



¿QUE HAY DE NUEVO EN LOS LINFOMAS?

Dr. Agustín Acevedo.

Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Quirón Madrid
Universidad Europea de Madrid

www.quiron.es



Universidad Internacional de Madrid



XXV Congreso de la SEAP-AIP, SEC y SEPAF,
Zaragoza, 18-21 de Mayo de 2011

Manos expertas

Actualización en Linfomas

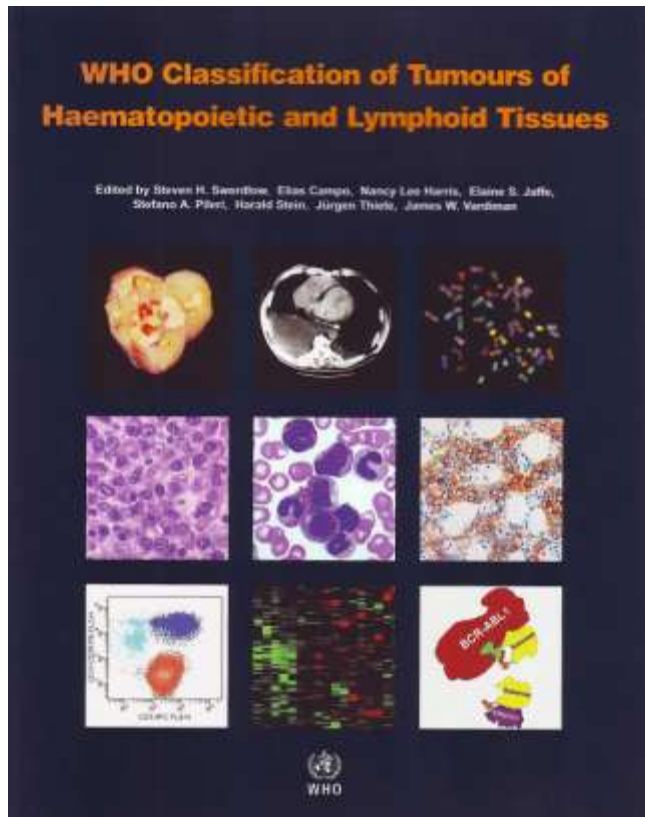
- Impacto de las nueva Clasificación de la OMS 2009
- Nuevas líneas: miRNA y linfomas
- Investigación molecular: Arrays de ADN
- Linfomas y citopatología:
 - Nuevas técnicas: Citometría de flujo
 - ¿Hay lugar para la PAAF?
- Conclusiones

PARADIGMAS DEL HEMATOPATÓLOGO EN 2011

- **Certeza 1: Igual que nacemos, es seguro que moriremos algún día**
- **Certeza 2: Algún día caeremos en las redes del amor**
- **Certeza 3: Aunque opongamos una tenaz resistencia, pagaremos impuestos**
- **Certeza 4: La clasificación de los linfomas va a cambiar.**

Ortiz Hidalgo, C. Patología 2009; 47: 1.

CLASIFICACIÓN OMS 2008



- **Linfomas B:**
 - 36 entidades (6 provisionales: variantes de LDCGB y pediátricos)
- **Linfomas T:**
 - 23 entidades (4 provisionales)
- **SLP post-transplante:**
 - 6 entidades
- **Linfoma de Hodgkin**
 - 5 subtipos

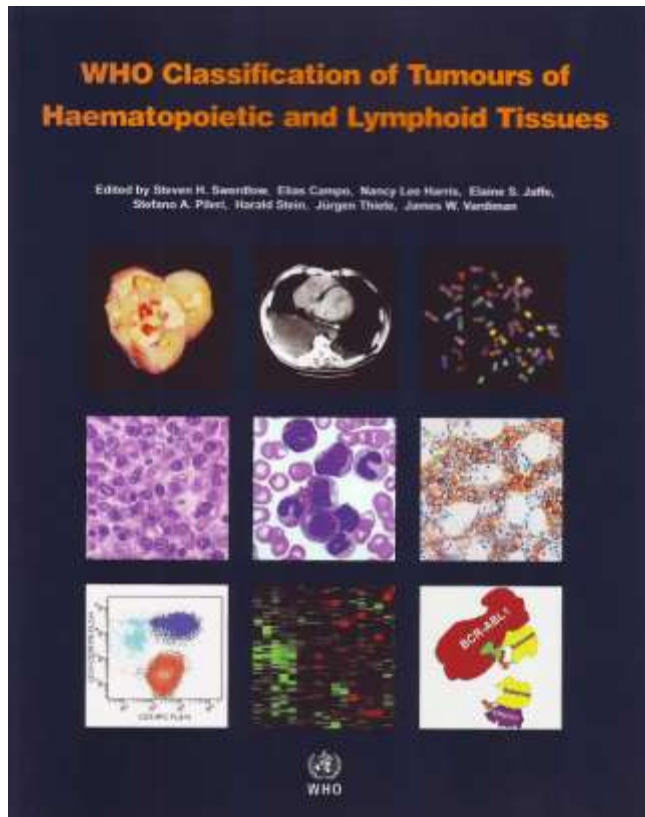
CLASIFICACIÓN OMS 2008

- Entidades provisionales limítrofes: “*Linfomas de la zona gris*”
 - LDCGB-LHC:
 - Borderline LH-Linfoma Primario B mediastínico
 - Varones, agresividad clínica
 - LDCGB-LB:
 - Agresivos
 - Criterios incompletos para Burkitt
 - Alteraciones en MYC y bcl-2
- Proliferaciones clonales / lesiones *in situ* e indolentes
 - Expansiones clonales T o B sin progresión
 - Alteraciones genéticas en sujetos sanos: t(14;18), bcr-abl,
 - Proliferaciones foliculares clonales en niños
 - Linfoma folicular y marginal pediátrico
 - Linfomas in situ: folicular y manto.

CLASIFICACIÓN OMS 2008

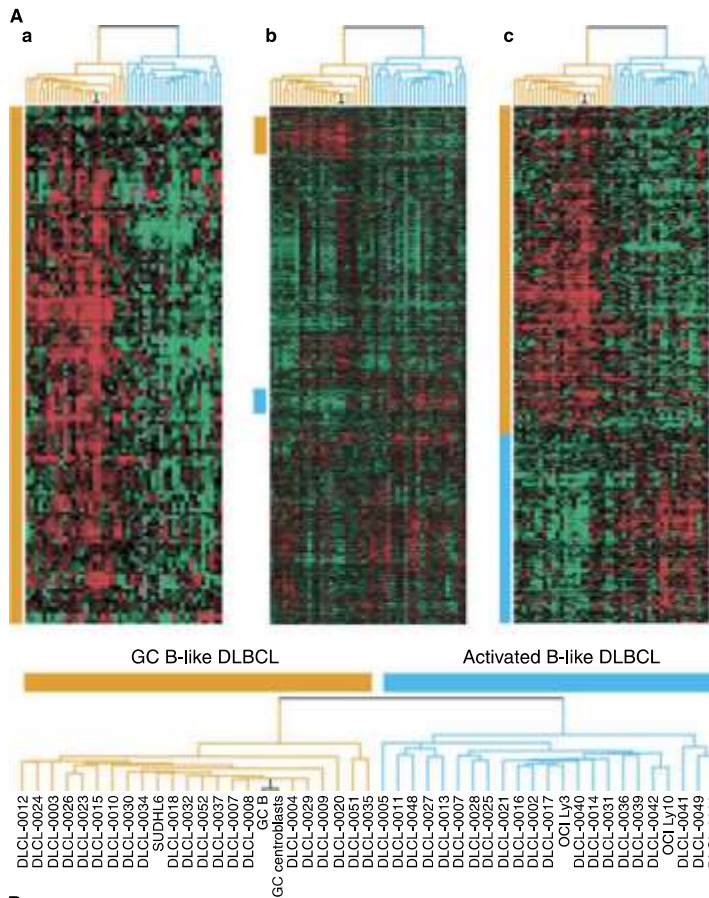
- Entidades con fuerte correlación clínica: *localización anatómica, edad*
 - Linfoma folicular duodenal
 - Linfomas de células B maduras pediátricos: folicular y marginal
 - Linfomas esplénicos
 - Subtipos de LDCGB:
 - Linfoma cutáneo primario tipo pierna
 - LCG-B del SNC
 - LDCGB asociado a la edad (EBV)
- Otros aspectos de interés:
 - Subclasificación citogenética en linfoma B linfoblástico
 - Gradación del linfoma folicular
 - Distinción fenotípica del LDCGB
 - Subtipo centrogerminal: CD10, bcl-6
 - Subtipo de célula B activada: MUM-1, CD138

NUEVA CLASIFICACIÓN OMS 2008



- **DEFINICIÓN DE ENTIDADES**
 - Base clínica
 - Base histológica
 - Inmunofenotipo
 - Genética
- **PUNTOS DE MEJORA:**
 - Heterogeneidad clínica en algunas entidades: LLC, LDCGB, LAM
 - Consenso en factores pronósticos
 - Adaptación al progreso en conocimientos sobre patogenia

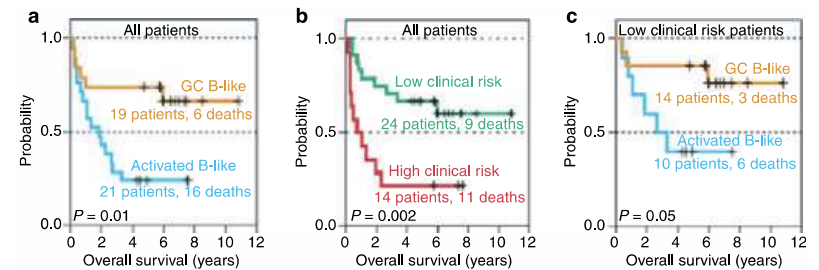
PATOGENIA: PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA



Linfoma Difuso de Células Grandes B:

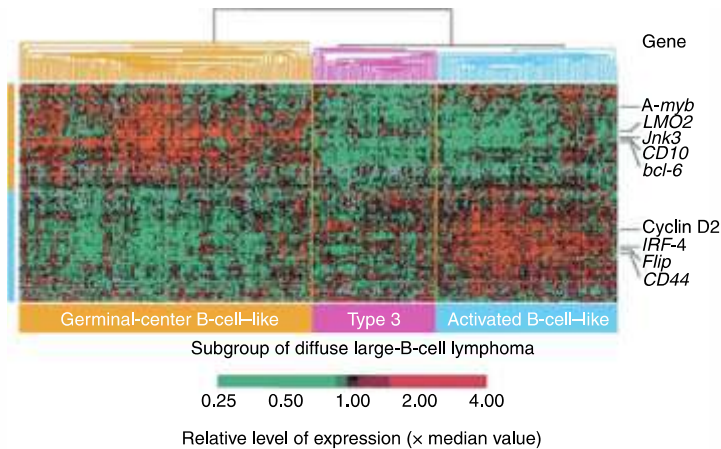
Características Biológicas
↓
Comportamiento clínico

GC-like vs. ABC-like:



Alizadeh AA et al. Nature 2000; 403: 503

PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA

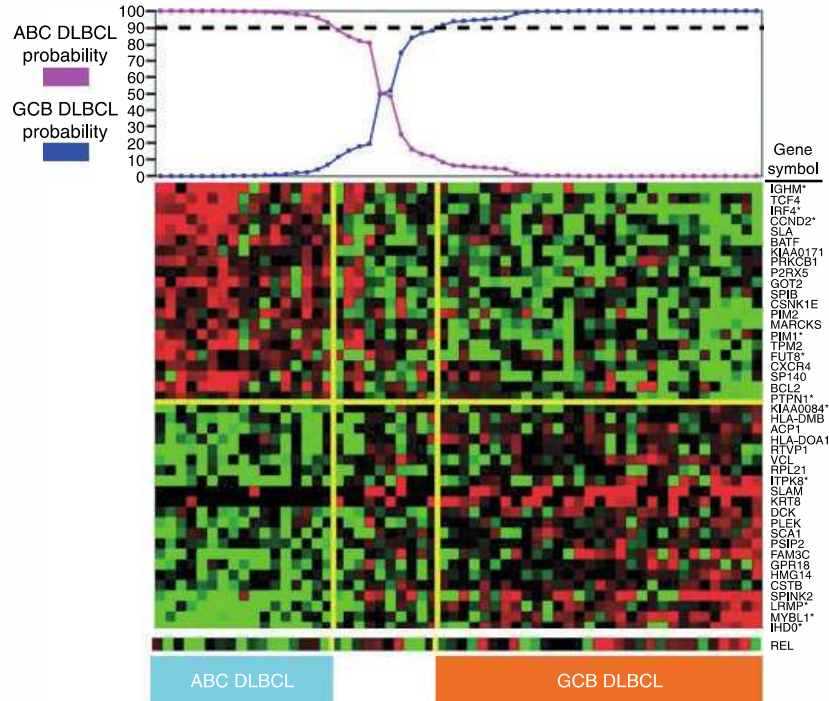


Oncogenic abnormality	Germinal-center B-cell-like	Type 3	Activated B-cell-like
	No. of samples		
<i>c-rel</i> amplification	17	0	0
<i>bcl-2</i> t(14;18)	26	0	0

- **Linfoma Difuso de Células Grandes B**
- **3 tipos por firma genética:**
 - GC-like
 - ABC-like
 - Intermedio: similar a ABC
- **17 genes predicen subtipo y pronóstico**
- **Un gen (REL) predice el subtipo**
- **Heterogeneidad de casos ABC like**
- **Genes de respuesta inmune**

Rosenwald A et al. N Eng J Med 2002, 346:1937

PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA



- Linfoma Difuso de Células Grandes B
- Predicción de subgrupo por una firma de 27 genes:
 - 87% de los casos asignados correctamente
 - Heterogeneidad del grupo intermedio
- Buena correlación entre distintas plataformas de análisis de GEP

Wright G. Et al. Proc. Nat. Acad. Sci USA 2003; 100: 9991.

PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA: PROBLEMAS

OBJETIVO:

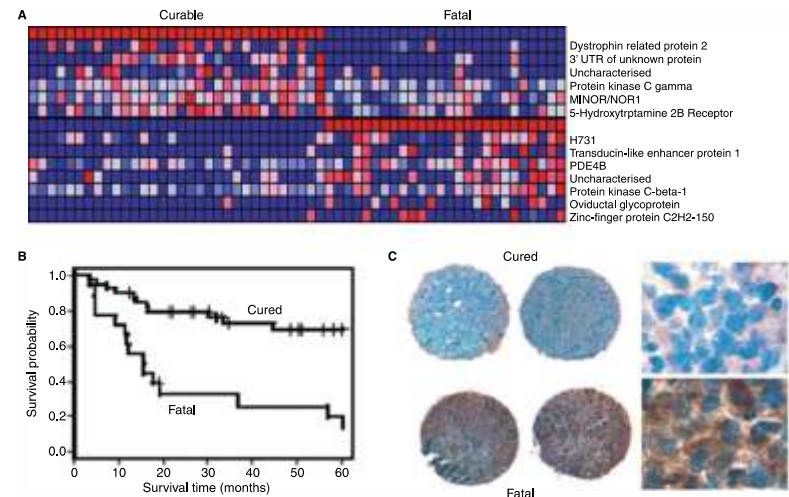
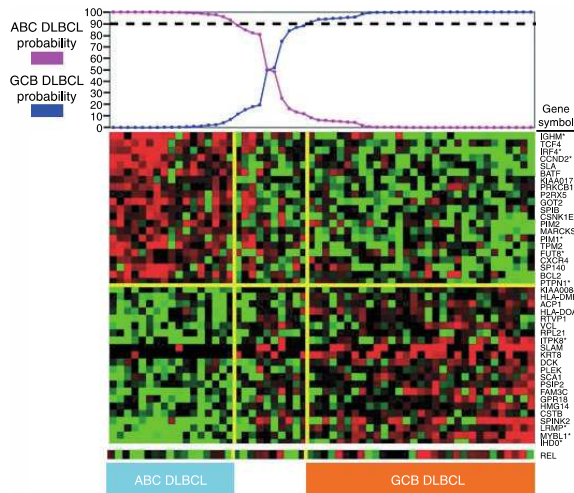
- Grupos de pacientes de interés definidos por grupos de genes
 - Número razonable de parámetros
 - Reproducibilidad de los resultados

PROBLEMAS:

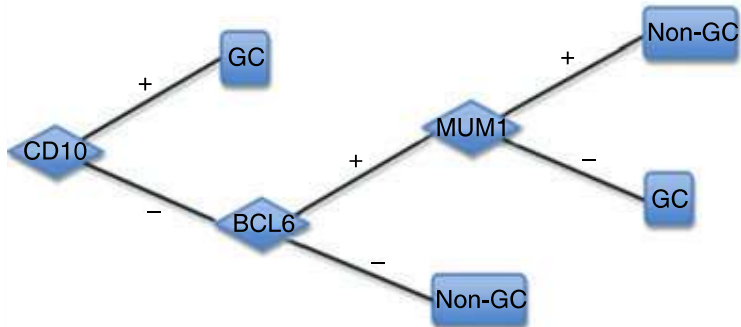
- Validación técnica inter e intraplataforma, etc.

HIPÓTESIS:

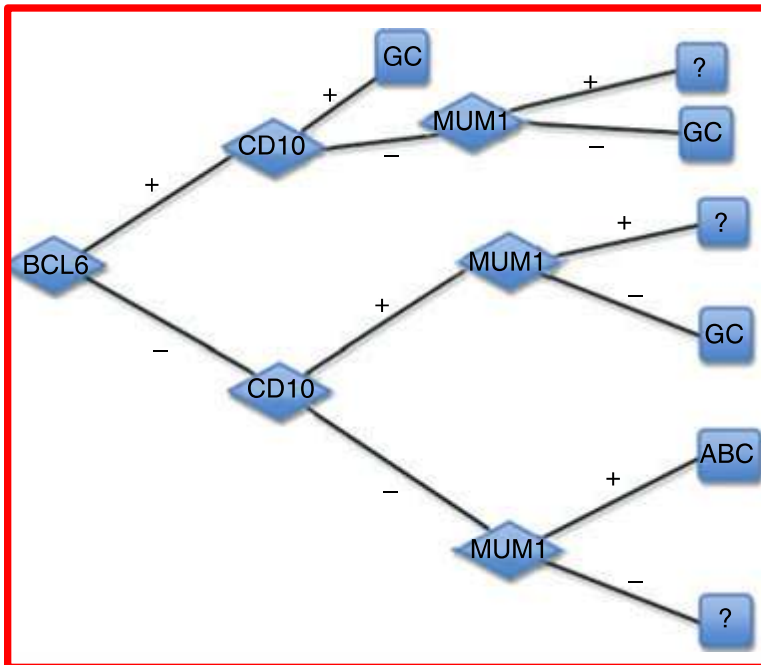
- gen (mRNA) \rightarrow proteína (AcM): inmunohistoquímica



LDCGB: SUBTIPOS POR IHQ



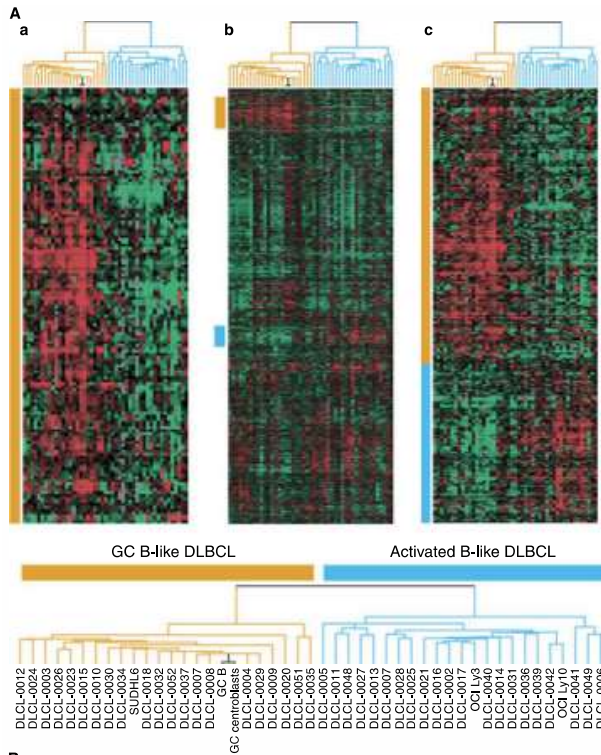
- Hans et al, Blood 2004: 103: 275
 - Bcl-6, CD10, MUM-1
 - Subtipo GC y no GC



- Parker et al. (RCP, London, UK 2011):
 - Bcl-6, CD10, MUM-1
 - Subtipos ABC-like y GC-like
 - Casos indeterminados

- Otros: Chang et al. Am J Surg Pathol 2004: 28: 464.
 - Bcl6/CD10 y MUM-1/CD138
 - Grupos A (CG), B y C (ABC)

PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA



- **LINFOMAS DE CÉLULAS GRANDES B:**
 - Subgrupos de interés pronóstico
 - CG-like y ABC-like
 - Predicción de supervivencia
 - Biología de los LDCGB: nuevas terapias
 - Identificación de vías oncogénicas
- **Linfoma de Burkitt:**
 - Firma genética (25 genes) y delimitación de la entidad
 - MYC en linfomas no Burkitt
- **Linfoma folicular:**
 - Papel de la respuesta del huésped
 - Respuesta a radioterapia
- **Linfomas T:**
 - Consolidación de subtipos
 - NF- κ B
- **Búsqueda de dianas terapéuticas:**
 - Enzastaurina: inhibidor de PKC- β en LDCGB
 - Imatinib en linfomas T (casos PDGFRA+)
 - Thalidomida y Bevacizumab en LTAI
 - Rapamicina en LACG (Akt-mTOR)

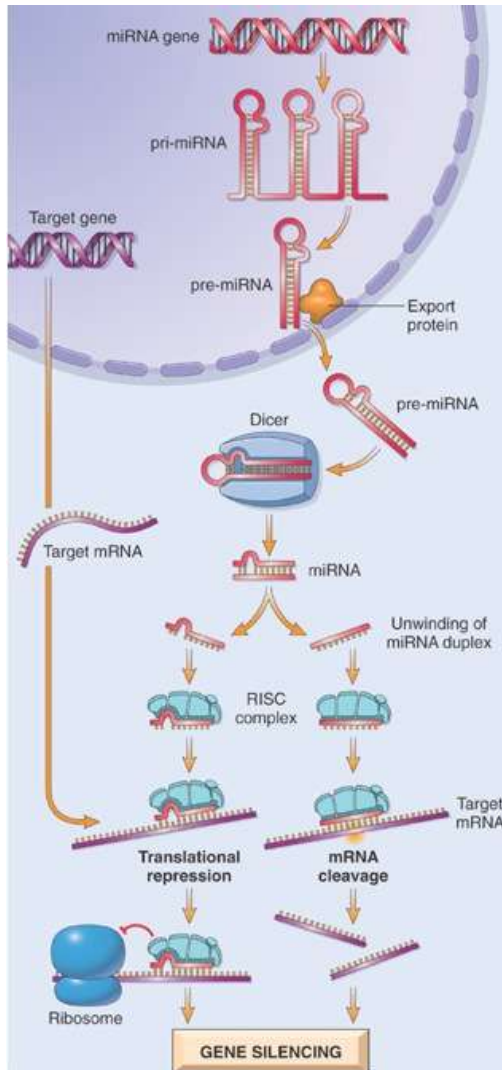
Osborn C. Et al. Histopathology 2011; 58: 106



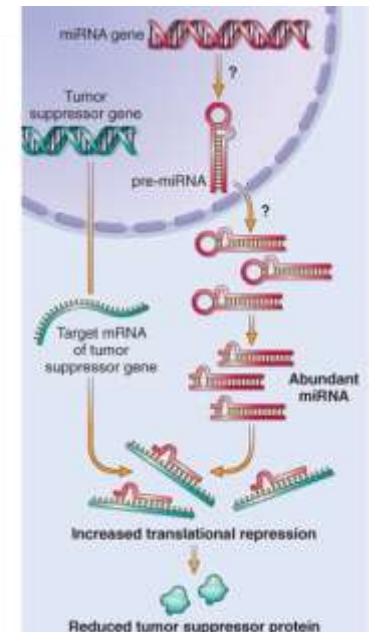
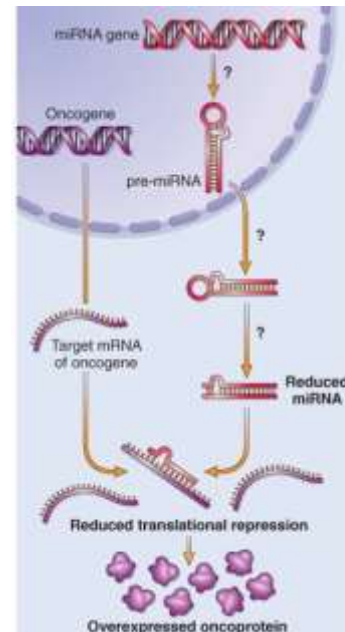
miRNA Y LINFOMAS



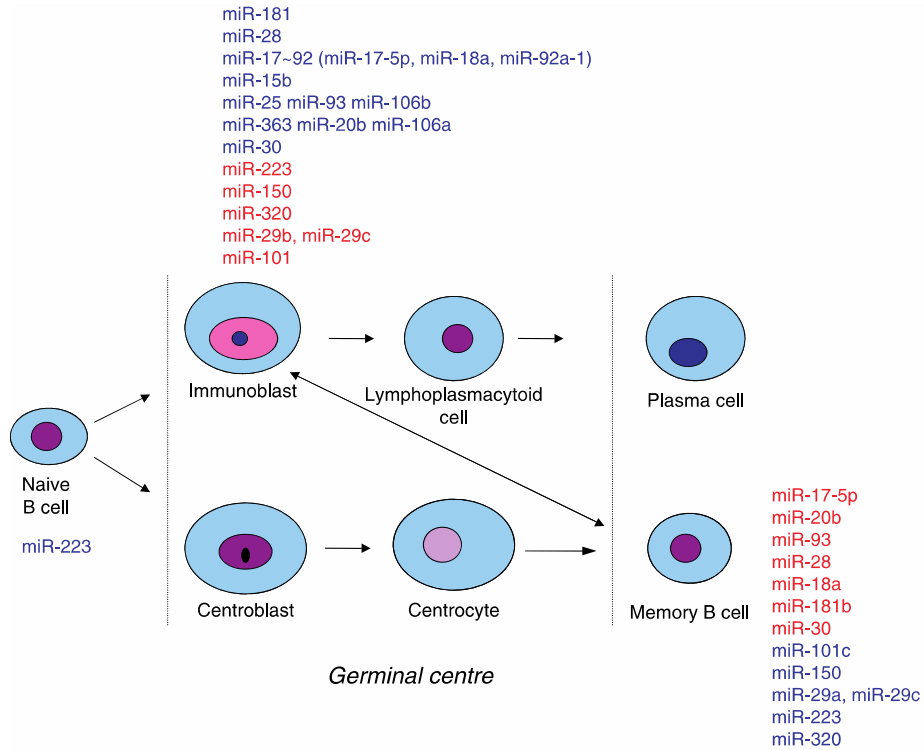
www.quiron.es



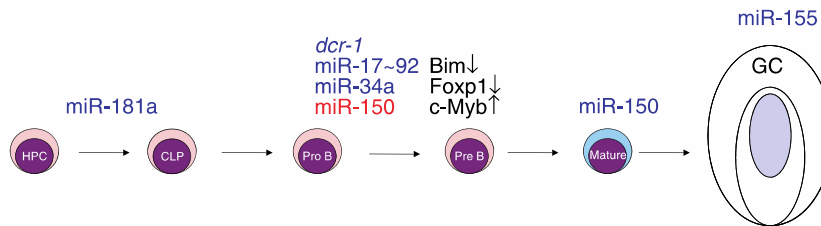
- REGULACIÓN POSTRANSCRIPCIONAL
- 19 a 23 nucleótidos
- 800 miRNA humanos
 - <http://www.mirbase.org>
- 10-30% de genes regulados por miRNA
- Oncogenes: mir-155
- Genes supresores: mir-15a



miRNA Y LINFOMAS



- **FIRMA miRNA: mirNome**
 - Patrón de expresión de miRNA
- **CÉLULAS B MADURAS:**
 - **miR-155:**
 - Neoplasias linfoides y sólidas
 - Supresor tumoral
 - Predicción de mirNome en linfomas
- **ONTOGENIA CELS. B:**
 - **miR-150: c-Myb**
 - **miR-17~92: Bim, PTEN. Represión de genes pro apoptóticos**
 - **miR-34a: p53**





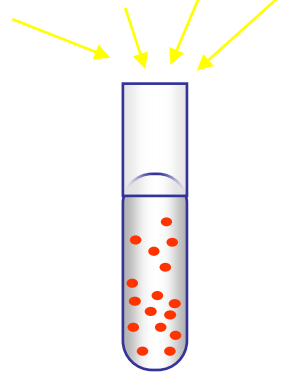
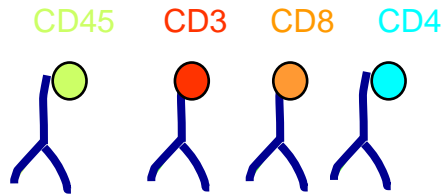
miRNA Y LINFOMAS



Disease	miRNAs	Target	Specifics
CLL	miR-15a/16-1 ↓	BCL-2	13q14 del
	miR-34a ↓		P53 mutant
			Fludarabine refractory
	miR-29c ↓		Unmutated V _H genes
	miR-223 ↓		
	miR-181 ↓ miR-21 ↑		Disease progression
DLBCL	miR-155 ↑	SHIP1, SMAD	ABC phenotype
	miR-17~92 ↑	Bim/p21	GCB phenotype
	miR-222		Prognostic marker
FL	miR-155 ↑		
	miR-221 ↑		
	miR-21 ↑		
MCL	miR-17~92 cluster ↑	Bim/p21	Prognostic marker
	miR-29 family ↓	CDK6	Prognostic marker
	miR-150 ↓		
	miR-155 ↑		

Auer R. Histopathology 2011: 58: 39

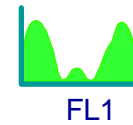
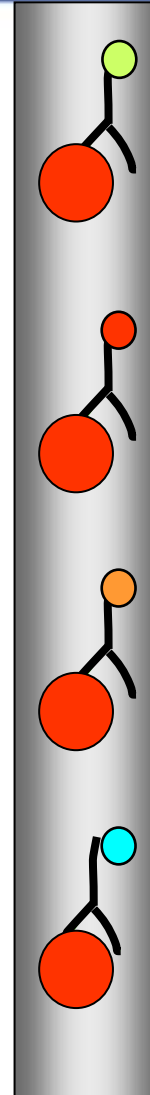
CITOMETRÍA DE FLUJO



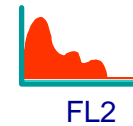
Incubación 20'



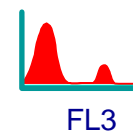
Análisis en el
citómetro



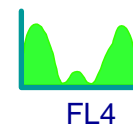
% de células positivas para FL1
(=% de células CD45+)



% de células positivas para FL2
(=% de células CD3+)



% de células positivas para FL3
(=% de células CD8+)



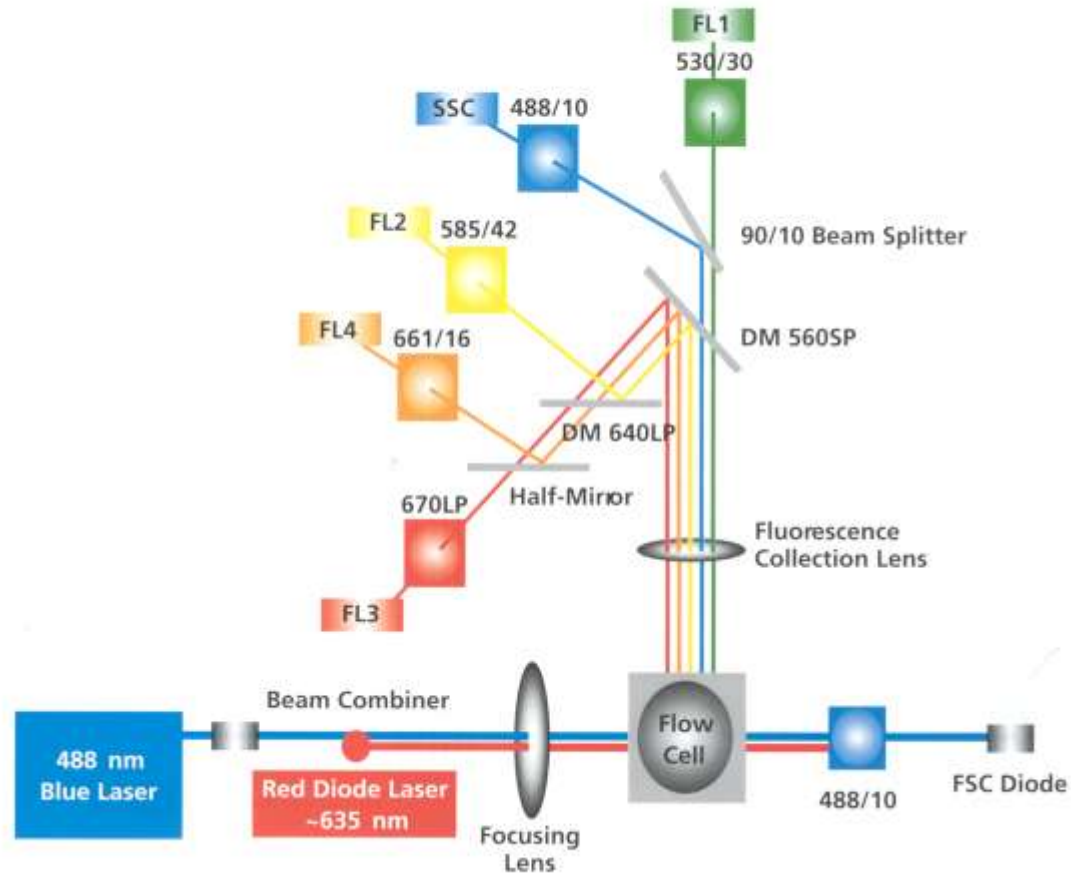
% de células positivas para FL4
(=% de células CD4+)



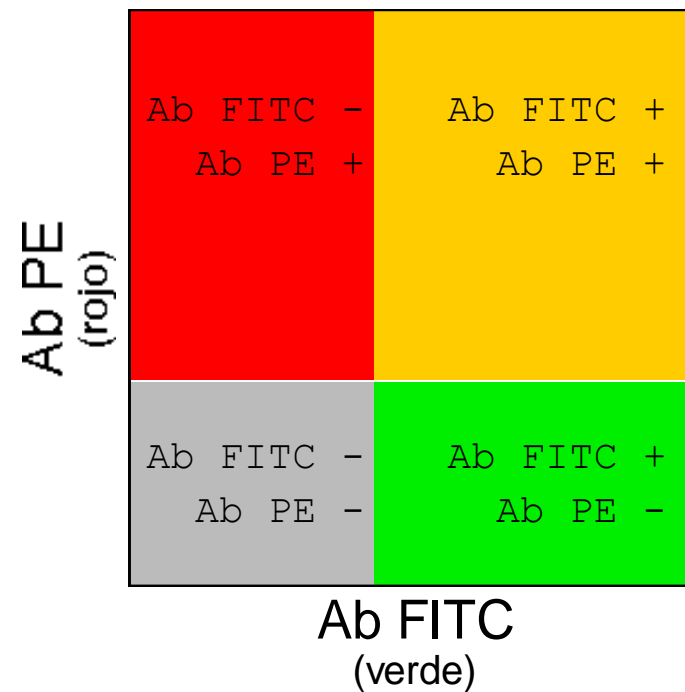
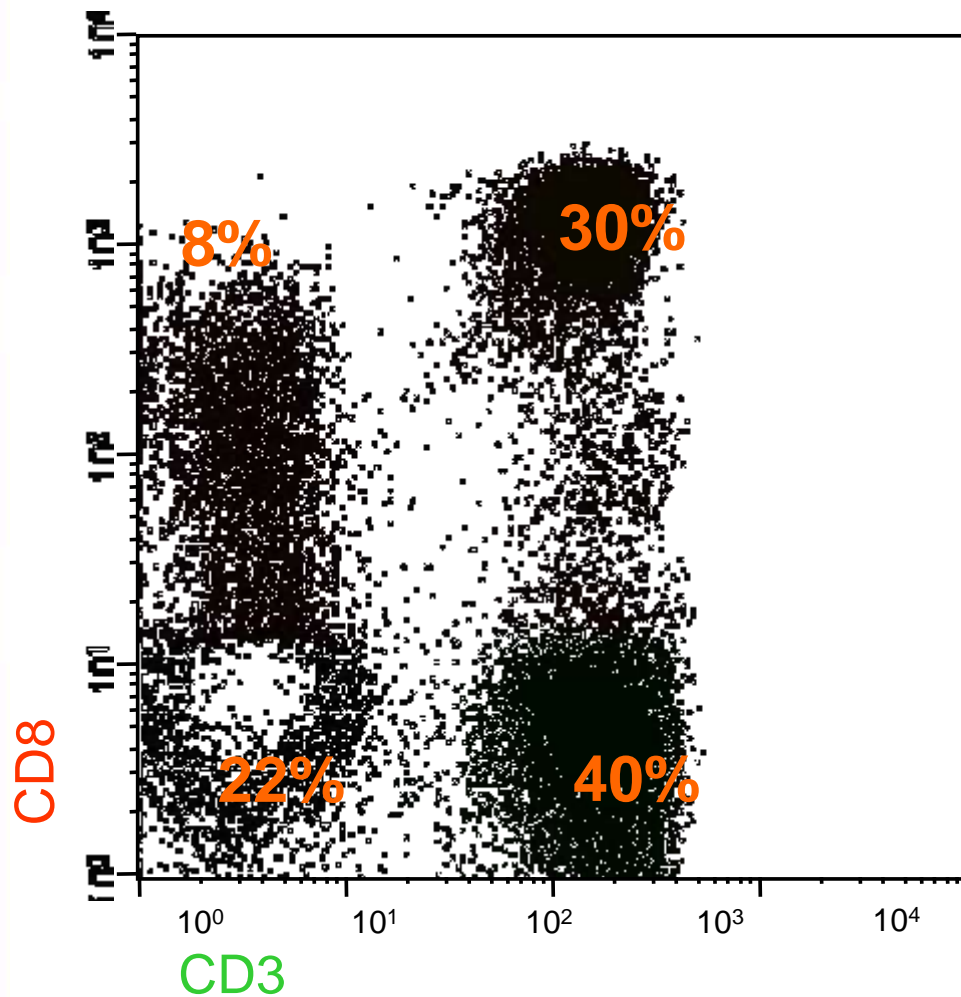
CITOMETRÍA DE FLUJO



FACSCalibur Optical Layout



CITOMETRÍA DE FLUJO

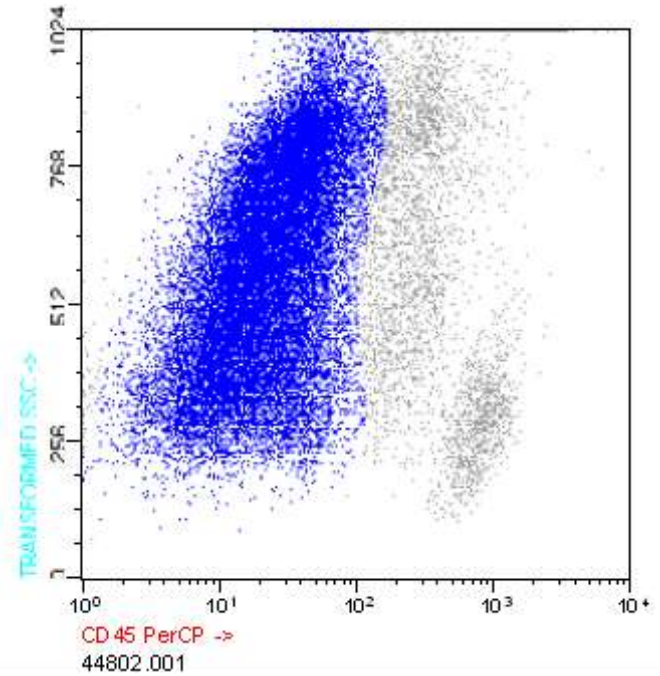
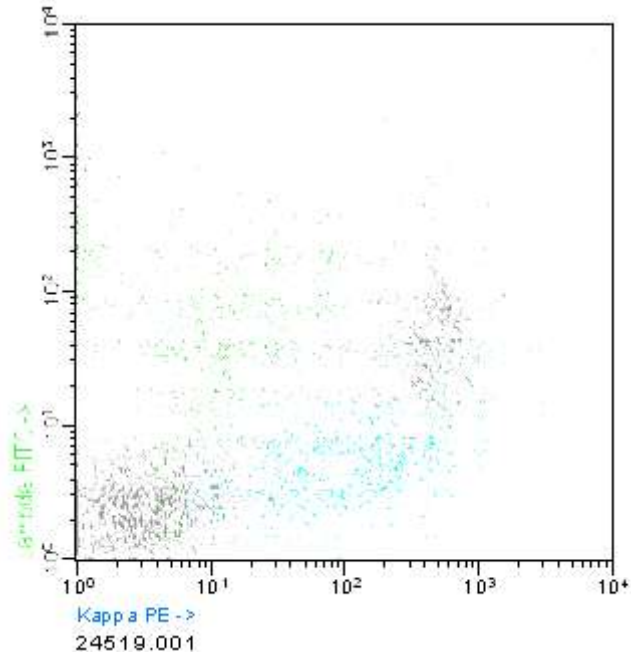




CITOMETRÍA DE FLUJO

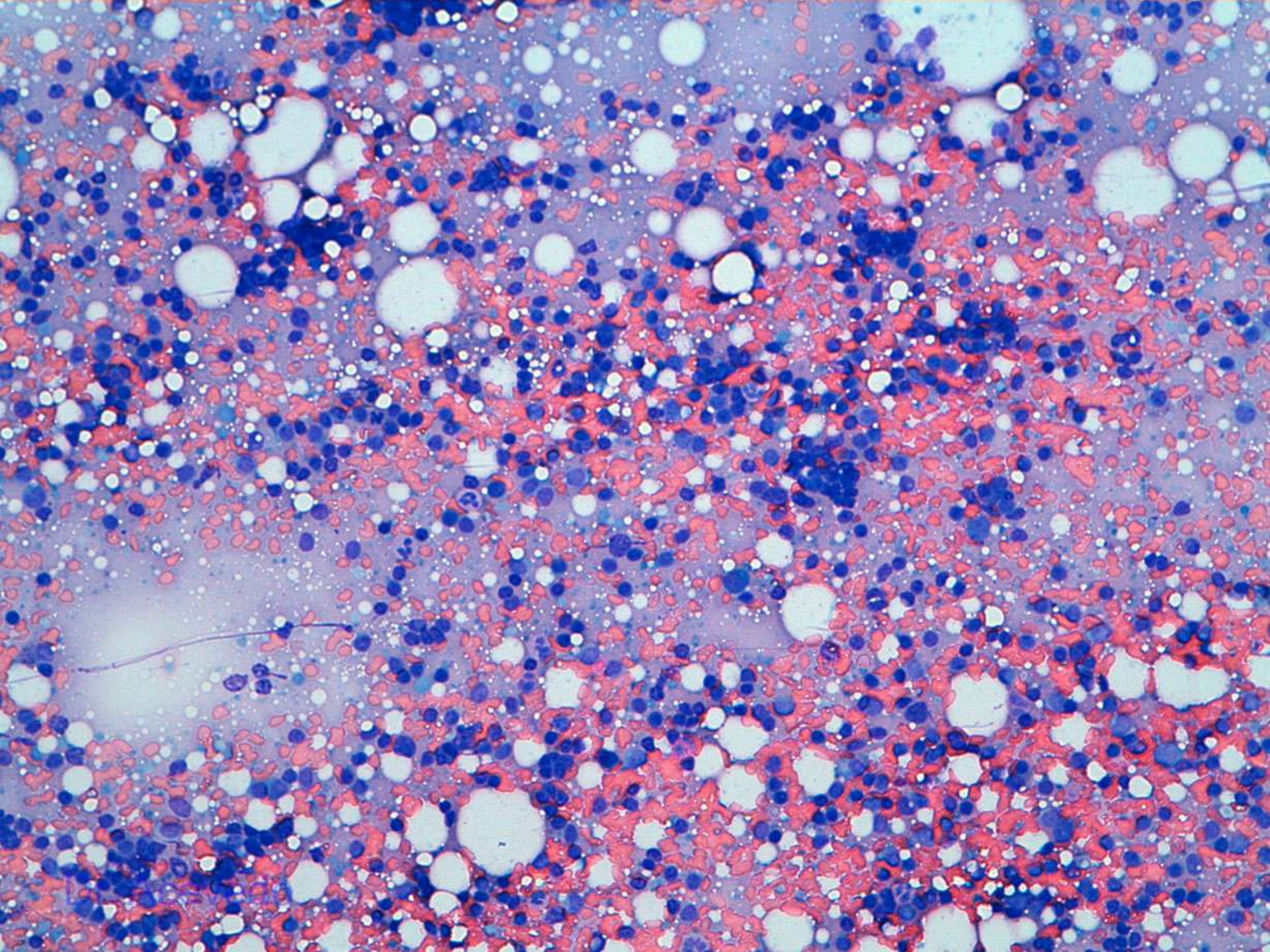


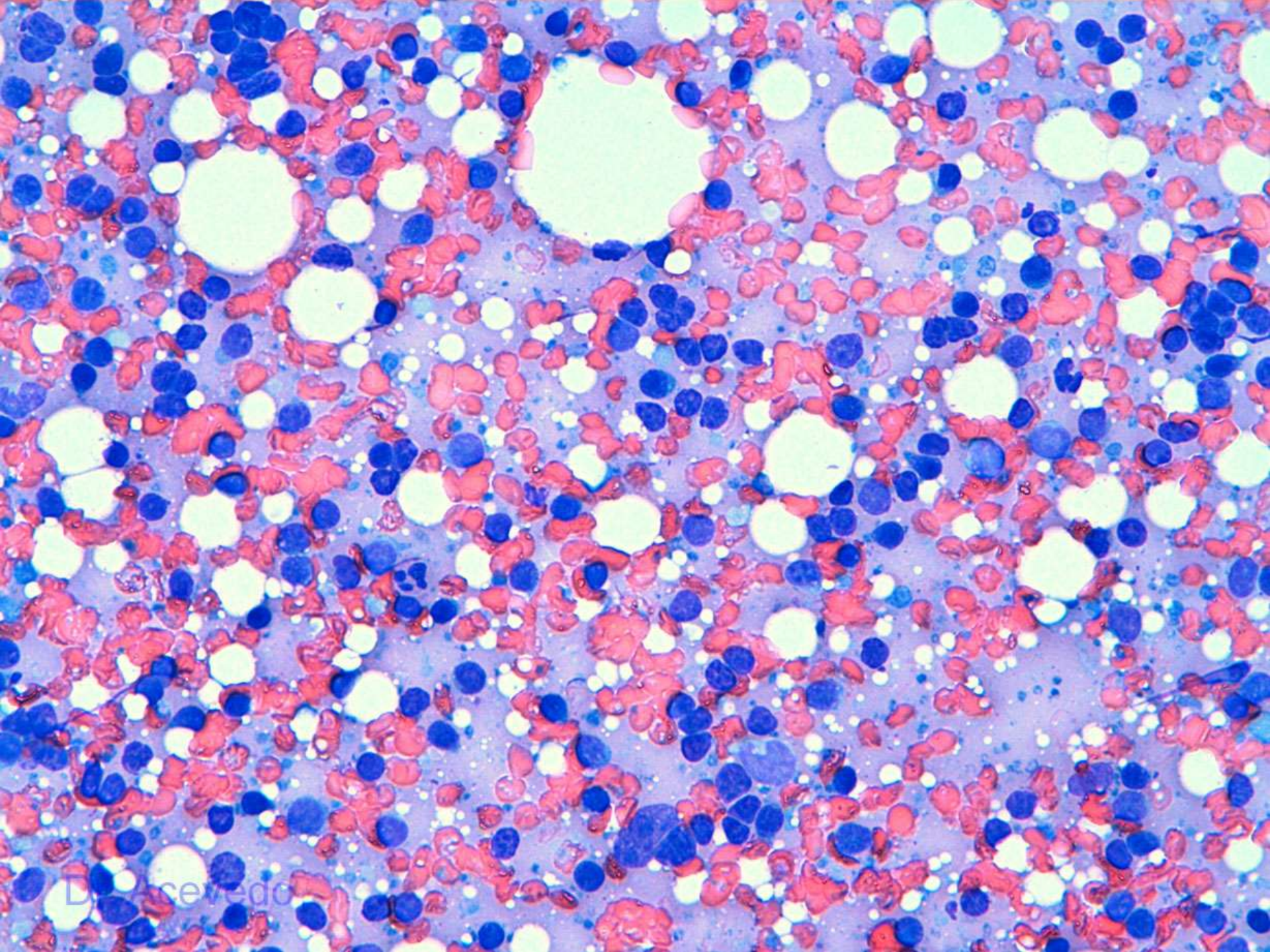
www.quiron.es



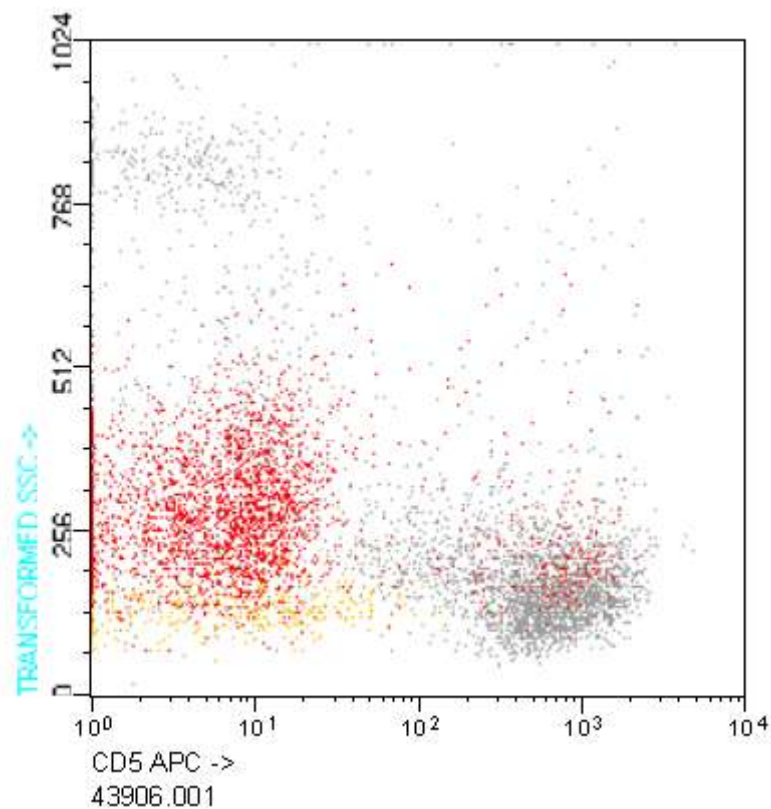
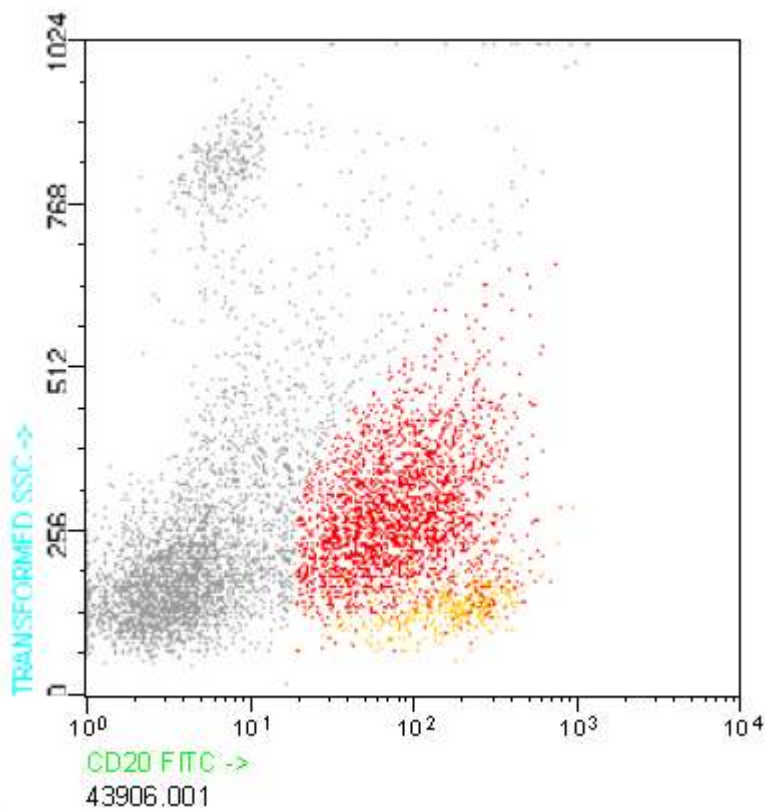
CITOMETRÍA DE FLUJO: CASO 1

- MNFC, mujer, 61 años
- Sin antecedentes de interés
- Adenopatía cervical izquierda alta, de 2 meses de evolución, dura, de 2 cm.
- PAAF y citometría de flujo



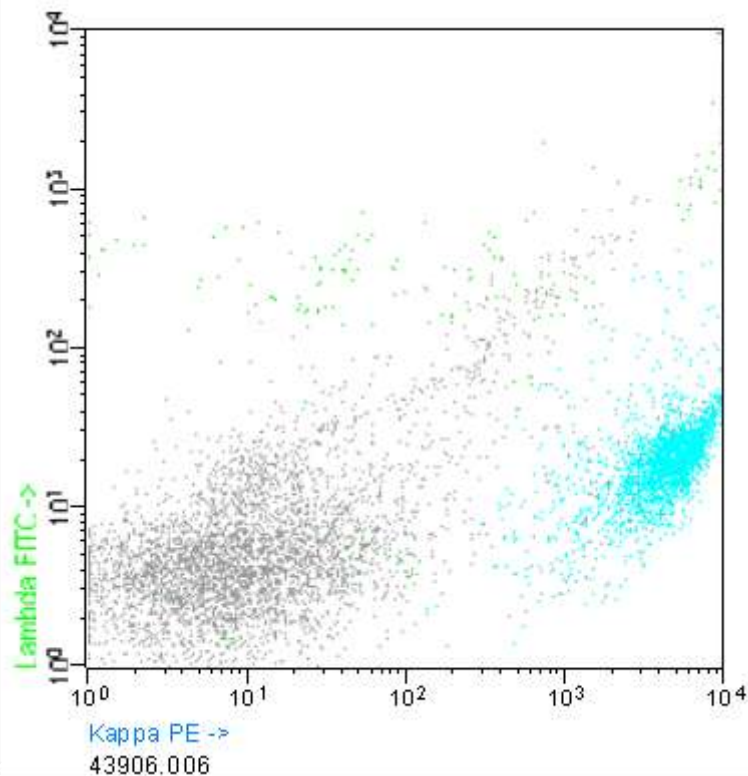
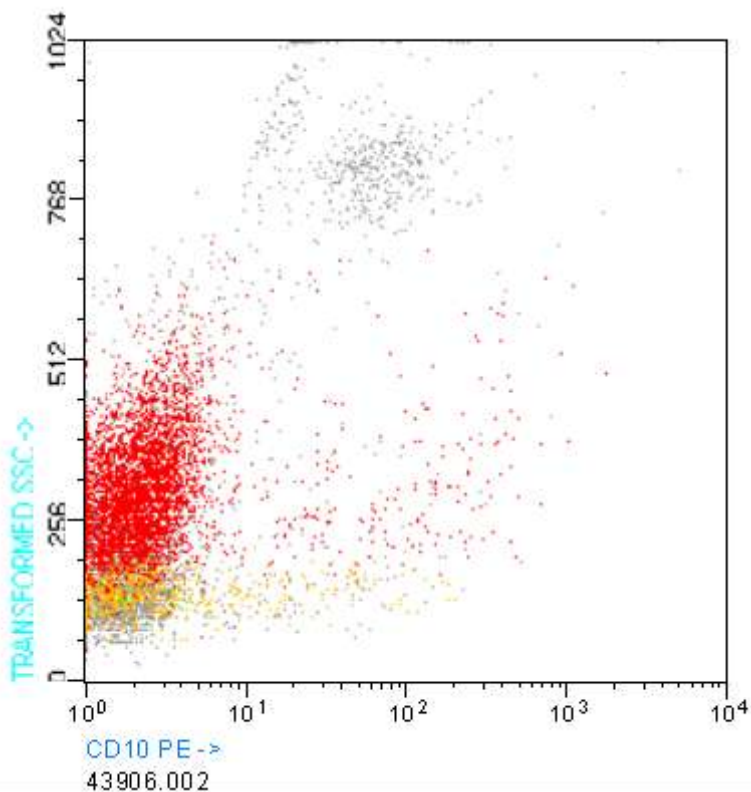


CITOMETRÍA DE FLUJO: CASO 1

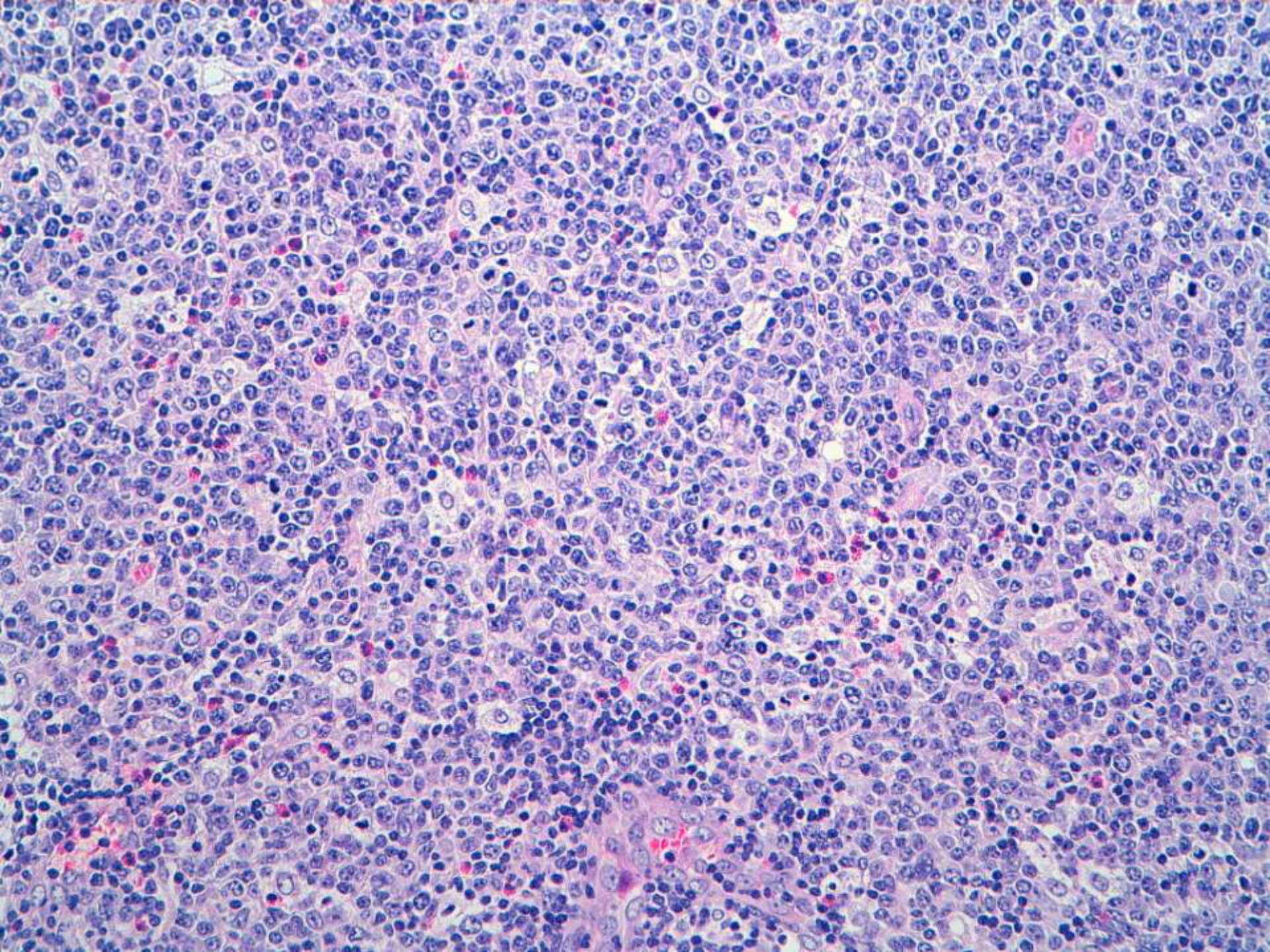


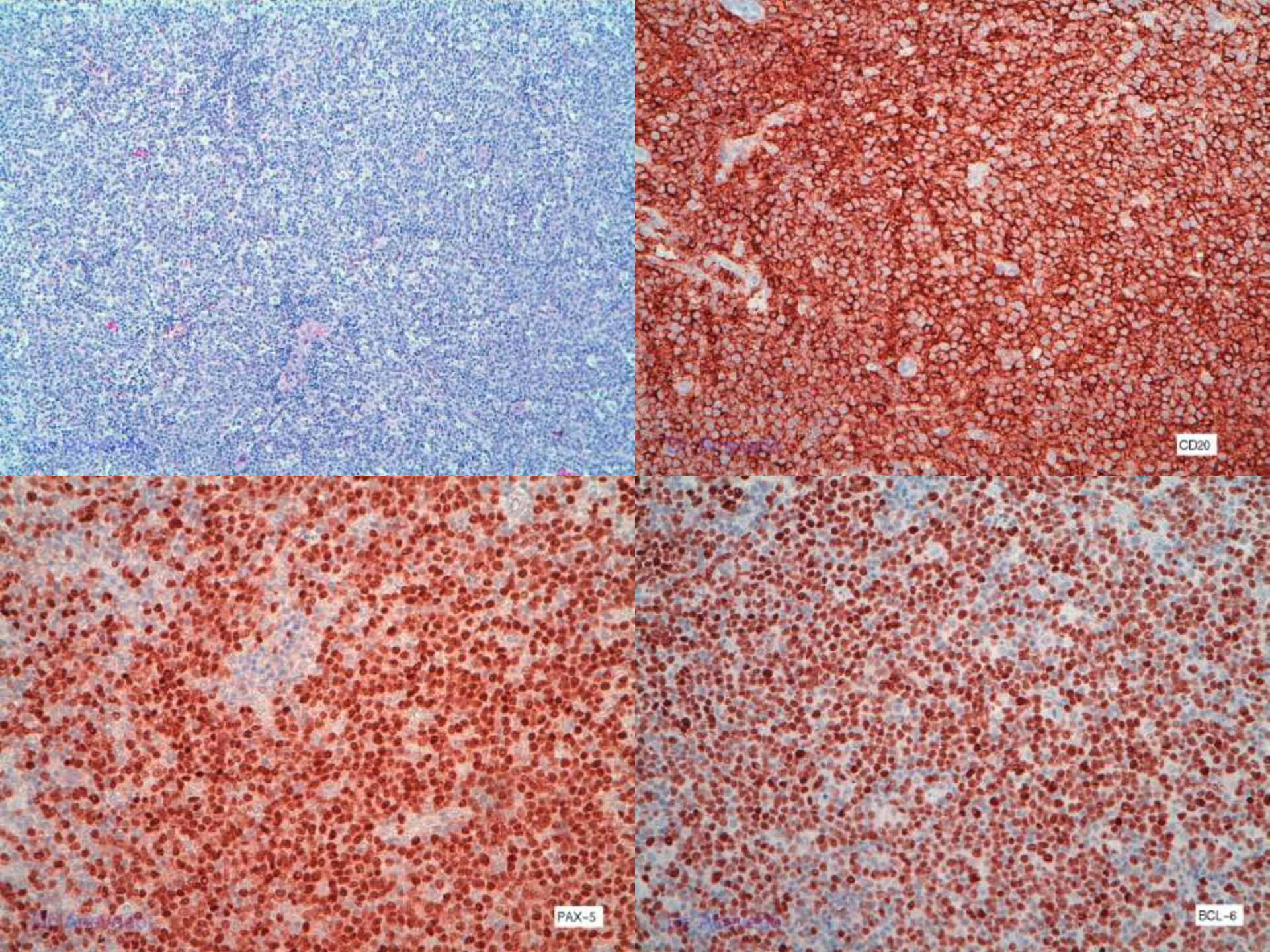
**Linfocitos B CD19+ complejos, CD20+, CD5-, 20%
CD23-, CD10-, CD38+**

CITOMETRÍA DE FLUJO: CASO 1



**Linfocitos B CD19+ complejos, CD20+, CD5-, 20%
CD23-, CD10-, CD38+, CLONALIDAD KAPPA**





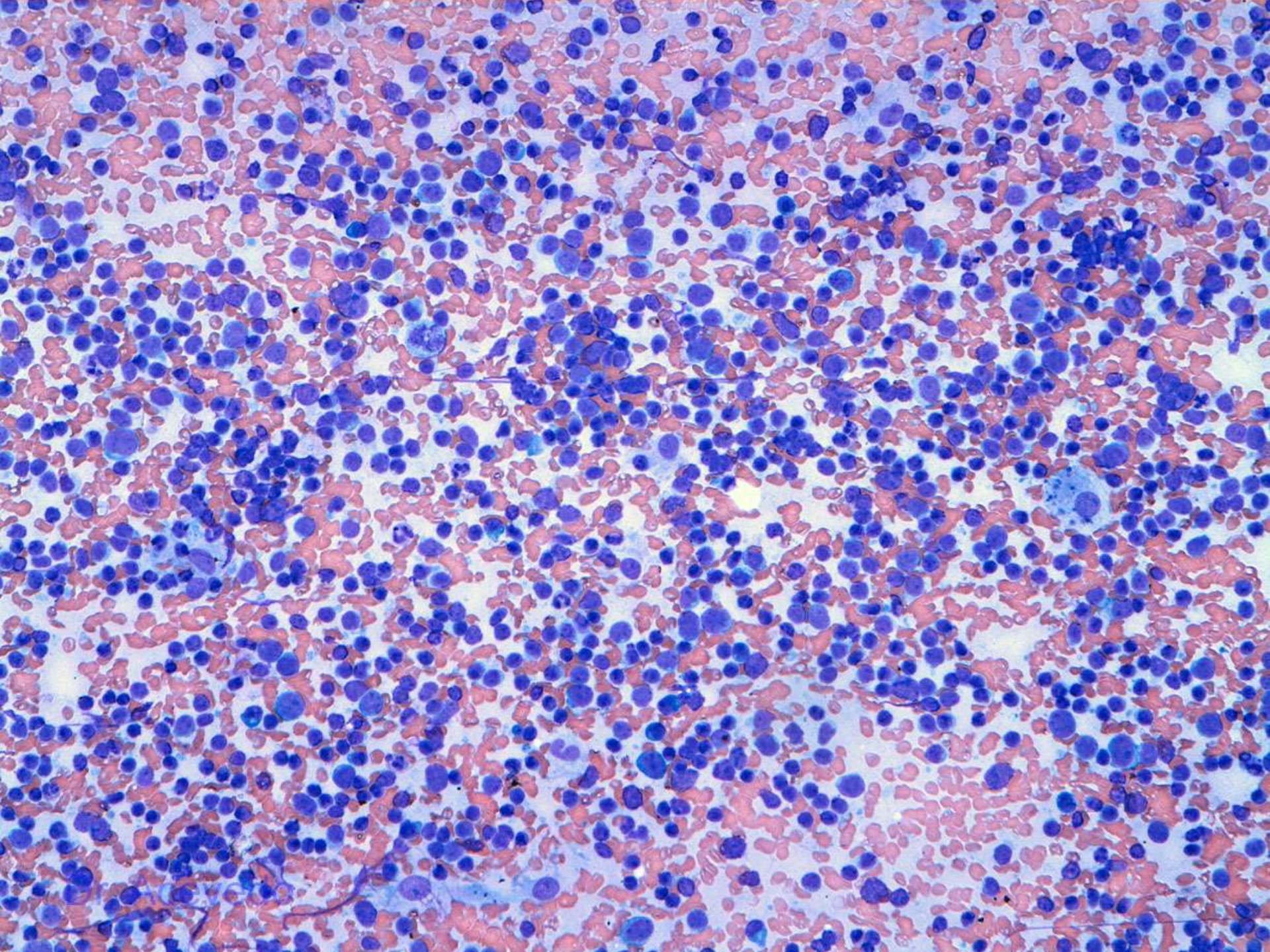
CD20

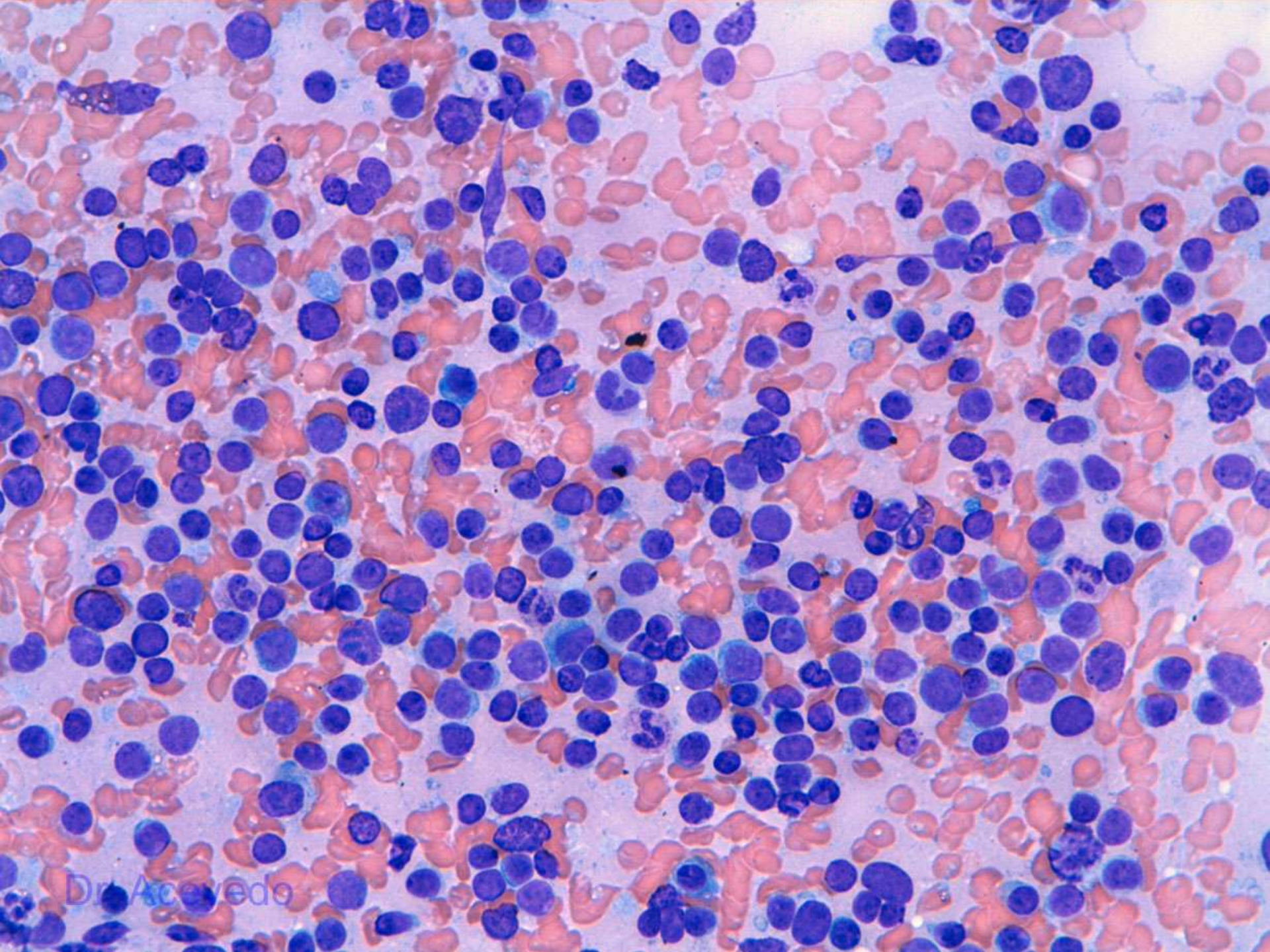
PAX-5

BCL-6

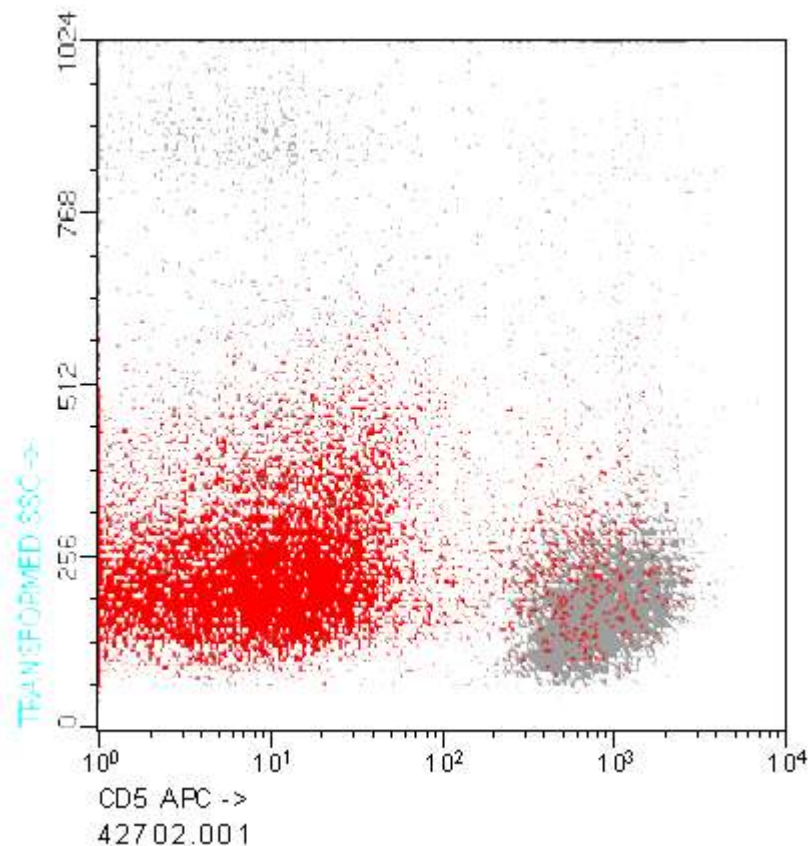
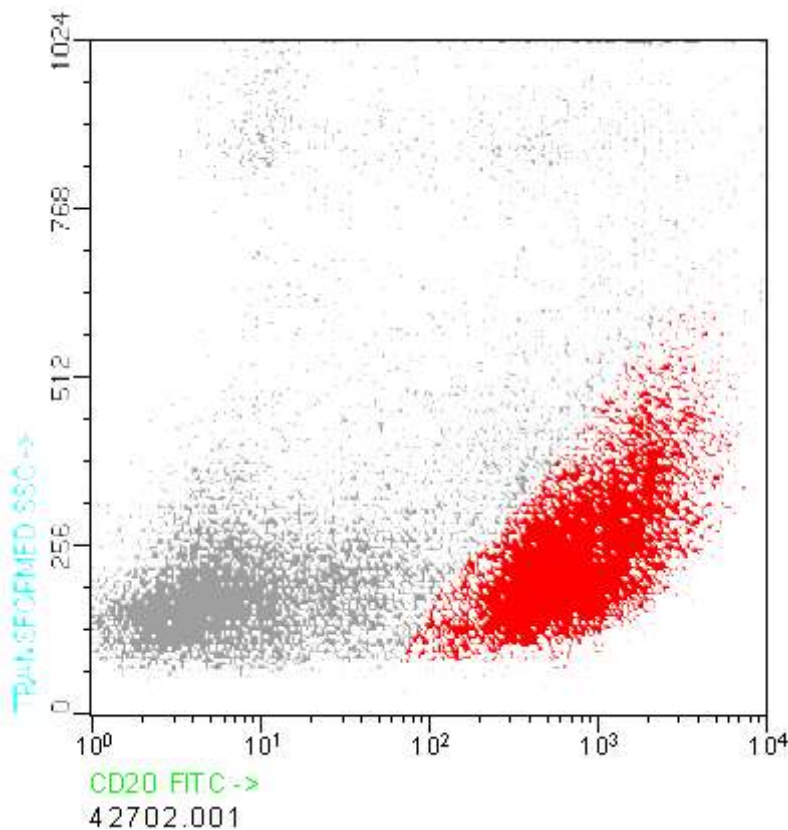
CITOMETRÍA DE FLUJO: CASO 2

- PMS, varón de 62 años de edad, sin antecedentes de interés.
- Adenopatías cervicales y supraclaviculares de hasta 2cm en cuello y de 3 cm en fosa supraclavicular desde hace varios meses.
- Fiebre vespertina desde hace 6 meses.
- PAAF de ganglio supraclavicular.



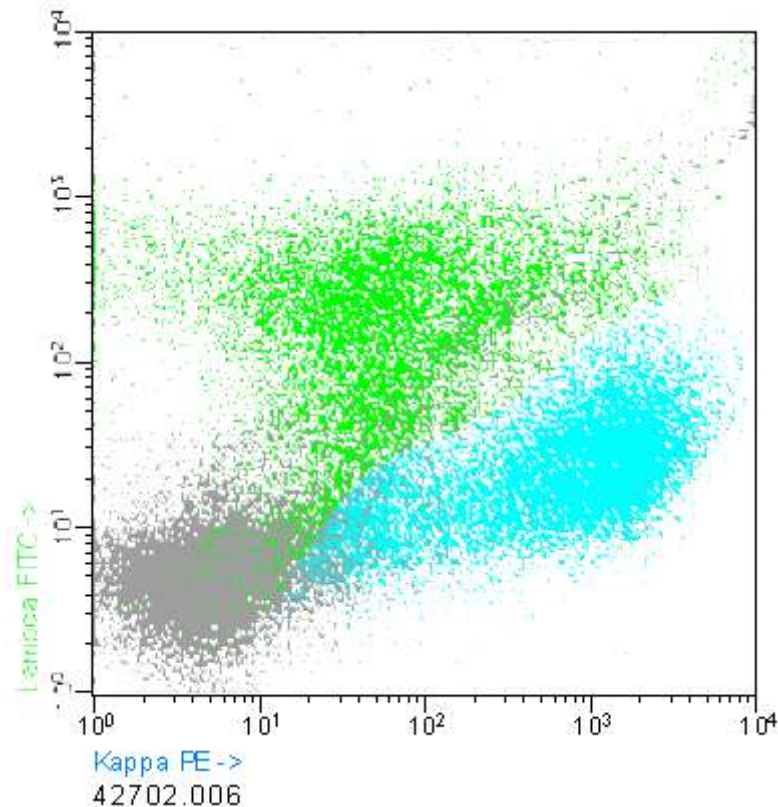
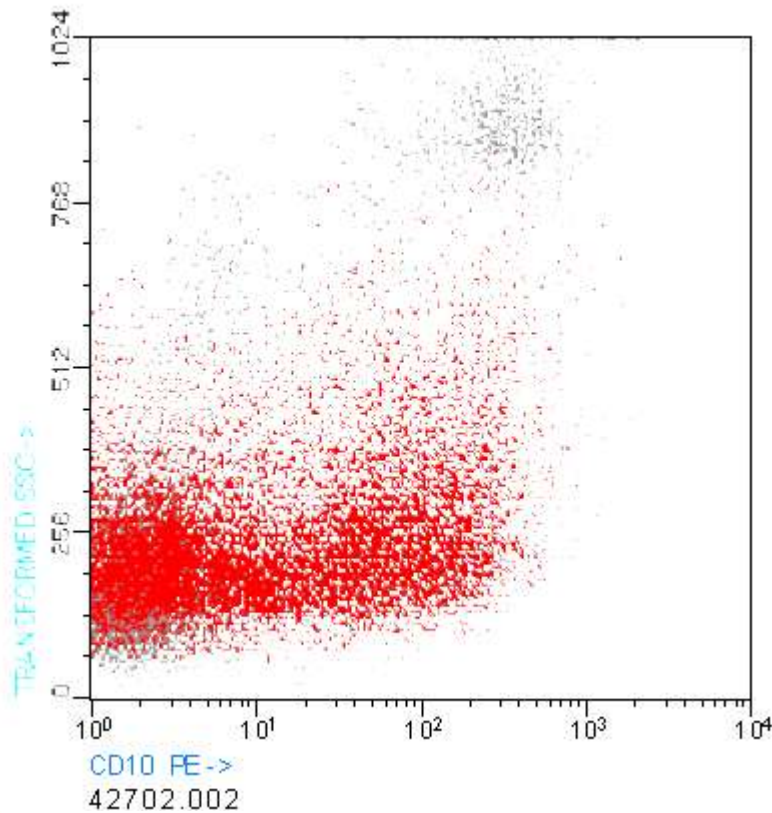


CITOMETRÍA DE FLUJO: CASO 2

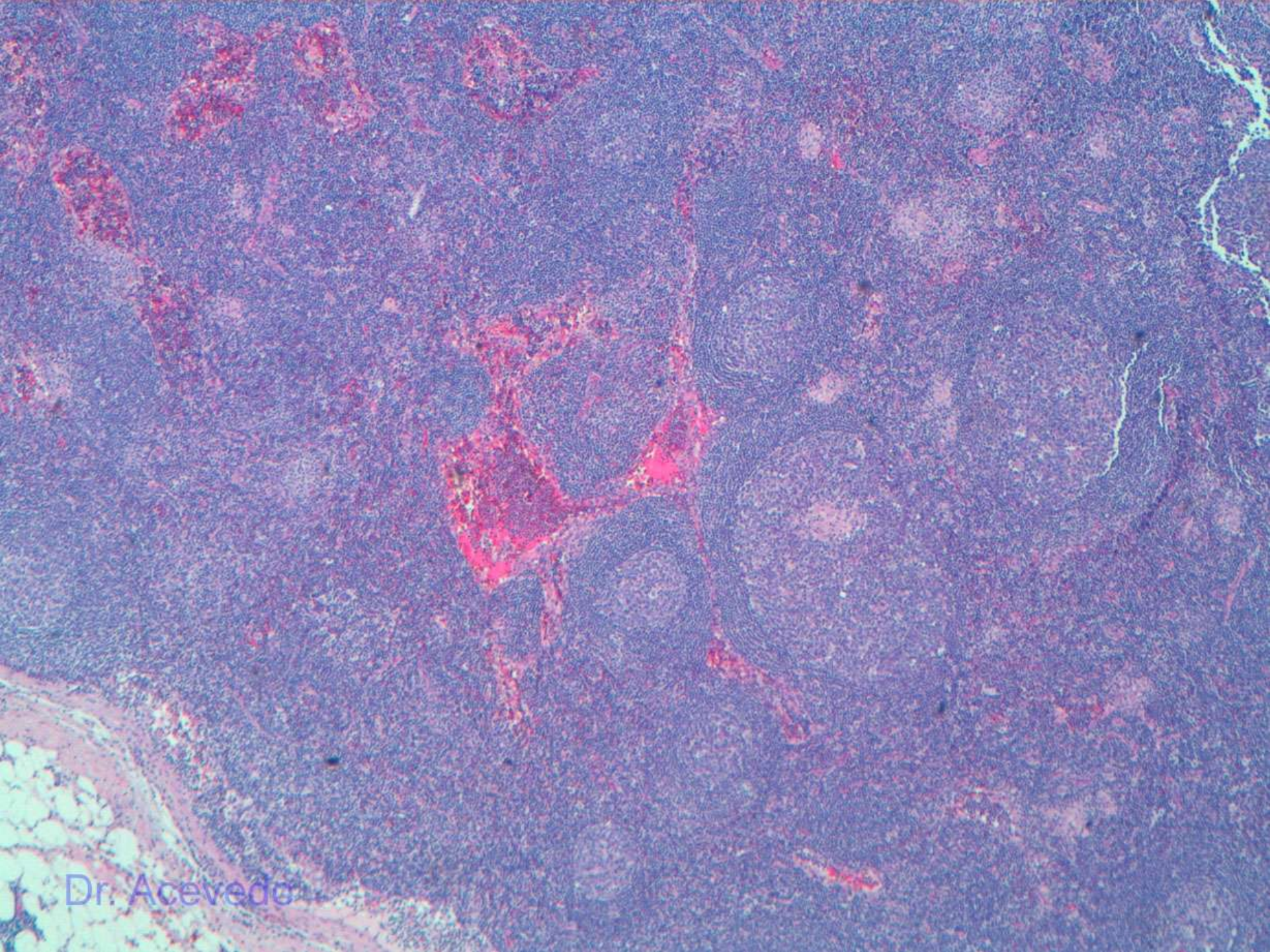


 Linfocitos B CD19+, CD20+, CD5-

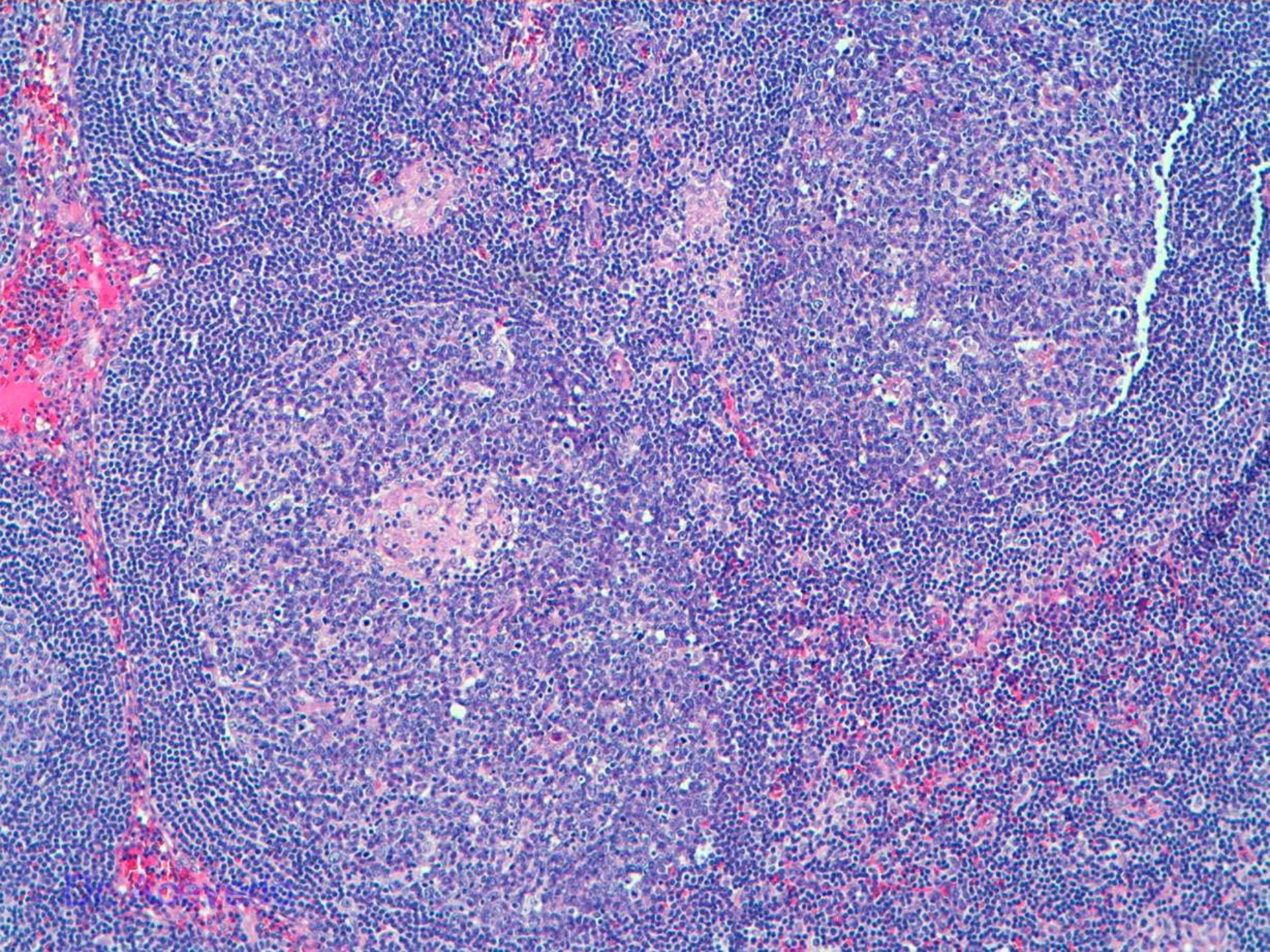
CITOMETRÍA DE FLUJO: CASO 2

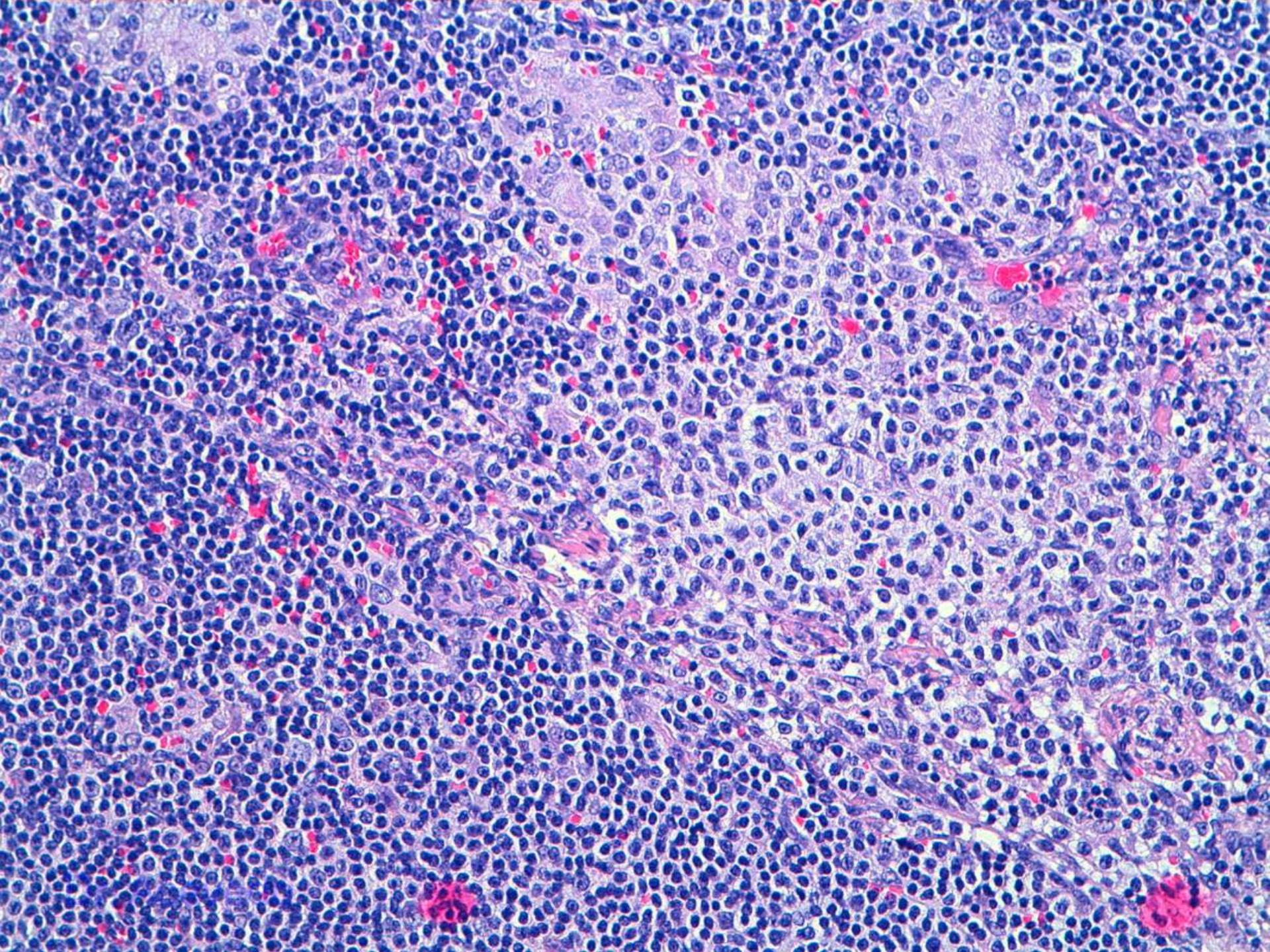


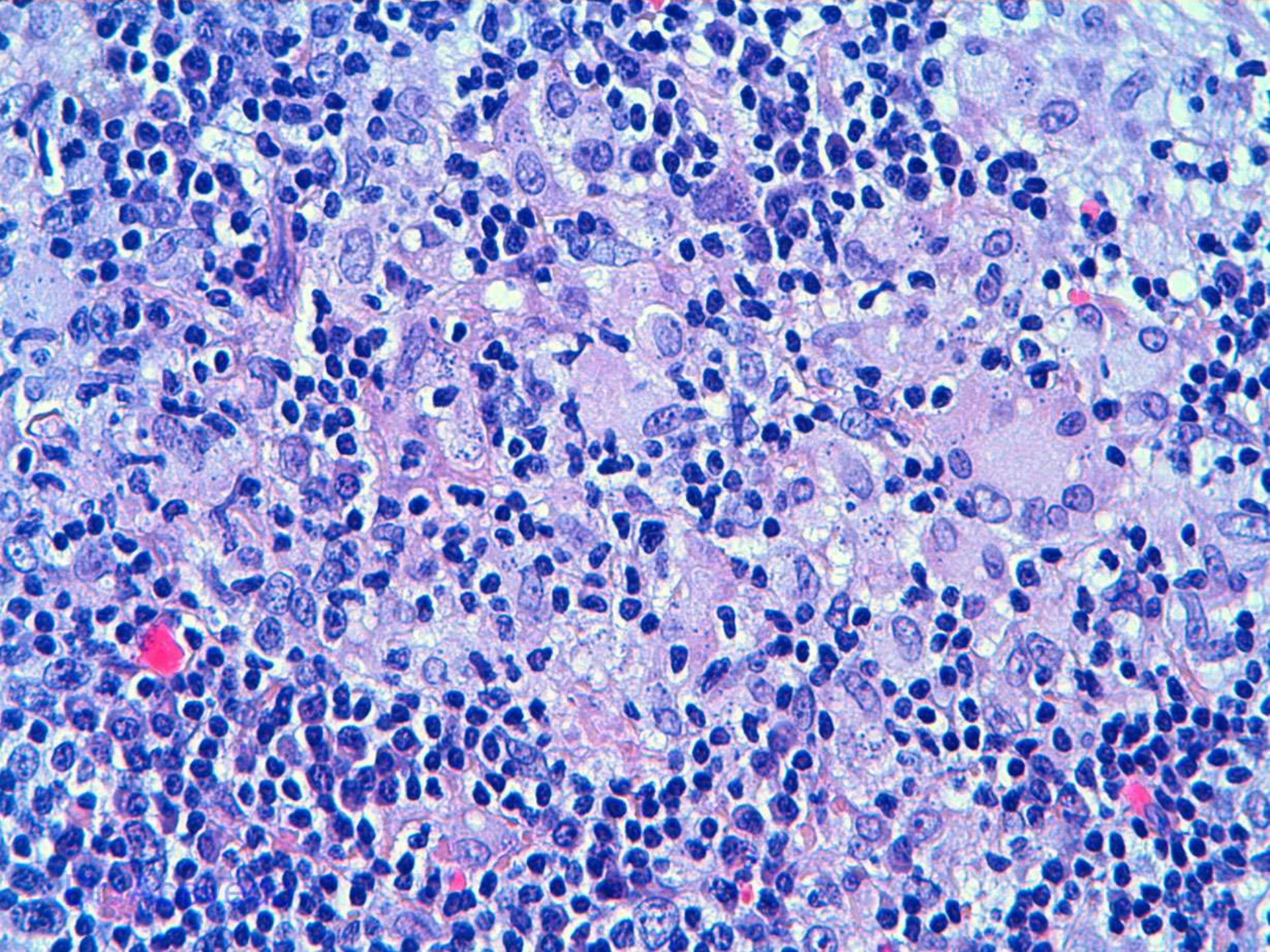
Linfocitos B CD19+, CD20+, CD5-, 20% CD23, CD10+, CD38+, policlonales

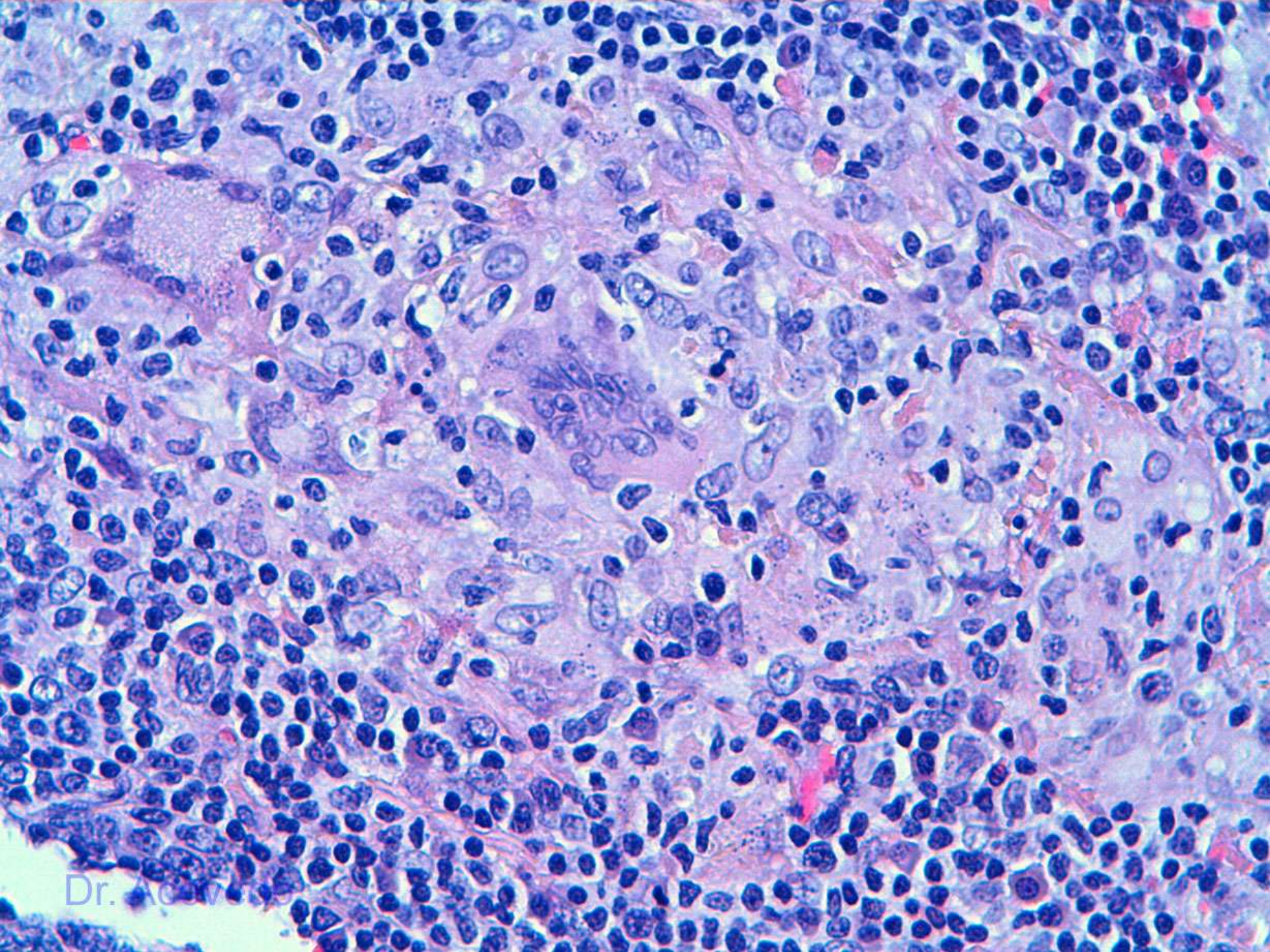


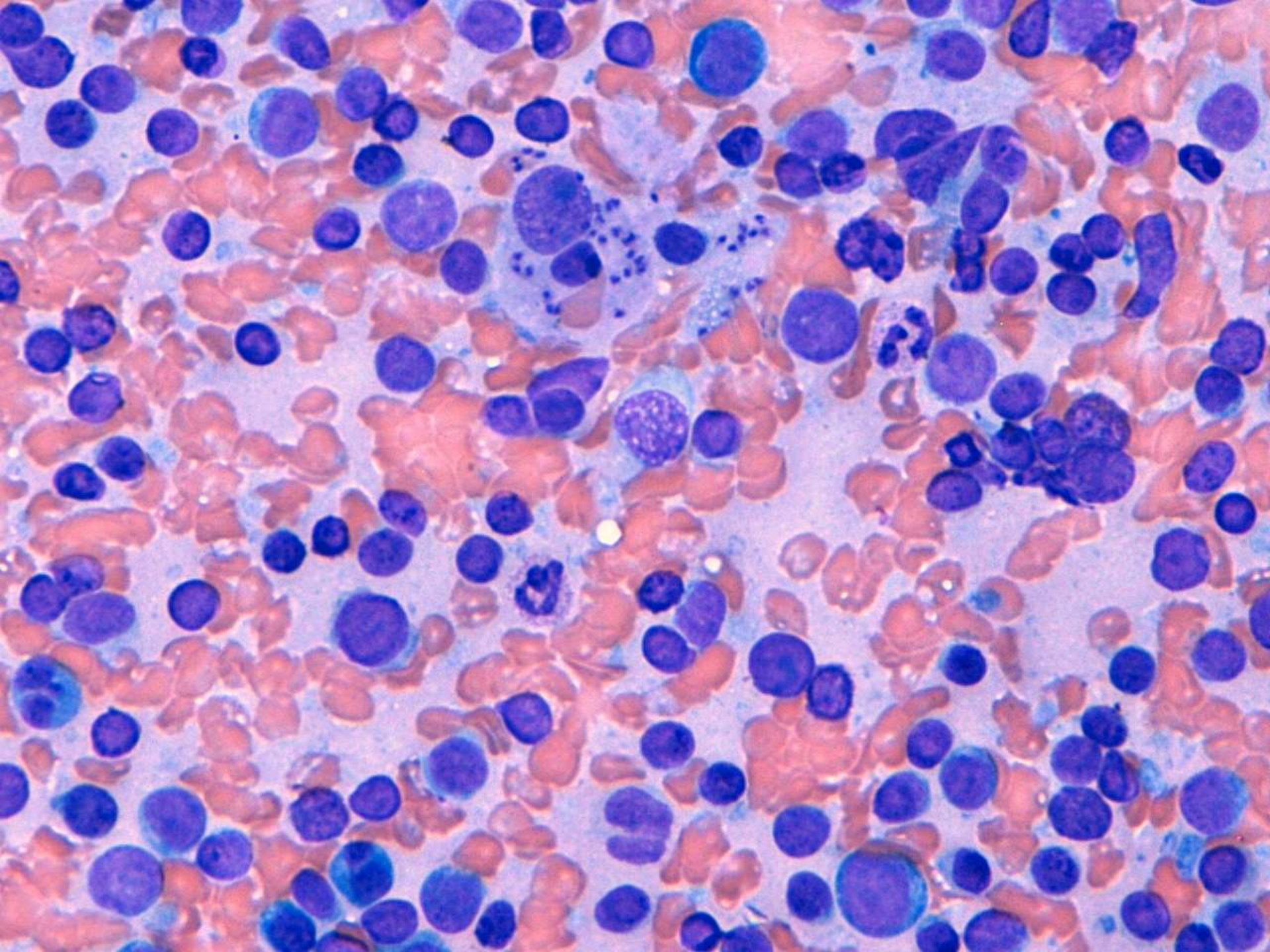
Dr. Acevedo











CITOMETRÍA DE FLUJO

- **VENTAJAS:**
 - Análisis masivo
 - Estimación cuantitativa con alta sensibilidad
 - Facilidad metodológica
 - Obtención por procedimientos no invasivos
 - PAAF
 - Biopsia por punción
- **INCONVENIENTES:**
 - Fuerte dependencia tecnológica
 - Representatividad de la muestra:
 - Limitada al punto de la toma: *linfomas transformados*
 - Características del tumor: *Linfoma de Hodgkin, Otros*
 - Localización de la muestra: *médula ósea*
 - Limitada a moléculas de superficie

PAAF EN LINFOMAS

- La PAAF ha demostrado su papel en el triaje de adenopatías, PERO...

¿TIENE TODAVÍA ALGÚN PAPEL EN EL DIAGNÓSTICO DE LINFOMAS?
- Hehn ST. Et al. J Clin Oncol 2004, 22: 3046: *“La PAAF es un método deplorablemente inadecuado y potencialmente engañoso para el diagnóstico de linfomas”*.
 - Análisis de centros en EEUU
 - < 50% de casos con fenotipo
 - 30% de casos con diagnóstico ajustado a un esquema válido
- División de opiniones:
 - Tani E. *Lymphoproliferative disorders: who needs histopathology when we have cytology?*. J Cytopathol 2005; 16(suppl): 16.

- **PREGUNTAS BÁSICAS:**

- ¿Puede y debe hacerse el diagnóstico de linfoma con PAAF, incluso con el apoyo de la CF?

En caso afirmativo:

- ¿Puede hacerse la subclasificación de un linfoma (en especial el diagnóstico inicial) basado en la PAAF de manera rutinaria y reproducible?
- ¿Debe limitarse la PAAF al papel de herramienta de triaje de los pacientes de linfoma?
- ¿Deben ser hematopatólogos los responsables del diagnóstico de estas PAAF?

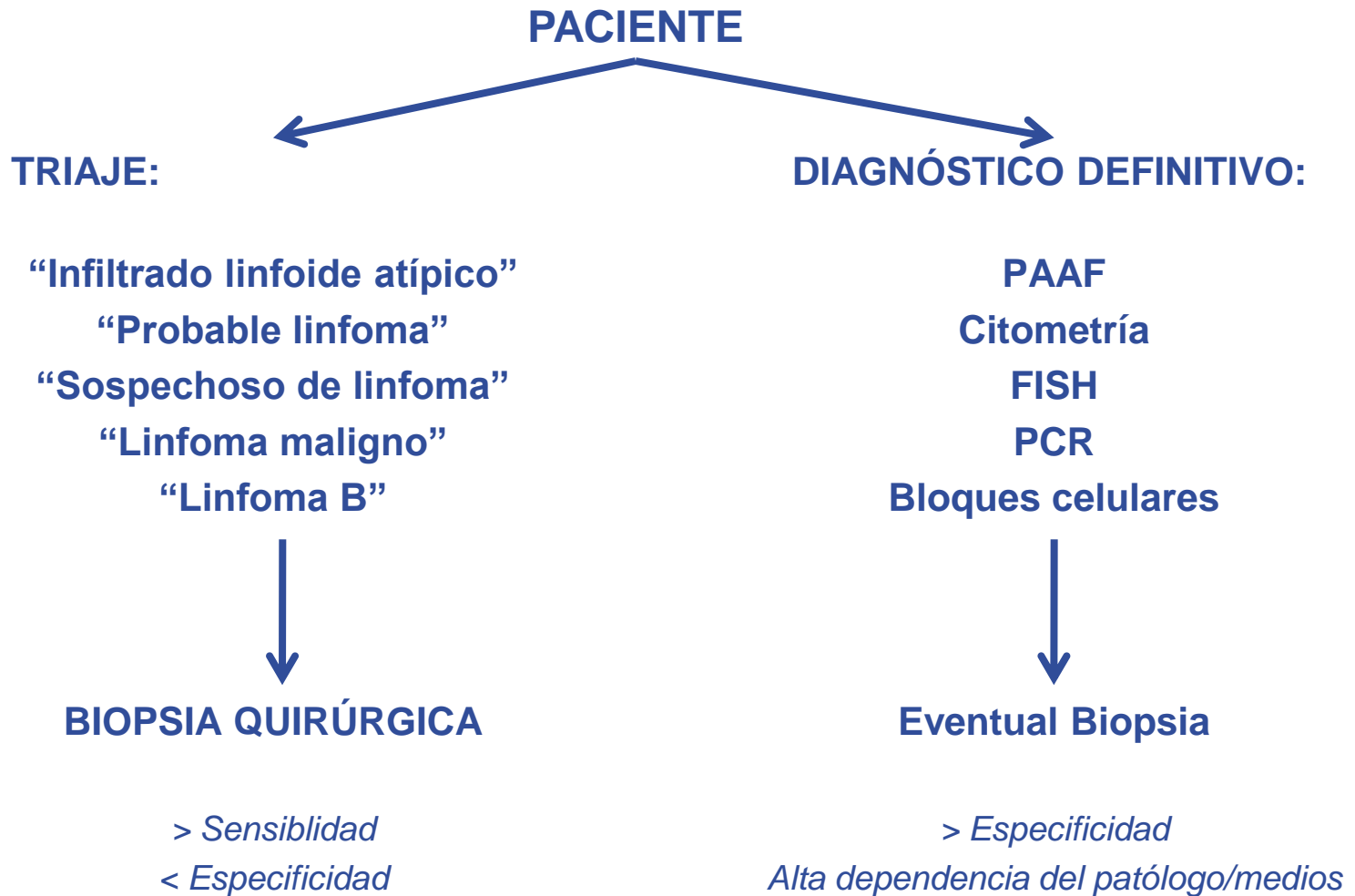
Wakely PE. Cancer Cytopathol 2010; 118: 238.

PAAF EN LINFOMAS

- **DIAGNÓSTICO INICIAL:**
 - Masa accesible: biopsia
 - Masas profundas: biopsia quirúrgica, BAG o PAAF
 - Bloque celular
 - Técnicas adicionales: CF, FISH, PCR
- **Problemas que limitan la PAAF en el diagnóstico inicial**
 - *Complejidad de la patología*
 - Escasa familiarización/¿interés? de los citopatólogos
 - Logística complicada
 - Necesidad de técnicas adicionales
 - Imposibilidad de archivar material
 - Facilidad de la biopsia

Wakely PE. Cancer Cytopathol 2010; 118: 238.

PAAF EN LINFOMAS: POLÍTICA



ACTUALIZACIÓN EN LINFOMAS: CONCLUSIONES

- Patología de gran complejidad
- Avances en conocimientos básicos → Mejoras en clasificación, tto. etc
- Importancia de la clínica
- Elevados y crecientes requerimientos técnicos:
 - Estudio morfológico: pieza central
 - Fenotipo:
 - Inmunohistoquímica
 - Citometría: limitaciones
 - Genética:
 - Convencional
 - FISH
 - Expresión génica: RNA
 - Conjuntos limitados de genes: QT-PCR ± IHQ
 - miRNA: QT-PCR
 - PAAF: triaje inicial
 - Combinada con CF y/o Bloque celular



SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA:

Dr. Agustín Acevedo

Dr. Carlos Prada

Dr. Jorge Mayor

Dr. Armando Meneses (Hospital México, UCR, San José, Costa Rica)

Teresa Caruana (TSEAP)

Nagore Etxeberria (TSEAP)

Cristina García (TSEAP)

LABORATORIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO:

Dra. M. Carmen Castellanos

Dr. Carlos Cuesta

Dra. Carmen Fernández Rañada