96% Y XILOL
- Montar con DPX

Los casos se revisaron y analizaron anotando en la base de datos los resultados para su análisis posterior.

Los datos obtenidos de los casos se anotaron en la base de datos para su posterior análisis.

En el caso de la inmunohistoquímica se reportó la positividad de la siguiente manera:

- + si la positividad era del 30 %.
- ++ entre 31 y 60 %.
- +++ más del 60 %.

En el caso de la Hibridación in situ se anotó positivo (+) o Negativo (-) según identificación de resultados.

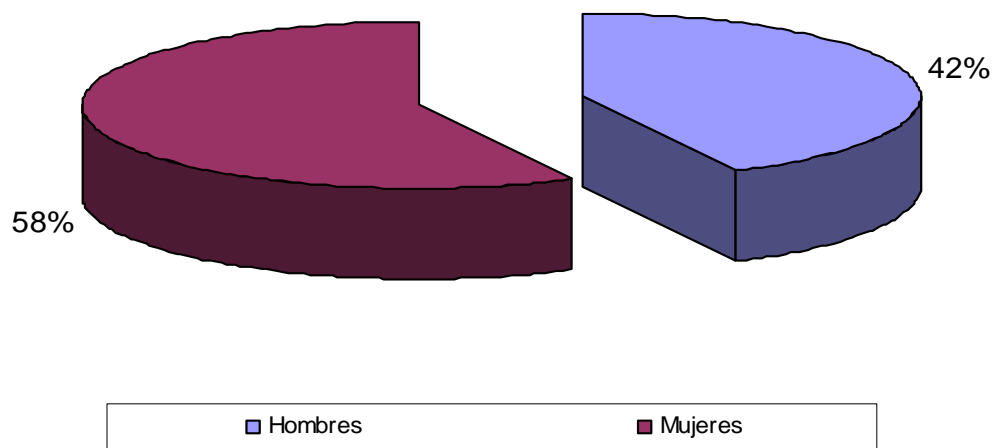
Los datos se procesaran en el programa estadístico SPSS 16 para Windows, los datos de identificación de los pacientes fueron codificados para proteger la identidad, se tomo únicamente edad, diagnóstico, resultados de inmunohistoquímica, reordenamiento y resultados de hibridación in situ y de inmunohistoquímica de las

cadena ligera y pesada, estos resultados se plasmarán en gráficos y tablas para su mejor comprensión.

## **RESULTADOS**

Se revisaron 33 casos de muestras de ganglios linfáticos que tenían diagnóstico e inmunohistoquímica realizada, distribuidos; 11 casos de Linfoma de alto grado, 11 casos de Linfoma de bajo grado y 11 casos de Leucemia linfocítica crónica, encontrándose en ellos que las edades de los pacientes oscilaban entre los 38 y los 93 años en la tabla 1 se describe la edad según el diagnóstico y vemos que el paciente con menor edad tenía 38 años y el paciente con mayor edad tenía 93 años, en el caso de los Linfomas de alto grado las edades estuvieron entre los 39 y 93 años un rango amplio de edades. Los linfomas de bajo grado entre los 49 y 83 años, las Leucemias linfocíticas crónicas en un rango de edad de 38 a 82 años. (Tabla 1)

De otra parte, la distribución de los casos estudiados según el sexo fue la siguiente: 14 casos en hombres y 19 en mujeres, siendo levemente mayor en mujeres (Fig. 3).



**Figura 3.** Distribución de los casos según el sexo.

**Tabla 1.** Relación entre la edad y el diagnóstico histopatológico.

Edad	Diagnóstico			Total
	Linfoma B de alto grado	Linfoma B de bajo grado	LLC	
38	0	0	1	1
39	2	0	0	2
40	0	0	1	1
47	0	0	1	1
49	0	1	0	1
53	1	1	0	2
56	0	0	1	1
57	0	1	0	1
59	0	2	0	2
60	1	0	0	1
63	1	1	0	2
64	0	0	1	1
65	0	2	0	2
66	0	0	1	1
67	0	0	2	2
69	1	0	0	1
72	1	0	0	1
74	0	0	1	1
78	2	2	0	4
79	1	0	0	1
80	0	0	1	1
82	0	0	1	1
83	0	1	0	1
93	1	0	0	1
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>33</b>

## LINFOMAS DE ALTO GRADO

El estudio inmunohistoquímico demuestra que el fenotipo de los linfomas de alto grado es de tipo B, positivos para CD 20, negativos para CD3 y CD5, éste (+) en un caso, variable positividad para CD10, Bcl2 y Bcl6, positivo en pocos casos y no reportado en la mayoría de los casos, y un índice de proliferación del 40-95% (Tabla 2).

**Tabla 2.** Fenotipo inmunohistoquímico de los linfomas de alto grado (LAG).

Caso N°	Inmunohistoquímica							
	CD3	CD5	CD10	CD20	CD30	Bcl2	Bcl6	Ki67
LAG - 1	-	-	-	+	-	+	NR	75
LAG - 2	-	-	NR	+	-	NR	NR	50
LAG - 3	-	-	NR	+	-	+	+	40
LAG - 4	-	NR	-	+	NR	+	+	95
LAG - 5	-	NR	NR	+	NR	NR	NR	90
LAG - 6	-	-	-	+	-	NR	NR	75
LAG - 7	-	NR	NR	+	-	NR	NR	40
LAG - 8	-	+	-	+	NR	-	-	30
LAG - 9	-	-	-	+	+	NR	NR	80
LAG - 10	-	NR	-	+	-	NR	NR	90
LAG - 11	NR	NR	+	+	-	NR	+	40

(-): Negativo; (+): Positivo; NR: no reportado.

En los linfomas de alto grado, por inmunohistoquímica, se demostró la presencia de cadenas kappa en nueve de los 11 casos y, de lambda, en seis de los 11 casos. Con hibridación in situ hay una marcada diferencia ya que se demostró la



presencia de cadenas kappa en 2 de los casos y, de las lambda, en otros dos casos. En el caso LAG-9 se observó la coincidencia de cadenas en ambos métodos, tanto por inmunohistoquímica como por hibridación in situ se demostró la presencia de cadenas kappa y lambda. Por otro lado, el caso LAG-2, por inmunohistoquímica, es positivo para cadenas kappa y lambda, en cambio, por hibridación in situ, solo es positiva para kappa y negativa para lambda. LAG-4 es positivo por inmunohistoquímica para kappa y lambda, en cambio, por hibridación in situ, es positiva solo para lambda (Tabla 3).

**Tabla 3.** Cadenas Kappa y Lambda en linfomas de alto grado (LAG). Comparación entre los resultados obtenidos por inmunohistoquímica e hibridación in situ.

Caso N°	Inmunohistoquímica		Hibridación in situ	
	Kappa	Lambda	Kappa	Lambda
LAG - 1	+	+	-	-
LAG - 2	+	-	+	-
LAG - 3	+	-	-	-
LAG - 4	+	+	-	+
LAG - 5	+	+	-	-
LAG - 6	+	-	-	-
LAG - 7	+	+	-	-
LAG - 8	-	+	-	-
LAG - 9	+	+	+	+
LAG - 10	+	-	-	-
LAG - 11	-	-	-	-

LAG: Linfoma de alto grado.

Al comparar la inmunoreactividad a cadenas ligeras y pesadas en los Linfomas de alto grado, se observó que la cadena Miu se expresa en el 100 % de los casos, nueve de ellos son +++, y dos + y ++, respectivamente. Las cadenas gamma le siguen en proporción de positividad y presentan una reactividad intensa, cuatro casos son fuertemente positivos, cinco moderadamente positivos y dos positivos (Tabla 4).

**Tabla 4.** Comparación de cadenas Kappa, Lambda, Alfa, Gamma, Delta y Miu detectadas por inmunohistoquímica en Linfomas de alto grado

Caso N°	Inmunohistoquímica					
	Kappa	Lambda	Alfa	Gamma	Delta	Miu
LAG - 1	+	+	-	+++	+++	+++
LAG - 2	+	-	-	++	++	+++
LAG - 3	+	-	-	++	++	+++
LAG - 4	+	+	-	+++	+	+++
LAG - 5	+	+	-	+++	+	+++
LAG - 6	+	-	-	+	++	+++
LAG - 7	+	+	-	++	+	+++
LAG - 8	-	+	-	++	+++	+++
LAG - 9	+	+	+	+++	++	+++
LAG - 10	+	-	-	+	-	++
LAG - 11	-	-	+	++	+	+

LAG: Linfoma de alto grado.

Con patrón de positividad menos intenso se encuentran las cadenas delta, en dos casos del 90%, c casos cuatro en el 60% y cuatro con 30%, uno negativo. En las

cadena Kappa hay positividad del 30% en la mayoría de los casos, excepto en uno. Lambda muestra 6 positivos y 5 negativos. Las cadenas alfa presentan 6 casos positivos y 5 negativos (Tabla 4).

### LINFOMAS DE BAJO GRADO

El inmunofenotipo de los linfomas de bajo grado fue el siguiente: positivo para CD 20, negativo para CD3 y CD5, variable positividad para CD10 y CD 30, y positivo para Bcl2 y Bcl6. El porcentaje de proliferación fue del 10 al 30 % (Tabla 5).

**Tabla 5.** Fenotipo inmunohistoquímico de los linfomas de bajo grado (LBG).

Caso N°	Inmunohistoquímica							
	CD3	CD5	CD10	CD20	CD30	Bcl2	Bcl6	Ki67
<b>LBG - 1</b>	NR	-	+	+	NR	+	NR	NR
<b>LBG - 2</b>	-	-	+	+	NR	NR	NR	10
<b>LBG - 3</b>	-	-	+	+	NR	+	NR	20
<b>LBG - 4</b>	-	-	+	+	NR	+	NR	NR
<b>LBG - 5</b>	-	-	NR	+	NR	-	+	30
<b>LBG - 6</b>	-	-	+	+	NR	+	+	NR
<b>LBG - 7</b>	-	NR	+	+	NR	+	+	5
<b>LBG - 8</b>	-	-	+	+	NR	+	+	20
<b>LBG - 9</b>	-	-	+	+	NR	+	+	20
<b>LBG - 10</b>	-	NR	+	+	NR	+	+	NR
<b>LBG - 11</b>	-	NR	+	+	-	NR	+	NR

(-): Negativo; (+): Positivo; NR: no reportado.

En los linfomas de bajo grado, por hibridación *in situ*, sólo se demostró la presencia de cadenas Kappa y Lambda en un caso cada una. Por el método de inmunohistoquímica no se pudo demostrar la presencia de cadenas kappa o lambda en ningún caso (Tabla 6).

**Tabla 6.** Presencia de de cadenas Kappa y Lambda en linfomas de bajo grado. Comparación entre los resultados obtenidos por inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

Caso N°	Inmunohistoquímica		Hibridación <i>in situ</i>	
	Kappa	Lambda	Kappa	Lambda
LBG - 1	-	-	+	-
LBG - 2	-	-	-	-
LBG - 3	-	-	-	-
LBG - 4	-	-	-	+
LBG - 5	-	-	-	-
LBG - 6	-	-	-	-
LBG - 7	-	-	-	-
LBG - 8	-	-	-	-
LBG - 9	-	-	-	-
LBG - 10	-	-	-	-
LBG - 11	-	-	-	-

LBG: Linfoma de bajo grado.

La inmunopositividad de las diferentes cadenas de los linfomas de bajo grado fue la siguiente: positiva en cadenas Miu, con dos casos +++, cuatro casos ++ y cinco casos +; la cadena delta presentó dos casos +++, dos ++, cuatro + y tres negativos; la

cadena gamma es positiva en el 100 % de los casos, pero tres de ellos son ++; la cadena alfa solo presenta un caso +, el resto son negativos; y las cadenas Kappa y lambda también son negativas. (Tabla 7)

**Tabla 7.** Comparación de cadenas Kappa, Lambda, Alfa, Gamma, Delta y Miu detectadas por inmunohistoquímica en linfomas de bajo grado (LBG).

Caso N°	Inmunohistoquímica					
	Kappa	Lambda	Alfa	Gamma	Delta	Miu
LBG - 1	-	-	-	+	-	+++
LBG - 2	-	-	-	+	++	++
LBG - 3	-	-	-	++	++	+++
LBG - 4	-	-	-	++	+	+
LBG - 5	-	-	-	+	+++	++
LBG - 6	-	-	-	+	+	+
LBG - 7	-	-	-	+	-	+
LBG - 8	-	-	+	+	-	+
LBG - 9	-	-	-	++	+	++
LBG - 10	-	-	-	+	+++	++
LBG - 11	-	-	-	+	+	+

## LEUCEMIAS LINFOCÍTICAS CRÓNICAS

El fenotipo en las leucemias linfocíticas crónicas demostró ser de tipo B, positivos para CD 20, negativos para CD3, variable positividad en CD5, y variable positividad para CD10, Bcl2 y Bcl6, que fueron positivos en pocos casos y no

reportados en la mayoría de los casos. El índice de proliferación fue del 5 al 30% (Tabla 8).

**Tabla 8.** Fenotipo inmunohistoquímico de las leucemias linfocíticas crónicas (LLC).

Caso N°	Inmunohistoquímica							
	CD3	CD5	CD10	CD20	CD30	Bcl2	Bcl6	Ki67
LLC - 1	-	+	-	+	NR	NR	NR	5
LLC - 2	-	-	-	+	-	NR	NR	5
LLC - 3	-	-	-	+	NR	NR	NR	10
LLC - 4	-	-	-	+	NR	NR	NR	5
LLC - 5	-	+	NR	+	NR	NR	NR	10
LLC - 6	-	NR	-	+	-	+	NR	30
LLC - 7	-	-	+	+	NR	+	+	15
LLC - 8	-	+	-	+	NR	+	-	10
LLC - 9	-	NR	+	+	NR	NR	NR	20
LLC - 10	-	+	NR	+	NR	NR	NR	25
LLC - 11	-	+	-	+	NR	NR	NR	NR

(-): Negativo; (+): Positivo; NR: no reportado.

En el caso de las leucemias linfocíticas crónicas se demostró la presencia de cadenas kappa y lambda, tanto por inmunohistoquímica como por hibridación in situ. El caso LLC-3 presenta cadenas kappa y lambda por ambos métodos. El caso LLC-5 demostró cadenas lambda por los dos métodos, el caso LLC-6 demostró lambda por ambos métodos y kappa solo por inmunohistoquímica, y el caso LLC-10 demostró

cadena lambda por ambos métodos. En cambio, el caso LLC-4 demostró cadena lambda solo por el método de inmunohistoquímica (Tabla 9).

**Tabla 9.** Cadenas Kappa y Lambda en leucemias linfocíticas crónicas (LLC). Comparación entre los resultados obtenidos por inmunohistoquímica e hibridación in situ.

Caso N°	Inmunohistoquímica		Hibridación in situ	
	Kappa	Lambda	Kappa	Lambda
LLC - 1	-	-	-	-
LLC - 2	-	-	-	-
LLC - 3	+	+	+	+
LLC - 4	-	+	-	-
LLC - 5	-	+	-	+
LLC - 6	+	+	-	+
LLC - 7	-	-	-	-
LLC - 8	-	-	-	-
LLC - 9	-	-	-	-
LLC - 10	-	+	-	+
LLC - 11	-	-	-	-

En las leucemias linfocíticas crónicas las cadenas ligeras resultaron negativas, las pesadas Miu son positivas en el 100 % de los casos, distribuidos: cinco +, cuatro ++ y dos +++; la cadena gamma también fue positiva en todos los casos, tres con ++, y

nueve +; la cadena delta presentó dos casos +++, dos ++, cuatro + y tres negativos; la alfa, solo un caso +, el resto negativos (Tabla 10).

**Tabla 10.** Comparación de cadenas Kappa, Lambda, Alfa, Gamma, Delta y Miu detectadas por inmunohistoquímica en leucemias linfocíticas crónicas.

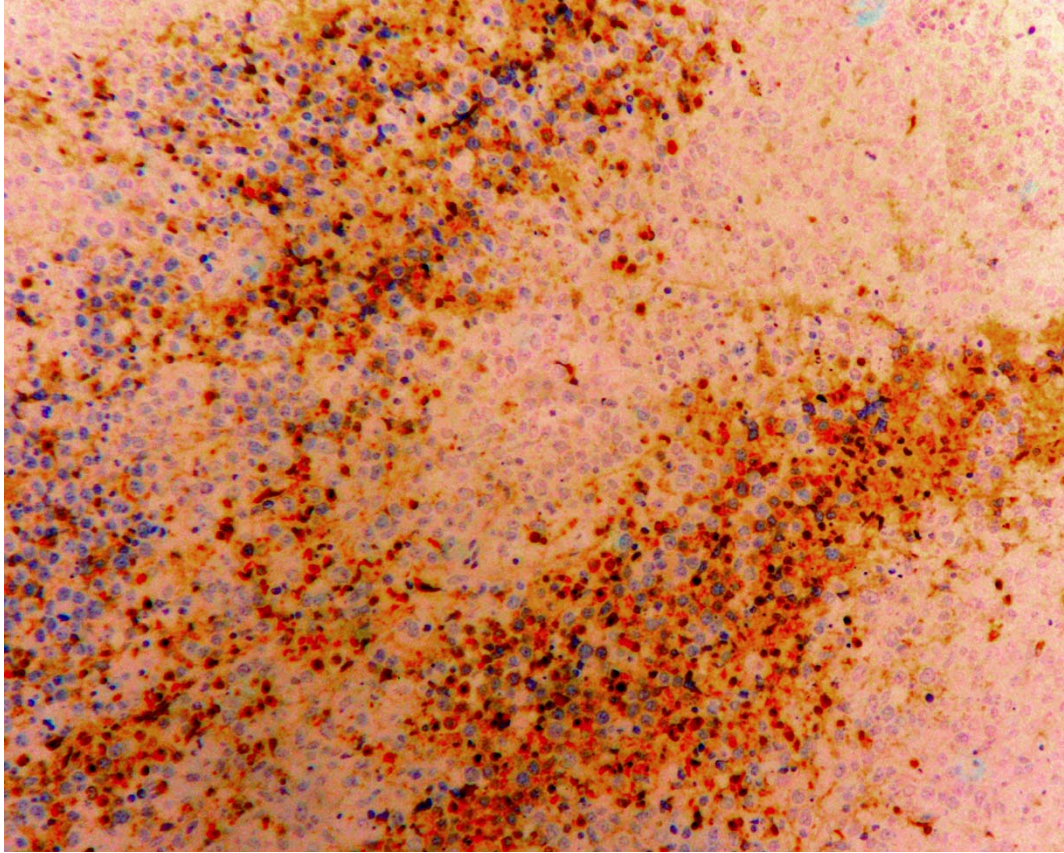
Caso N°	Inmunohistoquímica					
	Kappa	Lambda	Alfa	Gamma	Delta	Miu
LLC - 1	-	-	-	+	-	+++
LLC - 2	-	-	-	+	++	++
LLC - 3	-	-	-	++	++	+++
LLC - 4	-	-	-	++	+	+
LLC - 5	-	-	-	+	+++	++
LLC - 6	-	-	-	+	+	+
LLC - 7	-	-	-	+	-	+
LLC - 8	-	-	+	+	-	+
LLC - 9	-	-	-	++	+	++
LLC - 10	-	-	-	+	+++	++
LLC - 11	-	-	-	+	+	+

LLC: Leucemia linfocítica crónica.

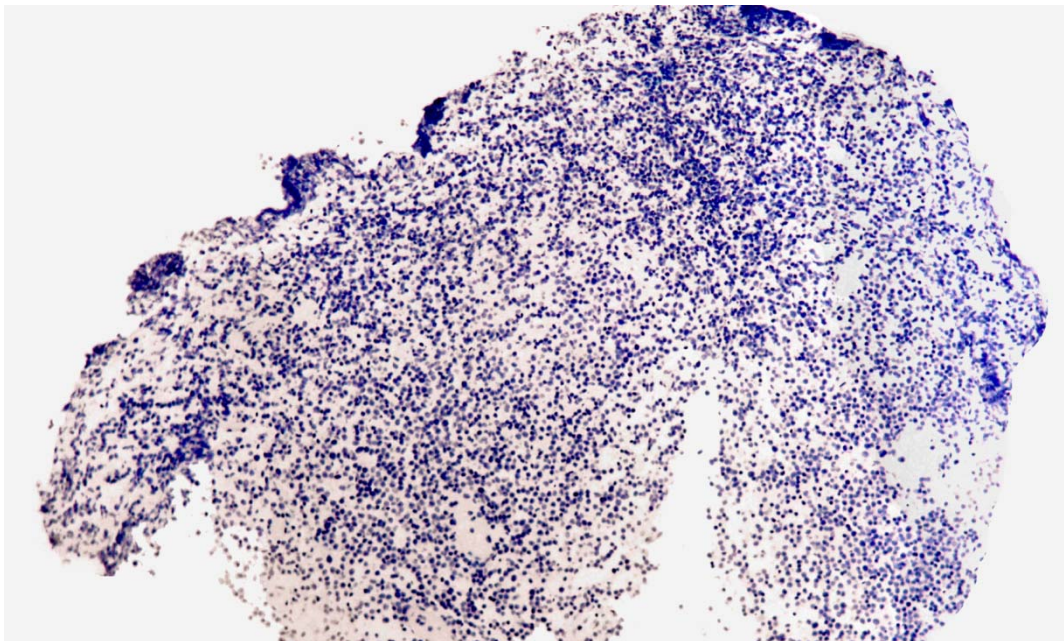


**ICONOGRAFÍA**

## LINFOMAS DE ALTO GRADO

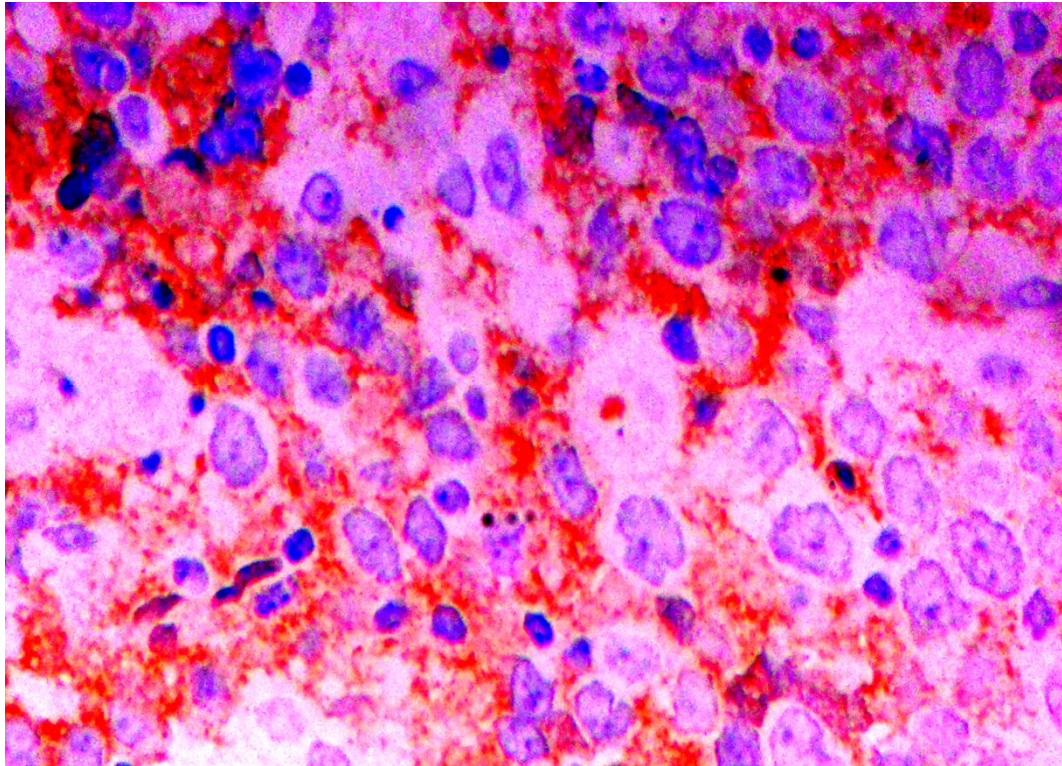


**Figura 4.** Linfoma de alto grado IgA +.

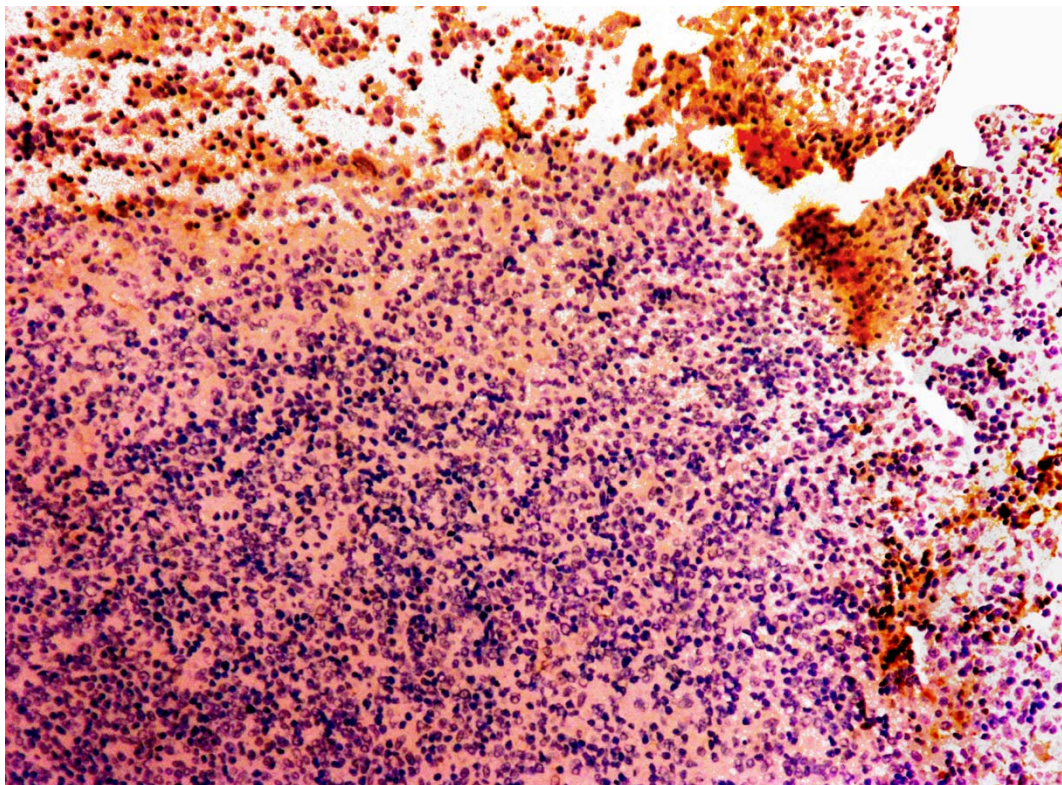


**Figura 5.** Linfoma de alto grado IgA -.



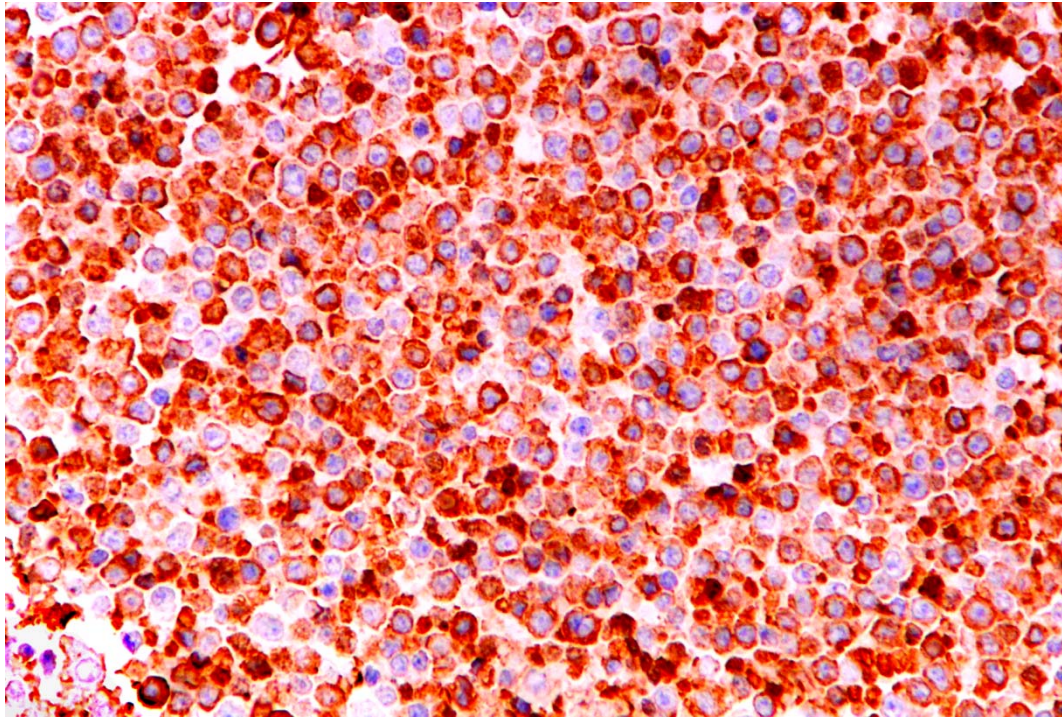


**Figura 6.** Linfoma de alto grado IgA +.

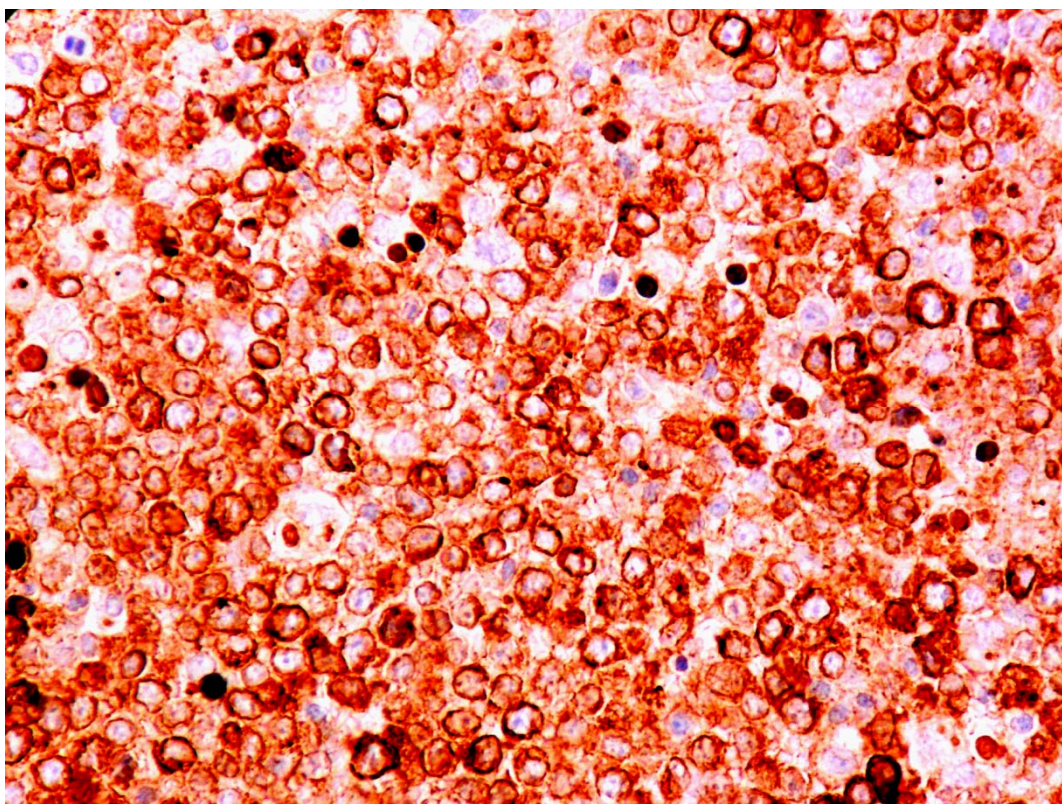


**Figura 7.** Linfoma de alto grado IgA +.



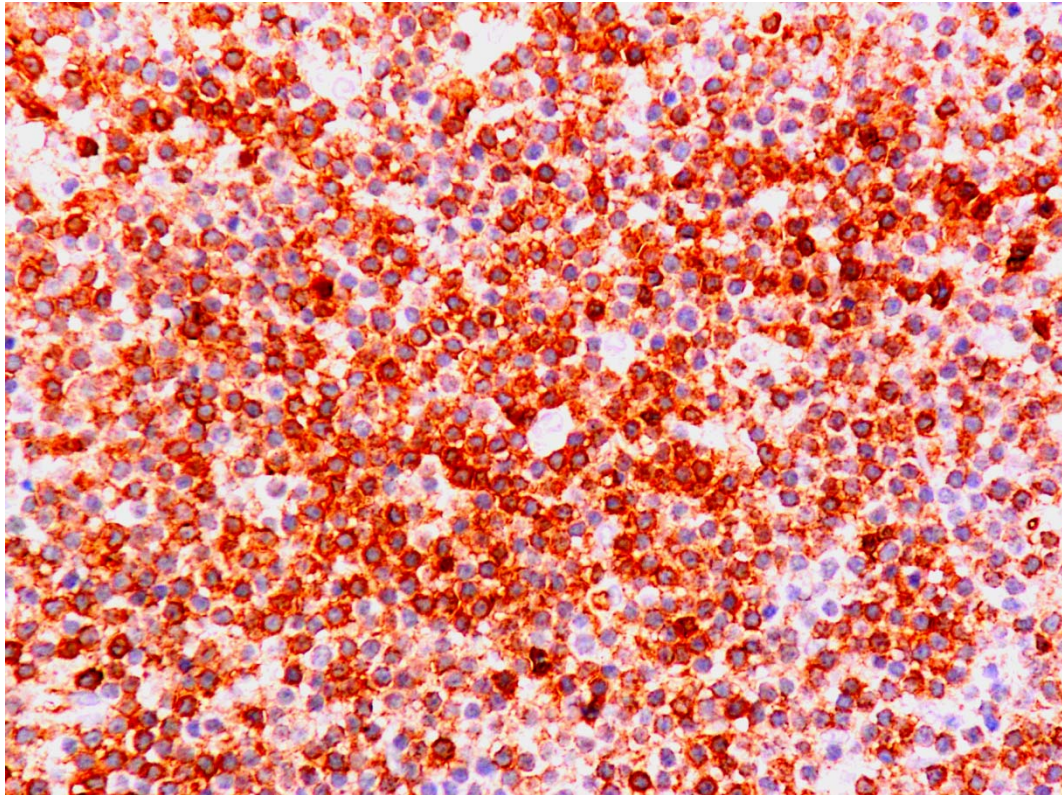


**Figura 8.** Linfoma de alto grado IgG +.

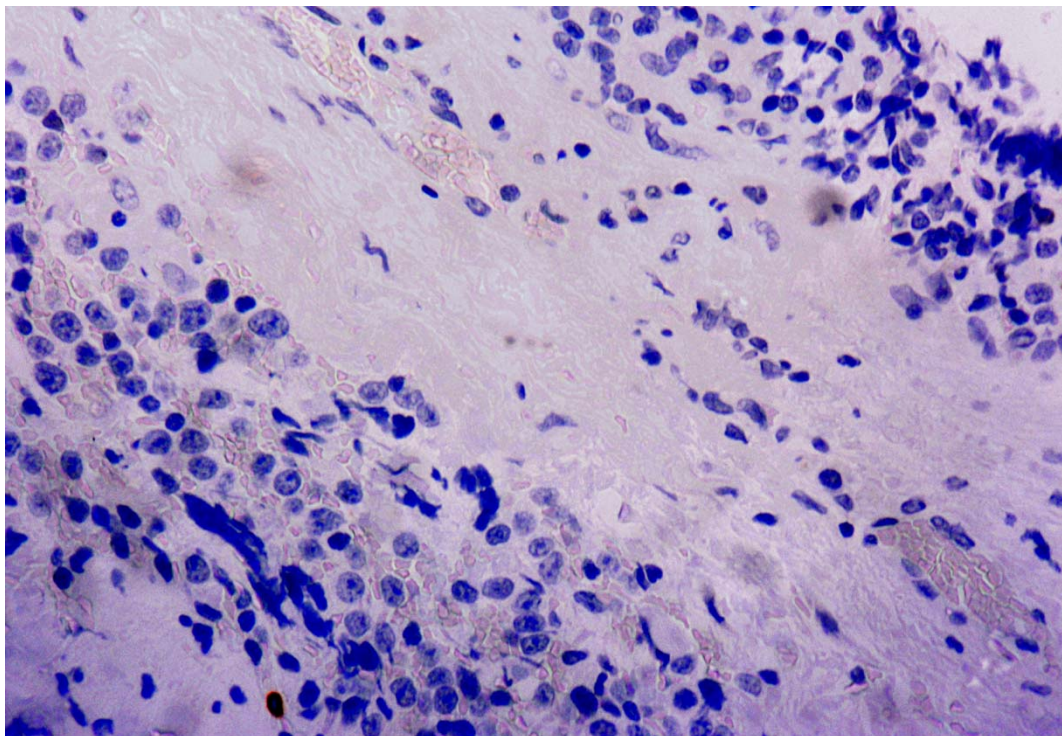


**Figura 9.** Linfoma de alto grado IgM +.



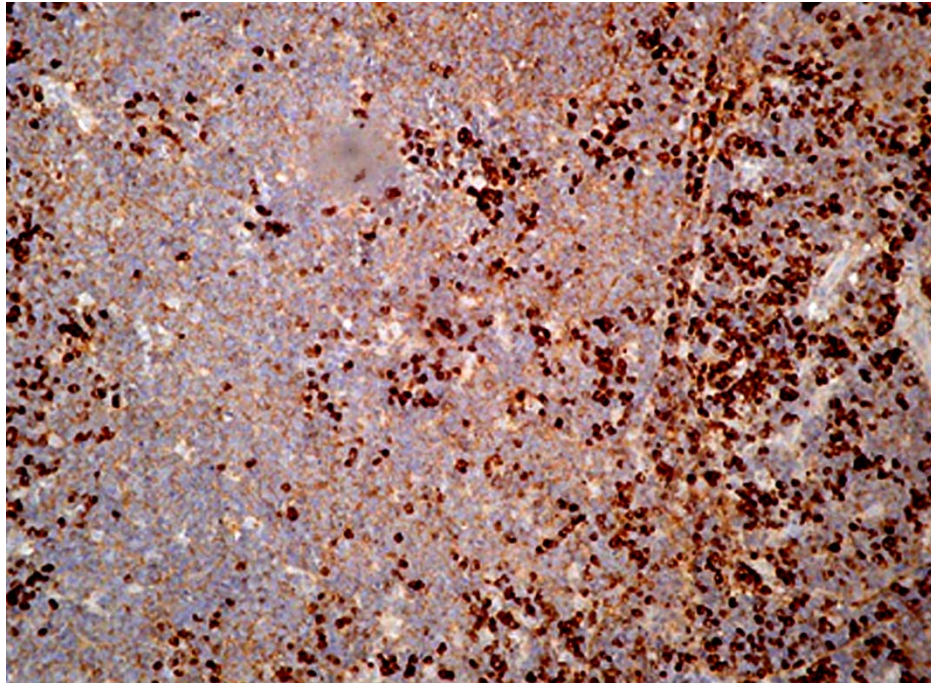


**Figura 10.** Linfoma de alto grado IgD +.

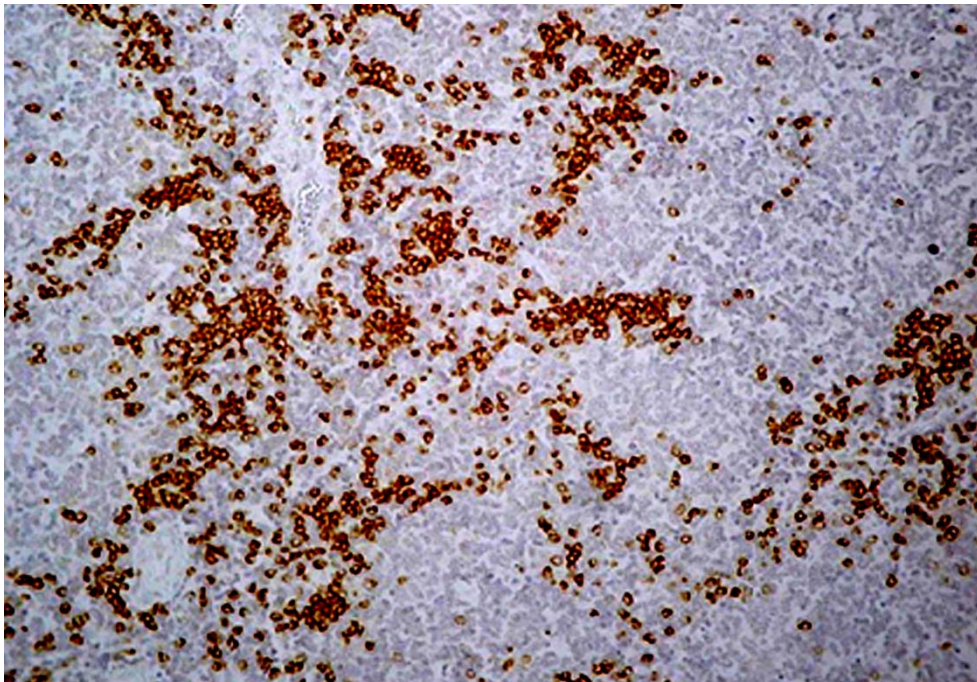


**Figura 11.** Linfoma de alto grado IgD -.





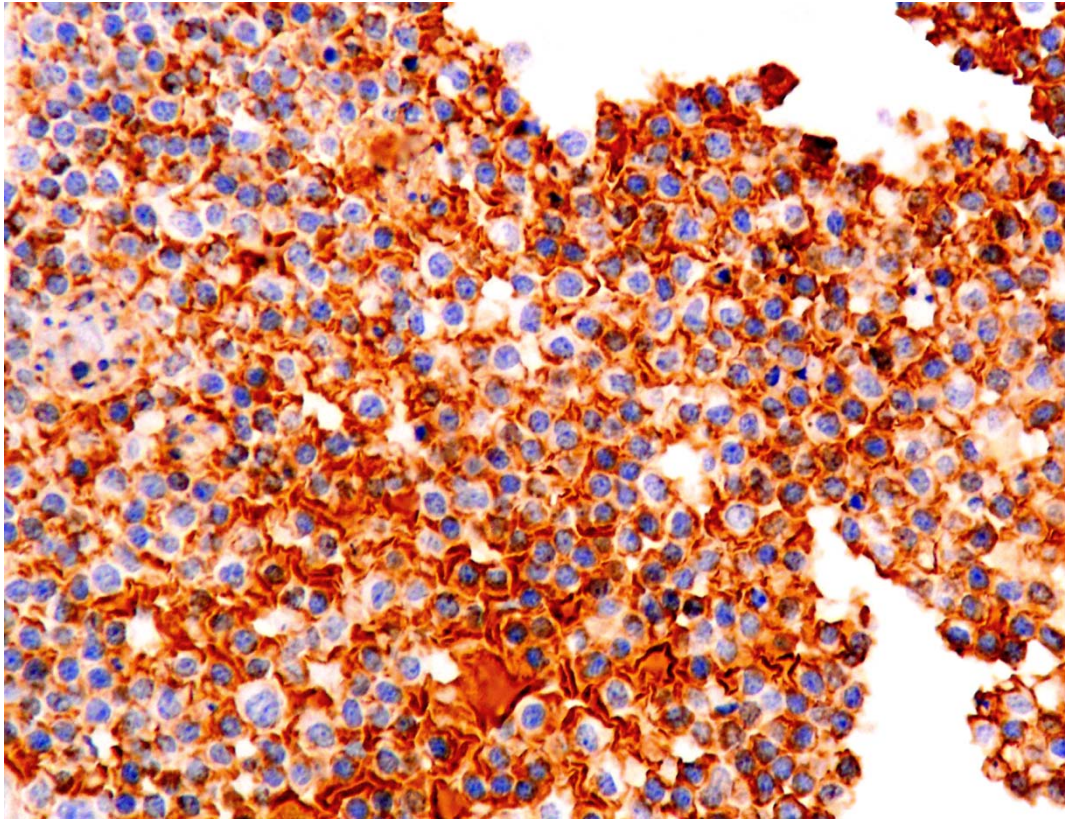
**Figura 12.** Linfoma de alto grado. Expresión de cadenas kappa, por inmunohistoquímica. 20x



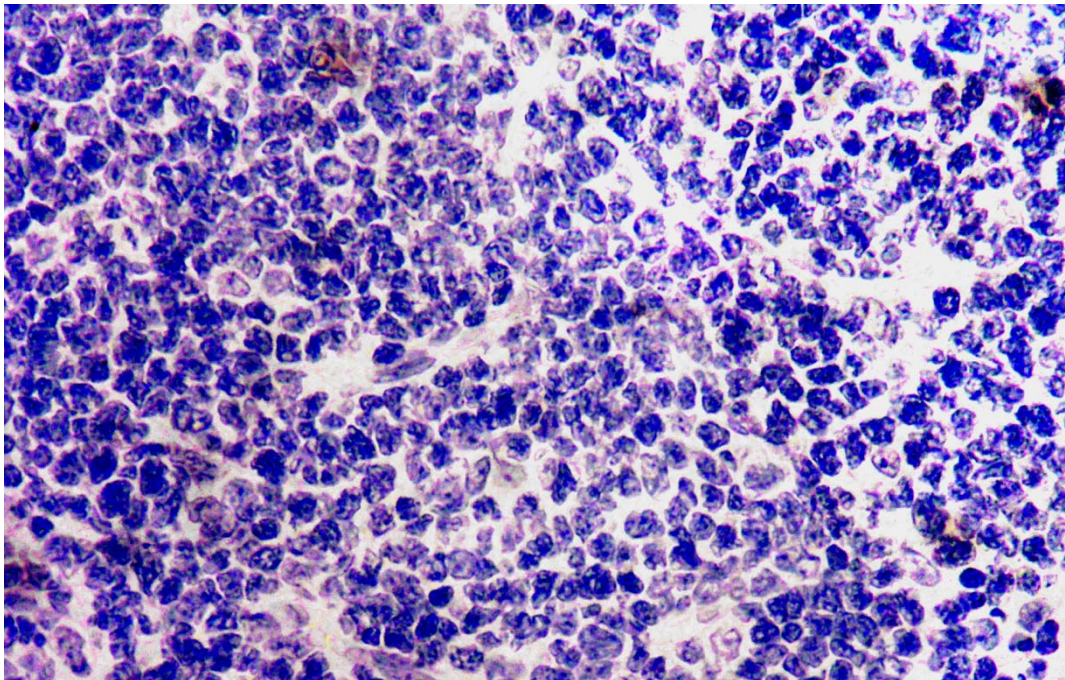
**Figura 13.** Linfoma de alto grado. Expresión de cadenas kappa, por hibridación in situ. 20x



## LINFOMAS DE BAJO GRADO

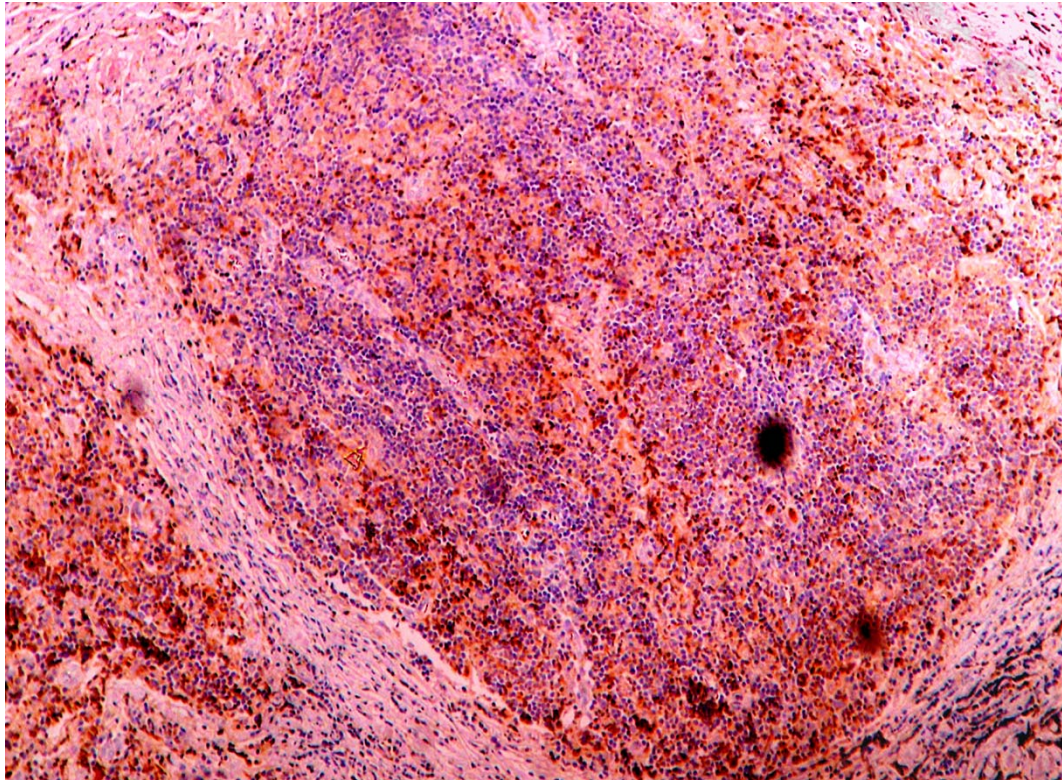


**Figura 14.** Linfoma de bajo grado IgA +.

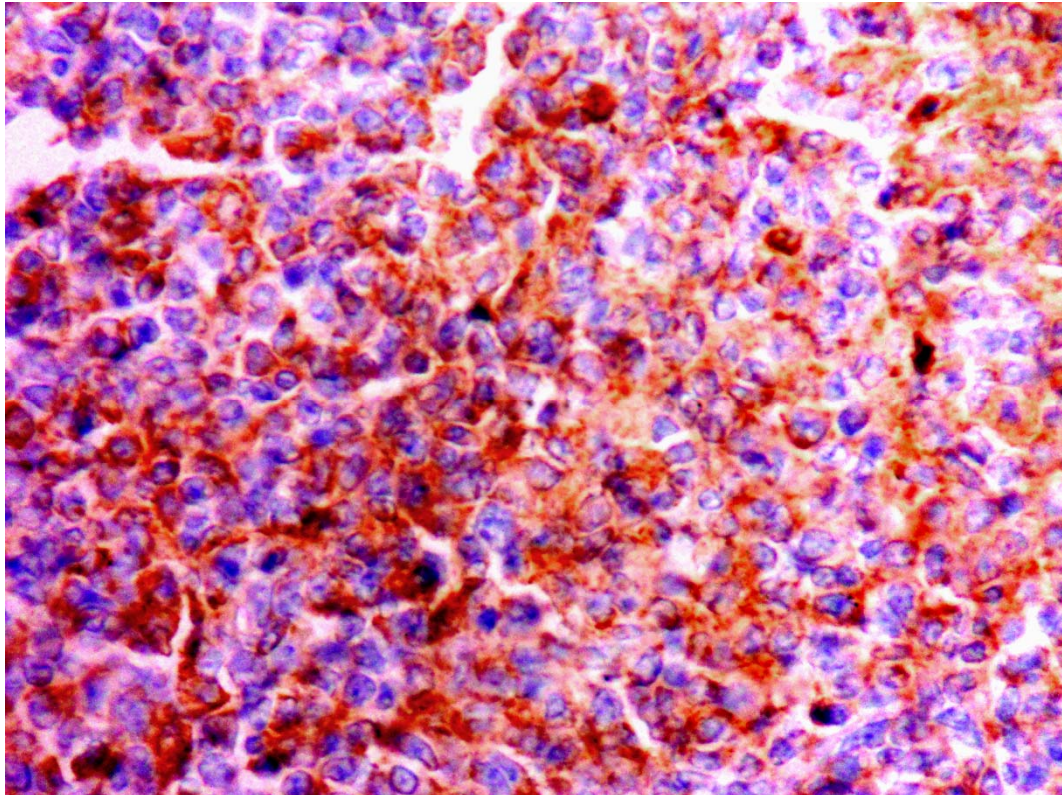


**Figura 15.** Linfoma de bajo grado IgA -.



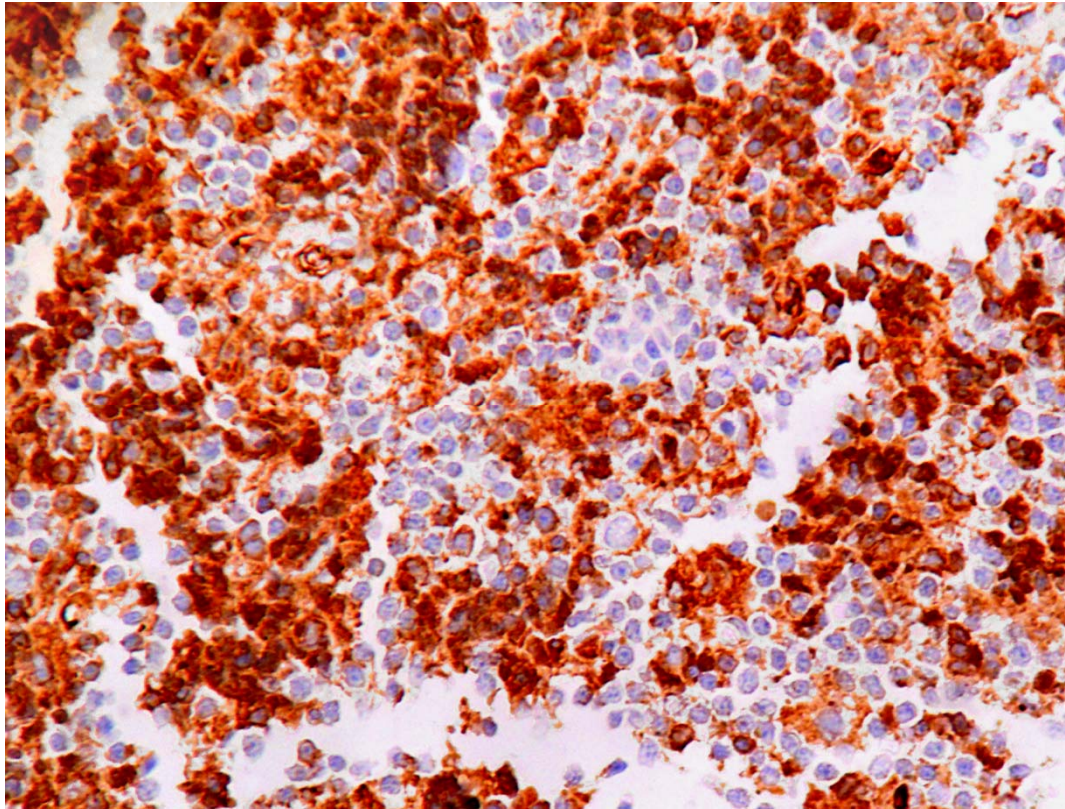


**Figura 16.** Linfoma de bajo grado, centro germinal IgG +.

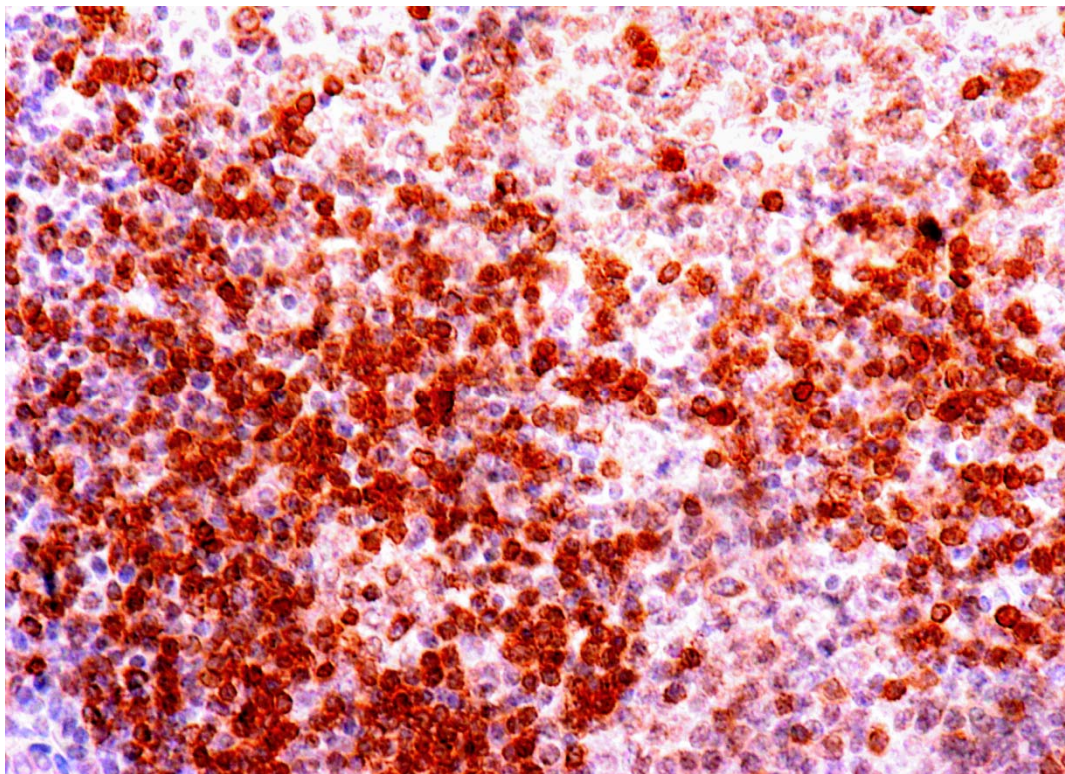


**Figura 17.** Linfoma de bajo grado IgG +.



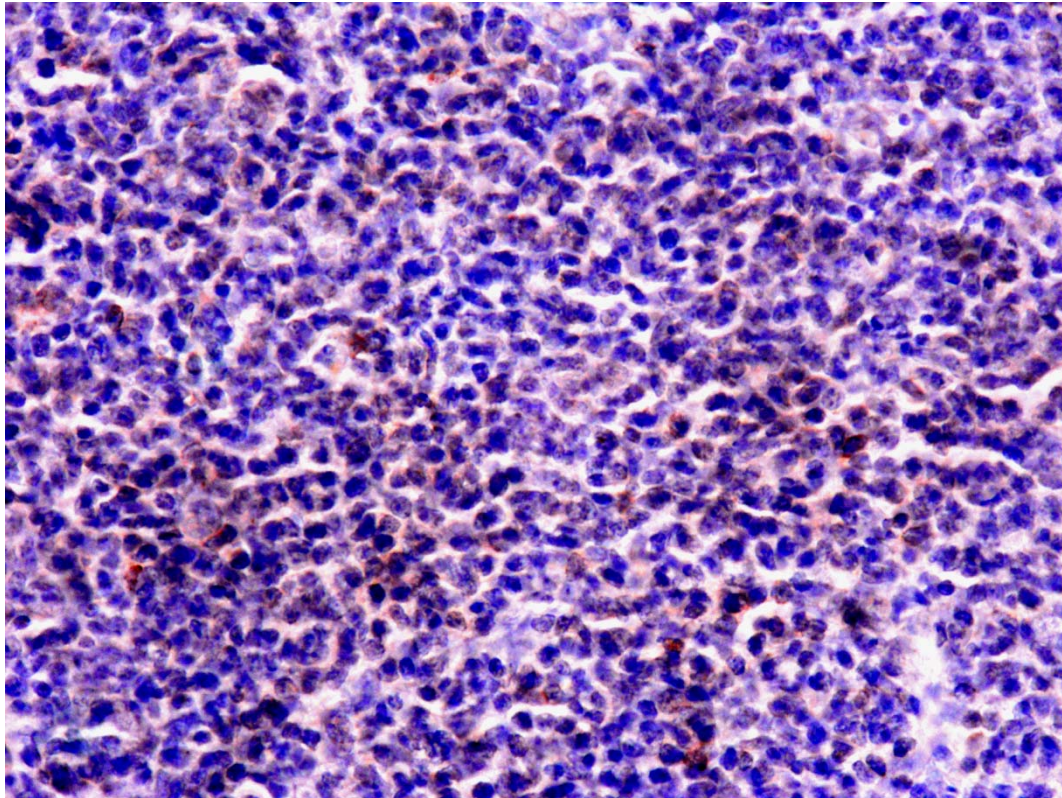


**Figura 18.** Linfoma de bajo grado IgM +.



**Figura 19.** Linfoma de bajo grado IgD +.

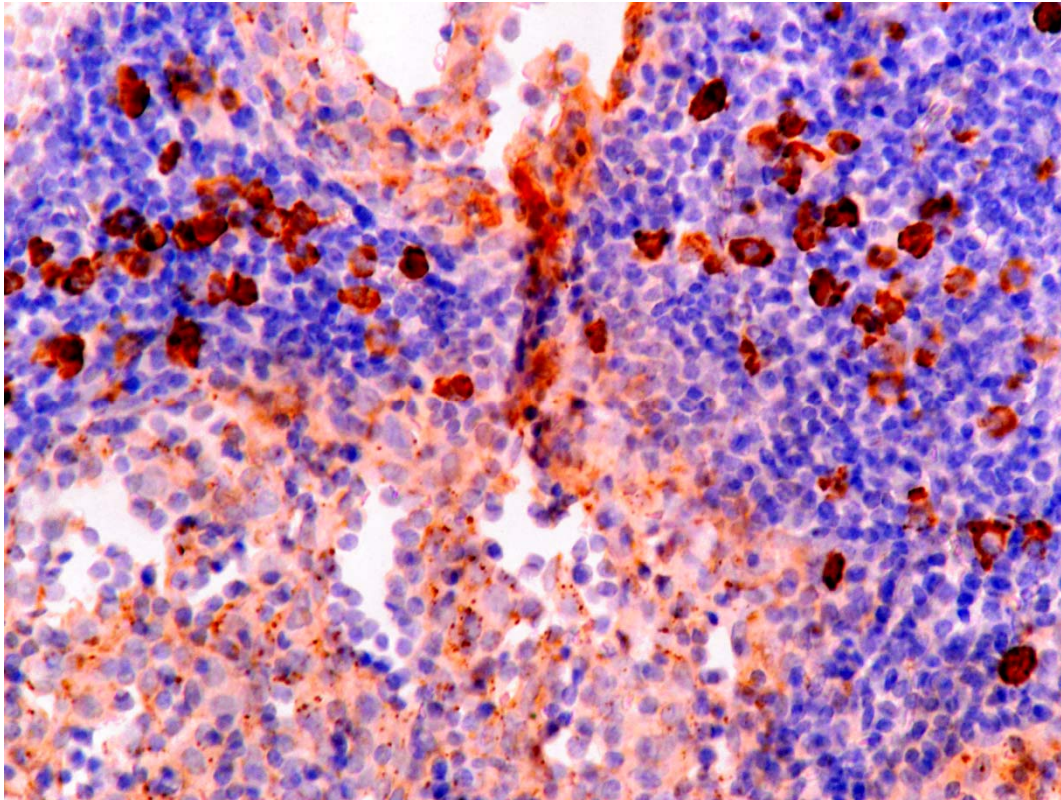




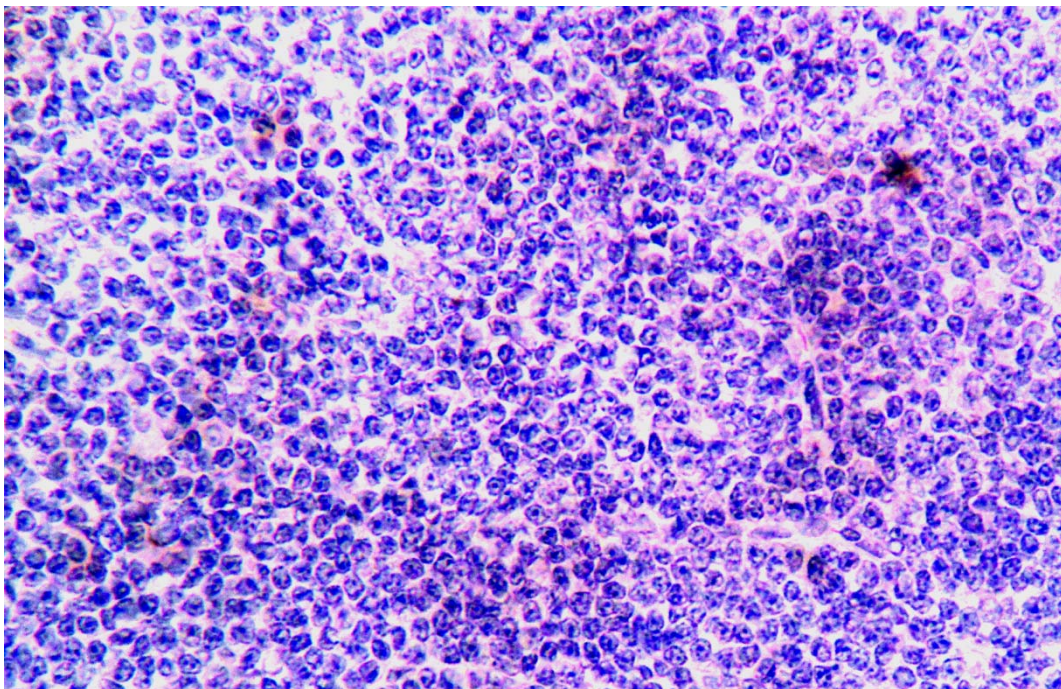
**Figura 20.** Linfoma de bajo grado IgD -.



## LEUCEMIAS LINFOCÍTICAS CRÓNICAS

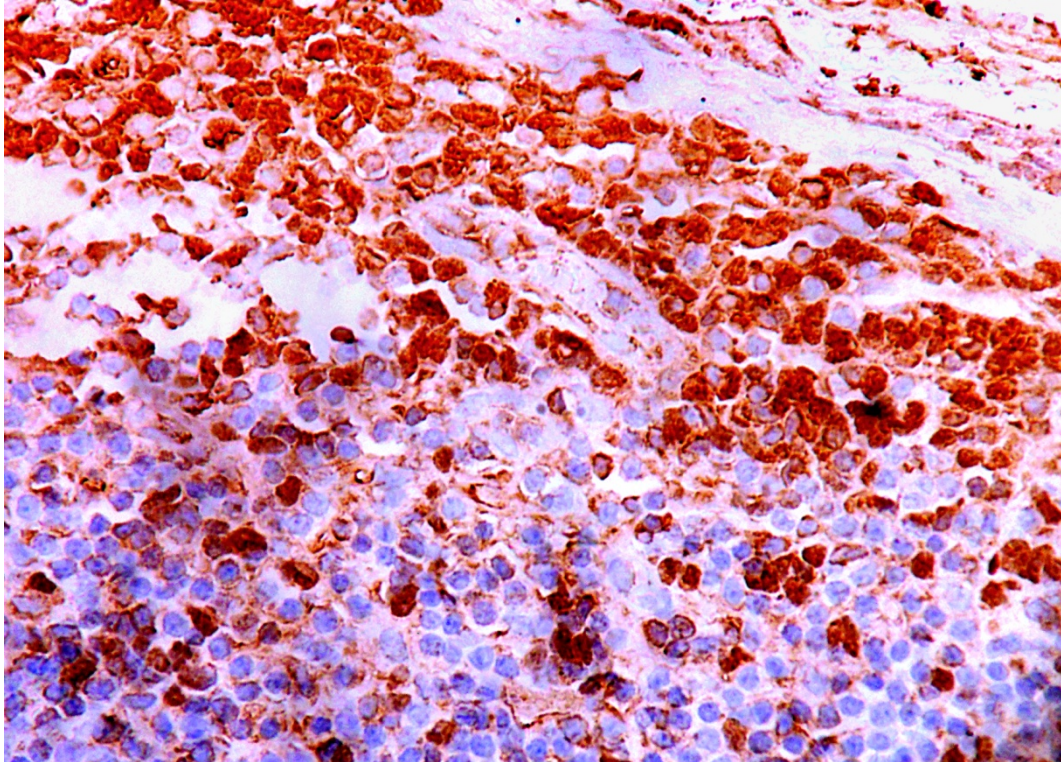


**Figura 21.** Leucemia linfocítica crónica IgA +.

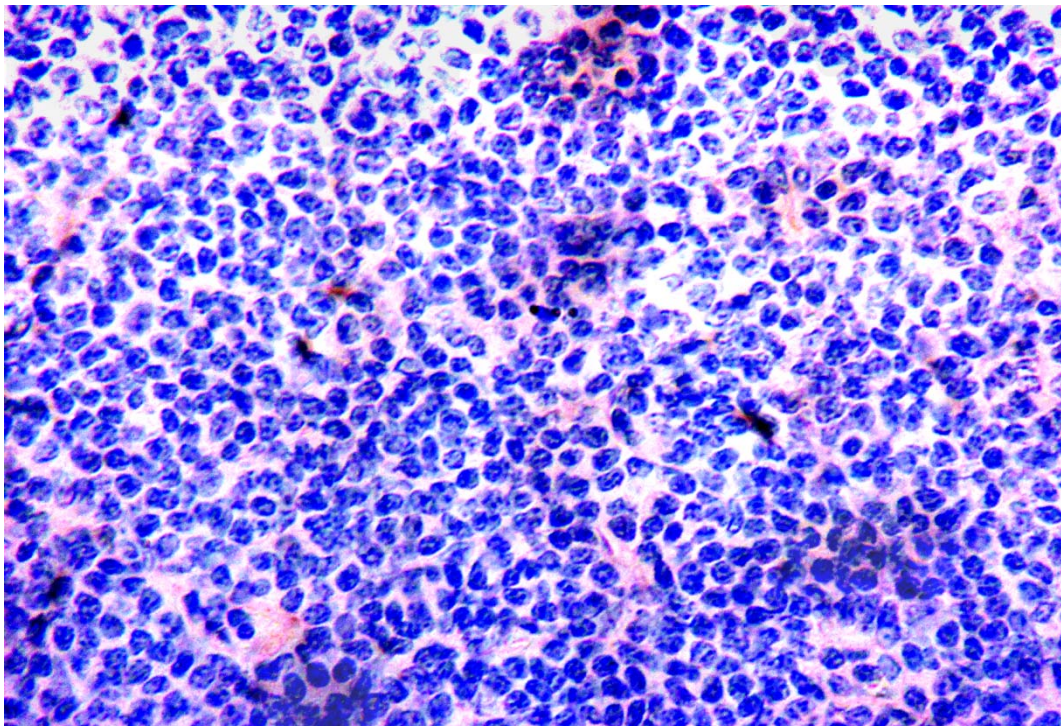


**Figura 22.** Leucemia linfocítica crónica IgA -.



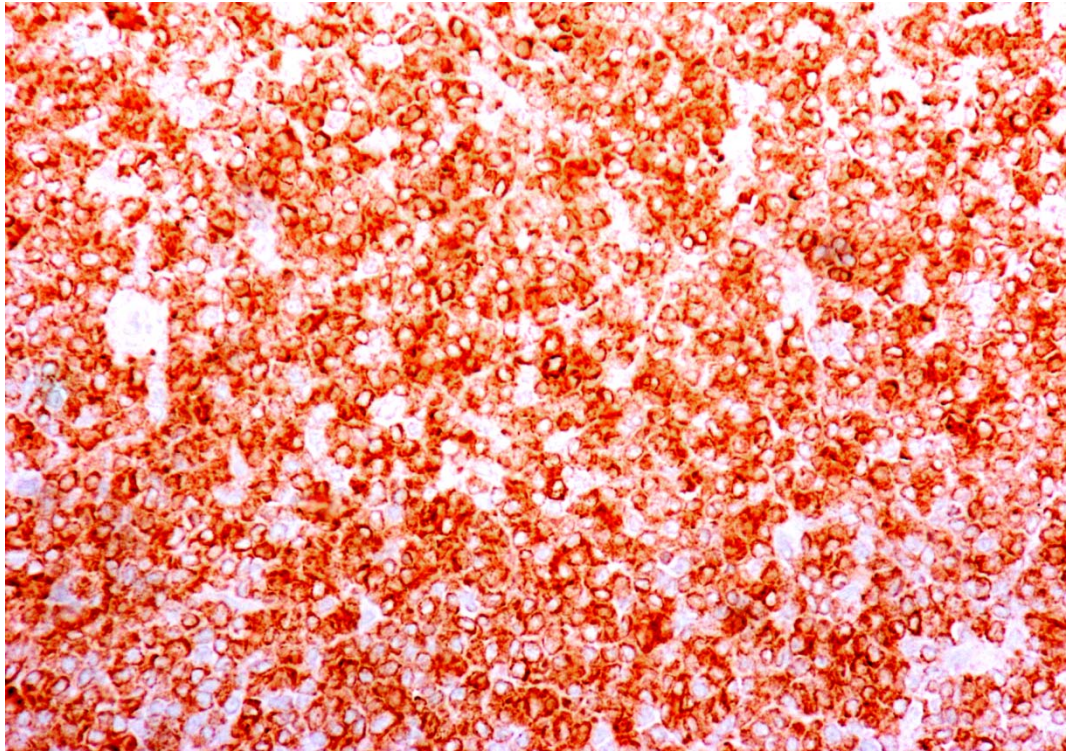


**Figura 23.** Leucemia linfocítica crónica IgG +.

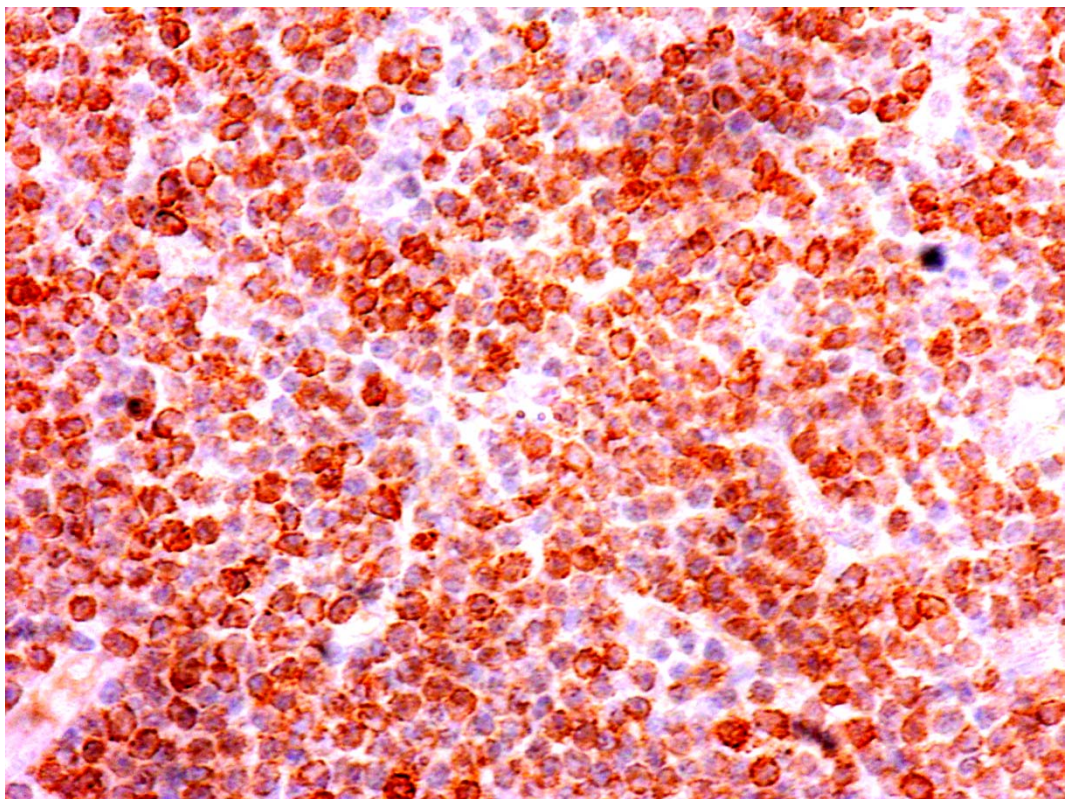


**Figura 24.** Leucemia linfocítica crónica IgG -.



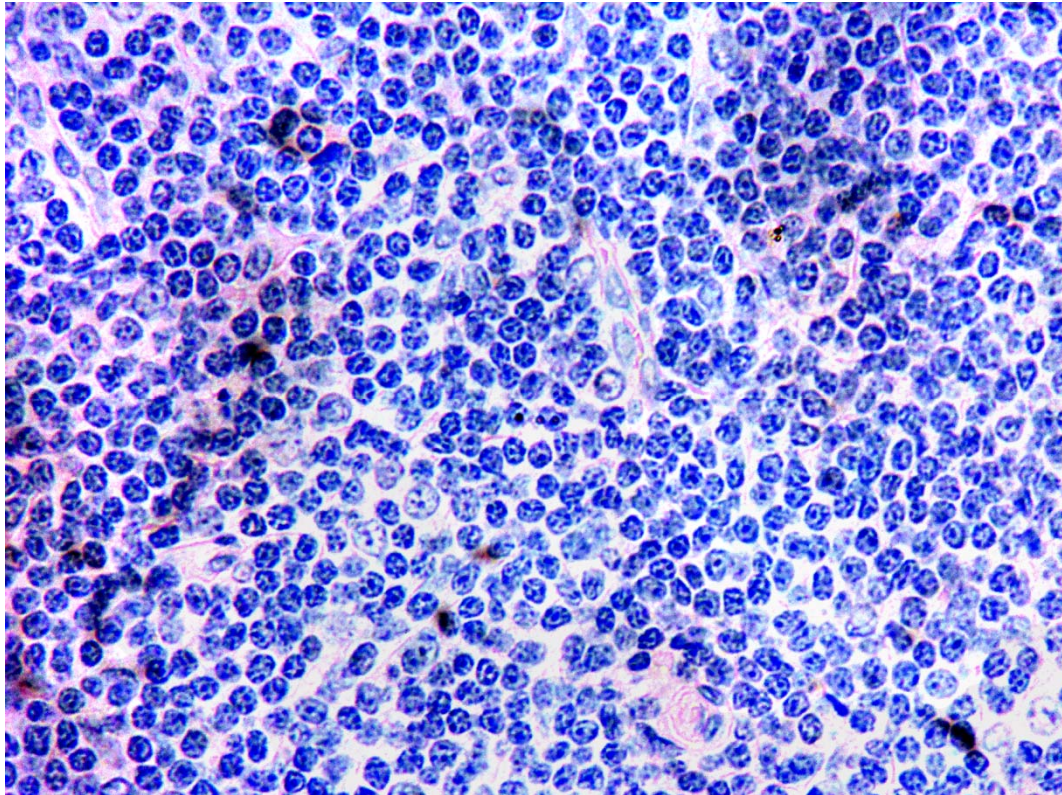


**Figura 25.** Leucemia linfocítica crónica IgM +.

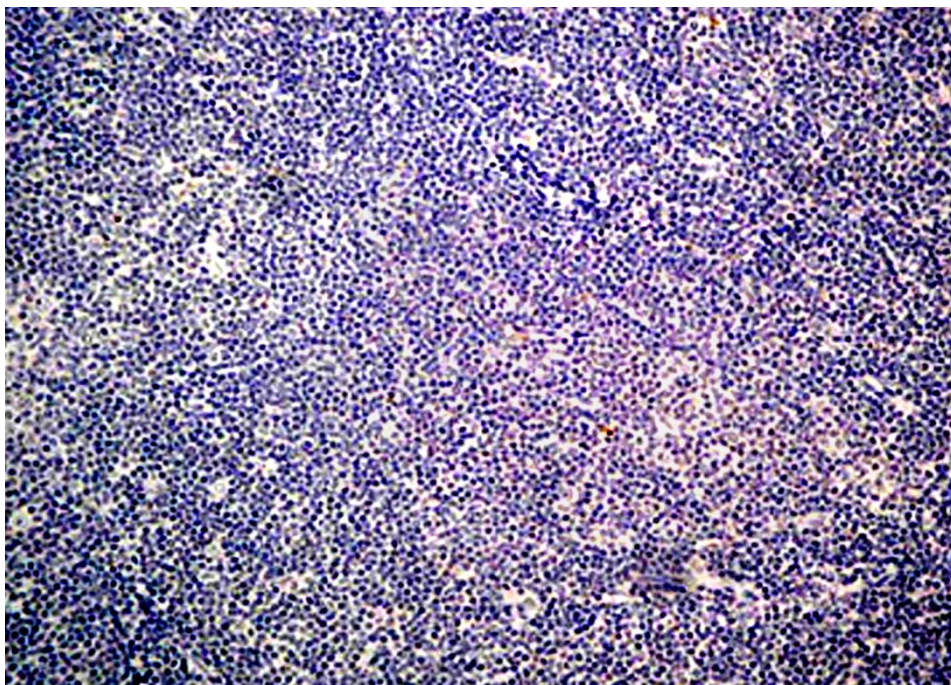


**Figura 26.** Leucemia linfocítica crónica IgD +.





**Figura 27.** Leucemia linfocítica crónica IgD -.



**Figura 28.** Leucemia linfocítica crónica. No expresión de cadenas Lambda, por Inmunohistoquímica. 20x

**DISCUSIÓN**

El presente estudio revisó 33 casos con diagnósticos de; Linfomas de alto grado 11 casos, Linfoma de bajo grado 11 casos, y 11 casos de Leucemia linfocítica crónica, todos estos casos tenían panel de inmunohistoquímica que demostraba eran neoplasias de células B (118). Las edades de estos pacientes oscilaron entre 38 años la menor edad encontrada y 93 años el de mayor edad encontrada, en general la mayor incidencia se encontró en el grupo de edad mayor de 53 años, los linfomas se presentan en todas las edades, con predilección los de bajo grado como linfoma de células B pequeñas se presenta mayormente en hombres entre 55 y 65 años el linfoma de células del manto se presenta en hombres en edad mediana a 63 años, el linfoma folicular igual tiene predilección por hombres de edad mediana a 60 años (30, 67). Los extranodales tienen predilección por mujeres y la edad es edad media a 60 años. Los linfomas B de la zona marginal extranodales se presentan en adultos de 60 a 65 años pero también se presenta en pacientes pediátricos. Los linfomas difusos de células grandes ocurren en niños también en edad media hasta los 73 años y predilección por el sexo masculino. Las leucemias linfocíticas crónicas se presentan en edades medias de 65 años y predominan en hombres (52, 56, 58, 80, 85, 113).

En este grupo de pacientes estudiados, vemos que las patologías afectaron similares grupos de edad, el predominio es en mayores de 53 años, solo que hay un leve predominio de mujeres (58%), por la cantidad de muestra es difícil aseverar el predominio de sexo o grupo de edad.



En relación al término bajo grado y alto grado, si bien el "grado" habla de la relación con la morfología, puede ser resabio de las clasificaciones clásicas, basadas solo en el aspecto de la morfología. El inmunofenotipo, clasifica realmente por líneas celulares y evalúa parámetros importantes para el tratamiento, la fenotipificación inmunológica de los linfomas ha descubierto una heterogeneidad que no predecían los estudios morfológicos, los linfomas de células B se reconocen por la presencia de una inmunoglobulina monoclonal en su superficie o por el reordenamiento clonal de sus genes de inmunoglobulinas, constituyen tumores inmunológicamente distintos de etapas consecutivas de células B que son detectadas por fenotipos inmunológicos particulares. El papel principal de los estudios inmunológicos de las muestras de linfomas es contribuir al diagnóstico para determinar el origen hematológico del proceso maligno si es indiferenciado, hiperplásico y si se dispone de inmunoterapia. (30, 58).

En los linfomas de alto grado se demostró la presencia de cadenas kappa en 9 de los 11 casos y lambda en 6 de los 11 casos, con el método de hibridación in situ se observa una marcada diferencia ya que las cadenas kappa demostraron su presencia en 2 de los casos y las lambda en dos de los casos la coincidencia de las cadenas ocurre solo en un caso, el caso LAG - 9 en el que tanto por inmunohistoquímica y por hibridación in situ se demostró la presencia de cadenas kappa y lambda por ambos métodos esto rompe el esquema normal que se presenta o solo cadenas Kappa o

Lambda nunca ambas, lo que podría explicar la evolución y el pronóstico de estos pacientes, por la expresión anormal de estas cadenas (12, 37).

En las neoplasias las moléculas de Ig que contienen cadenas Kappa son ligeramente más frecuentes que las que contienen Lambda y las proliferaciones reactivas de linfocitos B están compuestas por un número casi igual de células que producen cadenas ligeras Kappa o Lambda, las proliferaciones neoplásicas de linfocitos B muestran restricción de cadenas ligeras, es decir, son monoclonales, produciendo sólo cadenas Kappa o Lambda (83). Por lo tanto, la demostración de cadenas ligeras es un procedimiento muy importante en el diagnóstico de neoplasias de linfocitos B (linfomas y leucemias) (107, 111, 117). La cantidad de Igs producida por cada linfocito suele ser pequeña, por lo que es necesaria una técnica de detección muy sensible (52, 113). En este caso particular vemos que se ha demostrado por inmunohistoquímica (80, 114).

Las cadenas ligeras y pesadas se han estudiado más en patologías renales y de origen inmunitario, en lo revisado no se ha encontrado estudios similares donde se aborde el estudio de las cadenas. Por otro lado, en el caso de Linfoma de Alto Grado nº 2 hay coincidencia en el resultado por inmunohistoquímica y por hibridación in situ resultando expresión de cadenas Kappa y ausencia de Lambda por ambos métodos, en el resto de los casos no hay coincidencia. El caso de Linfoma de Alto Grado nº 4 es positivo por inmunohistoquímica para kappa y lambda en cambio por

hibridación in situ es positiva solo para lambda. Demostrando que hay expresión y restricción de cadenas, convendría abordar el pronóstico y evolución de estos pacientes para valorar la influencia de estas cadenas en el pronóstico de estas patologías (69). En general, se pudo observar 81.8 % de expresión de cadenas Kappa y 54.5 % de expresión de cadenas Lambda.

La positividad a cadenas pesadas por el método de inmunohistoquímica expresa una positividad en todos los casos para  $\mu$  y  $\gamma$ , la reacción fue más intensa en la cadena Miu, luego en la cadena  $\gamma$ , en orden de expresión fue la cadena  $\delta$  90.9 % de los casos expresan positividad en  $\delta$ , la cadena  $\alpha$  solo se expresa en un caso. Hay pocos estudios que hablen sobre el significado clínico de estos hallazgos pero hablar de expresión y restricción de cadenas pesadas es importante ya que traduce alteraciones en las células que forman estas neoplasias. Pudiendo de alguna manera participar en el pronóstico de estos pacientes (113).

Al ocurrir la diferenciación del linfocito B desde el precursor B linfoblástico hasta la célula plasmática madura, con sus respectivos cambios en la expresión antigénica. En la respuesta inmune temprana frente al antígeno, el linfocito naive B puede transformarse directamente en inmunoblasto y células plasmáticas productoras de IgM. En la respuesta tardía primaria y secundaria en el centro germinal se produce la mutación de la región variable del gen de Ig, el "switch" de la cadena pesada, y

generación de células plasmáticas productoras de IgG e IgA, y de linfocitos B memoria (113).

Los linfocitos en etapa de linfocito pro - B no poseen inmunoglobulinas de superficie, si inician el reordenamiento del ADN del gen de cadena pesada  $\mu$ , estos expresan inmunofenotipo para linfocitos B, si el reordenamiento es productivo se expresa la cadena pesada  $\mu$  en el citoplasma del linfocito, por reordenamiento VH - DH - JH. Algunas de las cadenas pesadas  $\mu$  de los linfocitos pre-B se asocian a un grupo de proteínas denominadas cadenas ligeras subrogadas que son estructuralmente homólogas a las cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$  pero invariables. Los complejos que forman  $\mu$  y las cadenas intermedias denominados receptores de linfocitos pre-B (pre-BCR) se expresan en poca cantidad en la superficie. Los pre-BCR productivos inhiben de forma irreversible el reordenamiento del locus de la cadena pesada del otro cromosoma. Si el primer reordenamiento no es productivo debido a las deleciones o cambios del marco de lectura, los genes del segundo cromosoma alélico pueden reordenarse asegurando que un linfocito B solo posea un reordenamiento productivo (exclusión alélica). Si ninguno de los dos reordenamientos es productivo el linfocito B muere por apoptosis. Los receptores pre-BCR se asocian a otras proteínas conocidas como  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  que actúan en la transducción de señales del receptor del linfocito B (59).

Dentro de un grupo de enfermedades bien estudiadas se encuentra la enfermedad de las cadenas pesadas (HCD), una proliferación de células linfoplasmocíticas de carácter monoclonal caracterizada por la síntesis de cadenas pesadas incompletas sin cadenas ligeras asociadas.

El diagnóstico de estas condiciones depende de la detección de estas moléculas inmunoglobulínicas estructuralmente anormales en el suero o en la orina de los pacientes. El diagnóstico bioquímico relega a un segundo plano el valor de la citología. Podemos encontrar proteinuria de Bence Jones (51) en más de la mitad de los casos de la enfermedad de las cadenas pesadas  $\mu$  y  $\gamma$ , muy esporádicamente, en otros tipos de enfermedades de cadenas pesadas. Se han descrito varias alteraciones genéticas (mutaciones, deleciones e inserciones) que tratan de explicar las anomalías de estas proteínas y la usual carencia de cadenas ligeras normales. Se ha descrito esta enfermedad para los tres tipos principales de cadenas pesadas: cadenas  $\alpha$ , cadenas  $\mu$  y cadenas  $\gamma$ . La enfermedad de las cadenas pesadas  $\alpha$  ( $\alpha$ -HCD) es la más frecuente de las tres, la enfermedad de las cadenas  $\gamma$  ( $\gamma$ -HCD) presenta una frecuencia intermedia y la enfermedad de las cadenas  $\mu$  ( $\mu$ -HCD) es muy rara.

Existe asociación directa entre determinadas entidades clínicas y diferentes subtipos de linfomas (36, 42, 49, 57, 64, 124, 129):

- Macroglobulinemia de Waldstrom: Linfoma Linfoplasmocítico
- Enfermedad de las cadenas pesadas gamma: Linfoma Linfoplasmocítico

- Enfermedad de las cadenas pesadas alfa: Linfoma de la Zona Marginal (Enfermedad nmunoproliferativa del Intestino Delgado.
- Enfermedades por depósito de Inmunoglobulinas: MM/Gamapatía monoclonal. - Amiloidosis Primaria: MM / Gamapatía monoclonal.

En el humano la proporción  $\kappa/\lambda$  en la inmunoglobulina de superficie de los linfocitos B maduros es 1.5/1. Cuando se produce un re arreglo productivo y se produce la cadena ligera, ésta se asocia con la cadena pesada  $\mu$  sintetizada previamente para formar el receptor IgM. Cuando los linfocitos expresan el receptor de linfocito B IgM se denominan linfocitos inmaduros . Los linfocitos B inmaduros expresan los marcadores CD20, CD21, CD22, CD24 y CD40 e IgM de superficie pero disminuyen el nivel de CD10 y pierden el TdT (28, 59).

Importante es que cuando un linfocito B adquiere la translocación Bcl-2-IGH continúa con su proceso de maduración y puede participar en las respuestas inmunes en los centros germinales adquiriendo el fenotipo de célula B de memoria y mutaciones en las IGH (cadenas pesadas de las inmunoglobulinas) secundarias al proceso de hipermutación somática. Desafortunadamente, en algunos casos la participación de estas células B con translocación Bcl-2-IGH en los centros germinales puede desembocar en la aparición de un linfoma folicular (35).

En estos casos de Linfomas de Alto grado las células son generalmente indiferenciadas tienen mayor capacidad para infiltrar o sea que caben dentro de este

prototipo celular, que por las alteraciones hace el cambio y expresa IgM. en estos casos IgM se expreso en el 100 %, se esperaría por la asociación que se expresara IgD pero se expresa IgG aunque luego se expresa IgD en el 90.9 de los casos. En caso que ocurriesen translocaciones que se han asociado a linfoma, podrían ocurrir como consecuencia azarosa de errores en el proceso de recombinación de genes necesario para la síntesis de inmunoglobulinas o receptores antigénicos y dar sobreexpresión de algunas Ig.

En los linfomas de bajo grado a como se puede observar en la tabla Nº 3 se demostró la presencia de cadenas Kappa y Lambda en un caso. En este grupo no se manifiesta la presencia de cadenas livianas en las inmunoglobulinas, pero hasta no determinar el perfil completo de las demás cadenas pesadas, no se puede concluir con la ausencia de inmunoglobulinas en estos casos, es importante revisar las cadenas pesadas para valorar la presencia o no de inmunoglobulinas (2, 12).

El marcador individual más importante de neoplasia de linfocitos B es la restricción de cadenas ligeras. Para la caracterización se exige demostrar también el perfil de restricción de cadenas pesadas y ligeras (127). Sin embargo, debemos tener en cuenta que las neoplasias de precursores B no expresan Igs. En algunos trabajos realizados y controles de calidad efectuados, El principal problema detectado ha sido la escasa sensibilidad de la técnica de visualización para cadenas e Igs, con una intensidad de la tinción o número de células inmunorreactivas inferior al esperado. La

excesiva tinción de fondo ha sido un problema menor, ya que su intensidad no impide, en general, la interpretación de la técnica. Problemas menos frecuentes, han sido los artefactos técnicos generales y los debidos a un exceso de pre tratamiento (9, 117, 123).

El linfocito B en su diferenciación va experimentado cambios importantes en las estructuras linfáticas periféricas, activa el mecanismo para acoplar cadenas pesadas y ligeras y sintetizar las primeras inmunoglobulinas (IgD e IgM) que quedan localizadas en el citoplasma o en la membrana celular, donde actúan como receptores para los antígenos y experimenta mutaciones somáticas como respuesta a estímulos antigénicos; lo que genera una gran diversidad de moléculas - anticuerpo. Finalmente, controla los reagrupamientos en las regiones constantes de las inmunoglobulinas para seleccionar el anticuerpo adecuado a cada situación. Así se configuran los cinco tipos de anticuerpos (IgD, IgM, IgG, IgA e IgE; algunos con varios subtipos) que se relacionan con efectores específicos (98, 124).

En algunos linfomas de bajo como el linfoma folicular el Inmunofenotipo. SIg + (IgM +/- IgD > IgG > IgA), Antígenos B-Asociados positivos (CD19, CD20, CD22, CD79a), CD10+, CD5-, CD23-, CD43-, CD11c-. no es la representación encontrada pero vemos como expresan las cadenas pesadas en el 100 % de los casos positivos para Miu, y Gamma, Delta con 72.7 % de los casos y Alfa solo 1 caso positivo (9 %).



Hay estudios donde reportan las enfermedades de Cadena Pesada que son procesos proliferativos linfoplasmacíticos caracterizados por la producción incompleta de cadenas pesadas con ausencia de cadenas ligeras (6, 31). Se han descrito variantes para cada una de las tres principales clases de inmunoglobulinas, siendo la más frecuente la enfermedad de cadenas Alfa, la de cadenas pesadas Miu es rara. La incidencia de cadenas pesadas Gamma es intermedia, su cuadro clínico patológico es heterogéneo, presentándose como un proceso asintomático benigno o como una enfermedad similar a un linfoma con linfadenopatias, esplenomegalia y hepatomegalia asociada o no a una proliferación linfoplasmacítica similar a la macroglobulinemia de Waldstrom. Es frecuente también su asociación con enfermedad autoinmune. Distintas variantes de Hodgkin y no-Hodgkin linfomas se han reportado asociados a esta enfermedad y a otras enfermedades ganglionares y extraganglionares que cursan con alternaciones inmunológicas (22, 51, 75, 84, 90, 128). En nuestras series está demostrado que son linfomas pero vemos que no expresan cadenas ligeras y si expresan cadenas pesadas, no expresando la alfa más que en un caso, existe un trastorno en cuanto a la distribución de las Ig en estas patologías que al igual que en los linfomas tienen patrones de distribución y en el caso de las cadenas tienden a ser de distribución citoplasmáticas.

Las manifestaciones clínicas, la morfología celular, el inmunofenotipo y los cambios moleculares son la base para diagnosticar los distintos tipos de linfomas. En algunos, la clínica está dominada por la participación de los ganglios linfáticos; otros

se acompañan de expresión leucémica; en un tercer grupo la enfermedad se inicia en las estructuras periféricas. Enfermos con el mismo diagnóstico tienen distinta evolución; presentan marcadas disparidades en la forma de presentación y en el perfil molecular. Esto es válido tanto para las formas indolentes, como para las agresivas. Cada uno de estos linfomas es consecuencia de la expansión clonal de linfocitos en diferentes etapas de maduración. El ancestro es el precursor linfoide B o linfoblasto B. En las etapas medulares, durante los reagrupamientos de los genes de las inmunoglobulinas, el linfoblasto experimenta alguna de las translocaciones que estarán presentes y serán específicas de determinados linfomas; por ejemplo t (74) en el linfoma folicular o t (74) en el linfoma de Burkitt. La estimulación antigénica, en las estructuras linfáticas ganglionares y extra ganglionares, genera una segunda onda de expansión que genera las condiciones óptimas para que ocurra el segundo evento (segundo paso) de la transformación maligna (88, 100, 128).

Un rasgo común a todo este grupo de linfomas es la expresión de inmunoglobulinas de superficie. Los otros cambios en el inmunofenotipo (expresión de distintos antígenos de diferenciación) permiten identificar los momentos a los que se ha llegado en el proceso de diferenciación. Así, el linfoma difuso de células B grandes, el más frecuente de las formas agresivas, es una neoplasia de los centroblastos del centro germinal; el linfoma folicular, el más frecuente de las formas indolentes, está relacionado con los centrocitos (100).

La leucemia linfoide crónica (LLC) es una entidad oncohematológica incluida dentro de los síndromes linfoproliferativos crónicos caracterizada por un aumento de una población linfoide disfuncional, clonal de inmunofenotipo B (>95%) y excepcionalmente T (<5%), con una expresión clínica que va desde estadios virtualmente indolentes, progresión y coexistencia de eventos de naturaleza autoinmune que comprometen una o varias líneas hemopoyéticas (28, 47).

Los criterios diagnósticos para Leucemia Linfoide Crónica (LLC), además de la clínica, examen físico y datos de laboratorio, incluyen:

- Linfocitosis en sangre  $> 5 \times 10^9 / L$ , linfocitos pequeños bien diferenciados.
- Infiltración de medula ósea por más de 30% de células linfoides bien diferenciadas
- Componente prolinfocítico menor de 55 %
- Inmunofenotipo: CD19, CD20, CD21, CD24 y CD5 positivos (+); SIg débil positivo.

En estos casos vemos que la inmunopositividad para las leucemias linfocíticas crónicas se demostró que eran de tipo B, positivos para CD 20, negativos para CD3, variable positividad en CD5, variable positividad para CD10, Bcl2 y Bcl6 positivo en pocos casos y no reportado en la mayoría de los casos, y un índice de proliferación de 5 a 30 %. (Tabla 8), cumpliendo con el hecho de que eran neoplasias de tipo B.

En las leucemias linfocíticas crónicas, como se puede observar en la Tabla 9, se demostró la presencia de cadenas kappa y lambda, tanto por inmunohistoquímica como por hibridación in situ. El caso LLC-3 presenta cadenas kappa y lambda demostrada tanto por inmunohistoquímica como por hibridación in situ. El caso LLC-5 demostró cadenas lambda por los dos métodos, el caso LLC-6 demostró lambda por ambos métodos y kappa solo por inmunohistoquímica, y el caso LLC-10 demostró cadenas lambda por ambos métodos. En cambio el caso LLC-5 demostró cadenas lambda solo por el método de inmunohistoquímica. demostrando más la presencia de Lambda en 5 casos y kappa en 2 casos, a diferencia de otros estudios es que la no expresión de ninguna cadena es menor o la minoría, en nuestra serie representa la mayoría las que no expresan las cadenas (salvo n=11 no expresados en 54 % que representa la mayoría en esta serie). y en este caso se expresa más Lambda (45.4 %) que Kappa que representa el (18.1%), igual a las series que no expresan mayoritariamente Kappa y minoritariamente Lambda. existiendo mayor restricción de cadenas Kappa que de Lambda (91, 115).

En nuestro estudio hemos obtenido una mayor restricción en las cadenas ligeras Kappa. La negatividad de una de las cadenas no es más que un dato, que tendremos que tener en consideración otros marcadores a la hora de establecer el diagnóstico de LLC-B.

En las leucemias linfocíticas crónicas las cadenas ligeras resultaron negativas por método de inmunohistoquímica, las pesadas Miu son positivas en el 100 % de los casos distribuidos 5 +, 4 ++ y 2 +++, la cadena gamma también fue + en todos los casos 3 con ++, y 9 +. la cadena delta 2 +++, 2 ++, 4 + y 3 negativos, la alfa solo un caso + el resto negativos. El inmunofenotipo de algunas leucemias expresa un linfocito B maduro y típicamente expresa una o más cadenas pesadas de Ig y un solo tipo de cadena ligera. Estas células expresan antígenos pan-B, incluidos CD19, CD20, CD22 y CD25. Esto se observa en estos casos que hay expresión de cadenas pesadas y ligeras. Se expresan las inmunoglobulinas de superficie y reordenamiento de genes de cadenas ligeras y pesadas de tipo monoclonal. (LLC e Ig)

En general, los factores pronósticos de las LLC pueden correlacionarse al menos con 4 elementos fundamentales: las características del enfermo, la magnitud de la masa neoplásica, la malignidad del clon leucémico y la respuesta terapéutica (100):

Los factores adversos relacionados con el paciente son la edad avanzada, el sexo masculino y el mal estado general.

- Relacionados con la masa tumoral se consideran de mal pronóstico los pacientes en estadios clínicos avanzados, el patrón histológico de infiltración medular difusa, los niveles séricos elevados de deshidrogenasa láctica (LDH), de  $\beta$ 2 microglobulina ( $\beta$ 2M) y del receptor soluble de la interleucina 2 (IL-2).

- Asociados con el grado de malignidad del clon leucémico se encuentran los siguientes factores de mal pronóstico: anomalías citomorfológicas, anomalías citogenéticas complejas, trisomía 12, deleción 11q23, deleción 17p, tiempo de duplicación de los linfocitos < 12 meses, niveles elevados de CD23 soluble (CD23s), anomalías moleculares (mutaciones/deleciones del gen p53, genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas en estado germinal, anomalías del inmunofenotipo (CD23-, FMC7+, presencia de antígenos mielomonocíticos, CD38+).
- Relacionados con el tratamiento se plantea que una mala respuesta representa un mal pronóstico.

Aunque los procesos linfoproliferativos se manifiesta en general de una forma heterogénea tanto en su aspecto clínico como evolutivo, en los últimos años se han logrado avances en su diagnóstico, que han contribuido a un mejor conocimiento de la enfermedad y al pronóstico de su evolución. Si tomamos en consideración los rápidos progresos en las ciencias médicas, se puede predecir que en los próximos años deben perfeccionarse los procedimientos diagnósticos y se podrán seleccionar los factores pronósticos con mayor impacto, todo lo cual contribuirá a la aplicación de los esquemas terapéuticos más apropiados en cada caso, para poder llevar los enfermos a una remisión molecular prolongada. Mientras tanto, el uso juicioso de los factores pronósticos clásicos continuará siendo un auxiliar indispensable al alcance

del hematólogo para el tratamiento convencional de los procesos de Linfomas y Leucemias Linfoides Crónicas.

**CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

**PRIMERA.** Se demostró en los Linfomas de alto grado la presencia de cadenas kappa (82.6 %) y lambda (54.5 %) por el método de inmunohistoquímica y por el método de hibridación in situ, expresándose más las cadenas Kappa que Lambda. En Leucemias linfocíticas crónicas 45.4 % Lambda y 18.1 % Kappa. Existiendo diferencia en ambos métodos.

**SEGUNDA.** Las cadenas pesadas que se expresan con mayor frecuencia en los Linfomas de alto grado, Linfomas de bajo grado y Leucemias linfocíticas crónicas son; Miu, Gamma y Delta, la Alfa se expresa en pocos casos.

**TERCERA:** Los linfomas de bajo presentan poca expresión de cadenas ligeras kappa y lambda. no así de cadenas Miu (100 %), Gamma (100 %) y Delta (72.7 %), que expresaron y la Alfa (9 %).

**CUARTA:** Los linfomas de alto grado y las leucemias linfocíticas crónicas revelan un patrón similar al demostrar la presencia de cadenas pesadas Alfa, Gamma, Delta y Miu. y restricciones de cadenas ligeras.

**QUINTA:** La alta variabilidad de expresión de cadenas ligeras y pesadas, tanto por inmunohistoquímica como por hibridación in situ, en los diferentes tipos de linfomas, hacen poco útil el uso de estas técnicas como un marcador único de monoclonalidad.

**RESUMEN**

En este estudio se describe la presencia de cadenas kappa y Lambda en 33 casos de procesos linfoproliferativos; Linfomas de alto grado, Linfomas de bajo grado y Leucemias Linfocíticas Crónicas, se demostró la presencia de cadenas Kappa y Lambda en Linfomas de alto grado y Leucemias Linfocíticas crónicas, mayor expresión de cadenas Kappa (82.6 %) ocurrió en Linfomas de alto grado, en cambio cadenas Lambda expresaron más (45.4 %) en Leucemias Linfocíticas Crónicas. Los linfomas de bajo expresaron en un 9 % cadenas Kappa y Lambda, solo en uno de los casos.

Las cadenas pesadas Miu, Gamma, Delta y Alfa se expresan en los Linfomas de alto grado, Linfomas de bajo grado y Leucemias Linfocíticas crónicas, casi con el mismo patrón de intensidad, la cadena Alfa se expresa en un caso (9 %) de los 11 estudiados en cada una de las patologías revisadas, en el caso de los Linfomas de bajo grado las cadenas pesadas Miu, Gamma y Delta se expresan en la mayoría de los casos siguiendo el patrón de positivo en el 100 % para Miu y Gamma, 72 % para Delta.

Las Leucemias Linfocíticas crónicas expresan restricción para cadenas Kappa y los Linfomas de alto grado para cadenas Lambda y los Linfomas de bajo grado Restricción de cadenas ligeras.

## **SUMMARY**

This study describes the presence of kappa and lambda chains in 33 cases of lymphoproliferative disorders, lymphomas of high-grade, low-grade lymphomas and chronic lymphocytic leukemias, showed the presence of kappa and lambda chains in high-grade lymphomas and lymphocytic leukemias chronic, increased expression of Kappa chains (82.6%) occurred in high-grade lymphomas, however Lambda chains expressed more (45.4%) in chronic lymphocytic leukemias. Lymphomas of low grade expressed in 9% kappa and lambda chains, only in one case.

Heavy chains Miu, Gamma, Delta and Alfa are expressed in high-grade lymphomas, low-grade lymphomas and chronic lymphocytic leukemias, almost with the same intensity pattern, the alpha chain is expressed in one case (9%) of the 11 studied in each of the conditions checked in the case of low grade lymphomas Miu heavy chains, Gamma and Delta are expressed in the majority of cases following the pattern of positive and 100% for gamma Miu, 72 % for Delta.

Chronic lymphocytic leukemias express restriction Kappa chains and high-grade lymphomas Lambda chains and low-grade lymphomas light chain restriction.

## **REFERENCIAS**

1. **Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS.** Cellular and Molecular Immunology, W.B. Sanders Company. 2000.
2. **Abdel-Ghafar AA, El Din El Telbany MA, Mahmoud HM, El-Sakhawy YN.** Immunophenotyping of chronic B-cell neoplasms: flow cytometry versus immunohistochemistry. *Hematol Rep* 2012;4:e3.
3. **Alba J.** Manual de histosondas: protocolo, laboratorios. CENBIMO. Lugo, España.
4. **Ambinder RF, Bhatia K, Martinez-Maza O, Mitsuyasu R.** Cancer biomarkers in HIV patients. *Curr Opin HIV AIDS* 2010;5:531-7.
5. **Andriko JA, Swerdlow SH, Aguilera NI, Abbondanzo SL.** Is lymphoplasmacytic lymphoma/immunocytoma a distinct entity? A clinicopathologic study of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 2001;25:742-51.
6. **Arai E, Shimizu M, Hirose T.** A review of 55 cases of cutaneous lymphoid hyperplasia: reassessment of the histopathologic findings leading to reclassification of 4 lesions as cutaneous marginal zone lymphoma and 19 as pseudolymphomatous folliculitis. *Hum Pathol* 2005;36:505-11.
7. **Arribas AJ, Campos-Martín Y, Gómez-Abad C, Algara P, Sánchez-Beato M, Rodríguez-Pinilla MS, Montes-Moreno S, Martínez N, Alves-Ferreira J, Piris MA, Mollejo M.** Nodal marginal zone lymphoma: gene expression and miRNA profiling identify diagnostic markers and potential therapeutic targets. *Blood* 2012;119:e9-e21.
8. **Arribas Castrillo JM, Vallina Alvarez E.** Hematología Temas de Patología Médica. Universidad Ediuono. 2005.
9. **Ashton-Key M, Jessup E, Isaacson PG.** Immunoglobulin light chain staining in paraffin-embedded tissue using a heat mediated epitope retrieval method. *Histopathology* 1996;29:525-31.
10. **Bayer-Garner IB, Prieto VG, Smoller BR.** Detection of clonality with kappa and lambda immunohistochemical analysis in cutaneous plasmacytomas. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:645-8.
11. **Belessi C, Stamatopoulos K, Hadzidimitriou A, Hatzi K, Smilevska T, Stavroyianni N, Marantidou F, Paterakis G, Fassas A, Anagnostopoulos A, Laoutaris N.** Analysis of expressed and non-expressed IGK locus rearrangements in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Med* 2005;11:52-8.
12. **Boy SC, van Heerden MB, Raubenheimer EJ, van Heerden WF.** Plasmablastic lymphomas with light chain restriction – plasmablastic extramedullary plasmacytomas? *J Oral Pathol Med* 2010;39:435-9.
13. **Butler JE, Zhao Y, Sinkora M, Wertz N, Kacs Kovics I.** Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. *Dev Comp Immunol* 2009;33:321-33.
14. **Cabanillas F.** Front-line management of diffuse large B cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2010;22:642-5.
15. **Capello D, Guarini A, Berra E, Mauro FR, Rossi D, Ghia E, Cerri M, Logan J, Foà R, Gaidano G.** Evidence of biased immunoglobulin variable gene usage in highly stable



- B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2004;18:1941-7.
16. **Carter D, Greenson JK, Oberman HA, Reuter VE, Stoler MH.** Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. Lippincott Williams & Wilkins. 2004.
  17. **Castrycck H, van den Driessche M, Hagemeyer A, Stul M, Wynendaele W, Vandenberghe P, Moerman J.** Coexistence of light chain disease and chronic lymphocytic leukaemia, a complex karyotype with a rapid fatal outcome. *Clin Lab Haematol* 2006;28:138-40.
  18. **Catherwood MA, Gonzalez D, Patton C, Dobbin E, Venkatraman L, Alexander HD.** Improved clonality assessment in germinal centre/post-germinal centre non-Hodgkin's lymphomas with high rates of somatic hypermutation. *J Clin Pathol* 2007;60:524-8.
  19. **Chang H, Cerny J.** Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia with two distinct cellpopulations: Evidence for separate clonal origins. *Am J Clin Pathol* 2006;126:23-8.
  20. **Charafeddine KM, Jabbour MN, Kadi RH, Daher RT.** Extended use of serum free light chain as a biomarker in lymphoproliferative disorders: a comprehensive review. *Am J Clin Pathol* 2012;137:890-7.
  21. **Chen HI, Akpolat I, Mody DR, Lopez-Terrada D, De Leon AP, Luo Y, Jorgensen J, Schwartz MR, Chang CC.** Restricted kappa/lambda light chain ratio by flow cytometry in germinal center B cells in Hashimoto thyroiditis. *Am J Clin Pathol* 2006;125:42-8.
  22. **Colović N, Terzić T, Andelić B, Sretenović M, Mihaljević B, Lipkovski JM, Colović M.** Nephrotic syndrome and acute renal failure in non-Hodgkin lymphoplasmacytic lymphoma. *Med Oncol* 2008;25:458-61.
  23. **Cortelazzo S, Ponzoni M, Ferreri AJ, Hoelzer D.** Lymphoblastic lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011;79:330-43.
  24. **Davids MS, Murali MR, Kuter DJ.** Serum free light chain analysis. *Am J Hematol* 2010;85:787-90.
  25. **Delgado J, Canales MA, Garcia B, Alavarez-Ferreira J, Garcia Grande A, Hernandez-Navarro F.** Radiation therapy and combination of cladribine, cyclophosphamide, and prednisone as treatment of Bing-Neel syndrome: Case report and review of the literature. *Am J Hematol* 2002;69:127-131.
  26. **Delville JP, Heimann P, El Housni H, Boutriaux M, Jeronnez A, Remmelink M, Lasudry J, Pradier O, Kentos A.** Biclinal low grade B-cell lymphoma confirmed by both flow cytometry and karyotypic analysis, in spite of a normal kappa/lambda Ig light chain ratio. *Am J Hematol* 2007;82:473-80.
  27. **Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, Palumbo A, Jagannath S, Blade J, Lonial S, Dimopoulos M, Comenzo R, Einsele H, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Harousseau JL, Attal M, Tosi P, Sonneveld P, Boccadoro M, Morgan G, Richardson P, Sezer O, Mateos MV, Cavo M, Joshua D, Turesson I, Chen W, Shimizu K, Powles R, Rajkumar SV, Durie BG; International Myeloma Working Group.**

- International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-24.
28. **Dorshkind K, Rawlings DJ.** B cell development. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil S, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. Hematology Basic Principles and Practice. Elsevier. 2005.
  29. **Duque RE.** Minimal disease detection of B-cell lymphoproliferative disorders by flow cytometry: multidimensional cluster analysis. *Hematology* 2012;17 Suppl 1:S63-5.
  30. **Edinger JT, Lorenzo CR, Breneman DL, Swerdlow SH.** Primary cutaneous marginal zone lymphoma with subclinical cutaneous involvement and biclonality. *J Cutan Pathol* 2011;38:724-30.
  31. **Engels EA, Preiksaitis J, Zingone A, Landgren O.** Circulating antibody free light chains and risk of posttransplant lymphoproliferative disorder. *Am J Transplant* 2012;12:1268-74.
  32. **Fernand JP, Brouet JC.** Heavy-chain diseases. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999;13:1281-94.66.
  33. **Flowers CR, Armitage JO.** A decade of progress in lymphoma: advances and continuing challenges. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2010;10:414-23.
  34. **Freedman A.** Follicular lymphoma: 2011 update on diagnosis and management. *Am J Hematol* 2011;86:768-75.
  35. **Fujimoto Y, Nomura K, Fukada S, Shimizu D, Shimura K, Matsumoto Y, Horiike S, Nishida K, Shimazaki C, Abe M, Taniwaki M.** Immunoglobulin light chain gene translocations in non-Hodgkin's lymphoma as assessed by fluorescence in situ hybridisation. *Eur J Haematol* 2008;80:143-50.
  36. **Fujiwara T, Ishizawa K, Kohata K, Yamamoto J, Yamada MF, Kameoka J, Ichinohasama R, Harigae H.** Aggressive B-cell lymphoma with dual surface immunoglobulin light-chain expression. *Intern Med* 2007;46:1458-61.
  37. **Gaidano G, Dalla-Favera R.** The biology of high grade non-Hodgkin's lymphoma. The Lymphomas. W. B. Saunders. 1998.
  38. **García-Muñoz R, Panizo C, Bendandi M, Llorente L.** Autoimmunity and lymphoma: is mantle cell lymphoma a mistake of the receptor editing mechanism? *Leuk Res* 2009;33:1437-9.
  39. **García-Sanz R, Ocio E, Caballero A, Magalhães RJ, Alonso J, López-Anglada L, Villaescusa T, Puig N, Hernández JM, Fernández-Calvo J, Aguilar A, Martín A, López R, Paiva B, Orfao A, Vidriales B, San-Miguel JF, Del Carpio D.** Post-treatment bone marrow residual disease > 5% by flow cytometry is highly predictive of short progression-free and overall survival in patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;11:168-71.
  40. **Gaulard P, de Leval L.** Follicular helper T cells: implications in neoplastic hematopathology. *Semin Diagn Pathol* 2011;28:202-13.

41. **Ghiotto F, Marcatili P, Tenca C, Calevo MG, Yan XJ, Albesiano E, Bagnara D, Colombo M, Cutrona G, Chu CC, Morabito F, Bruno S, Ferrarini M, Tramontano A, Fais F, Chiorazzi N.** Mutation pattern of paired immunoglobulin heavy and light variable domains in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Mol Med* 2011;17:1188-95.
42. **Ghobrial IM, Zhang Y, Liu Y, Ngo H, Azab F, Sacco A, Azab A, Maiso P, Morgan B, Quang P, Issa GC, Leleu X, Rocco AM.** Targeting the bone marrow in Waldenstrom macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;11 Suppl 1:S65-9.
43. **Gibson SE, Swerdlow SH, Craig FE, Surti U, Cook JR, Nalesnik MA, Lowe C, Wood KM, Bacon CM.** EBV-positive extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in the posttransplant setting: a distinct type of posttransplant lymphoproliferative disorder? *Am J Surg Pathol* 2011;35:807-15.
44. **Gómez J.** Histopatología y Clasificación de los LNH en: Linfomas B y T. Biología, Clínica y Tratamiento.: Roche Madrid, España. 2002.
45. **Goy A, Kahl B.** Mantle cell lymphoma: the promise of new treatment options. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011;80:69-86.
46. **Guastafierro S, Celentano M, Cuomo C, Falcone U.** Chronic lymphocytic leukemia with associated lambda-light-chain and IgG lambda paraproteins simulating a biclonal gammopathy. *Clin Lab* 2010;56:577-80.
47. **Gujral S, Polampalli SN, Badrinath Y, Kumar A, Subramanian PG, Nair R, Gupta S, Sengar M, Nair C.** Immunophenotyping of mature B-cell non Hodgkin lymphoma involving bone marrow and peripheral blood: critical analysis and insights gained at a tertiary care cancer hospital. *Leuk Lymphoma* 2009;50:1290-300.
48. **Habermann TM.** New developments in the management of diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology* 2012;17 Suppl 1:S93-7.
49. **Hadzidimitriou A, Darzentas N, Murray F, Smilevska T, Arvaniti E, Tresoldi C, Tsaftaris A, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Davi F, Ghia P, Rosenquist R, Stamatopoulos K, Belessi C.** Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113:403-11.
50. **Hagemeister FB.** Maintenance and consolidation strategies in non-Hodgkin's lymphoma: A review of the data. *Curr Oncol Rep* 2010;12:395-401.
51. **Hill PG, Forsyth JM, Rai B, Mayne S.** Serum free light chains: an alternative to the urine Bence Jones proteins screening test for monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2006;52:1743-8.
52. **Hsi ED, Goldblum JR.** Hematopathology, Foundations in Diagnostic Pathology. 2007.
53. **Iancu D, Hao S, Lin P, Anderson SK, Jorgensen JL, McLaughlin P, Medeiros LJ.** Follicular lymphoma in staging bone marrow specimens: correlation of histologic findings with the results of flow cytometry immunophenotypic analysis. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:282-7.

54. **Jaaffe ES, Harris LN, Stein H, Vardiman JW.** Pathology and genetics of Tumours of haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health organization classification of tumours. *IARC Press* 2001.
55. **Jones D.** Neoplastic Hematopathology Experimental and Clinical Approaches. Humana Press. 2010.
56. **Kansal R, Deeb G, Barcos M, Wetzler M, Brecher ML, Block AW, Stewart CC.** Precursor B lymphoblastic leukemia with surface light chain immunoglobulin restriction: a report of 15 patients. *Am J Clin Pathol* 2004;121:512-25.
57. **Kaplan B, Livneh A, Sela BA.** Immunoglobulin free light chain dimers in human diseases. *ScientificWorld Journal* 2011;11:726-35.
58. **Kaufman JL, Winton EF, Lonial S, Armitage JO, Khoury HJ.** Characteristics and outcomes of diffuse large B-cell lymphoma presenting in leukaemic phase. *Br J Haematol* 2012;158:608-14.
59. **Kelley WN.** Medicina Interna. Editorial Médica Panamericana. 1993.
60. **Kipps TJ, Beutler E, Litchman MA, Collier BS, Kipps TJ, Seligsohn U.** Chronic Lymphocytic Leukemia and related disorders. Williams Hematology. McGraw-Hill. 2001.
61. **Kobayashi Y.** Molecular target therapy in hematological malignancy: front-runners and prototypes of small molecule and antibody therapy. *Jpn J Clin Oncol* 2011;41:157-64.
62. **Kobrin C, Cha SC, Qin H, Raffeld M, Fend F, Quintanilla-Martinez L, Grove S, Jaffe ES, Kwak LW.** Molecular analysis of light-chain switch and acute lymphoblastic leukemia transformation in two follicular lymphomas: implications for lymphomagenesis. *Leuk Lymphoma* 2006;47:1523-34.
63. **Kojima M, Sato E, Oshimi K, Murase T, Koike T, Tsunoda S, Matsumoto T, Marutsuka K, Ogiya D, Moriuchi M, Tokunaka M, Yara Kikuti Y, Kikuchi T, Nakamura N, Ando K.** Characteristics of CD5-positive splenic marginal zone lymphoma with leukemic manifestation ; clinical, flow cytometry, and histopathological findings of 11 cases. *J Clin Exp Hematop* 2010;50:107-12.
64. **Kristinsson SY, Goldin LR, Turesson I, Björkholm M, Landgren O.** Familial aggregation of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia with solid tumors and myeloid malignancies. *Acta Haematol* 2012;127:173-7.
65. **Kumar V, Aster JC, Fausto N, Abbul K, Abbas AK, Robbins y Cotran.** Patología estructural y funcional. Saunders Elsevier. 2010.
66. **Landgren O, Albitar M, Ma W, Abbasi F, Hayes RB, Ghia P, Marti GE, Caporaso NE.** B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2009;360:659-67.
67. **Lefebvre C, Fabre B, Vettier C, Rabin L, Florin A, Wang J, Gressin R, Jacob MC, Callanan M, Leroux D.** Composite splenic marginal zone lymphoma and mantle cell lymphoma arising from 2 independent B-cell clones. *Hum Pathol* 2007;38:660-7.

68. **Leon Martínez G, Baquera Heredia J, Ortiz Hidalgo C.** Linfoma difuso de células grandes B, con diferenciación plasmacítica extensa y numerosas células de Mott. Informe de un caso poco frecuente y breve nota histórica. *Patol Rev Latinoam* 2011;49:151-156.
69. **Leong ASY, Cooper K, Leong FJWA.** Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. Oxford University Press. 1999.
70. **Levin C, Mirzamani N, Zwerner J, Kim Y, Schwartz EJ, Sundram U.** A comparative analysis of cutaneous marginal zone lymphoma and cutaneous chronic lymphocytic leukemia. *Am J Dermatopathol* 2012;34:18-23.
71. **Li K, Tipps AM, Wang HY.** Anaplastic lymphoma kinase-positive diffuse large B-cell lymphoma presenting as an isolated nasopharyngeal mass: a case report and review of literature. *Int J Clin Exp Pathol* 2010;4:190-6.
72. **Longo DL.** Harrison's Hematology and oncology Mac Graw Hill Medical. 2010.
73. **Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA et al.** prediction of survival on diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *New Engl J Med* 2004;350:1828-1837.
74. **Lossos I, Jones C, Warnke R, Natkunam Y, Kaizer H, Zehnder J, Tibshirani R, Levy R.** Expression of a single gene, bcl-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2001;98:945-51.
75. **Louissaint A Jr, Ferry JA, Soupir CP, Hasserjian RP, Harris NL, Zukerberg LR.** Infectious mononucleosis mimicking lymphoma: distinguishing morphological and immunophenotypic features. *Mod Pathol* 2012;25:1149-59.
76. **Lu J, Chang KL.** Practical immunohistochemistry in hematopathology: a review of useful antibodies for diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2011;18:133-51.
77. **Magro CM, Porcu P, Ahmad N, Klinger D, Crowson AN, Nuovo G.** Cutaneous immunocytoma: a clinical, histologic, and phenotypic study of 11 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:216-24.
78. **Maloney DG.** Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2012;366:2008-16.
79. **Maloney D, Morschhauser F, Linden O, Hagenbeek A, Gisselbrecht C.** Diversity in antibody-based approaches to non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2010;51 Suppl 1:20-7.
80. **Mannouji K, Tasaka T, Akiyama T, Irei I, Sano F, Matsuhashi Y, Wada H, Tohyama K, Sugihara T, Sadahira Y.** Transformation from follicular lymphoma to high-grade B-cell lymphoma/leukemia with additional t(2;8)(p12;q24), with inverse expressions of c-MYC and BCL-2, and light-chain switch. *Pathol Int* 2009;59:261-4.
81. **Marks DI.** Treating the "older" adult with acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:13-20.
82. **Maurer MJ, Cerhan JR, Katzmann JA, Link BK, Allmer C, Zent CS, Call TG, Rabe KG, Hanson CA, Kay NE, Slager SL, Witzig TE, Shanafelt TD.** Monoclonal and polyclonal

- serum free light chains and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;118:2821-6.
83. **Maurer MJ, Micallef IN, Cerhan JR, Katzmann JA, Link BK, Colgan JP, Habermann TM, Inwards DJ, Markovic SN, Ansell SM, Porrata LF, Johnston PB, Nowakowski GS, Thompson CA, Gupta M, Syrbu SI, Kurtin PJ, Macon WR, Nikcevic DA, Witzig TE.** Elevated serum free light chains are associated with event-free and overall survival in two independent cohorts of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2011;29:1620-6.
  84. **McElroy MK, Kulidjian AA, Sumit R, Weidner N.** Benign lymphoid hyperplasia (pseudolymphoma) of soft tissue. *Hum Pathol* 2011;42:1813-8.
  85. **McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S.** Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol* 2012;29:2-11.
  86. **Muringampurath-John D, Jaye DL, Flowers CR, Saxe D, Chen Z, Lechowicz MJ, Weisenburger DD, Bast M, Arellano ML, Bernal-Mizrachi L, Heffner LT, McLemore M, Kaufman JL, Winton EF, Lonial S, Armitage JO, Houry HJ.** Characteristics and outcomes of diffuse large B-cell lymphoma presenting in leukaemic phase. *Br J Haematol* 2012 Sep;158(5):608-14.
  87. **Natkunam Y, Farinha P, His ED et al.** LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J Clin Oncol* 2008;26:447.
  88. **Naushad H, Choi WW, Page CJ, Sanger WG, Weisenburger DD, Aoun P.** Mantle cell lymphoma with flow cytometric evidence of clonal plasmacytic differentiation: a case report. *Cytometry B Clin Cytom* 2009 May;76(3):218-24.
  89. **Nicholson KM, Patel KP, Duvic M, Prieto VG, Tetzlaff MT.** Bi-clonal, multifocal primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: report of a case and review of the literature. *J Cutan Pathol* 2012;39:866-71.
  90. **Pajor L, Lacza A, Kereskai L, Jákos P, Egyed M, Iványi JL, Radványi G, Dombi P, Pál K, Losonczy H.** Increased incidence of monoclonal B-cell infiltrate in chronic myeloproliferative disorders. *Mod Pathol* 2004;17:1521-30.
  91. **Pan ZG, Zhang QY, Lu ZB, Quinto T, Rozenvald IB, Liu LT, Wilson D, Reddy V, Huang Q, Wang HY, Ren YS.** Extracavitary KSHV-associated Large B-Cell Lymphoma: A Distinct Entity or a Subtype of Primary Effusion Lymphoma? Study of 9 Cases and Review of an Additional 43 Cases. *Am J Surg Pathol* 2012;36:1129-40.
  92. **Paolini S, Gazzola A, Sabattini E, Bacci F, Pileri S, Piccaluga PP.** Pathobiology of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol* 2011;28:124-34.
  93. **Piris MA, Arribas A, Mollejo M.** Marginal zone lymphoma. *Semin Diagn Pathol* 2011;28:135-45.
  94. **Pratt G.** The evolving use of serum free light chain assays in haematology. *Br J Haematol* 2008;141:413-22.

95. **Pratt G, Harding S, Holder R, Fegan C, Pepper C, Oscier D, Gardiner A, Bradwell AR, Mead G.** Abnormal serum free light chain ratios are associated with poor survival and may reflect biological subgroups in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009;144:217-
96. **Remstein ED, Dogan A, Einerson RR, Paternoster SF, Fink SR, Law M, Dewald GW, Kurtin PJ.** The incidence and anatomic site specificity of chromosomal translocations in primary extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) in North America. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1546-53.
97. **Rodak FB.** Hematología Fundamentos y Aplicaciones clínicas. Editorial Panamericana. 2004.
98. **Roitt IM, Delves PJ.** Inmunología Fundamentos. Editorial Médica Panamericana. 2008.
99. **Rosai J.** Surgical Pathology Ackerman's. Mosby. 1996
100. **Ruiz Argüelles GJ.** Fundamentos de Hematología. Editorial Panamericana.. 2009
101. **Sacco A, Issa GC, Zhang Y, Liu Y, Maiso P, Ghobrial IM, Roccaro AM.** Epigenetic modifications as key regulators of Waldenstrom's Macroglobulinemia biology. *J Hematol Oncol* 2010;3:38.
102. **Saito H, Oka K, Nakamura N, Nagayama R, Hakozaki H, Mori N.** A common clonal origin of nodal marginal zone B-cell lymphoma and plasma cell myeloma demonstrating different immunophenotypes: a case report of composite lymphoma. *Diagn Mol Pathol* 2004;13:75-80.
103. **Sander B.** Mantle cell lymphoma: recent insights into pathogenesis, clinical variability, and new diagnostic markers. *Semin Diagn Pathol* 2011;28:245-55.
104. **San Miguel JF, Vidriales MB, Ocio E, Mateo G, Sánchez-Guijo F, Sánchez ML, Escribano L, Báñez A, Moro MJ, Hernández J, Aguilera C, Cuello R, García-Frade J, López R, Portero J, Orfao A.** Immunophenotypic analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003;30:187-95.
105. **Sato K, Ueda Y, Yokoi M, Hayashi K, Kosaka T, Katsuda S.** Reactive lymphoid hyperplasia of the liver in a patient with multiple carcinomas: a case report and brief review. *J Clin Pathol* 2006;59:990-2
106. **Schneider C, Pasqualucci L, Dalla-Favera R.** Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Diagn Pathol* 2011;28:167-77.
107. **Schroers R, Baraniskin A, Heute C, Kuhnenn J, Alekseyev A, Schmiegel W, Schlegel U, Pels HJ.** Detection of free immunoglobulin light chains in cerebrospinal fluids of patients with central nervous system lymphomas. *Eur J Haematol* 2010;85:236-42.
108. **Shapiro RS.** Malignancies in the setting of primary immunodeficiency: Implications for hematologists/oncologists. *Am J Hematol* 2011;86:48-55.
109. **Soria JC, Blay JY, Spano JP, Pivot X, Coscas Y, Khayat D.** Added value of molecular targeted agents in oncology. *Ann Oncol* 2011;22:1703-16.

110. **Stamatopoulos K, Belessi C, Hadzidimitriou A, Smilevska T, Kalagiakou E, Hatzi K, Stavroyianni N, Athanasiadou A, Tsompanakou A, Papadaki T, Kokkini G, Paterakis G, Saloum R, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Fassas A.** Immunoglobulin light chain repertoire in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005;106:3575-83.
111. **Stamatopoulos K, Belessi C, Papadaki T, Kalagiakou E, Stavroyianni N, Douka V, Afendaki S, Saloum R, Parasi A, Anagnostou D, Laoutaris N, Fassas A, Anagnostopoulos A.** Immunoglobulin heavy- and light-chain repertoire in splenic marginal zone lymphoma. *Mol Med* 2004;10:89-95.
112. **Stenberg S.** Histology for pathologists. Lippincott-Raven. 1997.
113. **Strøm EH, Fogazzi GB, Banfi G, Pozzi C, Mihatsch MJ.** Light chain deposition disease of the kidney. Morphological aspects in 24 patients. *Virchows Arch* 1994;425:271-80.
114. **Talaulikar D, Dahlstrom JE, Shadbolt B, Broomfield A, McDonald A.** Role of immunohistochemistry in staging diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *J Histochem Cytochem* 2008;56:893-900.
115. **Tanaka T, Kitabatake K, Iino M, Goto K.** Immunohistochemical comparison of CD5, lambda, and kappa expression in primary and recurrent buccal mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas. *Diagn Pathol* 2011;6:82.
116. **Terada T.** CD5-positive marginal zone B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) of the lung. *Diagn Pathol* 2012;7:16.
117. **Thompson CA, Maurer MJ, Cerhan JR, Katzmann JA, Ansell SM, Habermann TM, Macon WR, Weiner GJ, Link BK, Witzig TE.** Elevated serum free light chains are associated with inferior event free and overall survival in Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol* 2011;86:998-1000.
118. **Todorovic M, Pavlovic M, Balint B, Kraguljac N, Mihaljevic B, Bogdanovic A, Elezovic I, Boskovic D, Colovic M.** Immunophenotypic profile and clinical characteristics in patients with advanced stage mantle cell lymphoma. *Med Oncol* 2007;24:413-8.
119. **Tolar P, Sohn HW, Pierce SK.** Viewing the antigen-induced initiation of B-cell activation in living cells. *Immunol Rev* 2008;221:64-76.
120. **Tsai HT, Caporaso NE, Kyle RA, Katzmann JA, Dispenzieri A, Hayes RB, Marti GE, Albitar M, Ghia P, Rajkumar SV, Landgren O.** Evidence of serum immunoglobulin abnormalities up to 9.8 years before diagnosis of chronic lymphocytic leukemia: a prospective study. *Blood* 2009;114:4928-32.
121. **Vaidyanathan G, Ngamphaiboon N, Hernandez-Ilizaliturri FJ.** Clinical spectrum and prognosis of follicular lymphoma with blastoid transformation: case series and a review of the literature. *Ann Hematol* 2011;90:955-62.
122. **Vera J, Savoldo B, Vigouroux S, Biagi E, Pule M, Rossig C, Wu J, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK, Dotti G.** T lymphocytes redirected against the kappa light chain of human immunoglobulin efficiently kill mature B lymphocyte-derived malignant cells. *Blood* 2006;108:3890-7.



123. **Vermeersch P, Van Hoovels L, Delforge M, Mariën G, Bossuyt X.** Diagnostic performance of serum free light chain measurement in patients suspected of a monoclonal B-cell disorder. *Br J Haematol* 2008;143:496-502.
124. **Vernon SE, Morgan TW.** Immunoglobulin light chain staining of lymph node biopsies: an interlaboratory comparison. *Ann Clin Lab Sci* 1981;11:525-9.
125. **Vettermann C, Schlissel MS.** Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunol Rev* 2010;237:22-42.
126. **Vose JM.** Mantle cell lymphoma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *Am J Hematol* 2012;87:604-9.
127. **Weiss LM, Loera S, Bacchi CE.** Immunoglobulin light chain immunohistochemistry revisited, with emphasis on reactive follicular hyperplasia versus follicular lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18:199-205.
128. **Wong KF, Yuen HL, Leung JN, Chan JK.** Polyclonal B-cell lymphocytosis mimicking malignant lymphoma in a newborn. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:251-2.
129. **Xu D.** Dual surface immunoglobulin light-chain expression in B-cell lymphoproliferative disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:853-6.
130. **Zhang Y, Gostissa M, Hildebrand DG, Becker MS, Boboila C, Chiarle R, Lewis S, Alt FW.** The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Adv Immunol* 2010;106:93-133.