

## **Evolució en el diagnòstic per immunofenotip de les Síndromes Limfoproliferatives Cròniques B a Catlab**

Els limfòcits són cèl·lules del sistema immunitari d'origen hematopoètic, encarregades de reconèixer i respondre de forma específica i adaptada davant diferents agents estranys i d'induir tolerància front a estructures pròpies. En termes generals, dins dels limfòcits s'engloben dos grans grups depenent del seu origen i funció: els limfòcits T i els limfòcits B. A més, existeix un tercer grup de cèl·lules limfoides que comparteixen alguns mecanismes efectors de la resposta immune amb els limfòcits T, les cèl·lules *Natural Killer* (NK).

Els limfòcits B i T circulants deriven, igual que totes les cèl·lules sanguínies, de les cèl·lules mare hematopoètiques del moll de l'os. La cèl·lula mare dona lloc, entre d'altres, als limfoblasts (cèl·lules limfoides més immadures) i d'ells, després de successives etapes maduratives, s'arriba als limfòcits. La transformació neoplàsica d'aquestes cèl·lules pot produir-se en qualsevol d'aquestes etapes maduratives del limfòcit i això origina els diferents tipus de síndromes limfoproliferatives (SLP). Aquest fet explica la gran varietat i heterogeneïtat biològica i clínica d'aquests tumors.

Les síndromes limfoproliferatives cròniques (SLPC) constitueixen un grup heterogeni de malalties oncohematològiques caracteritzades per l'expansió clonal de cèl·lules limfoides d'aspecte madur que reflecteixen les característiques de diferents subpoblacions normals de limfòcits dels que deriven.

Des del punt de vista fenotípic i d'acord amb el seu origen, les SLPC es classifiquen en SLPC-B, T i NK. No obstant, a la classificació actual de l'Organització Mundial de la Salut (OMS), les SLPC-T i NK es consideren sovint de forma conjunta, degut a que alguns tipus de SLPC-T i NK presenten característiques clíniques, morfològiques i evolutives similars, independentment de la natura de la cèl·lula expandida, i clarament diferents de les neoplàsies de limfòcits B madurs.

# Catlab Informa

A la pràctica, les SLPC-B presenten una incidència clarament superior a la de les SLPC-T i són rars els casos de SLPC-NK. Segons diferents autors, les SLPC-B representen més del 90-95% de totes les malalties limfoproliferatives cròniques. Tan mateix, cal destacar que les SLPC-B són un grup ampli d'entitats diferents, clínica i biològicament ben definides, mentre que el nombre de SLPC-T i NK és significativament més reduït.

Clàssicament, davant la sospita de la possible existència d'un procés leucèmic i/o limfomatós, el rastreig diagnòstic i la caracterització de les hemopaties malignes s'ha basat en els estudis citomorfològics i histopatològics de sang perifèrica (SP), moll de l'os (MO), òrgans limfoides i altres teixits.

A les últimes dècades, s'han introduït noves eines de recolzament al diagnòstic hematològic, de les que han resultat especialment útils: en una primera fase, els recomptes cel·lulars automatitzats pels comptadors hematològics (de sang perifèrica i moll de l'os) i la punció-aspiració d'agulla fina (PAAF) de teixits amb sospita d'infiltració tumoral, i en una segona etapa, la caracterització fenotípica, citogenètica i molecular de les cèl·lules neoplàsiques.

A partir de finals dels anys 80, la informació fenotípica i genètica s'ha anat incorporant progressivament i de forma massiva a la pràctica diagnòstica diària a través de les noves classificacions de consens, d'us estès en el diagnòstic i la classificació de les hemopaties malignes.

# Catlab Informa

Tot això ha portat que a la classificació actual de les hemopaties malignes de la Organització Mundial de la Salut (OMS), classificació de referència (inicialment publicada a l'any 2001 i amb actualitzacions al 2008 i 2016), la definició de la gran majoria de les diferents entitats incloses dins de cada subgrup d'hemopaties clonals tingui en compte simultàniament criteris citomorfològics, histopatològics, immunofenotípics, genètics-moleculars, a més del comportament clínic de la malaltia. És el que avui coneixem com diagnòstic integrat.

En el cas de les tècniques immunofenotípiques, l'evolució ha estat especialment notable en els últims anys, sobretot a partir del moment en que s'han començat a utilitzar a la rutina dels laboratoris clínics marcatges simultanis amb quatre, sis, buit i fins a dotze anticossos marcats amb diferents fluorocroms i analitzats per citometria de flux (CMF). Amb ells s'ha pogut demostrar que les tècniques immunofenotípiques proporcionen un recompte fiable, altament específic, sensible i reproducible de les diferents subpoblacions cel·lulars presents a una mostra biològica, sempre i quan aquesta última estigui constituïda per suspensions unicel·lulars (cèl·lules individualitzades). Inclús permeten distingir, dins d'un compartiment cel·lular concret, entre cèl·lules neoplàsiques i la seva contrapartida normal, quan ambdues coexisteixen en una mateixa mostra.

L'èxit dels anàlisis multiparamètrics per CMF ha estat particularment evident en el rastreig diagnòstic de les síndromes limfoproliferatives cròniques tant en SP, com en MO, gangli limfàtic, o en diferents líquids corporals com el líquid cefalorraquidi (LCR), especialment en el rastreig diagnòstic de la clonalitat B en les SLPC-B i la presència de característiques fenotípiques aberrants a les cèl·lules B neoplàsiques, també útils per a l'avaluació d'infiltració tissular al diagnòstic i pel seguiment de malaltia mínima residual després del tractament farmacològic.

Els avenços en el coneixement de les diferències fenotípiques existents entre les cèl·lules B normals i neoplàsiques, juntament amb la disponibilitat d'un nombre creixent de fluorocroms i d'equips (citòmetres digitals amb dos o més làsers) capaços

# Catlab Informa

de detectar múltiples fluorescències simultàniament, han fet que la citometria es converteixi en la tècnica d'elecció pel diagnòstic i han requerit que es modifiquin les estratègies d'anàlisi.

Les cèl·lules neoplàsiques de les SLPC-B mostren característiques de diferents subpoblacions de cèl·lules B normals, aturades en estadis maduratius concrets. Per tant, el fenotip de les cèl·lules B normals és un referent imprescindible per a la correcta caracterització fenotípica de les cèl·lules B neoplàsiques i per identificar el grau maduratiu de la clona neoplàsica. Se sap que aquestes presenten patrons d'expressió de proteïnes alterats (aberracions fenotípiques), probablement degut a alteracions genètiques i moleculars adquirides per la cèl·lula neoplàsica i/o la seva interacció amb el microambient tissular. Això suposa que cada patró fenotípic sigui característic de cada grup diagnòstic de SLPC-B. Encara que s'ha de tenir present l'existència de cert grau de solapament en els perfils immunofenotípics entre les diferents entitats, fet que dificulta el diagnòstic i resta especificitat a la CMF a l'hora de classificar les SLPC-B.

En aquest sentit, Euroflow (consorci científic independent patrocinat per la comissió europea, que col·labora amb l'Associació Europea d'Hematologia (EHA) i amb expansió mundial i que té com a objectiu la innovació i estandarització del diagnòstic hematològic per citometria i biologia molecular) ha desenvolupat protocols d'estandardització i optimització dels equips (SOP), i ha incorporat nous marcadors en els panells d'anticossos amb l'objectiu de diferenciar de forma més eficaç les cèl·lules limfoides normals i les cèl·lules neoplàsiques, i a la vegada perfeccionar la classificació d'aquestes últimes en categories de la OMS. La classificació actual de les neoplàsies limfoides madures de la OMS (WHO) inclou les següents entitats (figura 1):

# Catlab Informa

**Table 1. 2016 WHO classification of mature lymphoid, histiocytic, and dendritic neoplasms**

## **Mature B-cell neoplasms**

Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
Monoclonal B-cell lymphocytosis*
B-cell prolymphocytic leukemia
Splenic marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia
<i>Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>
<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>
<i>Hairy cell leukemia-variant</i>
Lymphoplasmacytic lymphoma
Waldenström macroglobulinemia
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*
μ heavy-chain disease
γ heavy-chain disease
α heavy-chain disease
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*
Plasma cell myeloma
Solitary plasmacytoma of bone
Extrasosseous plasmacytoma
Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
Nodal marginal zone lymphoma
<i>Pediatric nodal marginal zone lymphoma</i>
Follicular lymphoma
In situ follicular neoplasia*
Duodenal-type follicular lymphoma*
Pediatric-type follicular lymphoma*
<i>Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement*</i>
Primary cutaneous follicle center lymphoma
Mantle cell lymphoma
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV <sup>+</sup> DLBCL, NOS*
<i>EBV<sup>+</sup> mucocutaneous ulcer*</i>
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK <sup>+</sup> large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Primary effusion lymphoma
<i>HHV8<sup>+</sup> DLBCL, NOS*</i>
Burkitt lymphoma
<i>Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*</i>
High-grade B-cell lymphoma, with <i>MYC</i> and <i>BCL2</i> and/or <i>BCL6</i> rearrangements*
High-grade B-cell lymphoma, NOS*
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma

*Figura 1. Classificació de les SLPC-B de la OMS.*

# Catlab Informa

Així doncs, l' incorporació d'un nombre creixent de marcadors útils per establir patrons fenotípics altament característics de cada entitat, fa que la dificultat a l'hora d'interpretar els patrons fenotípics complexes i variables de cada cas, sigui cada vegada més gran. Aquest fet podria afectar negativament la reproductibilitat dels resultats i per aquest motiu, és necessari el disseny i la implementació de noves estratègies d'anàlisi de les dades obtingudes per citometria de flux. S'ha d'aconseguir una avaluació més objectiva de l'eficàcia dels panells d'anticossos emprats per a la classificació de les SLPC-B, i a la vegada facilitar informació sobre la contribució dels diferents marcadors a la classificació diagnòstica.

Els esforços encaminats d'Euroflow a solucionar aquests problemes s'han centrat primer, en identificar nous marcadors que fossin informatius i a ser possible específics de cada entitat, creant panells d'anticossos cada vegada més amplis. Posteriorment, els esforços s'han centrat en l'estandardització dels procediments necessaris per obtenir resultats òptims. Es formulen recomanacions i directrius pel que fa a les tècniques específiques pel processament de les mostres, als marcadors més informatius considerats d'us obligatori per a classificar certes entitats i, s'estableixen sistemes de puntuació per a la definició de les diferents categories diagnòstiques. Tots aquests esforços han millorat la reproductibilitat dels resultats immunofenotípics a expenses d'augmentar progressivament la complexitat en la interpretació de les dades obtingudes per CMF.

D'aquesta manera, l'estratègia convencional d'analitzar manualment les dades obtingudes basada en la visualització bidimensional dels paràmetres mesurats per poder identificar i caracteritzar la població d'interès, certament subjectiva, ha passat a ser una estratègia objectiva i reproduïble basada en l'aplicació d'algoritmes diagnòstics supervisats i orientats per experts que permeten una classificació més acurada de les SLPC-B i altres neoplàsies hematològiques.



# Catlab Informa

L'eina que Euroflow ha desenvolupat juntament amb Cytognos (companyia de diagnòstic clínic per CMF) per poder fer la fusió i estimació de les dades en arxius i poder-les explotar ha estat el software d'anàlisi Infinicyt™, que és capaç de guardar patrons d'expressió coneguts (imatges de referència) i emmagatzemar estratègies d'anàlisi multivariant per a ser aplicades en sèrie a altres mostres utilitzant sempre el mateix criteri.

Per a la identificació, enumeració i caracterització de limfòcits atípics, davant la sospita d'una SLPC, i la seva discriminació respecte a limfòcits normals i reactius és necessari una sèrie de eines de cribratge i panells per poder establir un diagnòstic final.

A Catlab, apliquem l'estratègia que el grup Euroflow recomana aplicant l'algoritme diagnòstic que es pot veure a la figura 2.

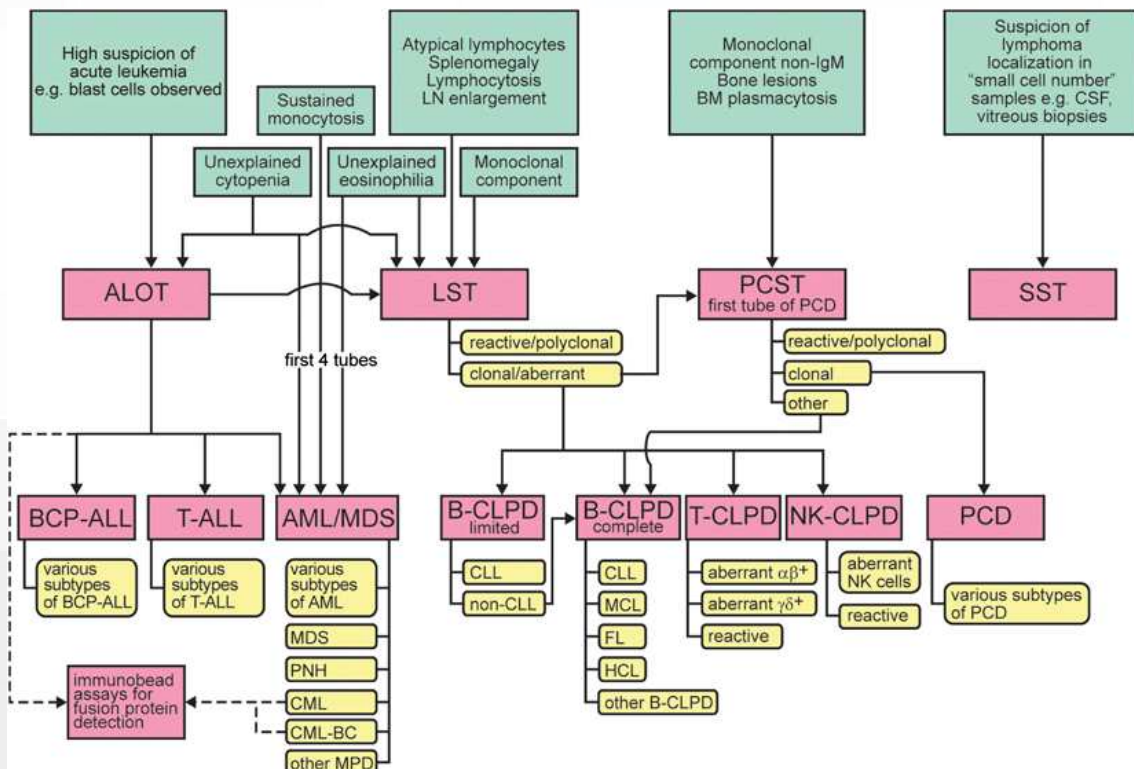


Figura 2. Diagrama de flux d'Euroflow amb l'estratègia per a la caracterització immunofenòtica de neoplàsies hematològiques.

# Catlab Informa

Per poder arribar a aquest diagrama, el consorci Euroflow ha hagut de validar la combinació d'anticossos emprats (Clusters de Diferenciació "CD"), les clones seleccionades, els fluorocroms conjugats i establir uns marcadors antigènics (CD) columna per als tubs de *screening* i per cada tub de cada un dels panells de cada categoria diagnòstica, basant-se en les mitjanes d'intensitat de fluorescència (MFI) que expressen les clones neoplàsiques i realitzant estudis multivariants de totes les possibles combinacions. Això ha permès la fusió d'arxius i un anàlisi objectiu i reproduïble, amb visualització de la separació automàtica de poblacions (APS) que ens facilita el software Infinicyt™, per obtenir un diagnòstic fiable.

Seguint aquest diagrama, el primer que fem per saber si la mostra que volem estudiar presenta alguna població limfocitària amb fenotip aberrant de cèl·lules madures B, T o NK o bé són limfòcits madurs normals o reactius, es fer el tub de *screening* de SLP anomenat *Lymphoid Screening Tub* (LST) (versió 7) que es tracta d'un únic tub de 8 colors (fluorocroms) amb una combinació de 12 anticossos per poder discernir si la mostra d'interès es tracta d'una cosa o un altre en funció de l'expressió o absència d'expressió dels diferents marcadors.

La combinació del tub dissenyat per Euroflow és la següent (fluorocroms a la part superior i anticossos marcats a la fila inferior):

Pacific Blue™	OC515™	FITC	PE	PerCP-Cyanine5.5	PE-Cyanine7	APC	APC-C750
CD20+CD4	CD45	CD8 + SmIgLambda	CD56 + SmIgKappa	CD5	CD19 + TCRγδ	SmCD3	CD38



# Catlab Informa

Segons les directrius del diagrama per a descartar una SLPC-B ens centrarem en la jerarquia marcada en taronja a la figura 3.

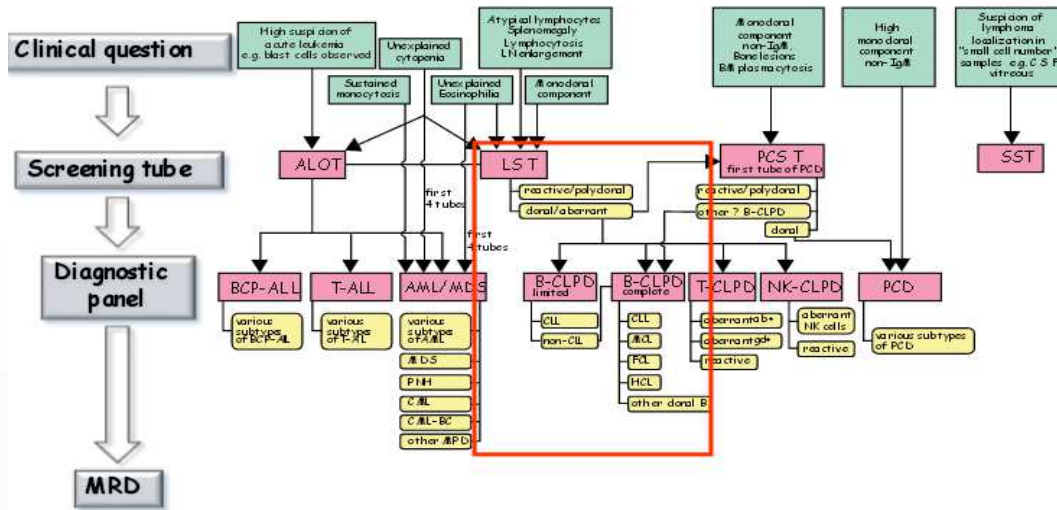


Figura 3. Estratègia a seguir per les SLPC-B.

Amb el patró fenotípic obtingut de l'anàlisi dels resultats d'aquest tub, seguirem l'estudi cap a una banda o altra o bé, ja no procedirà continuar l'estudi si no veiem un fenotip aberrant que sigui suggestiu de SLPC-B, T o NK.

En el cas de les SLPC-B, en aquest primer tub LST el més comú es detectar un percentatge significatiu de limfòcits B (positius pel CD19 i CD20) que poden ser positius o no pel CD5 (Pan-T) o pel CD38, monoclonals per a la cadena lleugera Kappa o per a la cadena lleugera Lambda amb una intensitat de fluorescència determinada. Veiem un exemple de SLPC-B CD19+, CD20+, CD5+, monoclonal Kappa+ a la figura 4.

# Catlab Informa

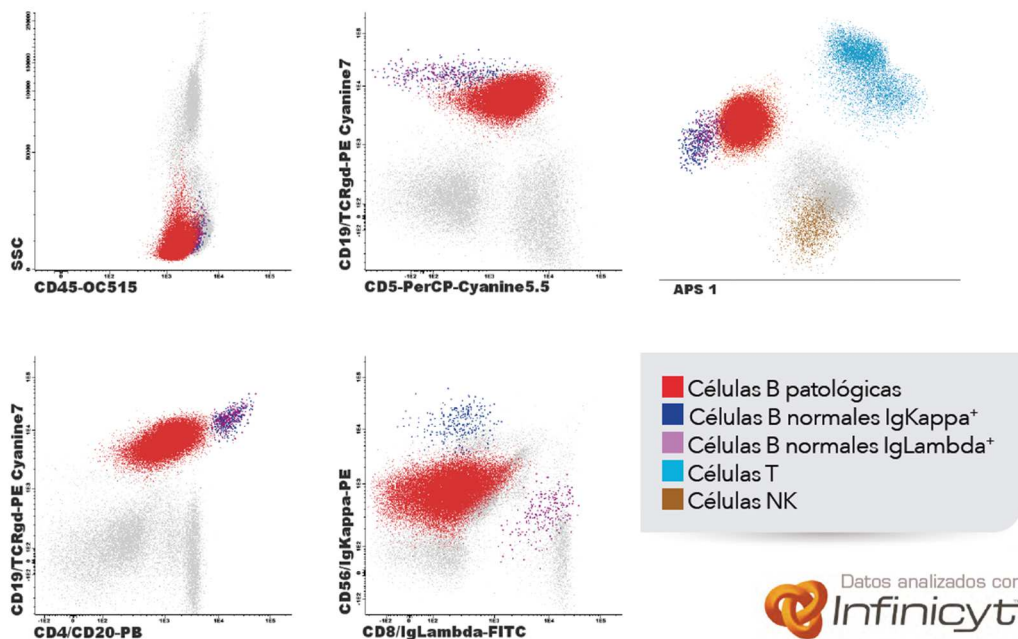


Figura 4. Sang perifèrica infiltrada per limfòcits B patològics (en vermell) amb expressió de CD19+, CD20+, CD5+, monoclonals Kappa+.

Si el CD5 és positiu, ja orienta a algunes entitats com la Leucèmia Limfàtica Crònica B (LLC-B) o el Limfoma de la Zona del Mantell.

Si aquests limfòcits B monoclonals són CD5- però expressen CD38+, aleshores ho orientarem a altres tipus de limfoma com poden ser el Limfoma de Burkitt (LB), el Limfoma Fol·licular (LF), etc...

Per completar l'estudi i poder filiar millor la població atípica B detectada, apliquem el panell anomenat *B-Cell Chronic Lymphoproliferative Diseases (B-CLPD)* d'Euroflow. Aquest panell consta de 4 tubs de 8 colors i presenta 3 marcadors columnar comuns a tots els tubs per facilitar la caracterització de la població aberrant amb la fusió d'arxius. Aquests anticossos són el CD20 (Pan-B cell), el CD45 (Pan Leucocitari) i el CD19 (Pan-B cell).

# Catlab Informa

La selecció de la resta d'anticossos s'ha basat en la contribució que cadascun d'ells aporta a cada categoria diagnòstica establerta per la OMS, en funció de les MFI que cada marcador expressa pel diagnòstic diferencial de cada entitat dins de les SLPC-B.

La combinació final (versió 5) proposada d'anticossos i fluorocroms dels 4 tubs és aquesta:

Pacific Blue™ OC515™ FITC PE PerCP-Cyanine5.5 PE-Cyanine7 APC APC-C750

Tub 1	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
Tub 2	CD20	CD45	CD31	LAIR1	CD11c	CD19	supIgM	CD81
Tub 3	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CXCR5(CD185)	CD49d
Tub 4	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA-DR	CD19	CD27	

D'aquesta manera, en el primer tub discriminem la LLC-B del Limfoma del Mantell (MCL) amb la reactivitat del CD200 per la LLC-B i la manca d'expressió d'aquest marcador per les cèl·lules del Limfoma del Mantell.

Si es tracta d'una LLC ja no cal continuar la bateria de la resta de tubs perquè ja queda classificada.

Pel que fa a l'expressió de CD10+, aquest es restringeix força al Limfoma Fol·licular (LF), al Limfoma de Burkitt (LB) i al Limfoma B Difús de Cèl·lula Gran (LBDCG).

Altres marcadors com el CD95 i el CD200 han estat inclosos en el panell per identificar malalties del centre germinal i per distingir els casos de MCL d'altres entitats dins dels SLPC-B, respectivament.

# Catlab Informa

Els anticossos CD305 (LAIR1), CD11c i CD103 s'han incorporat pel diagnòstic diferencial del limfoma *Hairy Cell Leukemia* (HCL). De forma que amb aquests anticossos més el CD200 i el CD22 podem discriminar un HCL d'un Limfoma de la Zona Marginal (LZM).

Adicionalment, s'han inclòs els CD62L, CD39, HLA-DR i CD27 pels casos de més dificultat en el diagnòstic diferencial entre la Leucèmia Prolimfocítica (LPL), el Limfoma de la Zona Marginal (LZM), el Limfoma Fol·licular (LF) i el Limfoma B Difús de Cèl·lula Gran (LBDCG).

En definitiva, aquest panell juntament amb el LST, permeten amb la combinació de 26 marcadors diferents, l' identificació de la clona neoplàsica B i la caracterització fenotípica de la mateixa per poder-la classificar en una categoria o entitat de la OMS en la majoria dels casos.

Els patrons immunofenotípics més freqüents per a cada entitat els podem observar a les següents taules (1,2):

	CD5	CD19	CD38	CD20	CD23	CD10	CD79b	CD43	CD11c	IgM	CD103	CD22
B-CLL	+			lo	hi		lo	+			lo	lo
MCL	+											
HCL		hi		hi		-/+		-/+	hi		hi	hi
MZL			lo						-/+			
LPL			lo						-/+			
FL		lo				+						
LDBCL						+						-/+
LDBCL								-/+	-/+			
BL			hi	lo	+		+				hi	

Taula 1

# Catlab Informa

	CD200	CD31	CD305	CD81	CD95	CXCR5	CD49d	CD62L	CD39	CD27
B-CLL	hi	hi	-/+	lo	-					
MCL	lo		-/+		-					
HCL	hi	hi				lo	+			-
MZL						lo				
LPL										
FL	lo	lo	lo						-	-
LDBCL	lo									
LDBCL	+						+			
BL		lo	lo	hi	-				-	-

Taula 2

Intensitat de fluorescència: (+) positiu; (-) negatiu; hi (high); lo (low); +/-: neg/pos

En conclusió, podem dir que les estratègies desenvolupades pel consorci Euroflow pel diagnòstic de les Síndromes Limfoproliferatives Cròniques B, així com per la resta de neoplàsies hematològiques madures i immadures, ha estat un gran avanç tot i la seva complexitat, com a eina de treball estandarditzada a instaurar en el laboratori clínic assistencial.

La finalitat d'aquests estudis és obtenir resultats i diagnòstics objectivables, reproduïbles i fiables.

Amb aquesta estratègia s'aporten dades més fiables pel diagnòstic que repercuteixen directament sobre la seguretat del pacient.

A l'estandarditzar marcadors, processos i algorismes obtenim resultats traçables que poden facilitar l'intercomparació i poden ser la base de l'acreditació de la tècnica segons la norma de qualitat ISO 15189.

**Judith Vidal**  
Responsable Citometria de flux

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35041 / 616.26.48.91

[jvidal@catlab.cat](mailto:jvidal@catlab.cat)

[www.catlab.cat](http://www.catlab.cat)

# Catlab Informa

## Bibliografia:

1. Steve H.Swerdlow, Elias Campo, Stefano A. Pileri, Nancy Lee Harris, Harald Stein, Reiner Siebert, Ranjana Advani, Michele Ghilmini, Gilles A. Salles, Andrew D. Zelenetz and Elaine S. Jaffe. *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*. *Blood* 2016 127:2375-2390.
2. Swerdlow, S.H., Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (4th ed). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2008.
3. Van Dongen, J. J., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., van der Velden, V. H., Flores-Montero, J., Rawstron, A., Asnafi, V., Lécrovisse, Q., Lucio, P., Mejstrikova, E., Szczepański, T., Kalina, T., de Tute, R., Brüggemann, M., Sedek, L., Cullen, M., Langerak, A. W., Mendonça, A., Macintyre, E., Martin-Ayuso, M., Hrusak, O., Vidriales, M. B., Orfao, A., EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708) (2012). *EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes*. *Leukemia*, 26(9), 1908-75.
4. Van Dongen et al. EuroFlow Consistorium. *EuroFlow EDUCATIONAL BOOK 2017*.
5. Loken, M.R., et al., *Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development*. *Blood*, 1987. 70(5): p. 1316-24.
6. Van Lochem, E.G., et al., *Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2004.60(1):p1-13
7. Lucio, P., et al., *Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL*. *Leukemia*, 1999. 13(3): p. 419-27.
8. Allen, C.D., T. Okada, and J.G. Cyster, *Germinal-center organization and cellular dynamics*. *Immunity*, 2007. 27(2): p. 190-202.