UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

SERVICIO GENERAL DE CITOMETRÍA

**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**“NUEVAS ESTRATEGIAS INMUNOFENOTÍPICAS
APLICADAS AL DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE
SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS”**

TESIS DOCTORAL

Susana Barrena Delfa

2011

**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

**D. Alberto Orfao De Matos Correia e Vale, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático del
Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca**

C E R T I F I C A:

Que el trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por Dña. Susana Barrena Delfa titulado "*Nuevas estrategias inmunofenotípicas aplicadas al diagnóstico y clasificación de síndromes linfoproliferativos crónicos*", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca. Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca a 16 de Mayo del año 2011.

Fdo: Dr.Alberto Orfao de Matos

VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

**Dña. Julia Almeida Parra, Doctora en Medicina y Cirugía y Profesora Titular del
Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca**

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por Dña. Susana Barrena Delfa titulado "*Nuevas estrategias inmunofenotípicas aplicadas al diagnóstico y clasificación de síndromes linfoproliferativos crónicos*", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca. Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca a 16 de Mayo del año 2011.

Fdo: Dra. Julia Almeida Parra

Glosario de abreviaturas

Ag: antígeno
AID: citosina deaminasa inducible por activación
APC: Alofocianina
APCCy7: Alofocianina-cianina 7
BCR: receptor de células B
Blimp1: del inglés "B lymphocyte-induced maturation protein 1"
CD: "cluster" de diferenciación
CDF: célula dendrítica folicular
CG: centro germinal
CyIg: inmunoglobulina de citoplasma
CMF: citometría de flujo
CMV: citomegalovirus
CP: célula plasmática
Cy: citoplasmático
EMR: Enfermedad mínima residual
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
FSC: dispersión frontal de luz o tamaño celular
GL: ganglio linfático
GMSI: gammapatía monoclonal de significado incierto
HMS: hipermutación somática
HPN: hemoglobinuria paroxística nocturna
Ig: inmunoglobulina
IGH: cadena pesada de las Igs
IGL: cadena ligera de las Igs
IL: interleucina
LB: linfoma Burkitt
LBDCG: linfoma B difuso de célula grande
LCM: linfoma de células del manto
LCP: leucemia de células plasmáticas
LCR: líquido cefalorraquídeo
LF: linfoma folicular
LH: linfoma de Hodgkin
LLA: leucemia aguda linfoblástica
LLC-B: leucemia linfática crónica B
LLCBP: linfoma linfocítico de célula B pequeña
LLGG-T: leucemia/linfocitosis de linfocitos T grandes granulares
LMA: leucemia aguda mieloblástica
LNH: linfoma no-Hodgkin
LPL-B: leucemia prolinfocítica B
LLP: linfoma linfoplasmocítico

LZME: linfoma de la zona marginal esplénica
LZMn: linfoma de la zona marginal nodal
MALT: linfoma de la zona marginal extranodal del tejido linfoide asociado a mucosas
MFI: intensidad media de fluorescencia
MM: mieloma múltiple
MO: médula ósea
MS: mastocitosis sistémica
MW: macroglobulinemia de Waldenstrom
NK: del inglés “natural killer”
OMS: organización mundial para la salud
slg: inmunoglobulina de superficie
PAAF: punción-aspiración con aguja fina
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PE: Ficoeritrina
PerCP: Proteína peridinin-clorofila
RAG: gen activador de la recombinación
REAL: clasificación revisada Europea-Americana
RS: Reed-Sternberg
SCF: del inglés “stem cell factor”
SLPC: síndrome linfoproliferativo crónico
SMD: síndrome mielodisplásico
SP: sangre periférica
SSC: dispersión lateral de luz o complejidad interna de la célula
TCR: receptor de células T
TdT: deoxinucleotidil transferasa terminal
TL: tricoleucemia
TL-V: forma variante de tricoleucemia
TLR: receptor “toll-like”
ZM: zona marginal

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
1.- Maduración linfoide	4
1.1.- Maduración linfoide B	5
1.2.- Maduración linfoide T y NK	15
2.- Rastreo diagnóstico de clonalidad linfoide en SLPC	19
2.1.- Rastreo de clonalidad B en el diagnóstico de los SLPC	21
2.2.- Rastreo de clonalidad T en el diagnóstico de los SLPC	25
2.3.- Rastreo de clonalidad NK en el diagnóstico de los SLPC	28
3.- Diagnóstico y clasificación de los linfomas no Hodgkin (LNH) en muestras de punción-aspiración con aguja fina (PAAF)	28
3.1.- Falsos negativos obtenidos por citometría de flujo en muestras de PAAF	31
3.2.- Falsos positivos obtenidos por citometría de flujo en muestras de PAAF	32
4.- Características inmunofenotípicas de los síndromes linfoproliferativos crónicos	33
4.1.- Características inmunofenotípicas de los SLPC-B primariamente leucémicos	36
4.1.1.- Leucemia linfática crónica B y linfoma linfocítico de células B pequeñas	36
4.1.2.- Leucemia prolinfocítica	39
4.1.3.- Tricoleucemia	40
4.2.- Características inmunofenotípicas de los linfomas no hodgkinianos B con expresión periférica	41
4.2.1.- Linfoma de células del manto	42
4.2.2.- Linfoma folicular	43
4.2.3.- Linfoma B difuso de célula grande	44
4.2.4.- Linfoma de Burkitt	46
4.2.5.- Linfoma de la zona marginal esplénica y nodal	47
4.2.6.- Linfoma de la zona marginal extranodal del tejido linfoide asociado a mucosas	48
4.2.7.- Linfoma linfoplasmocítico y macroglobulinemia de Waldstrom	48
4.2.8.- Gammopatías monoclonales y mieloma múltiple	49

4.3.- Características fenotípicas de los SLPC-T y SLPC-NK	50
4.3.1.- Leucemia prolinfocítica T	50
4.3.2.- Leucemia/linfoma T del adulto	51
4.3.3.- Leucemia de linfocitos T grandes granulares	51
4.3.4.- Síndrome de Sezary y micosis fungoide	53
4.3.5.- Linfoma T angioinmunoblástico	54
4.3.6.- Linfoma T periférico NOS	54
4.3.7.- Linfoma T hepatoesplénico	55
4.3.8.- Linfoma T subcutáneo tipo paniculítico	55
4.3.9.- Linfoma T/NK extranodal, tipo nasal	56
4.3.10.- Linfoma T asociado a enteropatía	56
4.3.11.- Linfoma T anaplásico de células grandes, ALK+	56
4.3.12.- Linfoma T anaplásico de células grandes, ALK-	57
4.3.13.- Síndrome linfoproliferativo crónico de células NK	57
4.3.14.- Leucemia agresiva de células NK	58
5.- Moléculas tetraspaninas	59
5.1.- Expresión tisular de las moléculas tetraspaninas	61
5.2.- Interacciones entre tetraspaninas y otras moléculas	61
5.2.1.- Interacciones entre tetraspaninas e integrinas	62
5.2.2.- Interacciones entre tetraspaninas y moléculas del sistema HLA	62
5.2.3.- Interacciones entre tetraspaninas y otras moléculas	63
5.3.- Alteración de los niveles de expresión de las tetraspaninas en distintos carcinomas: relación con la capacidad invasiva del tumor	64
II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67

III.- MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS73

3.1.- ARTÍCULO 1: Análisis inmunofenotípico mediante citometría de flujo de muestras obtenidas mediante punción-aspiración con aguja fina: utilidad en el diagnóstico y clasificación de los linfomas no Hodgkin.77

3.2.1- ARTÍCULO 2.1: Expresión aberrante de tetraspaninas en los síndromes linfoproliferativos crónicos B y su relación con la maduración linfoide B normal93

3.2.2.- ARTÍCULO 2.2: Identificación y discriminación de síndromes linfoproliferativos crónicos biclonales de acuerdo con el patrón de expresión de tetraspaninas.105

3.3.- ARTÍCULO 3: Análisis automático de patrones fenotípicos basado en el estudio de componentes principales *versus* análisis convencional, en la clasificación inmunofenotípica de los síndromes linfoproliferativos crónicos B: un paso adelante en la estandarización clínica de los estudios inmunofenotípicos.109

IV.- DISCUSIÓN121

V.- CONCLUSIONES143

VI.- BIBLIOGRAFÍA147

I.- Introducción

Los linfocitos son células del sistema inmune de origen hematopoyético, encargadas de reconocer y responder de forma específica y adaptada frente a distintos agentes extraños e inducir tolerancia frente a estructuras propias. En términos generales, dentro de los linfocitos se engloban dos grandes grupos dependiendo de su origen y función: los linfocitos T y los linfocitos B. Además, existe un tercer grupo de células de aspecto linfoide que comparten algunos mecanismos efectores de la respuesta inmune con los linfocitos T, las células *natural killer* (NK).

Los síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la expansión (mono)clonal de células linfoides de aspecto maduro que reflejan las características de distintas subpoblaciones normales de linfocitos maduros. Desde el punto de vista fenotípico y de acuerdo con su origen, los SLPC se clasifican en SLPC-B, T y NK. No obstante, en la clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [1], los SLPC-T y NK se consideran frecuentemente de forma conjunta, debido a que algunos subtipos de SLPC-T y NK presentan características clínicas, morfológicas y evolutivas similares, independientemente de la naturaleza de la célula expandida, y claramente diferentes de las neoplasias de linfocitos B maduros. Desde el punto de vista práctico, los SLPC B presentan una incidencia claramente superior a la de los SLPC-T, siendo raros los casos de SLPC-NK. Así, según diferentes autores, los SLPC-B representan más de 90-95% de todas las enfermedades linfoproliferativas crónicas de naturaleza neoplásica [2]. Así mismo, merece destacar que los SLPC-B son un amplio grupo de entidades diferentes, clínica y biológicamente bien definidas, mientras que el número de SLPC-T y NK es significativamente más reducido [1][3].

En esta introducción revisaremos en primer lugar la maduración linfoide normal como punto de partida para identificar la presencia de células linfoides alteradas en distintos tipos de muestras biológicas y establecer las similitudes y diferencias que presentan respecto a su contrapartida normal. A continuación analizaremos las estrategias actuales empleadas para el rastreo diagnóstico de clonalidad linfoide en

los SLPC empleando citometría de flujo, para finalmente revisar las características fenotípicas más relevantes de los distintos subtipos de SLPC identificados en la clasificación de la OMS.

1.-Maduración linfoide

Tanto los linfocitos T y B como las células NK tienen su origen en un precursor hematopoyético CD34+ [4-6]. Dentro de los precursores CD34+/CD45+débil de médula ósea (MO), se identifica de forma inequívoca un compartimento significativo de precursores B que coexpresan la enzima nuclear deoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt), PAX5, CD81, CD10, CD19, CD22 y CD79a citoplasmático (Cy) [7]; aunque existen algunas discrepancias acerca de la secuencia exacta de aparición de estos marcadores, sí se conoce que la expresión de PAX5 constituiría un evento temprano asociado con la activación de la expresión de otras proteínas relacionadas con la diferenciación B [8][9-11]. Pese a ello, en la actualidad se acepta que la expresión de Tdt precedería a la de CD10, CD22 y CD79a y que CD19 se haría positivo en un estadio inmediatamente posterior a la aparición de estos últimos marcadores, inducido por CD81 [7, 12].

En contraposición con lo descrito para la diferenciación B, la identificación de precursores tempranos comprometidos ya a línea T o NK resulta en la actualidad difícil, si no imposible [12-13]. Ello podría ser debido a que en la MO el precursor T y NK sería común a ambos tipos celulares, además de a células dendríticas. En este sentido, se ha sugerido que, en la MO, la fracción minoritaria de células CD34+/CD7+ (<0,5% de la celularidad global y <20% de los precursores CD34+) incluiría ese precursor común T/NK/célula dendrítica [14-16]. Este precursor mostraría además, coexpresión de CD117, CD135, CD38, CD44, CD45RA y HLA-DR, caracterizándose por presentar expresión variable de los marcadores asociados a línea mieloide CD13 y CD33 [14-16][17] (Figura 2). La adquisición de reactividad para CD5, que

habitualmente ocurre ya fuera de la MO, permitiría identificar los precursores específicos de célula T más inmaduros que han emigrado al timo, diferenciándolos de los de las células NK [14-16].

1.1.- Maduración linfoide B

De forma general, se establece que la maduración de las células B tiene lugar en dos estadios diferentes, y en dos localizaciones distintas: i) la diferenciación de precursores de células B desde la célula *stem* hasta los linfocitos B maduros *naïve*, que ocurre en la MO [18] y ii) la maduración a células de memoria/efectoras, que tiene lugar en los órganos linfoides secundarios –ganglios linfáticos (GL), bazo, MO y tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)-, [19][20]. Las subpoblaciones de células B resultantes de estos procesos y que circulan entre estos tejidos a través de la sangre periférica (SP), podrían reflejar el estado inmunológico de un individuo, incluyendo los defectos que pudiera potencialmente tener en la maduración de las células B y las alteraciones asociadas a autoinmunidad y enfermedades linfoproliferativas relacionadas con la biología de la célula B y su homeostasis.

Basándonos en el estado de los genes de las cadenas de las inmunoglobulinas y la expresión de una gran variedad de proteínas de superficie e intracelulares, se han identificado cinco compartimentos madurativos de células B en la MO: precursores pro-B, pre-B-I, pre-B-II, linfocitos B inmaduros (o transicionales) y células B *naïve* [11][12][18][21][22] (Figura 1). Durante los primeros pasos de la maduración de las células B, los precursores de MO muestran compromiso madurativo a línea B tras interaccionar con las células estromales a través de las moléculas VLA-4/VCAM-1 y c-kit/SCF, entre otras [18][21][23]. Las células pro-B expresan CD22 y CD45 de forma débil, junto a marcadores típicos de célula precursora como CD34 y niveles elevados de CD38; CD19 todavía no se expresa en este estadio [11][12][24]. Además, estos precursores se encuentran unidos a células que expresan CXCL12 a través de

CXCR4, no estando aún comprometidos a precursores de línea B; dicho compromiso ocurre cuando el precursor migra a nichos medulares que contienen células que expresan IL-7 [18][25][26]. La interacción de IL-7 con el receptor que se expresa en las células pro-B promueve la producción de varios factores de transcripción (PAX-5, PU.1, EBF-1, E2A), que inducen la síntesis de la enzima Tdt y el gen activador de la recombinación (*RAG*), produciendo tdt, rag1 y rag2; estas proteínas son requeridas para la recombinación somática entre los segmentos de genes *D* y *J* del locus de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Ig) (*IGH*) [27-28]. Al expresar PAX-5, las células pro-B comprometen su linaje a línea B como células pre B-I, a cuyo nivel se detecta por primera vez expresión de CD19, junto con un fenotipo CD10⁺⁺CD38⁺⁺CD34⁺CyCD79a⁺ y expresión nuclear de Tdt (Figura 1). Durante este paso, la unión de un segmento V a un segmento D-J preformado completaría el reordenamiento del locus *IGH*.

La generación de la cadena pesada Ig μ es debida a la unión de un exón VDJ funcional con el exón constante Ig μ . Aquellas células en las que se detecte Ig μ citoplasmática (CyIg μ), se identifican como células pre B-II [12][29], y muestran reactividad para CD20, aumento de expresión de CD45 y descenso de reactividad para CD34 y nTdt [11][12]; además, la Ig μ se expresa en niveles bajos en la superficie de las células pre-B junto con las proteínas VpreB y λ 5, que sustituyen la cadena ligera de la Ig, cuyo loci no ha sido todavía reordenado en estas fases de la maduración [22][30].

Las proteínas de señalización Ig α e Ig β (CD79a y CD79b), también se expresan para formar el pre-receptor de células B (BCR) junto con la cadena Ig μ , VpreB y λ 5; a este nivel tiene lugar una selección positiva de precursores B, confirmando así que la cadena Ig μ generada es funcional, y eliminando aquellas células con reordenamiento de genes *IGH* no funcionales, y que se calcula constituyen aproximadamente la mitad de las células pre-B generadas [22][31]. Además, la

señalización a través del pre-BCR induce proliferación de estos precursores B y reordenamiento de los genes *IGL* [32].

Una vez que los loci *IGH* e *IGL* se han reordenado completamente de forma funcional, se detecta expresión de una molécula de IgM completa en la superficie celular (sIgM) en el compartimento de células B inmaduras/transicionales [12]. Estas células B inmaduras tienen en común algunas de las características fenotípicas de los linfocitos B *naïve* maduros, incluyendo expresión fuerte de CD20 y CD45; no obstante, a diferencia de las células B *naïve* maduras, todavía expresan CD10 de forma débil y muestran reactividad fuerte para el antígeno CD38 [12], presentan mayor intensidad de expresión de sIgM, menor intensidad de expresión de sIgD [33][34][35][36][37] y CD21 [37], positividad homogénea de CD5 y niveles elevados de expresión de CD81 (molécula de adhesión de la familia de las tetraspaninas que está asociada con el complejo BCR CD19/CD21/CD225) [33][34][35][36].

Mediante un proceso de selección negativa se eliminan aquellas células que tienen un BCR autorreactivo [31][38][39]; sin embargo, algunas células B inmaduras que unen antígenos propios disponen de una segunda oportunidad en la MO para reordenar su loci *IGL* y “reeditar” su BCR [31][38][39]; en el caso de que no sean capaces de producir un BCR no autorreactivo, son eliminadas o entran en proceso de anergia, dependiendo de su afinidad por dichos autoantígenos [22][31]. Después de pasar por este proceso de selección, las células B inmaduras que sobreviven se convierten en linfocitos B *naïve* maduros que pierden la expresión de CD10, CD38 y, posteriormente también de CD5 [12], abandonan la MO hacia la SP y circulan a través de los vasos sanguíneos. Al contrario de lo que ocurre en ratones [22], las células B *naïve* maduras que coexpresan IgM+IgD+, y que son completamente funcionales, se producen en el ser humano en la MO, de manera que no dependen del bazo para completar su maduración [12][40].

Las células B *naïve* CD27⁻CD20⁺CD19⁺CD38⁻ que salen de la MO circulan a través de la SP, y entran en la zona T del GL a través de las venas endoteliales

[19][20]; si en este tejido no se ven expuestas a antígeno, abandonan el GL a través de las venas linfáticas y recirculan entre la SP y los GL, muriendo a los pocos días. Por el contrario, si estas células B *naïve* reconocen su antígeno presentado por las células dendríticas foliculares (CDF) y entran en contacto con células T activadas específicas de Ag, se activan y migran al centro germinal (CG) [19][20], donde las células B están continuamente migrando entre la zona oscura (rica en centroblastos) y la zona clara (rica en centrocitos). En la zona oscura, las células experimentan una rápida proliferación, hipermutación somática (HMS) de las regiones de IgV dependiente de la enzima AID (citosina deaminasa inducible por activación) y cambio del isotipo de IgH; en la zona clara se reencuentran con el antígeno, produciéndose la maduración de la afinidad del BCR por el antígeno, aumentando así la supervivencia y proliferación de clones de células B con elevada afinidad del BCR por el antígeno inductor de la respuesta B [19][20].

El aumento de expresión de CD10, CD38, CD95 y HLA-DR y la disminución de la reactividad para CD44 y Cybcl2, junto con una positividad heterogénea para aquellos marcadores relacionados con la maduración del compartimento efector/memoria, como CD27 [19][41][42], discrimina las células B del CG de otras subpoblaciones de células B en el GL como los linfocitos B *naïve* y de memoria y los plasmablastos [19][41][42][43]. Aunque se ha sugerido que los centroblastos expresan de forma intensa CXCR4 [44] y CD77 [42] con respecto a lo observado en los centrocitos, no se ha llegado a un consenso sobre cuáles son las diferencias fenotípicas exactas entre estas dos subpoblaciones de linfocitos B [19]. En la actualidad se cree que los centroblastos CXCR4⁺ que contactan con CDF de la zona oscura expresan niveles elevados de CXCL12 en ausencia de CXCL13; la internalización de CXCR4⁺ por los centroblastos induce la expresión de CXCR5, que atraería a estas células a la zona clara, donde las CDF producen niveles elevados del ligando de este receptor (CXCL13) y muestran de nuevo el antígeno a la célula B [19][45]. La nueva interacción entre célula B y CDF en la zona clara dura muy poco,

pero permite la captación y presentación del antígeno por parte de la célula B a las células T foliculares, perpetuando éstas las señales de supervivencia requeridas por el linfocito B activado [45][46][47].

Durante la diferenciación del linfocito B *naïve* a célula B de memoria, los linfocitos B adquieren una gran afinidad de unión al antígeno [20], a la vez que cambian los patrones de expresión de múltiples receptores de superficie e intracelulares, que aumentan su sensibilidad a la estimulación antigénica [48]. En consecuencia, las células B de memoria muestran una mayor respuesta *in vitro* (vs. células B *naïve*) frente a diferentes estímulos que imitan el reconocimiento del antígeno (es decir anticuerpos anti-BCR) y/o señales que median la interacción con células T-helper (como CD40L) [48][49], con o sin el apoyo de citocinas como la IL21 [50] y/o de los ligandos de los receptores “toll-like” (TLR) [51]. Cuando las células B de memoria se exponen a estos factores, se induce un descenso de expresión de bcl6 inducido por NFkB/IRF4, junto a un aumento de expresión de Blimp1 (inducido por IRF4/STAT3); las células B entran rápidamente en ciclo celular, experimentando un número relativamente alto de rondas de división consecutivas y convirtiéndose una gran proporción de ellas en células secretoras de antígeno: plasmablastos y células plasmáticas (CP) [20][49][50][51][52]. Tales diferencias en la proliferación y maduración *“in vitro”* de las células B *naïve* y de memoria imitan las respuestas inmunitarias primaria y secundaria *“in vivo”*. Merece destacar también que aunque los linfocitos B *naïve* y de memoria circulan por la SP, muchas de las células B de memoria residen en lugares de drenaje de antígenos como la zona marginal del bazo y los folículos linfoides, el epitelio de las mucosas y las amígdalas, mientras que las células B *naïve* recirculan constantemente entre los diferentes tejidos linfoides [53][54].

Además de los precursores de células B (células pro-B y pre-B), los linfocitos B inmaduros y las células B *naïve*, las células plasmáticas (CP) también residen en nichos específicos de la MO, que mantienen su supervivencia y la producción de anticuerpos [26][27][28][29][30][31][32][38][39][55][56]. Si bien el compartimento

medular de células plasmáticas está relacionado con la recirculación linfoide -que ocurre desde los GL y otros órganos linfoides secundarios, a la MO a través de la SP-, presenta unas características fenotípicas bien definidas. Así, junto a la elevada expresión de CD38 y la positividad para CD138 y Cylg (habitualmente de tipo IgG o IgA y en menor proporción IgM), las células plasmáticas normales de MO no expresan la mayoría de los antígenos asociados a línea B (CD5⁻, CD20⁻/FMC7⁻, CD22⁻, CD23⁻, CD24⁻, CD25⁻, CD79b⁻), excepto CD19, CD21, CD27 y CyCD79a [57-60]. Además expresan Blimp1 [10, 61-63], una proteína que hoy se conoce que desempeña un papel clave en la diferenciación de los linfocitos B a célula plasmática productora de anticuerpos [10, 61-63]. A nivel citoplasmático, la mayoría de las células plasmáticas de MO normal expresan Cybcl2 de forma fuerte [64], y una proporción variable de ellas puede expresar en la membrana marcadores asociados a otras líneas hematopoyéticas, como CD13, CD28, CD33 y CD56 [57, 59-60, 65-66] (expresión débil) y presentar positividad para las moléculas de adhesión de la familia de las tetraspaninas CD9, CD53, CD63 y CD81.

En SP, las células B *naïve* comprenden aproximadamente el 60-70% de las células B circulantes, carecen de mutaciones somáticas en la región IgV, y coexpresan simultáneamente IgM e IgD [54][67]. Por el contrario, las células B de memoria ($\approx$ 20%-30% de todas las células B de SP) han sufrido fenómenos de hipermutación somática y muestran una región IgV mutada; además, aproximadamente la mitad de estas células B de memoria han sufrido el cambio de isotipo de IgH [54][67], reflejado por la expresión de slgA y slgG en el 23% $\pm$ 10% y el 21% $\pm$ 9% de las células B de memoria circulantes del adulto, respectivamente [68]. La otra mitad de las células de memoria coexpresan slgM y slgD (52% $\pm$ 15% de las células de memoria). Globalmente, estas subpoblaciones de linfocitos B son CD18⁺, CD19⁺, FMC7⁺, CD21⁺, CD37⁺, CD40⁺, CD44⁺, CD53⁺, CyCD79a⁺, CD79b⁺ y CD81⁺, mostrando además expresión fuerte de CD20, CD22 y CD45 en la membrana y de bcl2 intracitoplasmático [69-70][71][72-75]; por el contrario, estos linfocitos B maduros de SP y MO son habitualmente CD103⁻ y

CD10⁻ [71][72-74, 76]. A su vez, los antígenos CD5, CD11c, CD23, CD24, CD25, CD27, CD38, CD43, CD62L, CD80 y CD148, entre otros, se expresan de forma variable en las distintas subpoblaciones de linfocitos B maduros antes referidas [7, 77-80]. En este sentido, a modo de ejemplo, la expresión de CD27 y CD148 se asocia con células B de memoria generadas en el CG de los órganos linfoides secundarios [81-83], mientras que la expresión de CD11c y la negatividad para CD24 se asocian con estadios de maduración más avanzados [84]; por el contrario, CD43 identificaría, dentro de los linfocitos B, a aquellas subpoblaciones B más inmaduras o con diferenciación a linfoplasmaocito/plasmablasto [69, 85] y CD25 se expresaría de forma específica en un subgrupo de células B de memoria [68].

Estudios recientes sugieren la existencia de células B de memoria sIgG⁺ y sIgA⁺ que no expresan CD27 en la SP de individuos sanos [86]. Su origen y relación con las subpoblaciones de células B de memoria CD27⁺ siguen siendo desconocidos por el momento, aunque la frecuencia de mutaciones somáticas en estas células es muy baja [86]. De acuerdo con estos hallazgos, se ha observado que alrededor de un 20% de las células B de memoria sIgG⁺ y un 10% de las células B de memoria sIgA⁺ de SP de adultos sanos no expresan CD27 [68]. Hasta ahora no se ha descrito la existencia de células B de memoria sIgE⁺; estudios realizados en ratones sugieren que las células plasmáticas secretoras de IgE podrían generarse directamente a partir de células B de memoria IgG₁ [87], aunque esta posibilidad sigue siendo motivo de controversia y está por demostrar de forma definitiva [88].

Aunque la mayoría de los linfocitos B circulantes de SP expresan niveles elevados de CD21, existe una pequeña proporción de células B *naïve* y de memoria (3%±2%, y 4%±3%, respectivamente), que expresa niveles bajos de CD21 y muestra características fenotípicas diferentes a su contrapartida CD21⁺ [89][90], entre las que se incluyen: expresión de CD11c y CD95 en ausencia de CD23 vs. CD11c⁻, CD95⁻ y CD23^{-/+}. Si bien en la actualidad sigue sin conocerse el papel biológico de esta subpoblación B, se ha constatado que su frecuencia se incrementa en

inmunodeficiencias primarias (p.ej.: inmunodeficiencia variable común) [90] y secundarias –p. ej.: la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)- [89].

Además, en la SP de adultos sanos se detecta de forma sistemática la presencia de un pequeño número (y proporción) de células con características morfológicas, fenotípicas y funcionales superponibles a las de las CP [36][91][92] que representa aproximadamente el 1-3% (1-5 células/ μ L) de todas las células B de SP en adultos sanos en condiciones de normalidad [36][91][92]. Se cree que la mayoría de estas células son plasmablastos recién generados que han pasado a la sangre desde los tejidos linfoides secundarios, dirigiéndose a un nicho de MO, MALT o a tejidos inflamados. Además de estos plasmablastos circulantes, en condiciones de activación inmune también podrían detectarse en la sangre CP maduras que han abandonado la MO y las mucosas [91][92].

Estudios recientes [93] han contribuido a demostrar que en la migración de los plasmablastos desde el tejido linfoides a la SP a través de la zona T perivascular y los cordones medulares desempeñan un papel central las integrinas ICAM1/2. A su vez, los monocitos/macrófagos de la zona medular del GL contribuyen a la diferenciación del plasmablasto a célula plasmática mediante la secreción de CXCL12, APRIL e IL6 [93].

Desde el punto de vista fenotípico se han identificado algunas diferencias entre las células plasmáticas que se encuentran en los nichos de la MO y los plasmablastos/CP circulantes de SP; así, estas últimas muestran expresión heterogénea de CD20 y CD138, expresión débil pero homogénea de CD19 y CD45 en ausencia de CD56, y expresan niveles ligeramente más bajos de CD38 que las células plasmáticas de la MO [36][91][92][94]. Además, al contrario que las CP de MO que son slg^- , más del 75% de los plasmablastos/CP circulantes expresan slg de forma débil [36].

Figura 1. Diferenciación de las distintas subpoblaciones de células B humanas en médula ósea (MO), sangre periférica (SP), ganglio linfático (GL), tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y otros órganos y tejidos linfoides secundarios, de acuerdo con sus características fenotípicas e isotipo de la cadena pesada de la Ig. Las células B inmaduras y naíve slgM+slgD+ producidas en la MO migran a los órganos linfoides secundarios a través de la sangre periférica; tras su activación y gracias a la interacción con células T cooperadoras, los linfocitos B naíve que conforman el folículo B primario son reemplazados por células B del centro germinal (CG) que proliferan en respuesta al antígeno y son desplazadas fuera del folículo, estableciendo la zona del manto alrededor del CG. En el CG, se distingue una zona oscura formada por células B del CG en fase de proliferación (centroblastos) y una zona clara que contiene células B del CG en estado de reposo (centrocitos). En las células B proliferantes se activan de forma secuencial los procesos de hipermutación somática y de cambio del isotipo de cadena pesada de la Ig. Las células B del CG que han acumulado mutaciones somáticas en su Ig y que incrementen su afinidad por el antígeno son seleccionadas positivamente, sobreviven y abandonan el CG; por el contrario, las células B que no son seleccionadas positivamente por antígenos, mueren por apoptosis dentro del CG. Las células que abandonan el CG (células post-CG) pueden tener dos destinos: diferenciarse a células plasmáticas productoras de anticuerpos o a células B de memoria que recirculan a través de sangre periférica hacia la médula ósea y los tejidos linfoides secundarios, respectivamente.

A diferencia de lo que ocurre con los compartimentos de células B de SP y MO, la información disponible en la actualidad sobre las características fenotípicas de los linfocitos B de tejido linfoide normal o reactivo es limitada. Pese a esta limitación, hoy se conoce que en el centro germinal los linfocitos B son habitualmente CD5⁺ y CD23⁺,

muestran expresión débil de slg y de Cybcl2, junto con una fuerte reactividad para CD10, CD20 y CD38. Además, estas células B tienen un fenotipo de memoria CD27⁺ y una elevada tasa proliferativa, reflejada en una expresión intensa de bcl6 y del antígeno Ki67 [95-96]. Por el contrario, las células de la zona del manto del tejido ganglionar normal o reactivo son slgM⁺/slgD⁺, expresan Cybcl2 de forma intensa y tienen una positividad variable para los antígenos CD5, CD10, CD23 y CD27, junto a una menor expresión de CD20 y CD38 y negatividad para Ki67 -fenotipo característico de linfocitos B vírgenes/*naïve* en reposo- [97].

La heterogeneidad fenotípica de estas células se debe a la coexistencia de diferentes subpoblaciones de células B. Así, una pequeña proporción de linfocitos B expresa niveles elevados de slgD y CD23 junto a niveles intermedios de CD21, constituyendo el grupo de células B *naïve* foliculares (slgD^{hi}, slgM^{lo}, CD23⁺, CD21^{int}), mientras que la subpoblación mayoritaria presenta niveles elevados de CD21 y CD1d correspondiendo a células de la zona marginal (ZM) (slgM^{hi}, slgD^{lo}, CD23⁻, CD21^{hi}, CD1d^{hi}) [98]. Tras el reconocimiento antigénico, la maduración de estas células dependiente de linfocitos T supone la formación del CG y la correspondiente transición de célula B *naïve* folicular a célula efectora [99].

El CG está constituido por un microambiente celular complejo en el que se observan centroblastos, centrocitos, CDF y linfocitos T [99], cuya finalidad es la generación de respuestas humorales de alta afinidad por el antígeno (Figura 1). Por este motivo, los cambios fenotípicos que ocurren en el CG se asocian, por un lado, con un aumento de la afinidad del BCR por el antígeno -debido al proceso de hipermutación somática que afecta a los genes de las Igs-, y por otra parte, con el cambio de clase (isotipo) de Ig por recombinación somática de la región constante del gen *IGH* [99]. Posteriormente, algunas de las células de memoria y los plasmocitos de vida larga resultantes, permanecen en las zonas B de los órganos linfoides secundarios, mientras que otras células recirculan o migran a la MO, como se ha referido anteriormente [99][100].

Finalmente, las CP del GL presentan algunos rasgos fenotípicos diferentes de los de las CP medulares, incluyendo expresión variable (de intensidad débil a fuerte) de Cybcl2 [64], junto a una mayor proporción de células CylgM⁺ [64] y menor reactividad para CD138.

1.2.- Maduración linfoide T y NK

Aunque los linfocitos T tienen su origen en un precursor hematopoyético de MO, su maduración ocurre de forma mayoritaria en el timo [101] (Figura 2). La unidad funcional del timo es el lobulillo tímico y está constituido por tres compartimentos diferentes representados por las zonas subcapsular, cortical y medular [102]. La maduración de los linfocitos T se produce a partir del precursor hematopoyético de MO mediante la interacción con el ligando de Notch-1 [103], y a través del tránsito de los timocitos desde la zona subcapsular a la medular [102]; durante este proceso, a partir de los protimocitos se generan linfocitos T portadores del complejo CD3-receptor de célula T (TCR) de membrana [102].

Al timo llegan precursores inmaduros CD34⁺/CD7⁺⁺/Tdt⁺/CD44⁺/CD117⁺ [13, 104]. Precisamente, se cree que tanto CD44 como CD7 podrían ser moléculas asociadas con el tropismo por el timo de precursores CD34⁺ [102]. La primera molécula intervendría en la salida de esta célula del interior del capilar sanguíneo y la molécula CD7 estaría implicada en el tropismo de este precursor por la zona subcapsular del timo [102]. Al entrar en el timo, el precursor T queda retenido en la zona subcapsular, donde entra en contacto con las células epiteliales tímicas; en dicha interacción participan, entre otras, la molécula CD2 del timocito y la molécula CD58 de la célula epitelial, induciéndose, por un lado, la secreción de citocinas y hormonas tímicas, y por otra parte, la activación, proliferación y diferenciación del timocito. En este estadio, el timocito subcapsular deja de expresar CD44 y HLA-DR y adquiere reactividad para otros antígenos pan-T como CD5 y CD2 de membrana, además de

positividad citoplasmática para CD3. La activación de esta célula va asociada a la expresión de receptores de citocinas como CD25, y de moléculas de activación como CD71 (timocito inmaduro) [105-106] (Figura 2). En este momento tiene lugar el reordenamiento de los genes del *TCR*, de forma similar a lo que ocurre en las células B, constituyendo éste el hecho central de la diferenciación tímica.

Tras expresar una forma primitiva del receptor, los timocitos adquieren reactividad para CD4 y a continuación coexpresan CD4 y CD8 junto a la molécula CD1a y pierden reactividad para Tdt, CD34 y CD117; esta población celular representa alrededor del 80% de la celularidad tímica [107] (Figura 2). La diferenciación posterior a timocito maduro va asociada a la pérdida de expresión de CD1a, junto a CD4 (timocitos CD8⁺/CD4⁻) o CD8 (timocitos CD4⁺/CD8⁻) [107][108] (Figura 2). A este nivel se observa ya expresión clara tanto de CD3 como de TCR $\alpha\beta$ en la membrana citoplasmática [108]. Los linfocitos T CD3⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ abandonan de forma precoz el timo, siendo constantemente negativos para CD4, en presencia de expresión débil o ausente de CD8 [108] (Figura 2).

Los linfocitos T *naïve* inicialmente son CD45RA⁺, CCR7⁺, CD28⁺, CD62L⁺, CD27⁻ y CD45RO⁻ [109-110], fenotipo que permite distinguirlos tanto de las células T de memoria central (CD45RA⁻, CCR7⁺, CD45RO⁺, CD27⁺) [109-110], como de los linfocitos T de memoria periférica (CD45RA⁻, CCR7⁻, CD45RO⁺, CD27^{-/+}) [109-110] (Figura 2). A su vez, los linfocitos T efectoras, generalmente tienen un fenotipo CD45RA⁺, CD45RO⁻ o ^{+débil}, CCR7⁻, CD28⁻, CD27⁻ y CD62L⁻ [109-110] (Figura 2). Así mismo, la activación de linfocitos T *naïve* o de memoria se asocia con cambios fenotípicos similares a los de las células NK activadas y consistentes en: 1) un incremento progresivo de la expresión de CD2, CD11a y en células T CD8⁺, también de CD11c [111-112]; 2) un aumento transitorio de la positividad para CD69, CD25, HLA-DR, CD38, CD57 y CD45RO [111-112]; y, 3) una disminución de la reactividad para CD7 [111-112].

Figura 2.-Esquema representativo de la secuencia de cambios en la expresión de diferentes antígenos a lo largo de la maduración de precursores T y NK (Cy: citoplasmático; +d: positivo de intensidad débil; CD: célula dendrítica; NK: "natural killer")

Además de estas tres subpoblaciones mayoritarias de linfocitos T (linfocitos T $\text{TCR}\gamma\delta^+$, $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^+/\text{CD8}^-$ y $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^-/\text{CD8}^+$), en sangre periférica se observan otras subpoblaciones minoritarias, cuyo significado se conoce de forma parcial. Por un lado está la subpoblación de células T $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^+/\text{CD8}^{-/+débil}$, que se caracterizan por presentar un fenotipo citotóxico efector con expresión de granzima⁺ y perforina⁺ en el citoplasma [113-115]. Desde el punto de vista funcional, estas células T $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^+/\text{CD8}^{-/+débil}$ están incrementadas en respuesta a citomegalovirus (CMV) y otros virus capaces de inhibir la presentación antigénica a través de moléculas HLA de clase I [116-117]. Por otra parte, con frecuencia se observan subpoblaciones minoritarias de linfocitos T maduros $\text{TCR}\alpha\beta^+$ y CD5^- [13], $\text{CD4}^-/\text{CD8}^-$ [118] o CD2^- [13, 119], cuyo significado fisiopatológico no se conoce bien en la actualidad.

El conocimiento actual de la maduración *in vivo* de las células NK a partir de precursores hematopoyéticos CD34⁺ es muy limitado. Un primer indicio de que la maduración de las células NK no se lleva a cabo de forma completa en la médula ósea radica en la observación de la existencia de una población de células NK con expresión intensa de CD56 (NK-CD56⁺⁺), que se ha aislado de GL, amígdala y otros tejidos (p.ej. placenta), y cuyo número es más abundante en los tejidos linfoides secundarios respecto a las células NK CD56^{+débil}, más abundantes en MO, SP y bazo [120-121]. Además, se ha visto que las células NK CD56⁺⁺ son más inmaduras que las células NK CD56^{+débil} [122] y que su activación aumenta la expresión de los receptores característicos de la población CD56^{+débil} [123]. Así mismo, se ha identificado en tejidos linfoides secundarios la presencia de una población de células precursoras NK CD34⁺ y CD45RA⁺, presentes también en baja frecuencia en la MO (<1%) y en SP (<10%) con respecto al total de precursores CD34⁺ [124]. Estos hallazgos, conjuntamente con la existencia de abundantes células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos que expresan IL-15 [125] -citocina necesaria para la maduración de las células NK [126-128]- sugiere que el lugar en el que se produce la maduración de las células NK *in vivo*, podrían ser los órganos linfoides secundarios.

En concordancia con los estudios realizados *in vitro*, se ha propuesto un modelo hipotético de maduración NK a partir de células CD34⁺ [14-16][129] (Figura 2) según el cual las células NK más inmaduras expresarían los antígenos CD7 y CD161. Al madurar a célula NK, estos precursores adquirirían de forma secuencial reactividad para CD56, CD94 y finalmente CD16, presentando las células NK circulantes un fenotipo CD56^{+débil} y/o CD16⁺, CD3⁻, CD7⁺, CD94^{-/+}, CD161⁺, Cygranzima⁺, Cyperforina⁺ [130], CD11b⁺ y CD122⁺ [129]. No obstante, las células NK maduras de sangre periférica no son fenotípicamente homogéneas, habiéndose descrito reactividad variable para los antígenos CD16, CD56, CD2, CD94, CD11c y CD57, entre otros [130-132]. Esta diversidad viene explicada en parte por la existencia de diferentes subpoblaciones de células NK que incluirían, entre otras, las células NK

CD56⁺⁺/CD16^{- o +débil} y las células NK CD56^{+débil}/CD16⁺ [130-132]. Algunos autores [122] han descrito una tercera población de células NK agranulares con fenotipo CD56⁻/CD16⁺, escasamente representadas en adultos y que podrían corresponder a células NK más inmaduras [122].

Cuando se produce el reconocimiento de la célula diana y la activación de las células NK, éstas experimentan cambios fenotípicos significativos, determinados por un incremento progresivo de la expresión de CD2, CD94 y CD11c, y por un aumento transitorio de la positividad para HLA-DR, CD57 y CD45RO, junto a una disminución de la reactividad para CD7, CD38 y CD11b, entre otros marcadores [111, 130, 133-135].

2.- Rastreo diagnóstico de clonalidad linfoide en síndromes linfoproliferativos crónicos.

Clásicamente, ante la sospecha de la posible existencia de un proceso leucémico y/o linfomatoso [1, 136-138], el rastreo diagnóstico y la caracterización de hemopatías malignas se han fundamentado de forma casi exclusiva en los estudios citomorfológicos e histopatológicos de SP, MO, órganos linfoides secundarios y otros tejidos. En las últimas décadas se han introducido nuevas herramientas de apoyo al diagnóstico hematológico, de las que han resultado especialmente útiles en una primera fase, 1) los recuentos celulares automatizados en contadores hematológicos y la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) de tejidos con sospecha de infiltración tumoral [139-141][142][143][144] y, en una segunda etapa, 2) la caracterización fenotípica, citogenética y molecular de las células neoplásicas [1, 145]. En este sentido, el recuento automatizado de las cifras periféricas de distintas poblaciones celulares (p.ej.: hematíes, plaquetas, leucocitos y sus subpoblaciones mayoritarias de linfocitos, granulocitos neutrófilos y monocitos, entre otros subtipos de células

nucleadas) y diversos parámetros relacionados con las mismas (p.ej.: concentración de hemoglobina), junto con las técnicas de PAAF, han aportado una herramienta clave de rastreo diagnóstico de anomalías cuantitativas y cualitativas de las poblaciones mayoritarias de células de SP y tejidos linfoides asociadas a hemopatías clonales; con ello se ha ampliado enormemente la capacidad de despistaje de hemopatías clonales, al facilitarse por ejemplo la realización de cientos de hemogramas en un corto periodo de tiempo y con un coste relativamente limitado [146-147]. En paralelo, a partir de finales de los años 80 la información fenotípica y genética se ha ido incorporando progresivamente y de forma masiva a la práctica diagnóstica diaria a través de las nuevas clasificaciones de consenso, de uso extendido en el diagnóstico y clasificación de hemopatías malignas [1, 148]. Todo ello ha llevado a que en la clasificación actual de las hemopatías malignas de la OMS [1], la definición de la gran mayoría de las distintas entidades incluidas dentro de cada subgrupo de hemopatías clonales tenga en cuenta simultáneamente criterios citomorfológicos, histopatológicos, inmunofenotípicos y genético-moleculares, junto con el comportamiento clínico de la enfermedad.

Inicialmente, la incorporación de estas nuevas herramientas diagnósticas al laboratorio clínico se ha realizado con el objetivo principal de contribuir a mejorar la clasificación de las hemopatías, una vez confirmada la presencia de tumor con los métodos microscópicos convencionales [149]. No obstante, los avances técnicos alcanzados, junto al empleo sistemático de estas nuevas herramientas en la rutina diagnóstica, han propiciado que su aplicación se haya extendido desde una posición de herramienta diagnóstica de segunda línea (dirigida a confirmar la sospecha diagnóstica fundamentada en la observación citológica e histológica), al rastreo diagnóstico inicial y la monitorización del tratamiento de un número creciente de hemopatías malignas [150-153]. En el caso de las técnicas inmunofenotípicas, esta evolución ha sido especialmente notable en los últimos años, y en especial a partir del momento en el que se han empezado a utilizar en la rutina marcajes simultáneos con

tres o más anticuerpos analizados mediante citometría de flujo. Con ellos se ha podido demostrar que las técnicas inmunofenotípicas proporcionan un recuento fiable, altamente específico, sensible y reproducible de las distintas subpoblaciones celulares presentes en una muestra biológica, siempre que esta última esté constituida por suspensiones unicelulares [151]. Además, estas técnicas complementan y detallan con precisión la información proporcionada por los contadores hematológicos y la citología convencional, permitiendo incluso la distinción, dentro de un compartimiento celular concreto, entre células neoplásicas y su contrapartida normal, cuando ambas coexisten en una muestra [154-156]. En este campo, el éxito de los análisis multiparamétricos por citometría de flujo ha sido particularmente evidente en el rastreo diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos crónicos, ya sea en muestras de SP, MO [145] y tejido linfoide [157] o en diferentes líquidos corporales como el líquido cefalorraquídeo (LCR) [158]. Así mismo, a través de la citometría multiparamétrica se obtiene información de incalculable valor en otras neoplasias hematológicas linfoides y mieloides, incluidas las leucemias agudas linfoblásticas (LLA) y mieloblásticas (LMA) [152, 159-161], la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) [162] y más recientemente, también los síndromes mielodisplásicos (SMD) [163] y algunos subtipos concretos de enfermedades mieloproliferativas, como las mastocitosis sistémicas (MS) [164-167]. A continuación revisaremos la utilidad de los estudios inmunofenotípicos en el diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos crónicos, centrando de forma preferente nuestro interés en las aplicaciones asociadas al diagnóstico de clonalidad en SLPC y la caracterización fenotípica de cada entidad.

2.1 Rastreo de clonalidad B en el diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos crónicos.

La citometría de flujo se ha convertido desde hace tiempo en uno de los métodos más empleados para la caracterización diagnóstica de los SLPC-B [145, 168].

Aunque en la actualidad conocemos que la citometría de flujo permite distinguir las células B normales de las neoplásicas por la presencia en estas últimas de características fenotípicas aberrantes, en un principio las técnicas inmunofenotípicas sólo se aplicaban al estudio de los SLPC-B, cuando el diagnóstico de la hemopatía ya se había establecido con un elevado grado de certeza mediante métodos morfológicos y/o histopatológicos [1, 149].

Las expansiones de linfocitos B maduros se detectan habitualmente en SP, MO y/o los órganos linfoides secundarios, siendo menos frecuente la infiltración de otros tejidos como el sistema nervioso central, la piel y las mucosas, entre otros [1]. Uno de los principales objetivos del estudio fenotípico de estas expansiones de linfocitos de aspecto maduro, consiste en establecer o descartar su naturaleza clonal. Clásicamente, las técnicas de fenotipado por citometría de flujo han demostrado ser de gran utilidad en el rastreo diagnóstico de clonalidad B [169-170]. Así, durante muchos años el diagnóstico inmunofenotípico de clonalidad B se ha fundamentado de forma casi exclusiva en la existencia de un exceso de células B que expresan de forma exclusiva en su membrana y/o citoplasma las cadenas ligeras de inmunoglobulinas κ o λ ($Ig\kappa^+$ o $Ig\lambda^+$) [157, 171] (Figura 3). No obstante, los avances recientes en el conocimiento de las diferencias fenotípicas existentes entre células B normales y neoplásicas, junto con la disponibilidad de un número creciente de fluorocromos y de equipos capaces de medir simultáneamente >2 fluorescencias diferentes, han modificado las estrategias empleadas para la identificación de clonalidad B, convirtiendo el fenotipado por citometría de flujo en la técnica de elección para su rastreo diagnóstico [74, 84, 145, 153].

Figura 3.- Identificación de las principales poblaciones linfocitarias de sangre periférica en una muestra representativa de un donante adulto sano (panel A) y de un paciente con leucemia linfática crónica (panel B), identificándose las distintas subpoblaciones linfocitarias según un código de colores definido en la figura.

Entre otros avances, estos incluyen la posibilidad de llevar a cabo un análisis rápido, simple y relativamente barato de muestras con sospecha diagnóstica de infiltración por SLPC-B, que permita la identificación de la línea celular y estadio madurativo de la población de linfocitos expandida, empleando marcajes múltiples en tres (p.ej.: CD3, CD4, CD8, CD56 y CD19) o cuatro fluorescencias (p.ej.: CD3, CD4, CD8, CD56, CD19, slg κ y slg λ) en una sola medición [145] (Figura 3). Su ampliación a ocho fluorescencias (p.ej.: CD3, CD4, CD8, CD5, CD38, CD56, CD19, CD20, CD45, TCR $\gamma\delta$, slg κ y slg λ) permite además la identificación de subpoblaciones celulares y fenotipos aberrantes adicionales, asociados a los SLPC-B más frecuentes [172]. En su conjunto, este tipo de aproximaciones metodológicas proporcionan una sensibilidad y especificidad >95% cuando se comparan con los procedimientos convencionales,

pudiendo además proporcionar resultados en un corto espacio de tiempo [145]. Cuando se sospecha la presencia de células B clonales en la muestra, la identificación de la existencia de fenotipos aberrantes -presentes en la práctica totalidad de los SLPC-B [84]-, constituye un signo inequívoco de clonalidad B, no requiriéndose habitualmente en esta situación de confirmación molecular. Además, la inclusión en el proceso de rastreo diagnóstico de clonalidad B, de marcadores dirigidos a identificar las aberraciones fenotípicas más frecuentes en los SLPC-B más habituales, permite alcanzar una gran sensibilidad, que en la rutina diagnóstica se sitúa en niveles de 10^{-4} - 10^{-5} [84, 173]. Ante estas características, el uso de los análisis multiparamétricos por citometría de flujo se extiende hoy día también al diagnóstico de *enfermedad mínima*, tanto en el contexto de una evaluación del grado de infiltración tumoral de un tejido y del grado de extensión de un tumor en el momento del diagnóstico (p.ej.: infiltración de LCR en linfomas no hodgkinianos B agresivos o con sospecha de infiltración leptomeníngea) [158], como para monitorizar los efectos del tratamiento en situaciones donde la sensibilidad de las técnicas convencionales resulta insuficiente [84, 173-174].

En los SLPC-B el rastreo inmunofenotípico por citometría de flujo suele proporcionar también información adicional, útil para la caracterización diagnóstica de las células B clonales; son ejemplos claros de ello i) la observación de células B de elevado tamaño y complejidad interna en los linfomas de células grandes y la tricoleucemia, ii) la expresión débil de CD20 y slg, y positividad de CD5, asociados a la leucemia linfática crónica (LLC)-B, iii) la ausencia/disminución acentuada de expresión de CD19 en células de pequeño tamaño en el linfoma folicular (LF) y, iv) la expresión elevada de CD38 en el linfoma de Burkitt (LB) y en el mieloma múltiple (MM) (donde se asocia además a expresión débil de CD45, negatividad para CD19 y expresión de CD56 en una proporción significativa de casos) [84, 175-176]. Ello se debe a que los SLPC-B más habituales muestran características fenotípicas únicas, que los distinguen de los demás subtipos diagnósticos de la enfermedad, y que hacen que el análisis inmunofenotípico constituya en la actualidad un pilar básico en la

caracterización diagnóstica de los SLPC-B [1], conjuntamente con las características clínicas, morfológicas, histopatológicas y genéticas/moleculares, como veremos más adelante en esta introducción.

La demostración de la elevada frecuencia con la que las células B neoplásicas presentan fenotipos aberrantes ha abierto también la posibilidad de emplear este tipo de análisis para la evaluación de infiltración tisular en los SLPC-B, al diagnóstico y/o tras el tratamiento, proporcionando información de gran utilidad clínica sobre el grado de extensión de la enfermedad y la persistencia de enfermedad mínima residual, respectivamente. En relación con este último aspecto, aunque el número de estudios realizados hasta la fecha es relativamente pequeño y se limita prácticamente a la LLC-B, la tricoleucemia (TL) y el linfoma de células del manto (LCM) [84, 177-178], hoy se reconoce que el análisis inmunofenotípico por citometría de flujo constituye una técnica de elevada sensibilidad ($<10^{-4}$ - 10^{-5}) y especificidad para el diagnóstico de enfermedad mínima residual en SLPC-B, siendo elevado el impacto clínico de sus resultados en el caso de la LLC-B [173]. Merece destacar el hecho de que con relativa frecuencia -debido a la elevada sensibilidad de la citometría de flujo-, se detecta la presencia de dos o más clones diferentes (no relacionados) de células B en un mismo paciente, siendo su frecuencia de hasta un 5% de todos los SLPC-B leucemizados [179]. La verdadera repercusión clínica de estos hallazgos está aún por dilucidar.

Pese a todo lo anterior, en la actualidad siguen siendo escasos los trabajos en los que se evalúa la utilidad del análisis inmunofenotípico por citometría de flujo en el diagnóstico inicial de clonalidad B en muestras obtenidas mediante punciones (p.ej. PAAF) de tejidos sólidos.

2.2.-Rastreo de clonalidad T en el diagnóstico de los SLPC

Durante décadas hemos carecido de marcadores clonotípicos similares a las cadenas ligeras de las Ig de las células B, para la demostración de la naturaleza clonal

de las células T. Por ello, inicialmente la sospecha inmunofenotípica de clonalidad T se ha fundamentado en la observación de un desequilibrio entre distintas subpoblaciones de células T y la presencia de fenotipos T poco habituales o aberrantes [156, 180]. Así, desde hace tiempo se incluyen, entre otros criterios empleados en el diagnóstico inmunofenotípico de sospecha de clonalidad T y la identificación de células T neoplásicas en SLPC-T, los siguientes: 1) la ausencia o pérdida de expresión de una o más moléculas pan-T (p.ej.: CD7 en células de Sézary); 2) la sobre-expresión de un antígeno asociado a células T; 3) los asincronismos madurativos (perfil fenotípico de coexpresión de dos o más marcadores ausente en linfocitos T normales, como la expresión asincrónica de CD3 y TCR en la superficie celular) y; 4) la coexpresión de CD4 y CD8 o la ausencia de expresión de ambos marcadores en una proporción elevada de linfocitos T. Aunque estos criterios son útiles en la rutina, no son altamente eficientes, ya que solo están presentes en cerca del 60-70% de los SLPC-T [181-184]. Ante esta situación, tradicionalmente se ha empleado la identificación de reordenamientos clonales de los genes que codifican las diferentes cadenas del TCR mediante técnicas moleculares (p.ej.: Southern blot), como el método de referencia para el diagnóstico de clonalidad T [185].

Como ocurre con los linfocitos T maduros normales, las células neoplásicas de los SLPC-T expresan en su mayoría las cadenas alfa (α) y beta (β) o gama (γ) y delta (δ) del TCR (TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$, respectivamente). En la actualidad existen dos aproximaciones metodológicas distintas para la caracterización del repertorio de estas cadenas del TCR centrados en técnicas de biología molecular y citometría de flujo, respectivamente [186-189].

En el caso de las técnicas inmunofenotípicas, hoy disponemos de una amplia batería de anticuerpos específicos dirigidos frente a gran parte de las distintas familias de las cadenas del TCR, especialmente de la cadena β . Estudios recientes han demostrado que la caracterización del repertorio T mediante citometría de flujo permite

confirmar o excluir clonalidad T, de acuerdo con la demostración de la existencia de una expansión preferencial de una familia de regiones variables de las cadenas α y/o β y γ y/o δ del TCR [186-189]. Esta aproximación resulta especialmente útil en aquellos casos en los que carecemos de aberraciones fenotípicas evidentes y/o cuando no están disponibles de forma inmediata los resultados de las técnicas moleculares. No obstante, merece destacar que la interpretación de los resultados de los estudios del repertorio T en sujetos con sospecha de SLPC-T exige un conocimiento detallado del repertorio T normal [190]. En este sentido, la selección del grupo control es clave, ya que hoy se conoce que dicho repertorio depende de una gran variedad de factores, entre los que se incluyen el origen étnico, la edad, el tejido objeto de estudio y la subpoblación T en cuestión (p.ej.: linfocitos T CD4⁺ vs. CD8⁺) [191-192]. Así mismo, se reconoce que en sujetos sanos pueden encontrarse expansiones de una o más familias, especialmente en los linfocitos T efectores de individuos de edad avanzada [193-196], o en sujetos que padecen algunas enfermedades de naturaleza infecciosa, tumoral o autoinmune en las que pueden observarse expansiones oligoclonales de células T [197-200]. En estos casos, las expansiones no suelen superar el 40% de las células T CD4⁺ y/o CD8⁺ de SP. Aún con estas precauciones, el análisis del repertorio de las familias TCR en pacientes con sospecha de infiltración por SLPC-T resulta de gran utilidad en el rastreo diagnóstico de clonalidad T, sobre todo cuando se combina con la identificación de fenotipos aberrantes para una mejor delimitación de la población tumoral y se observa por ejemplo, un uso restringido de una familia de la cadena β del TCR en más de 60% de las células T [188]. No obstante, dado el elevado número de reactivos requeridos para el diagnóstico de clonalidad T por citometría de flujo, en la actualidad se cree que resultaría más eficaz, en un primer paso, y de forma previa al estudio del repertorio TCR, identificar la subpoblación T alterada o sospechosa de estar alterada.

2.3.- Rastreo de clonalidad NK en el diagnóstico de SLPC

A diferencia de lo que ocurre en pacientes que presentan expansiones de linfocitos T o B maduros, la demostración de clonalidad sigue resultando difícil en los casos que tienen un aumento de células NK en sangre, si exceptuamos una pequeña proporción de: i) pacientes en los que se detectan alteraciones citogenéticas, o ii) se demuestra la integración clonal de secuencias genómicas de origen vírico, o iii) mujeres en las que se comprueba la existencia de un patrón clonal de inactivación del cromosoma X sobre células NK previamente purificadas [201-203].

Desde el punto de vista fenotípico, datos preliminares sugieren que el patrón de expresión de receptores tipo inmunoglobulina de las células NK (KIR) (en especial de CD158a y CD158b) podrían ser marcadores útiles para la detección de clonalidad NK [204-208]. Sin embargo, ya en estos estudios preliminares se reconoce su limitada sensibilidad y especificidad, en especial cuando la población clonal de células NK está presente sobre un fondo de células NK policlonales residuales.

3.- Diagnóstico y clasificación de los linfomas no Hodgkin (LNH) en muestras de punción-aspiración con aguja fina (PAAF).

La elección de la estrategia metodológica más adecuada (sensible y específica) para el diagnóstico y clasificación de los SLPC en muestras de tejido ha sido motivo de gran controversia en los últimos años. A principios del siglo XX comenzó a utilizarse la PAAF como herramienta diagnóstica en pacientes con aumento de tamaño de uno o varios ganglios linfáticos. Sobre la muestra de punción-aspiración con aguja fina se procedía a hacer el estudio diagnóstico. Tradicionalmente, sobre esta muestra solo se realizaba el examen citológico, pero posteriormente se introdujo de manera secuencial y paralela al anterior el análisis inmunofenotípico de las células obtenidas por PAAF – primero por inmunocitoquímica y más recientemente por citometría de flujo–, lo que

contribuyó a mejorar la eficiencia de la técnica en el propósito inicial de establecer la naturaleza benigna o maligna del infiltrado tisular [142, 209-211].

En todos aquellos casos en los que se sospechaba infiltración por linfoma tras los estudios morfológicos (e inmunofenotípicos, en su caso), así como en aquellos en los que el estudio a partir de la muestra de PAAF no era concluyente, era obligado proceder a la biopsia del ganglio mediante cirugía escisional, con el fin de confirmar el diagnóstico mediante el estudio histológico e inmunohistoquímico de la pieza quirúrgica. En el caso de tratarse de un infiltrado compatible con linfoma, el clínico procedía a tomar una decisión terapéutica sólo si se disponía de la confirmación histológica de malignidad, sobre todo en pacientes sin historia previa de enfermedad; ello era debido en gran parte a que el patrón histológico del ganglio (nodular vs. difuso) se consideraba esencial para el diagnóstico de linfoma no Hodgkin (LNH) o de linfoma de Hodgkin. Por tanto, la biopsia ha constituido durante mucho tiempo la técnica de referencia, tanto para la clasificación de los SLPC en las distintas categorías diagnósticas, como para confirmar el diagnóstico preliminar de sospecha al que se llegaba a partir de la muestra de PAAF.

La comparación entre ambas técnicas (biopsia vs. PAAF) muestra que la ventaja más destacable de la biopsia es que proporciona información de la arquitectura tisular en la muestra del tejido, mientras que las características más ventajosas del análisis realizado sobre muestras de PAAF deriva de que con ella se obtiene un resultado más rápido, tiene menos morbilidad y supone un menor coste global, a expensas de perder información sobre el patrón de infiltración tisular.

Considerando las ventajas que tendría la PAAF como método de diagnóstico inicial de los SLPC, durante los últimos años se han llevado a cabo numerosos trabajos, con el objetivo de establecer su utilidad frente a la biopsia en el diagnóstico inicial de los pacientes con adenopatías, y por tanto determinar con rigor la posibilidad de sustitución de la histología en la valoración inicial de estos sujetos. En estos trabajos –en la mayoría de los cuales se realizó el análisis inmunofenotípico por

citometría de flujo, en paralelo al estudio citológico—, se señala que en una proporción elevada de casos de LNH (alrededor del 75-80% en las series mas antiguas y en un porcentaje algo más elevado en las más recientes) [211][212][213][214][215] podría establecerse el diagnóstico de certeza, mediante la combinación del análisis morfológico e inmunofenotípico a partir de la muestra obtenida por PAAF, sin necesidad de realizar una biopsia posterior [216], prácticamente en ausencia de falsos positivos, aunque en estos trabajos el grado de acuerdo observado depende del tipo de linfoma [211, 213, 215, 217]. En términos generales, estos trabajos demuestran que la elevada concordancia entre los análisis realizados sobre las muestras obtenidas por PAAF y biopsia en el diagnóstico inicial de los pacientes con sospecha de padecer linfoma ha sido posible gracias a la incorporación del estudio inmunofenotípico, ya que el empleo combinado del análisis citológico e inmunofenotípico (mediante citometría de flujo) de las muestras obtenidas por PAAF incrementa considerablemente la utilidad del procedimiento (de un 60-70% a un 80% en los estudios más antiguos, a más del 90% en los más recientes) [212, 216, 218-222] en comparación con el análisis morfológico aislado; en general, en la mayoría de los trabajos se señala que el empleo de la citometría de flujo aumenta en aproximadamente un 20% el porcentaje de casos concordantes con la histología, en comparación con el uso aislado de la citología convencional. No obstante, estos estudios también concluyen que la PAAF no puede reemplazar por completo a la biopsia del tejido, ya que en prácticamente todas las series hay casos de linfoma que requieren del estudio anatomopatológico de la pieza quirúrgica para la confirmación diagnóstica.

Además, una revisión detallada de la literatura pone de manifiesto que el estudio inmunofenotípico de muestras obtenidas por PAAF tiene una serie de limitaciones o inconvenientes en el diagnóstico de linfoma/SLPC, debidas fundamentalmente a falsos negativos y en menor medida también a falsos positivos, por las causas que se especifican a continuación:

3.1.- Falsos negativos obtenidos por citometría de flujo en muestras de PAAF

En general, la existencia de falsos negativos por citometría de flujo se ha asociado a diferentes motivos, entre los que destacan:

1.- *Material no adecuado o insuficiente para estudio*: el material empleado a veces no es adecuado o es insuficiente para estudio, debido a que la cantidad de muestra obtenida mediante PAAF es insuficiente, presenta contaminación con sangre periférica, o muestra una caída de la viabilidad celular inmediatamente tras la obtención de la muestra; esto último es especialmente frecuente en el LB y otros linfomas agresivos con elevada tasa proliferativa [216, 223-225]. En general, este problema afecta del 3% al 15% de las muestras, dependiendo de las distintas series, aunque en algún estudio aislado afecta incluso a más de la mitad de las muestras analizadas [224].

2.- *Error en la toma de la muestra*: en otras ocasiones, los resultados falsos negativos se deben a un error en la toma de la muestra, de forma que las células aspiradas no son en realidad representativas de lo que ocurre en el ganglio (casos con infiltración parcial del ganglio linfático), en el caso de que se haya realizado un procedimiento inadecuado (p. ej. sin haber hecho varios pases de la aguja desde distintos ángulos de la lesión).

3.- *Ausencia de clonalidad por CMF*: Meda et al., [210] encontraron que la mayoría de los casos en los que no pudieron llegar a un diagnóstico a partir de la muestra de PAAF era debido a que el estudio se realizaba sobre material no adecuado o a la ausencia de confirmación de clonalidad (slg⁺) mediante CMF, siendo esto último especialmente frecuente también en el linfoma B difuso de célula grande (LBDCG) [210, 216, 225]. De forma similar, la ausencia de marcadores fenotípicos fiables de clonalidad T en el diagnóstico de los LNH-T periféricos originaría también falsos negativos [226][227][228].

5.- *Diagnóstico de linfoma de Hodgkin (LH)*. Finalmente, prácticamente todos los autores están de acuerdo que el diagnóstico de LH sólo puede hacerse en el momento actual mediante el estudio histológico del ganglio completo o de la pieza quirúrgica extraída, ya que el diagnóstico citológico depende de la presencia de células de Reed-Sternberg (RS). Hasta la fecha, solamente Fromm et al. [229] han demostrado la posibilidad de identificar células de RS por citometría de flujo, pero sus resultados aún no han sido reproducidos por otros grupos.

3.2.- Falsos positivos obtenidos por citometría de flujo en muestras de PAAF

En general, la obtención de resultados falsos positivos por citometría de flujo se ha asociado con un aumento/disminución marcada de la ratio de células B $\text{slg}\kappa^{+}/\text{slg}\lambda^{+}$. Si bien la gran mayoría de los estudios que han comparado la utilidad diagnóstica del análisis de la muestra obtenida por PAAF frente al estudio histológico no encuentran resultados falsos positivos, en algunos trabajos sí se identifica un pequeño número de casos discordantes (diagnóstico final de proceso reactivo vs. diagnóstico o sospecha de linfoma, comparando los datos morfológicos con los de citometría de flujo). Considerando sólo los estudios más recientes, cabe señalar que Meda et al. [210] describieron 2 casos en los que el diagnóstico era de lesión benigna (biopsia: "hiperplasia folicular"), mientras que por CMF se consideró que existía una expansión clonal B. Por su parte, Kussick et al. [230], detectaron aproximadamente un 1% de casos con adenopatías reactivas, provenientes de pacientes con tiroiditis de Hashimoto, cuyas células B del ganglio tenían una ratio $\text{slg}\kappa^{+}/\text{slg}\lambda^{+}$ alterada en la muestra obtenida por PAAF. Generalmente, el aumento de la ratio $\text{slg}\kappa^{+}/\text{slg}\lambda^{+}$ se detectaba en la población de células B $\text{CD}10^{+}$. En un estudio más reciente [231] en el que se evaluaron un total de 172 muestras reactivas obtenidas por PAAF, en 5 de ellas se consideró la sospecha de linfoma (3%), generalmente por encontrar ratios $\text{slg}\kappa^{+}/\text{slg}\lambda^{+}$ alteradas. Pero en los estudios histológicos correspondientes no se vio

infiltración por células linfomatosas, ni se detectaron reordenamientos clonales; asimismo, ninguno de los pacientes desarrolló síntomas o signos sugerentes de linfoma a los dos años del estudio inicial.

Estas circunstancias hacen que no exista aún acuerdo unánime sobre la utilidad de la citometría de flujo en muestras de PAAF como técnica inicial de diagnóstico en un paciente que debuta con adenopatía/s. En general, en el momento actual se acepta la utilidad del análisis de muestras obtenidas por PAAF para el diagnóstico de enfermedades epiteliales, benignas y malignas (como por ejemplo en el diagnóstico de extensión del cáncer de mama o de célula pequeña de pulmón), pero existe controversia en la literatura en lo que respecta a su empleo para el diagnóstico de LNH. Hay mayor consenso cuando se trata de diagnosticar la recidiva de un linfoma, de manera que se acepta como técnica que permite obviar la biopsia en la evaluación de enfermedades hematológicas recurrentes (linfoma recurrente). Sin embargo, en el momento actual sigue siendo objeto de controversia su papel en el diagnóstico primario de los SLPC en general, y de manera particular en el diagnóstico de los linfomas. De hecho, algunos autores piensan que este procedimiento solo debería emplearse en pacientes en los cuales la biopsia es inaccesible, o en el estadiaje y seguimiento de enfermos en los que ya está bien documentado el diagnóstico y subtipo de linfoma que padecen [232].

4.- Características inmunofenotípicas de los síndromes linfoproliferativos crónicos

Inicialmente, tras la obtención de los primeros antisueros policlonales y el desarrollo de anticuerpos monoclonales frente a células neoplásicas linfoides, se buscó con tesón la identificación de antígenos específicos de células tumorales. No obstante, estudios posteriores mostraron que de forma prácticamente sistemática las

proteínas identificadas también estaban presentes -en menor o mayor proporción-, en células normales en distintos estadios madurativos [233-234]. Estos hallazgos llevaron al concepto de que desde el punto de vista fenotípico, las células neoplásicas de pacientes con distintas hemopatías malignas, incluidos los SLPC, reflejaban las características de las células normales de distintas líneas linfoides, bloqueadas en estadios madurativos concretos [235-236]. A partir de este momento, los estudios inmunofenotípicos aplicados a los SLPC han estado dirigidos a la identificación de aquellas características fenotípicas de las células neoplásicas que, por su similitud con las células normales, permitieran establecer la línea T, B o NK de la célula expandida y su correspondiente estadio madurativo [235-236].

Más recientemente se ha constatado que, pese a las similitudes fenotípicas existentes respecto a los linfocitos normales, las células neoplásicas con frecuencia muestran alteraciones en los patrones de expresión de proteínas normales -fenotipos aberrantes- [69, 84, 237-239][150]. En los SLPC estas alteraciones fenotípicas consisten habitualmente en: 1) expresión asincrónica de proteínas asociadas a la maduración celular (asincronismos madurativos), 2) reactividad anormalmente elevada (sobre-expresión antigénica) o disminuida de un antígeno (sub-expresión antigénica), 3) fenotipos asociados a características alteradas de dispersión de luz (FSC: dispersión frontal de luz o tamaño celular, y; SSC: dispersión lateral de luz o complejidad interna de la célula) y/o 4) fenotipos ectópicos [69, 84, 237-239]. A diferencia de lo que ocurre en las leucemias agudas, en los SLPC la expresión en las células neoplásicas de antígenos asociados a una línea celular distinta de la suya, constituye un hallazgo muy poco habitual [69, 84, 237-239][150].

Por todo ello, actualmente la caracterización inmunofenotípica de los SLPC persigue la identificación, no solo de las similitudes existentes entre la célula neoplásica expandida y su contrapartida normal para la identificación de la línea celular y estadio madurativo de la misma, sino también de sus diferencias [176]. Estudios recientes realizados en neoplasias de precursores B y algunos subtipos de

SLPC-B sugieren que la expresión alterada de antígenos asociados a distintos estadios madurativos en las células de pacientes con SLPC podría reflejar las alteraciones genéticas subyacentes o anomalías en la comunicación entre la célula expandida y su micromedioambiente [176].

Aunque disponemos de diferentes estrategias metodológicas para el estudio de las características fenotípicas de los SLPC, merece destacar que estas habitualmente proporcionan distinta información [84, 240-242]. Mientras que las técnicas de inmunohistoquímica permiten conocer el estado de diferenciación e infiltración tisular por parte de las células neoplásicas tras su identificación con anticuerpos asociados a las distintas líneas linfoides, el empleo de análisis multiparamétricos por citometría de flujo debe considerarse el método de elección para el estudio de las características fenotípicas de células individuales, incluso en aquellos SLPC que infiltran de forma exclusiva órganos linfoides secundarios como los ganglios, bazo o la piel, entre otros [243]; menor relevancia clínica tienen otras aproximaciones metodológicas, como las técnicas de Western-Blot o, más recientemente los *arrays* de anticuerpos.

Durante algún tiempo, los análisis inmunofenotípicos de los SLPC se han centrado de forma preferente en los SLPC de origen B, resultando particularmente útiles en la identificación de la LLC-B y la TL y su diagnóstico diferencial con otras neoplasias de células B maduras [176][244-247]. Entre los antígenos estudiados hasta la fecha, algunos como CD5, CD19, slg, CD20, CD23 y CD10 se consideran esenciales en la caracterización fenotípica de los SLPC-B [231, 248]. Además, otros antígenos como CD11c, CD22, CD25, CD30, CD38, CD79b, CD103, FMC7 y Cybcl2, resultan de gran ayuda en la caracterización específica de algunas entidades [231, 248]. Finalmente, otros marcadores como Tdt, CD34 y CD45, pueden así mismo contribuir a diferenciar las neoplasias inmaduras de precursores B de los SLPC-B [248].

Según hayan sufrido o no el proceso de hipermutación somática en los genes de las Ig, se considera que el origen de los SLPC-B se situaría en células B que no

han pasado por el CG (carentes de mutaciones en los genes de las Ig) o de células B del CG o post-CG (células B que han pasado a través del CG y que presentan mutaciones en los genes de las Ig) (Figura 2) [99, 249]. Así mismo, de acuerdo con sus patrones de expresión génica, algunos SLPC-B como el LF, el LB y el LBDCG, muestran perfiles asociados con células B del CG [250-251], aunque existen casos de LBDCG cuyos perfiles de expresión génica se asemejan más a los de las células B activadas *in vitro* [251]. Desde el punto de vista práctico, en esta *Introducción* revisaremos primero las características fenotípicas de los SLPC-B primariamente leucémicos, para centrarnos posteriormente en los perfiles de expresión antigénica característicos de los linfomas no Hodgkin B con expresión leucémica.

4.1.- Características inmunofenotípicas de los SLPC-B primariamente leucémicos

Bajo el término de SLPC-B primariamente leucémicos se incluyen, de acuerdo con la clasificación más reciente de la OMS [1], la LLC-B, la leucemia prolinfocítica (LPL)-B y la TL, tanto en sus formas clásicas como atípicas o variantes.

4.1.1- Leucemia linfática crónica B y linfoma linfocítico de células B pequeñas (LLC-B/ LLCBP)

La LLC-B es la leucemia más común en adultos en los países occidentales (2-6 casos/10⁵ habitantes y año), aumentando su frecuencia con la edad [252]. Desde hace tiempo se conoce que las células neoplásicas de la LLC-B muestran un fenotipo característico, aunque a la vez relativamente heterogéneo [70][71][72-73]. Así, además de presentar reactividad débil (respecto a los linfocitos B maduros de sangre periférica normal), para CD20, CD22, CD79b, CD81 y sIg, en ausencia de positividad para FMC7 [72-76], la LLC-B típica presenta de forma constante expresión de CD5, CD23 y

CD200 en células B neoplásicas CD19+, siendo este último marcador (CD200) clave junto con CD79b [253] para diferenciar la LLC-B del LCM [254][255]; además, las células B clonales de la LLC-B típica son positivas para CD21, CD24, CD25, CD27, CD39, CD40, CD45RA, CD62L, CXCR5 y sIgM, y expresan de forma moderadamente intensa Bcl2 en el citoplasma [64, 256] (Figura 4). En las formas atípicas de la enfermedad, este patrón fenotípico puede verse modificado, adoptando distintos perfiles. Tanto en la LLC-B típica, como en las formas atípicas, el patrón de expresión de otros marcadores como CD11c, CD38, CD45RO, CD80, CD95, CD124, CD126, CD130 y CyZAP-70 es heterogéneo y variable de unos casos a otros [256][257]. Además, merece destacar que la reactividad para algunos de estos marcadores, como CD38 y CyZAP-70 (presente en casi la mitad de los casos), se ha asociado con el estado mutacional de los genes de las cadenas pesadas de las Ig (genes *IGH*) – ausencia de mutaciones somáticas- y/o un peor pronóstico de la enfermedad [258-264]; a este respecto merece destacar que también la positividad para CD49d en LLC-B no mutadas se ha asociado con un pronóstico peor [257].

SANGRE PERIFÉRICA

Figura 4. Origen de los SLPC-B de acuerdo con sus similitudes respecto a su contrapartida normal. La mayoría de los SLPC-B derivan de células B que aún no han pasado por el CG (leucemia linfática crónica, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal esplénica), de células B del CG (linfoma folicular, linfoma B difuso de célula grande, linfoma de Burkitt), o de células B más diferenciadas que han transitado previamente por el CG (linfoma linfoplasmocítico, mieloma múltiple).

El linfoma linfocítico de células B pequeñas está íntimamente relacionado con la LLC-B, siendo superponible el fenotipo de los linfocitos B patológicos en ambas entidades [1, 3, 265-266][267]. Así mismo, recientemente se ha propuesto la denominación de linfocitosis B monoclonal (MBL) para designar aquellos casos que, pese a presentar una expansión de células B monoclonales en SP con fenotipo superponible al de la LLC-B, el número de linfocitos B clonales es $<5 \times 10^9/L$, en ausencia de otros síntomas o signos de enfermedad [268].

Si bien se han barajado en el pasado diferentes posibilidades en lo que respecta a la posible contrapartida normal de estas células neoplásicas, actualmente se considera que las LLC-B que presentan genes *IGVH* mutados derivarían de

linfocitos B de memoria presentes tanto en MO y SP como en los órganos linfoides secundarios, en los que el proceso de hipermutación somática ha tenido lugar [269][270][271]; por el contrario, los casos no mutados tendrían su origen en células B *naïve* que no han pasado por el CG, correspondiendo a pacientes con un curso clínico más agresivo y menor supervivencia [270][272][273][274][275][276][277][278]. Más recientemente, la demostración de la existencia de pequeños clones de células B fenotípicamente idénticas a las células B neoplásicas de la LLC-B en prácticamente todos (o una gran proporción) de adultos sanos >40 años ha abierto nuevas perspectivas en la identificación de la posible contrapartida normal de la LLC-B [279-280][281].

4.1.2.-Leucemia prolinfocítica B (LPL-B)

Durante años, el diagnóstico de sospecha de la LPL-B se ha basado en las manifestaciones clínico-hematológicas de la enfermedad: linfocitosis elevada (habitualmente $>100 \times 10^9/L$) a expensas de una población de linfocitos B grandes con nucleolo prominente –prolinfocitos-, asociada a esplenomegalia con o sin adenopatías evidentes [176]. Desde el punto de vista fenotípico, los prolinfocitos B son CD19⁺, CD20⁺/FMC7⁺, CD22⁺, CD79b⁺ y expresan niveles elevados de sIgM y/o sIgD; además, respecto a la LLC-B, presentan menor reactividad para CD5 (20-30%), CD23 (10-20%) y CD25 (<50%), marcadores que con relativa frecuencia son negativos en la LPL-B [72, 74, 151, 282-283][284-285] (Figura 4). Así, en términos globales el prolinfocito muestra un fenotipo superponible al de un linfocito B activado de sangre periférica, en un estadio madurativo posterior al de la LLC-B [75, 283]. Aunque en algunos casos puede plantearse el diagnóstico diferencial con formas variantes de TL (TL-V) [286][287-289], a diferencia de los tricoleucocitos, los prolinfocitos carecen de reactividad para CD103 y muestran una menor expresión, aunque variable, de CD11c y CD305 (LAIR-1) [71]. Así mismo, debe realizarse el diagnóstico diferencial con el

LCM que puede presentar un cuadro clínico y morfológico sugerente de LPL-B, aunque de forma característica las células B neoplásicas de estos pacientes son CD200⁻ o ⁺ débil, CD23⁻, CD5⁺⁺/CD43⁺ y presentan t(11;14)(q13;q32) [284]. Finalmente, desde hace tiempo se conoce la existencia de formas variantes de LPL-B con características intermedias entre la LLC-B y la LPL-B [70][290]. Algunos de estos pacientes representan formas evolucionadas de LLC-B, mientras que otros presentan ya en el momento del diagnóstico un porcentaje variable de prolinfocitos (entre 11% y 55%) con características intermedias entre ambas entidades [1][3, 290]. Por todo ello, ante la sospecha de una LPL-B, debe realizarse un cuidadoso diagnóstico diferencial con otros SLPC-B, especialmente con el LCM, la LLC-B y formas variantes de TL, siendo la verdadera incidencia de LPL-B claramente inferior a la descrita inicialmente.

La expresión de CyZAP-70 y CD38 en estos pacientes se da en alrededor del 50-60% de los casos, respectivamente; al contrario de lo que ocurre en la LLC-B, esta expresión no está relacionada con el estado mutacional de los genes de las inmunoglobulinas [291].

4.1.3.-Tricoleucemia (TL)

Pese a su morfología característica y a su fenotipo único, en la actualidad seguimos sin conocer cuál es la contrapartida normal del tricoleucocito; no obstante, se ha descrito que la célula neoplásica de la TL ha sufrido los procesos de recombinación *IGH V(D)J* e hipermutación somática [292] y que podría corresponder a una célula B de memoria activada y/o presentadora de antígenos. Los rasgos fenotípicos del tricoleucocito son altamente característicos, no planteándose habitualmente grandes problemas en el diagnóstico diferencial entre la TL y otros SLPC-B. Así, el tricoleucocito muestra características de dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) de luz anormalmente elevadas, reactividad elevada para los antígenos CD25, CD103, LAIR-1 (CD305), CD123, T-bet, anexina A1 y HC2, junto a sobre-

expresión de los marcadores CD72, CD11c, CD19, CD20 y CD22 [70][71][74-75, 242, 282][286][252, 287-289, 293-294]. Además, el tricoleucocito generalmente carece de reactividad para CD5, CD10, CD23 y CD24, expresa FMC7 y es CD79b⁺; aunque generalmente expresa sIgM y/o sIgD, también puede ser positivo para sIgG y/o sIgA [1][71][72, 151, 242, 252] (Figura 4).

Desde hace años se reconoce la existencia de una forma variante de la TL (TL-V) [287][288][295][296] en la que, al igual que ocurre en la TL clásica, en el momento del diagnóstico los pacientes suelen presentar esplenomegalia, anemia y trombocitopenia asociadas con leucocitosis, en ausencia de monocitopenia [287][288][295][296]. A diferencia de lo que ocurre en las formas clásicas, en la TL-V, las células B neoplásicas generalmente no expresan los antígenos CD25 y HC2 [74]. Aunque la ausencia de ambos marcadores puede plantear en ocasiones el diagnóstico diferencial con el linfoma de la zona marginal esplénica (LZME), a diferencia de esta entidad, la TL-V muestra expresión clara de CD103 y un patrón diferente de reactividad para CD24 y CD305 [74].

4.2.- Características inmunofenotípicas de los linfomas no hodgkinianos B (LNH-B) con expresión periférica.

Inicialmente, los LNH-B con expresión periférica se incluyeron bajo el término de leucemia de células linfoesarcomatosas. No obstante, hoy se sabe que corresponden a formas leucemizadas de distintos subtipos de LNH-B. En principio, todos los subtipos de LNH-B descritos hasta la fecha pueden leucemizarse, si bien la expresión periférica es más frecuente en algunos subtipos de LNH-B. Por ello, ante la sospecha de que una linfocitosis B clonal pueda corresponder a una fase de leucemización de un LNH-B, es aconsejable realizar biopsia ganglionar para esclarecer el diagnóstico de LNH-B y definir su correspondiente subtipo histológico. Por otra parte, dada la elevada sensibilidad de las técnicas de análisis fenotípico

basadas en la citometría de flujo, cabe recordar que ante la presencia de una pequeña población de células B clonales en SP con fenotipo diferente de LLC-B, debe buscarse de manera sistemática realizar una confirmación histológica que permita establecer el diagnóstico diferencial entre infiltración por LNH-B y MBL no-LLC-B [297].

4.2.1-Linfoma de células del manto (LCM)

El LCM representa alrededor de 5-10% de todos los LNH del adulto [298]. En la mayoría de los LCM, las células B neoplásicas presentan un tamaño pequeño o mediano y aspecto maduro, similar al de la LLC-B; a veces, el núcleo es hendido con contorno irregular, asociado o no a la presencia de nucleolos evidentes con cromatina dispersa y escaso citoplasma, en ausencia de sombras de Gümprecht [299]. Aunque estos rasgos citológicos contribuyen al diagnóstico diferencial entre ambas entidades, para ello es clave el estudio histológico ganglionar, el análisis fenotípico de las células linfomatosas y la demostración de la t(11;14)(q13;q32) [300]. Desde el punto de vista fenotípico, el LCM comparte características con la LLC-B, lo que sugiere que su origen podría ubicarse en un linfocito B en un estadio madurativo inmediatamente posterior al de la LLC-B, que histológicamente se localizaría en la zona del manto de los órganos linfoides secundarios. Aproximadamente el 25% de los pacientes con LCM presentan genes *IGVH* mutados [301], y esto ocurre con mayor frecuencia en los pacientes con enfermedad ganglionar (90% vs. 40%) [301]. A diferencia de la LLC-B, la presencia de mutaciones *IGVH* no se correlaciona con la supervivencia [301][302]. El uso de *IGHVH3-21*, y posiblemente *IGHVH4-59*, podrían estar asociados con una mayor supervivencia [302] de los pacientes.

En el LCM, las células B neoplásicas CD19+ habitualmente coexpresan CD5 y CD43, junto a otros marcadores pan-B como CD20, CD22 y CD24 [1, 69-70][71][3, 72, 74-75]. Por el contrario, a diferencia de la LLC-B, generalmente carecen de reactividad clara para CD23 [303] y CD200 [254] y pueden presentar una positividad más intensa

para sIgM y/o sIgD, CD18, CD20, FMC7, CD54 y, sobre todo, CD79b; la reactividad para CD38 es variable, aunque en términos generales es superior a la detectada en la LLC-B típica [1, 3, 69, 138, 248] (Figura 4).

La variante blástica del LCM, asociada o no a la presencia de prolinfocitos en sangre periférica, presenta un fenotipo superponible con la forma clásica de LCM, asociada con frecuencia a un mayor tamaño y complejidad interna de las células B clonales (FSC y SSC), además de expresión de CD10 en algunos casos y tetraploidia de ADN, lo que podría llegar a plantear el diagnóstico diferencial con el LBDCG [304-305]; a diferencia de éstos, los linfocitos B neoplásicos del LCM son bcl6 negativos.

4.2.2- Linfoma folicular (LF)

De todos los linfomas primarios con infiltración de SP, el LF es el más frecuente. Aunque se ha estimado que la incidencia total de leucemización en el LF ocurre entre el 10% y el 40% de los casos [265], el uso de técnicas sensibles como el análisis multiparamétrico por citometría de flujo de la expresión de varios antígenos celulares y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), demuestran que las células B neoplásicas son detectables en la SP al diagnóstico o pueden aparecer después a lo largo de la evolución de la enfermedad, en una mayor proporción de casos [265][306]. Estos cuadros pueden confundirse en ocasiones con la LLC-B, siendo útil para su diagnóstico diferencial la demostración de la existencia de linfocitos con núcleo hendido (centrocitos) y la presencia de cierto grado de polimorfismo celular, con la coexistencia de células pequeñas y grandes (centrocitos y centroblastos, respectivamente) en ausencia de sombras de Gümprrecht [265]. La histología ganglionar es esencial para el diagnóstico definitivo del LF [71].

Las células B neoplásicas del LF habitualmente muestran un fenotipo similar al del linfocito B del folículo linfoide normal. Así, además de presentar reactividad fuerte para sIgM, CD20/FMC7, CD22 y CD79b, estas células coexpresan de forma

prácticamente constante CD10, bcl6 y CD38 de intensidad intermedia [74-75, 96, 248, 266, 282]. Por el contrario, generalmente son negativos para CD5, CD11c, CD23, CD43, CD103, CD200 y HC2 y algunos casos muestran negatividad o expresión anormalmente débil de CD19 [74-75, 96, 266, 282]; de forma característica, se observa sobre-expresión de bcl2 a nivel citoplasmático [64] (Figura 4). En la mayoría de los casos de LF las células B neoplásicas muestran pequeño tamaño (FSC) y escasa complejidad interna (SSC), aunque en ocasiones se observa la coexistencia -o incluso el predominio- de células B clonales de elevado FSC y SSC, que puede llegar a plantear el diagnóstico diferencial con algunas formas de LBDCG CD10⁺/CD200⁻. En la clasificación actual de la OMS [1] se incluye el LNH folicular cutáneo primario como un subtipo particular de linfoma centrofolicular. A diferencia del LF típico, las células neoplásicas de este subtipo suelen carecer de slg, con mayor frecuencia son CD10⁻ y expresan Cybcl2 de forma menos intensa.

4.2.3-Linfoma B difuso de célula grande (LBDCG)

El LBDCG constituye un grupo heterogéneo de linfomas en los que su descripción parte de criterios morfológicos e histológicos. Sólo una pequeña proporción de todos los LBDCG (<5%) presenta infiltración en SP al diagnóstico [265], generalmente asociada a la presencia de inmunoblastos grandes y/o centroblastos. En la mayoría de los casos las células B neoplásicas presentan reordenamiento de los genes de *Ig* asociados a la existencia de mutación somática [298]. En la clasificación actual de la OMS [1] dentro del LBDCG se establecen múltiples variantes y subtipos, lo que refleja la gran heterogeneidad de este subgrupo de linfomas.

La heterogeneidad clínica del LBDCG podría ser un reflejo de su variabilidad genética, habiéndose identificado al menos dos subtipos principales de LBDCG de acuerdo a los perfiles de expresión genómica, correspondiendo cada subtipo a un origen celular diferente [307]. Los LBDCG con un patrón de expresión del tipo CG se

asocian con una supervivencia mas larga de los pacientes que los LBDCG con un patrón de expresión de célula B activada (ABC) [307]. De esta manera, en relación con el patrón de expresión genómica los pacientes con LBDCG pueden agruparse de acuerdo con el origen celular y con su pronóstico según la expresión de distintos genes, de los que *HGAL*, *BCL6*, *LMO2* y *FN1* se asocian a una supervivencia favorable [308], y *BCL2*, *SCYA3* y *CCND2* a un peor pronóstico [308]. Entre el 35% y el 65% de los casos expresan *IRF4/MUM1* [309].

En el LBDCG los linfocitos neoplásicos generalmente muestran características de dispersión de luz (FSC y SSC) anormalmente elevadas, asociadas a reactividad intensa para marcadores pan-B como CD19, CD20/FMC7, CD22, CD79b y slg, siendo una proporción elevada de casos CD10⁺/CD200⁻ [1, 3, 74-75, 248, 266, 282] (Figura 4). Entre estos últimos pacientes, se incluiría un subgrupo numeroso que además muestra sobre-expresión clara de *Cybcl2*, y que podría corresponder a aquellos casos que, de acuerdo con su patrón de expresión genómica estudiado con *microarrays* de oligonucleotidos, muestran características de célula B del CG y t(14;18)(q32;q21) [64, 310]. Tanto CD5 como CD23 suelen estar ausentes, aunque se han descrito casos con expresión variable de ambos marcadores que, en el caso de CD5, se ha asociado con un peor pronóstico de la enfermedad [1, 3, 138, 311]. Aquellos LBDCG que expresan CD5 se diferencian de los casos diagnosticados como variante blástica de LCM en que no expresan ciclina D1 y carecen de la t(11;14)(q13;q32) [311]. Algunos LBDCG presentan un contenido de ADN aneuploide por citometría de flujo [312] y generalmente tienen una tasa proliferativa intermedia o alta [312-313], lo que contribuye al diagnóstico diferencial con otros SLPC-B; a su vez, puede observarse expresión de CD30, especialmente en la variante anaplásica de LBDCG [314].

4.2.4- Linfoma de Burkitt (LB)

El LB es un linfoma B de células grandes, agresivo, que se asocia a estados de inmunodeficiencia grave y cuyo pronóstico se relaciona en gran medida con el grado de extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico [315-317].

El fenotipo del LB es altamente característico y con frecuencia reproduce los rasgos de los linfocitos grandes centrofoliculares. Así, la célula B neoplásica del LB expresa marcadores pan-B como CD19, CD20, CD22 y CD79b, muestra reactividad para CD10, CD77, bcl6 y CD43, y positividad muy intensa para CD38 [318]; por el contrario, generalmente carece de expresión de CD5 y CD23 y expresa de forma débil bcl2 citoplasmático [64, 318] (Figura 4). Es característico el hallazgo de una elevada tasa proliferativa asociada a una mayor propensión a sufrir apoptosis espontáneamente *in vitro* por parte de las células B clonales [317, 319]. Las características de dispersión de luz corresponden a las de un linfocito grande, habitualmente en ausencia de aneuploidia de ADN que lo justifique. Se ha descrito una forma variante inicialmente conocida como linfoma Burkitt-*like*, con características histopatológicas intermedias entre las del LB y el LBDCG [1, 3, 138]. En la actualidad esta forma variante recibe varias denominaciones, como linfoma de célula B inclasificable [1] con características intermedias entre el LB y el LBDCG y formas genéticamente mixtas entre ambas entidades. Aunque las células B de estos pacientes expresan antígenos pan-B en ausencia de CD5, a diferencia del LB, suelen ser CD10⁺ y muestran mayor expresión de Cybcl2, junto a positividad intensa para Ki67 [1, 3, 138].

4.2.5- Linfoma de la zona marginal esplénica (LZME) y nodal

En la última década se ha acumulado gran cantidad de información acerca de las características clínicas y biológicas de los pacientes con LZME [73, 304] [320-321]. Clínicamente, el LZME presenta un curso benigno y los pacientes habitualmente no requieren tratamiento inmediato. En la SP los linfocitos B neoplásicos son morfológicamente más grandes que las células B normales, tienen un núcleo redondo, algo excéntrico, de contornos regulares, con cromatina condensada, a veces con nucléolo, junto a un citoplasma basófilo con proyecciones vellosas citoplasmáticas, generalmente dispuestas en un polo de la célula (menos numerosas, aunque más gruesas, largas y separadas, que las de las células B de la TL) [304].

En el LZME las células B neoplásicas fenotípicamente muestran características que lo situarían en un estadio madurativo cercano al de la TL. En la mayoría de los casos las células B muestran un fenotipo relativamente homogéneo, consistente en expresión intensa de slg y CD79b y positividad para CD19, CD20/FMC7 y CD22 [67, 71-73]. Al igual que en la TL, las células B clonales expresan CD11c, que habitualmente no supera los niveles detectados en una pequeña subpoblación de células B (<5%) circulantes CD11c⁺, de tamaño intermedio [84]. Por el contrario, con frecuencia carecen de reactividad para CD103, HC2 y CD25 y muestran un patrón de expresión de CD24 diferente del de los tricoleucocitos [1, 3, 67, 73] (Figura 4). Otros antígenos característicos de algunos SLPC-B como CD5, CD10 y CD23 son generalmente negativos en el LZME, mientras que CD38 y CD43 se expresan únicamente en una pequeña proporción de casos (<25%) y no se observa reactividad para anexina A1, bcl6 o ciclina D1 [1, 3, 67, 73, 75, 304] (Figura 4). Fenotípicamente, el LZME es muy similar al linfoma de zona marginal nodal, pero a diferencia de éste suele ser slgD⁻.

4.2.6- Linfoma de la zona marginal extranodal del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)

El linfoma tipo MALT comprende aproximadamente el 7-8% de todos los linfomas de células B [322] y más del 50% de los linfomas gástricos primarios [323]. En estos pacientes, las células B expresan slg (slgM, slgA o slgG) y en muchos casos coexpresan Cylg del mismo isotipo y antígenos B como CD19, CD20, CD22, CD79b y CXCR3, habitualmente en ausencia de positividad para CD5, CD23, CD10, CD27 y CD45RO [324-326] (Figura 4). La expresión de CD11c y CD43 es variable [324-326] (Figura 4). Algunos autores han asociado la expresión de CD5 con un comportamiento más agresivo y un peor pronóstico de la enfermedad [327].

4.2.7.- Linfoma linfoplasmocítico (LLP) y macroglobulinemia de Waldenstrom (MW)

El LLP frecuentemente presenta infiltración de la MO; por el contrario, la presencia de células B clonales en SP es menos habitual en esta entidad [70-71, 74-75, 282] . En las muestras infiltradas (tanto en SP como en MO) a menudo coexisten desde linfocitos pequeños clonales a linfoplasmocitos típicos y células plasmáticas que expresan el mismo isotipo de cadena ligera de Igs [71-72, 74-75, 282] . En la mayoría de los casos se detecta un componente monoclonal, aunque a veces se necesitan métodos sensibles como la inmunofijación para su identificación [138, 328-329]. La MW es una variante de LLP caracterizada por la presencia de paraproteinemia IgM (que excede la concentración de 1,5 g/dL) y la acumulación de células linfoplasmocíticas en la MO. En los estadios avanzados de la enfermedad, los pacientes desarrollan organomegalias, anemia e hiperviscosidad sanguínea. La presencia de componente monoclonal IgM diferencia la MW de otras neoplasias con diferenciación plasmocitoide [330]. Debido a sus características morfológicas e

inmunofenotípicas, la MW se incluyó dentro del grupo más amplio de LLP, a partir de la clasificación REAL (Clasificación revisada Europea-Americana) de los linfomas y SLPC-B [138].

El perfil fenotípico de los linfocitos B neoplásicos de los pacientes con linfoma linfoplasmocítico generalmente es superponible al de los linfocitos B CD5⁻/CD23⁻ maduros predominantes en sangre periférica: ausencia de reactividad para CD5, CD10 y CD23, expresión de marcadores pan-B (CD19⁺, CD20⁺/FMC7⁺, CD22⁺, CD24⁺), positividad constante para CD25 y CD54 y reactividad variable para CD38 [1, 3, 69, 74-75, 266] (Figura 4). Característicamente, en la MW se observa expresión de sIgM en ausencia de sIgD asociada a un predominio de casos sIgκ⁺ sobre los sIgλ⁺ (cociente κ/λ: 5/1) [330]; además, en alrededor de la mitad de los casos de MW se detecta en la MO la coexistencia de células plasmáticas clonales CD38⁺⁺, CD56⁻, CD19^{-/+} que presentan coexpresión de CD20 e IgM de membrana y citoplasmática conjuntamente con los linfocitos B maduros clonales, [330].

4.2.8.- Gammapatías monoclonales (GM) y mieloma múltiple (MM)

En términos generales, las GM representan neoplasias de células B terminalmente diferenciadas -CP-. Desde el punto de vista fenotípico existe una gran similitud entre las CP clonales de las distintas formas de GM. Así, estas células carecen de forma característica de marcadores asociados a otras neoplasias B como CD22, CD5 y CD23, pudiendo presentar una pequeña proporción de casos reactividad débil para sIg y CD20 [1, 3, 138, 331]. Al igual que las CP normales, presentan fuerte reactividad para CD38, expresión de CD138 y Cylg [1, 3, 138, 331-332]; por el contrario, con frecuencia son CD45⁻ y CD19⁻ [59, 65, 333] (Figura 4). En las GM de significado incierto (GMSI) y en el MM se detecta frecuentemente una fuerte reactividad para CD56, en presencia o ausencia de un patrón de expresión aberrante para CD117, CD27, CD28, CD33, CD81, CD126, CD229 y CD86 [57-58, 334-338]

(Figura 4). En la leucemia de células plasmáticas (LCP) puede observarse expresión de CD56, aunque su frecuencia es claramente inferior a la detectada en las GMSI y en el MM [339-340]; por el contrario, en la LCP se detecta más frecuentemente reactividad para CD20 y positividad más intensa para CD27 [58, 339-340]. Estudios recientes muestran además la existencia de un descenso progresivo en los niveles de expresión de CD38, CD40, CD63, HLA-I y beta-2-microglobulina desde la GMSI a la LCP, pasando por el MM [341].

4.3.- Características fenotípicas de los SLPC-T y SLPC-NK

Actualmente, nuestro conocimiento acerca de las características fenotípicas de los SLPC-T es más limitado que el de los SLPC-B, debido en gran medida a la menor frecuencia de presentación de este grupo de enfermedades y a su mayor complejidad diagnóstica. Por el contrario, a pesar de que las neoplasias de células NK maduras son muy poco frecuentes, su diagnóstico no suele plantear grandes dificultades, salvo en el caso de las leucemias/linfocitosis clonales de linfocitos grandes granulares de origen NK, debido a la ausencia de marcadores de clonalidad (ausencia de reordenamientos de los genes *IGH* y *TCR*), particularmente en el caso de los varones, donde la utilidad de los test moleculares de inactivación del cromosoma X para el diagnóstico de clonalidad es prácticamente nula.

4.3.1.- Leucemia prolinfocítica T

Los prolinfocitos T se caracterizan por presentar un fenotipo T (CD2⁺, CD3⁺, CD5⁺) maduro (ausencia de expresión de CD34, Tdt y CD1a junto a expresión generalmente fuerte de CD45) asociado de forma habitual a una expresión elevada de CD7 [267, 342] y un fenotipo CD4⁺/CD8⁻, aunque se han descrito también fenotipos CD4⁺/CD8⁺ y CD4⁻/CD8⁺ en aproximadamente 1/4 y 1/10 casos, respectivamente [267,

342]. Estas células muestran también reactividad intensa para CD52 (diana terapéutica), positividad débil y variable para CD25 y HLA-DR, junto con características de un linfocito T escasamente diferenciado, de fenotipo *naïve* en la mayor parte de los casos ($CD45RA^+$, $CCR7^+$, $CD27^+$, $CD45RO^-$, $CD28^+$) [267, 342]. De forma característica, en la mayoría de los casos (~80%) se observa expresión citoplasmática de TCL1, asociada a translocaciones que involucran este gen en el cromosoma 14q32.1 [343].

4.3.2.- Leucemia/linfoma T del adulto

La leucemia/linfoma T del adulto presenta un fenotipo T maduro correspondiente al de un linfocito T regulador $CD4^+/CD25^{++}$ con expresión de CCR4 y Foxp3 [70, 138, 267, 344-345]; además de la expresión de marcadores pan-T como CD2 y CD5, con frecuencia las células T neoplásicas muestran expresión débil o incluso negatividad para CD7 y, en menor medida, para CD3 y $TCR\alpha\beta^+$ [70, 138, 267, 344-345]. El antígeno CD8, así como los marcadores asociados a célula citotóxica CD57, CD56, CD11b y CD11c son habitualmente negativos en las células T clonales de estos pacientes [70, 138, 267, 344-345]. A veces se observa expresión parcial de CD30 en ausencia de proteína ALK y enzimas citotóxicas [1].

4.3.3.- Leucemia de linfocitos T grandes granulares

Las leucemias/linfocitosis clonales de linfocitos T grandes granulares (LLGG-T) son un grupo de entidades relativamente heterogéneo desde el punto de vista fenotípico. En la mayoría de los pacientes las células T clonales expandidas muestran un fenotipo $CD3^+/TCR\alpha\beta^+/CD8^+$, pero también se ha descrito una proporción significativa de casos en los que se acumulan en SP y otros tejidos linfocitos T $CD3^+/TCR\gamma\delta^+/CD4^-$ o linfocitos T $CD3^+/TCR\alpha\beta^+/CD4^+$ asociado o no a expresión débil

de CD8. De forma excepcional se detectan expansiones clonales de células T con aspecto de linfocito grande granular CD3⁺/TCRαβ⁺/CD8⁻/CD4⁻ [346].

Generalmente, las células T de los pacientes con LLGG-T tienen un fenotipo citotóxico efector, independientemente de su origen en distintas subpoblaciones de células T, detectándose expresión intracitoplasmática de proteínas citotóxicas, como granzima B y M y perforina, junto a una reactividad variable para las moléculas CD16, CD56, CD57, CD11c y CD94 [347], expresión intensa de CD45RA en ausencia de reactividad para CCR7 y CD28 y positividad variable para CD45RO [347-350]. Otras moléculas pan-T como CD5, CD7 y CD2, que habitualmente son positivas, en estas células pueden mostrar una intensidad de expresión variable, detectándose incluso en algunos pacientes dos o más subpoblaciones T patológicas con diferentes niveles de expresión para estos marcadores [347-350].

Un análisis más detallado de las características fenotípicas de cada uno de los distintos subgrupos de LLGG-T pone de manifiesto la existencia de rasgos particulares en cada uno de ellos; a modo de ejemplo, las LLGG-T CD3⁺/TCRαβ⁺/CD4⁺ se asocian de forma prácticamente constante con coexpresión de marcadores T como CD2, CD7 y CD5, junto con reactividad para los antígenos CD56 y CD57, en ausencia de positividad para otros marcadores asociados a célula citotóxica como CD11c, CD11b, CD16, CD161, CD158 y CD94; un hallazgo interesante es que en una proporción elevada de estos casos las células clonales expresan la familia TCRVβ13.1, asociada a la presencia del alelo HLA-DRB1*0701 e infección por CMV, la cuál probablemente constituye el estímulo antigénico concreto involucrado en estas expansiones clonales T [351-353].

Por su parte, las LLGG-T CD3⁺/TCRγδ⁺/CD4⁻ se caracterizan por su frecuente expresión de marcadores pan-T, expresión de intensidad variable de CD8, CD56 y CD57 y ausencia de reactividad para CD16, CD11b y CD11c; de forma similar a lo que

ocurre con las células T $\text{TCR}\gamma\delta^+$ de SP de adultos sanos, en las LLGG-T $\text{CD3}^+/\text{TCR}\gamma\delta^+$ se observa un predominio de expansiones $\text{TCRV}\gamma 9^+/\text{TCRV}\delta 2^+$ [189].

Respecto a los casos $\text{CD3}^+/\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD8}^+$, merece resaltar que suelen expresar un repertorio de regiones $\text{TCRV}\beta$ similar al de las células T CD8^+ de sujetos adultos sanos [187-188]. Fenotípicamente, las células clonales de estos pacientes expresan antígenos pan-T habitualmente asociados a reactividad variable para CD57, CD11c y CD56 [354]. La intensidad de expresión de CD8 suele ser intensa, en ausencia de CD4 [347, 354].

4.3.4.- Síndrome de Sézary y micosis fungoide

El linfocito T patológico de los pacientes con síndrome de Sézary y micosis fungoide muestra un fenotipo característico de una célula T CD4^+ de memoria, habitualmente de memoria central [183]. La gran mayoría de los casos son CD4^+ en ausencia de CD8, siendo raros los casos que expresan CD8 [355], que se comportan desde el punto de vista clínico de igual forma que los CD4^+ ; con frecuencia este último fenotipo se describe en pacientes pediátricos. En la mayor parte de los casos (>95%), las células de Sézary expresan niveles bajos (respecto del linfocito T CD4^+ circulante normal) de $\text{TCR}\alpha\beta/\text{CD3}$ (94%), CD4 (94%), CD7 (100%) y/o CD2 (83%) [70, 74-75, 138, 183, 267, 356-357]. Este patrón constituye el fenotipo aberrante característico de las células de Sézary, ausente en los linfocitos T de pacientes con eritrodermias reactivas. Además, las células de Sézary muestran reactividad para el antígeno CD28^+ , CD45RO^+ , CCR7^+ (fenotipo de memoria central) y CD5^+ , en ausencia de expresión de marcadores asociados a células citotóxicas (CD8^- , CD56^- , CD57^- , CD11b^- , CD11c^- , CD161^- , CD158^- y CD94^- , entre otros) [183].

Pese a poseer rasgos fenotípicos característicos, es frecuente que en un mismo paciente las células de Sézary sean fenotípicamente heterogéneas, e incluso

que se detecten distintas subpoblaciones de células T neoplásicas con diferente tamaño y complejidad (FSC y SSC), contenido de ADN (diploide y tetraploide) y fenotipo (por ejemplo: coexistencia de subpoblaciones celulares CD7⁻ y CD7⁺) [183, 358-360].

4.3.5.- Linfoma T angioinmunoblástico

El linfoma T angioinmunoblástico muestra habitualmente un fenotipo típico (similar en la sangre periférica y en los ganglios linfáticos), caracterizado por la presencia de una o varias subpoblaciones de células T CD4⁺/CD8⁻ con expresión anormalmente disminuida y variable de CD3/TCR $\alpha\beta$ ⁺, asociada o no a una expansión numérica de tipo policlonal de las células B [361-362]. De forma característica, las células neoplásicas de prácticamente todos los pacientes con linfoma T angioinmunoblástico expresan los antígenos CD10 [363], CXCL13 [364], y PD-1 (CD279, miembro de la familia extendida CD28/CTLA-4) [365], fenotipo similar al de la célula T colaboradora folicular CD4⁺ normal, de la que se ha propuesto recientemente que se originaría esta neoplasia [363, 366].

4.3.6.- Linfoma T periférico NOS (“not otherwise specified”)

Este subgrupo de linfomas T comprende aproximadamente un 30% de los linfomas T periféricos [367], de manera que en la mayoría de las series representa el grupo más frecuente de todas las neoplasias T postímicas; en realidad, es un grupo muy heterogéneo, ya que en esta categoría se incluyen todos aquellos linfomas T periféricos que no pueden adscribirse a ninguna otra categoría de la OMS. Reflejo de ello es su gran heterogeneidad en lo que se refiere a la expresión de marcadores T, pudiendo ser positivos o negativos para los antígenos pan-T CD3, CD2, CD5 y CD7 [184, 368-369]; además, estos linfomas pueden expresar niveles bajos de CD30,

moléculas asociadas a citotoxicidad (granzima B, perforina, CD56 y CD57) e incluso marcadores asociados a célula T CD4⁺ colaboradora folicular (como PD-1). En la mayoría de los casos (65%) las células clonales son CD4⁺/CD8⁻, aunque pueden detectarse también fenotipos CD4⁻/CD8⁺ (15% de los casos) y mas raramente CD4⁻/CD8⁻ (10%) e incluso CD4⁺/CD8⁺ (10% de los casos) [184, 368]. Suelen expresar la isoforma CD45RA del antígeno CD45, en ausencia de CD45RO [1, 3].

4.3.7.- Linfoma T hepatoesplénico

En la clasificación más reciente de la OMS se incluye el linfoma T hepatoesplénico como un nuevo subtipo de linfoma T, y es una neoplasia agresiva derivada de células T citotóxicas, que en la mayoría de los casos expresan el receptor TCR $\gamma\delta$. Desde el punto de vista fenotípico el linfoma T hepatoesplénico se caracteriza por presentar un perfil en general superponible al de las expansiones clonales de linfocitos T $\gamma\delta$ tipo LLGG-T $\gamma\delta$ CD3⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺, CD2⁺ y CD7⁺ asociados a una expresión variable de CD5 y CD8 y positividad generalmente débil (e incluso a veces ausente) para enzimas citotóxicas (granzima B y perforina) y CD56, en ausencia de CD94 y otros receptores KIR [370-372]

4.3.8.- Linfoma T subcutáneo tipo paniculítico

El linfoma T subcutáneo tipo paniculítico característicamente se asocia a una expansión clonal de células T TCR $\alpha\beta$ ⁺, CD8⁺, con fenotipo citotóxico y expresión de β F1 en ausencia de CD56; este linfoma habitualmente infiltra el tejido subcutáneo en ausencia de diseminación periférica. En la nueva clasificación de la OMS [1] se excluye de esta entidad el linfoma T- $\gamma\delta$ cutáneo primario.

4.3.9.- Linfoma T/NK extranodal, tipo nasal

El linfoma T/NK extranodal, tipo nasal representa una entidad rara en nuestro medio, que está asociada en la mayoría de los casos a infección por el virus de Epstein-Barr (EBV) [373-376]. Histológicamente se observa un infiltrado pleomórfico en la lesión tumoral, con destrucción vascular y necrosis asociada [373-376]. Fenotípicamente, las células neoplásicas muestran rasgos típicos de células NK, tanto a nivel citoplasmático (TIA1⁺, granzima⁺, perforina⁺) como de membrana (CD56⁺, CD16^{-/+}, CD2⁺, CD3⁻) asociado o no a expresión de CD30 y CD7, generalmente en ausencia de reactividad para CD57, HLA-DR, CD25 y CD95 [377-378]; en una minoría de los casos se observa un fenotipo de célula T citotóxica CD3⁺/CD56⁺.

Aquellos casos en los que se observa expresión de CD3 intracitoplasmático en ausencia de CD56 y que son EBV⁺, CyGranzima⁺ y CyPerforina⁺, se clasifican como linfoma T/NK extranodal, mostrando estos casos un comportamiento clínico similar al de los casos CD56⁺ [379].

4.3.10.- Linfoma T asociado a enteropatía

De forma característica, en el linfoma T asociado a enteropatía se detecta una expansión de linfocitos T CD7⁺, CD3⁺/TCR $\alpha\beta$ ⁺ en ausencia tanto de CD4 como CD8 o con expresión débil de este último marcador [1, 3, 380-383]. Es típico que las células T neoplásicas de estos pacientes coexpresen el antígeno CD103 y presenten reactividad variable para CD30, en ausencia de CD5 [1, 3, 380, 382, 384].

4.3.11.- Linfoma T anaplásico de células grandes, ALK⁺

El linfoma T anaplásico de células grandes ALK⁺ muestra un fenotipo característicamente CD30⁺, asociado a expresión variable de marcadores pan-T como

CD3, CD7, CD2, y CD5, así como de CD25 [1, 3, 385]. Así mismo, en estos pacientes pueden ser positivos o negativos los antígenos EMA, CD15, CD43, CD45, CD45RO, en ausencia de CD68 [1, 3, 385]; de forma característica muestran expresión de la proteína ALK, asociada a las translocaciones que involucran este gen en el cromosoma 2p23, de las cuales la más frecuente de todas (84% de los casos) es la t(2;5)(p23;q53), que resulta en la generación de la proteína quimérica NPM-ALK [386].

4.3.12. Linfoma T anaplásico de células grandes ALK⁻

A diferencia de lo que ocurre en el linfoma T anaplásico de células grandes ALK⁺, este subtipo de linfoma T carece por definición de la expresión de ALK, asociada a positividad intensa para CD30 y pérdida de expresión de uno o múltiples antígenos pan-T; con relativa frecuencia se observa expresión de CD4 y raramente de CD8. Por el momento se trata de una entidad provisional en la nueva clasificación de la OMS, y el interés de su distinción de la forma ALK⁺ radica sobre todo en que tiene un pronóstico diferente, claramente peor [1].

4.3.13- Síndrome linfoproliferativo crónico de células NK (SLPC-NK)

El síndrome linfoproliferativo crónico de células NK (SLPC-NK) es el subgrupo de neoplasias/expansiones de células NK maduras más frecuente en los países occidentales. Esta nueva categoría (de momento provisional) ha sido propuesta por la OMS en su última clasificación, y ha venido a sustituir los nombres previos de “linfocitosis crónica de células NK”, “leucemia crónica de células grandes granulares NK”, y “leucemia/linfocitosis de LGG de células NK”, entre otros, agrupando a todos ellos (leucemias y linfocitosis) bajo un término común, ya que en muchas ocasiones no es posible demostrar la naturaleza clonal de las células NK expandidas. Desde el

punto de vista práctico, las células NK de los SLPC-NK presentan un fenotipo de célula madura, similar al de su contrapartida normal: CD16⁺, CD3⁻, CD7⁺, Cygranzima⁺ y Cyperforina⁺. Según la expresión de CD56 y CD2 pueden definirse tres subtipos de SLPC-NK: 1) SLPC-NK de células CD56⁺/CD2⁺, 2) expansiones NK CD56⁺/CD2⁻ y 3) SLPC-NK CD2⁺/CD56^{-/+débil} [201]. El primer subgrupo es el más frecuente, ya que representa alrededor de 50% de los casos; a su vez los casos con expresión anormalmente descendida o ausente de CD56 representan alrededor de 40% de todos los SLPC-NK, mientras que los pacientes CD2⁻/CD56⁺ representarían el subgrupo menos frecuente (<10% de los casos) [201]. Estudios previos han demostrado el carácter clonal de las expansiones NK con expresión anormalmente baja o ausente de CD56 y CD2 [201], pero también hay algunos casos en los que se ha podido comprobar que las células NK CD56^{-/+débil} expandidas son policlonales. Por su parte, el fenotipo de las células NK clonales CD56⁺/CD2⁺ es prácticamente idéntico al de las células NK maduras de SP, excepto en lo que se refiere a la positividad para CD94 y HLA-DR, que está significativamente incrementada, expresándose además CD94 de forma homogénea en las células NK patológicas [387-388]. Aunque algunos autores han sugerido que el patrón de expresión de proteínas de algunos receptores NK como CD158, podría ser distinto en las células NK neoplásicas y en las reactivas [350], sus hallazgos no han podido ser confirmados posteriormente por otros grupos [201, 389-390].

4.3.14- Leucemia agresiva de células NK

La leucemia agresiva de células NK constituye una entidad rara en nuestro medio, que afecta predominantemente a adultos jóvenes, casi siempre asociada a infección por EBV. Clínicamente estos pacientes presentan mal pronóstico y una evolución generalmente rápida asociada a fracaso terapéutico [1]. Habitualmente cursa como una enfermedad sistémica con hepatoesplenomegalia y afectación

ganglionar asociadas a recuentos linfocitarios elevados [391-393]. Aunque se han descrito algunas anomalías cromosómicas como del(6)(q21q25) y delección de 11q [394], no existe una alteración genética característica de esta enfermedad. Fenotípicamente, las células tumorales muestran características superponibles a las de las células NK normales, con expresión de proteínas citotóxicas a nivel citoplasmático (TIA1⁺, granzima⁺, perforina⁺) junto con moléculas de membrana características de células NK maduras (CD56⁺, CD16⁺, CD7⁺, CD3⁻, CD8⁻ o ⁺) [391], siendo habitual la expresión de CD95 en ausencia de CD57 [395].

5.- Moléculas tetraspaninas

Las proteínas tetraspaninas se descubrieron a principios de los años noventa del siglo XX; fueron descritas de manera independiente por dos grupos de investigación, y hasta la fecha engloban al menos 33 moléculas diferentes en humanos [396-397] (Figura 5). Las tetraspaninas son proteínas de membrana tipo II, que presentan una única cadena polipeptídica de 200 a 300 aminoácidos, con cuatro dominios transmembrana (hidrofóbicos) muy conservados en toda la familia de proteínas (Figura 5). Los extremos amino terminal y carboxilo terminal están compuestos por 5-14 aminoácidos que se disponen hacia el citosol [398]. Los dominios transmembrana están unidos entre sí mediante el dominio extracelular EC1 (los dominios transmembrana 1 y 2), mediante un dominio intracitoplásmico (los dominios transmembrana 2 y 3) y mediante el dominio extracelular EC2 (los dominios transmembrana 3 y 4) [399-400], que se encuentra normalmente glicosilado (N-glicosilado) [401] (Figura 5). El elevado contenido en aminoácidos polares emplazados en la bicapa lipídica de estos dominios parece estar implicado en la posible interacción de estas moléculas con otras moléculas transmembrana [402].

Figura 5. Estructura típica de la molécula tetraspan. (ej. la proteína CD53, que tiene cuatro dominios transmembrana. EC: dominio extracelular).

A diferencia de lo que ocurre en los dominios transmembrana, altamente conservados en las distintas tetraspaninas, existe una elevada variabilidad en la secuencia, longitud y grado de glicosilación de los dominios extracelulares [400, 403]. En el dominio EC2 se detectan dos subdominios, uno de ellos presenta un plegamiento conservado (tres hélices) y el otro es variable en cuanto a longitud, estructura secundaria y plegamiento. El primero contiene sitios de unión que corresponden a interacciones de las proteínas tetraspaninas, bien sea entre ellas, formando la “red de tetraspaninas” o con otras moléculas de adhesión (integrinas), mientras que el segundo parece estar implicado en interacciones específicas de las tetraspaninas con virus o toxinas [400]. La mayor parte del conocimiento de esta “red” se ha obtenido de un número muy pequeño de tetraspaninas que incluyen CD9, CD81, CD82 y CD151 [404]. Estas proteínas se expresan en leucocitos y en la mayoría de

otros tipos celulares [405], pero la información más precisa y abundante sobre su función se ha obtenido a partir del estudio de células hematológicas y epiteliales [404].

5.1.- Expresión tisular de las moléculas tetraspaninas

Si bien la expresión de algunas de las tetraspaninas se limita casi exclusivamente al tejido linfoide o mieloide (p.ej. CD37), la mayoría de las tetraspaninas se expresan ampliamente en muchos tipos celulares diferentes de líneas hematopoyéticas y no hematopoyéticas (p.ej. CD9, CD63 y CD81) [406-407]. Así, en mamíferos, algunas proteínas tetraspaninas como CD81, CD9 o CD63 se expresan prácticamente en todos los tejidos. Varias de ellas son moléculas asociadas a la diferenciación de los leucocitos, como CD9, CD37, CD53, CD63 y CD81 [403, 406]. CD9 es característico de plaquetas y de células pre-B, CD63 es un componente ubicuo de la membrana lisosomal que se encuentra en los gránulos densos de las plaquetas y en los corpúsculos de Weibel-Palade y aparece en la membrana plasmática de células tumorales y de células activadas; CD81 se expresa ampliamente tanto en leucocitos como en otros tipos celulares; CD53 es un marcador panleucocitario y se ha descrito su presencia en queratinocitos del sustrato espinoso y en la capa granular de la piel [408], mientras que la expresión de CD37 está restringida a los linfocitos B [409].

5.2. Interacciones entre tetraspaninas y otras moléculas

Las tetraspaninas tienen la capacidad de interaccionar entre sí [410], y con otros tipos de moléculas transmembrana como las integrinas y con las moléculas del sistema HLA, entre otras, formando complejos macromoleculares en la membrana plasmática [410-413]. La variedad de los complejos descritos (expuestos de forma resumida a continuación) ha llevado a formular la hipótesis de que las tetraspaninas

funcionan como moléculas adaptadoras dentro de los complejos macromoleculares, donde organizan la posición relativa de otras moléculas de superficie, modulando así su función [410].

5.2.1.-Interacciones entre tetraspaninas e integrinas

Las interacciones descritas hasta ahora entre las tetraspaninas y las integrinas involucran siempre a la cadena $\beta 1$ de la integrina, y son interacciones constitutivas. Concretamente, todas las tetraspaninas interactúan con las integrinas $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ [411, 413-416]. Además, existe evidencia de que en los linfocitos B CD9 interactúa con la integrina $\alpha 5\beta 1$ [410, 414], aunque otros autores no han podido confirmar la existencia de complejos con $\alpha 5\beta 1$ en estas células, tanto de CD9 como de otras tetraspaninas [411, 415-416]. También se ha descrito la existencia de complejos multimoleculares en la membrana plasmática, en los que se asocian entre sí las tetraspaninas CD9, CD81 y CD63 y con las integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$. En estos complejos también están presentes antígenos HLA-DR [410]. La unión de las tetraspaninas con integrinas parece intervenir en procesos de migración y adhesión celular.

5.2.2.- Interacciones entre tetraspaninas y moléculas del sistema HLA

Las interacciones de las tetraspaninas con moléculas del sistema HLA se han estudiado sobre todo en linfocitos B, en los que se han descrito complejos de CD81, CD37 y CD53 con glicoproteínas HLA de clase II [413, 417], y complejos macromoleculares de CD53 y CD81 con las moléculas HLA, tanto de clase I como de clase II (en concreto, dentro de estas últimas, con HLA-DR y HLA-DQ), además de otras moléculas, como CD71 (receptor de transferrina) y CD20. La proximidad de

estas moléculas en la membrana plasmática sugiere que se distribuyen formando complejos macromoleculares en la superficie celular; no obstante, aunque aún no se ha podido determinar si las moléculas tetraspaninas intervendrían en la modulación de las funciones mediadas por estas moléculas del sistema HLA, se cree que pueden afectar a la presentación de antígenos [418]. Por ejemplo, se ha visto que en los linfocitos B, CD82 y CD63 forman complejos con las moléculas HLA-DR, HLA-DM y HLA-DQ, participando en la presentación antigénica [419]. Por otra parte, también se han descrito interacciones de tetraspaninas con moléculas HLA en otros compartimentos celulares, aparte de los linfocitos B. Así, se ha visto que CD63 interacciona con moléculas HLA de clase II en diversos compartimentos intracelulares de las células dendríticas [420].

5.2.3- Interacciones entre tetraspaninas y otras moléculas

La tetraspanina CD81 también forma un complejo macromolecular que incluye a las moléculas CD21, CD19 y CD225 (Leu-13 o antígeno inducible por interferón), en los linfocitos B [421], (Figura 6), formando el llamado complejo correceptor del BCR. CD21 reconoce a la molécula CD23 de las células dendríticas foliculares, o alternativamente fragmentos del componente 3 del complemento (CD21 también se identifica como CR2, o receptor de complemento tipo 2). La señalización del complejo requiere el dominio citoplásmico de CD19, lo que sugiere que CD19 es la molécula implicada en transducir las señales enviadas por el complejo al interior celular [422]. La función de CD81 (TAPA-1) en este complejo es hasta el momento desconocida.

La interacción se produce directamente entre el dominio extracelular de CD81 y CD19, mientras que las tetraspaninas CD82 y CD9, que también interaccionan con CD19, lo hacen indirectamente a través de CD81 [423], asociándose estas moléculas entre sí de forma no covalente.

Figura 6. Interacción de la tetraspanina CD81 con el complejo de señalización de células B, CD21/CD19/CD225 (Leu-13). Las interacciones se producen a través del dominio EC2 de CD81 y el dominio extracelular de CD19. CD21 interacciona con CD19. La posición exacta de CD225 en el complejo no se conoce.

5.3.- Alteración de los niveles de expresión de las tetraspaninas en distintos carcinomas: relación con la capacidad invasiva del tumor

Se ha sugerido que la expresión alterada de algunas tetraspaninas se relaciona con un peor pronóstico en algunos tipos de carcinomas. El primer hallazgo que apoya la relación entre una alteración en el patrón de expresión de tetraspaninas y la capacidad de diseminación del tumor fue la observación de que la pérdida de CD63 se relacionaba con un aumento del potencial invasivo en melanomas, donde existía una correlación inversa entre los niveles de expresión de CD63 y el potencial metastásico del tumor [424-425]; además, la reexpresión de CD63 en las células de melanoma redujo el potencial invasor del tumor [426]. Se ha encontrado una correlación similar entre los niveles de expresión de CD63 y la capacidad invasiva del tumor en una línea celular de cáncer de colon [427].

Por otra parte, se ha visto que la expresión de CD9 se asocia con el control de la motilidad celular. Esta afirmación se fundamenta en los siguientes hallazgos: a) funcionalmente, anticuerpos anti-CD9 inhiben la trans migración de células de melanoma [428]; b) en melanocitos primarios, la reducción de la expresión de CD9 produce una pérdida de la motilidad [429], y; c) la motilidad celular dependiente de la unión a laminina-5 se inhibe por la interacción de CD9 con el gangliósido GM3 [430]. Estos datos sugieren que CD9 probablemente promueve la diseminación del tumor. De acuerdo con esta hipótesis, se ha detectado una correlación inversa entre los niveles de expresión de CD9 y la invasividad en melanomas [431], cáncer de mama [432], carcinoma oral [433], carcinoma de ovario [434] y carcinomas cervicales [435]

Hasta el momento en el que se planteó el presente trabajo de tesis doctoral, no se había referido en la literatura ningún estudio en el que se hubiera determinado el papel de estas moléculas en la capacidad de diseminación de las células tumorales de pacientes con linfomas.

II.- Hipótesis y Objetivos

Bajo el término de síndromes linfoproliferativos crónicos B (SLPC-B) se engloba un conjunto amplio y heterogéneo de hemopatías linfoides malignas, que se originan a partir de la expansión clonal de células B de aspecto maduro, bloqueadas en estadios relativamente avanzados de diferenciación. Constituyen el grupo de neoplasias hematológicas más prevalente en los países occidentales, por lo que resulta esencial en nuestro medio el poder disponer de técnicas eficaces para la identificación de las células B patológicas, que permitan establecer un diagnóstico precoz de la enfermedad.

Tradicionalmente, el diagnóstico de los SLPC-B se fundamenta casi de forma exclusiva en técnicas citomorfológicas e histopatológicas convencionales, junto con la información clínica derivada de la anamnesis y exploración física del paciente. No obstante, diferentes estudios han demostrado que por sí solas, estas técnicas tienen una especificidad y sensibilidad limitadas, tanto a la hora de detectar la presencia de enfermedad como de definir el subtipo diagnóstico concreto de la misma. Ante esta situación, en los últimos años se han incorporado las técnicas inmunofenotípicas, genéticas y moleculares al diagnóstico y clasificación de los SLPC-B, proponiendo en este sentido la OMS una aproximación multiparamétrica, basada en la combinación de técnicas morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y moleculares, para el diagnóstico y clasificación integrados de estos procesos.

De acuerdo con ello, estudios recientes sugieren que el análisis inmunofenotípico por citometría de flujo también podría contribuir a mejorar la eficiencia de los métodos de rastreo diagnóstico tradicionales. En estos trabajos se demuestra de forma clara la superioridad de la citometría de flujo respecto a la citología convencional (en términos sobre todo de sensibilidad) a la hora de detectar células B aberrantes/clonales en muestras de sangre periférica de sujetos con linfocitosis absoluta y/o relativa y en muestras de líquido céfaloorraquídeo (LCR) de pacientes con SLPC-B con sospecha de infiltración leptomeníngea; por el contrario, la utilidad de la citometría de flujo (respecto de la citología convencional) en el estudio de

muestras de tejido linfoide obtenidas mediante punción-aspiración con aguja fina (PAAF), y su papel en el diagnóstico inicial de los SLPC-B y T en muestras de PAAF *versus* el análisis histológico realizado sobre la pieza de tejido obtenida por biopsia, siguen siendo motivo de controversia en la actualidad. Aún más controvertida es la utilidad del análisis inmunofenotípico realizado sobre muestras obtenidas por PAAF, en la clasificación de los linfomas B y T en los distintos subgrupos diagnósticos establecidos por la OMS, donde de nuevo el análisis histológico/inmunohistoquímico realizado sobre la biopsia escisional es la técnica considerada de referencia.

A favor de la utilidad del análisis inmunofenotípico en la clasificación de los SLPC-B y T (incluidos los linfomas), está la existencia de perfiles fenotípicos característicos de cada una de las distintas entidades; no obstante, hay que tener en cuenta que se observa un grado no deseado de solapamiento entre las diferentes categorías diagnósticas, que hace que el estudio inmunofenotípico mediante citometría de flujo pierda peso respecto a otros criterios y herramientas diagnósticas. En este sentido, puede que se requiera de marcadores adicionales capaces de diferenciar de forma más eficaz las células normales de las neoplásicas, permitiendo a su vez refinar la clasificación de estas últimas. Además, se hace necesario disponer de nuevas estrategias de análisis de los resultados fenotípicos que faciliten una evaluación más objetiva de la eficiencia de un panel de anticuerpos monoclonales concreto, la determinación de los perfiles inmunofenotípicos característicos de estas neoplasias y la definición de utilidad independiente o redundante de un marcador en el contexto del perfil fenotípico global de las células neoplásicas de cada subtipo diagnóstico de SLPC-B o T.

Ante todo lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo doctoral nos hemos propuesto los siguientes **objetivos**:

1.- Evaluar la utilidad de la citometría de flujo en muestras obtenidas por PAAF frente a la citología convencional (asociada o no al análisis histológico/inmunohistoquímico), en el diagnóstico inicial y la clasificación de los SLPC.

2.- Investigar la utilidad del análisis inmunofenotípico de la expresión de proteínas de la familia de las tetraspaninas en el diagnóstico y clasificación de los SLPC-B, tomando como referencia el patrón de expresión de estas proteínas en células B normales.

3.- Diseñar una nueva estrategia metodológica que permita evaluar de forma objetiva la eficiencia de un panel de combinaciones de anticuerpos empleado en la rutina para la clasificación de los subtipos más frecuentes de SLPC-B, proporcionando a la vez información sobre los marcadores más útiles y su contribución relativa a dicha clasificación diagnóstica.

III.- Material, Métodos y Resultados

En esta sección de la memoria se describen los pacientes y los materiales y métodos empleados, así como los resultados obtenidos en relación con cada uno de los objetivos planteados, mediante la inclusión de artículos originales redactados como consecuencia del trabajo realizado. Cada uno de los artículos referidos está precedido de un breve resumen en castellano que facilita una revisión rápida de la información contenida en los mismos. Los artículos incluidos en este apartado son:

3.1.- Flow cytometry immunophenotyping of fine-needle aspiration specimens: utility in the diagnosis and classification of non Hodgkin lymphomas.

Barrena S, Almeida J, García-Macias MC, López A, Rasillo A, Sayagués JM, Rivas RA, Gutiérrez ML, Ciudad J, Flores T, Balanzategui A, Caballero MD and Orfao A.

Histopathology 2011 (en prensa)

3.2.1- Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation.

Barrena S, Almeida J, Yunta M, López A, Fernández-Mosteirín N, Giralte M, Romero M, Perdiguier L, Delgado M, Delgado A, Orfao A, and Lazo PA.

Leukemia (2005) 19, 1376–1383

3.2.2- Discrimination of biclonal B-cell chronic lymphoproliferative neoplasias by tetraspanin antigen expression.

Barrena S, Almeida J, Yunta M, López A, Díaz-Mediavilla J, Orfao A, and Lazo PA.

Leukemia (2005) 19, 1708–1709

3.3.- Automated pattern-guided principal component analysis vs expert-based immunophenotypic classification of B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a step forward in the standardization of clinical immunophenotyping.

Costa ES, Pedreira CE, **Barrena S**, Lecrevisse Q, Flores J, Quijano S, Almeida J, del Carmen García-Macias M, Bottcher S, Van Dongen JJM, Orfao A.

Leukemia (2010) 24, 1927–1933

3.1.- ARTÍCULO 1: Análisis inmunofenotípico mediante citometría de flujo de muestras obtenidas mediante punción-aspiración con aguja fina: utilidad en el diagnóstico y clasificación de los linfomas no Hodgkin.

OBJETIVO: El diagnóstico de los linfomas no Hodgkin (LNH) y otros síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC) en muestras de tejido ha sido durante los últimos años motivo de gran controversia, no existiendo consenso acerca de la utilidad de la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) en el diagnóstico inicial de los SLPC, como técnica independiente de la biopsia del tejido. El objetivo de este trabajo se centró en establecer la utilidad del inmunofenotipo por citometría de flujo en el rastreo diagnóstico y la clasificación de los SLPC-B y T en muestras de tejido linfoide obtenidas mediante PAAF.

MÉTODOS: En el presente trabajo se realizaron análisis inmunofenotípicos mediante citometría de flujo sobre 448 muestras de PAAF, empleando en un primer paso una única combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales conjugados con 4 o 5 fluorocromos distintos -FITC/PE/PerCPCy5.5/APC (y APCCy7)-: CD8, anti-slg λ / CD56, anti-slg κ / CD4, CD19 / CD3 / (CD45). Esta combinación permitía identificar todas las poblaciones celulares presentes en la muestra, incluidas las células patológicas, en el caso de que existieran. En aquellas muestras en las que se detectó la presencia de células patológicas, tras la identificación de la población aberrante, se procedió a ampliar el estudio con diferentes paneles de anticuerpos orientados a caracterizar y clasificar cada subtipo de enfermedad dentro de los distintos subgrupos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). El diagnóstico final de cada paciente -al que se llegó mediante una combinación de distintas técnicas, los datos genéticos y moleculares y la evolución clínica del paciente-, se consideró como el diagnóstico de referencia con el que comparar las distintas técnicas que se utilizaron en este estudio. Posteriormente se procedió a comparar las técnicas inmunofenotípicas con la citología convencional y con la histología, para evaluar la

contribución del análisis inmunofenotípico por citometría de flujo en el diagnóstico inicial y posterior clasificación de los SLPC en las distintas categorías OMS.

RESULTADOS: En términos globales se observó un elevado (93%) grado de concordancia entre los resultados obtenidos por citología convencional e inmunofenotipo por citometría de flujo, así como entre los resultados obtenidos por citología convencional, inmunofenotipo por citometría de flujo e histología (87%).

Del total de muestras discordantes por citología y citometría de flujo (n=22), 68% fueron inicialmente clasificadas correctamente por CMF, correspondiendo la mayoría de ellas a LNH: 7/11 LNH-B y 5/6 LNH-T. Merece destacar que todos los casos inicialmente considerados como LNH-B o LNH-T por citometría de flujo fueron clasificados correctamente con esta técnica, excepto un caso en el que coexistía un clon de células B con un clon de células T, y en el que mediante citometría de flujo únicamente se detectó el clon B. De la misma manera, la mayoría de los casos finalmente diagnosticados como portadores de alguna hemopatía maligna diferente de un linfoma (n=4), fueron también clasificados correctamente por citometría de flujo. El análisis de la sensibilidad y especificidad de ambas técnicas en esta fase diagnóstica reveló que la citometría de flujo tenía una sensibilidad más elevada que la citología convencional en el diagnóstico inicial de LNH (u otra hemopatía) vs. proceso reactivo (PR), mientras que la sensibilidad de la citometría de flujo era ligeramente menor que la de la citología en el diagnóstico de infiltración por tumor sólido.

En cuanto a la comparación entre la citometría de flujo y la histología en la clasificación diagnóstica de los LNH-B, se observó un grado de concordancia global del 74%, correspondiendo el mayor grado de acuerdo al linfoma de células del manto (LCM; 100%), a la leucemia linfática crónica/linfoma linfocítico de células pequeñas (LLC-B/LLBCP; 4/4), al linfoma folicular (LF; 81%), al linfoma B difuso de célula grande (LBDCG; 79%) y al linfoma de Burkitt (LB; 75%). Dentro de los casos discordantes por ambas técnicas, la citometría de flujo confirmó el diagnóstico de referencia en el 56% de los casos, frente al 38% de casos en los que éste correspondía al subtipo

identificado por histología. En términos globales, la citometría de flujo mostró mayor sensibilidad a la hora de establecer el diagnóstico de LF, LBDCG y LB; por el contrario, la sensibilidad de la histología fue claramente superior en los linfomas de la zona marginal (LZM).

CONCLUSIÓN: En conjunto, nuestros resultados muestran un elevado grado de acuerdo entre la citometría de flujo y la citología convencional (junto con la histología en aquellos casos en los ésta se realizó en paralelo) en el estudio diagnóstico de muestras de tejido obtenidas mediante PAAF, con <10% de casos discordantes; estos resultados sugieren que la citometría de flujo debería utilizarse de forma sistemática en el diagnóstico inicial de muestras de PAAF de tejido, mejorando la capacidad diagnóstica de la citología. Con respecto a la clasificación diagnóstica de los LNH-B en los distintos subgrupos de la OMS, nuestros resultados sugieren que la citometría de flujo proporciona información complementaria a la que aporta el estudio histológico, y que sólo se podría plantear obviar la realización de la biopsia del tejido en aquellos casos en los que el diagnóstico final fuera de LLC-B/LLBCP o LCM.

Flow cytometry immunophenotyping of fine-needle aspiration specimens: utility in the diagnosis and classification of non-Hodgkin lymphomas

Susana Barrena,¹ Julia Almeida,¹ María Del Carmen García-Macias,² Antonio López,¹ Ana Rasillo,¹ Jose María Sayagués,¹ Rosa Ana Rivas,¹ María Laura Gutiérrez,¹ Juana Ciudad,¹ Teresa Flores,² Ana Balanzategui,³ María Dolores Caballero⁴ & Alberto Orfao¹

¹Servicio General de Citometría, Departamento de Medicina and Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, ²Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain, ³Unidad de Biología Molecular, Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain, and ⁴Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

Date of submission 22 April 2010

Accepted for publication 13 September 2010

Barrena S, Almeida J, García-Macias M D C, López A, Rasillo A, Sayagués J M, Rivas R A, Gutiérrez M L, Ciudad J, Flores T, Balanzategui A, Caballero M D & Orfao A

(2011) *Histopathology*

Flow cytometry immunophenotyping of fine-needle aspiration specimens: utility in the diagnosis and classification of non-Hodgkin lymphomas

Aims: To establish the utility of flow cytometry (FCM) for screening and diagnosis of B cell non-Hodgkin lymphoma (B-NHL) from lymphoid tissue samples obtained by fine-needle aspiration (FNA).

Methods and results: We compared prospectively FCM versus cytology/histology analysis of FNA samples for the diagnostic screening and further World Health Organization (WHO) subclassification of B-NHL. FCM and cytology showed a high degree of agreement (93%); however, diagnosis of reactive processes (RP), B-NHL and T-NHL by FCM showed higher sensitivity than cytology (92–100% versus 64–94%, respectively), without false positive NHL cases. The antibody combination used did not allow a positive diagnosis of Hodgkin lymphoma as distinct from a RP. A high concordance rate was found between FCM and histo-

pathology (74%) in subtyping B-NHL. In this regard, mantle-cell lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma showed the highest degree of agreement (100% concordant rates). In turn, FCM showed higher sensitivity/specificity in classifying follicular lymphoma (FL) and large B cell lymphomas, while the opposite occurred for marginal-zone and lymphoplasmacytic lymphomas.

Conclusions: FCM enhances the diagnostic ability of FNA cytology, playing a crucial role in a rapid and accurate differential diagnosis between RP, B-NHL and T-NHL. In addition, immunophenotyping of FNA samples contributes to a more precise subclassification of B-NHL when combined with histopathology and genetic/molecular data.

Keywords: B cell non-Hodgkin lymphoma, cytology, fine-needle aspiration, flow cytometry, histology, WHO classification

Abbreviations: AML, acute myeloid leukaemia; BL, Burkitt's lymphoma; B-CLPD, B cell chronic lymphoproliferative disorders; B-NHL, B cell non-Hodgkin lymphoma; CLL/SLL, B cell chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma; CSF, cerebrospinal fluid; cyt, cytoplasmic; DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; FCM, flow cytometry; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; FL, follicular lymphoma; FN, false negative cases; FNA, fine-needle aspiration; HL, Hodgkin lymphoma; LBCL, large B cell lymphoma; LPL, lymphoplasmacytoid lymphoma;

Address for correspondence: Professor A Orfao MD, PhD, Centro de Investigación del Cancer, Paseo de la Universidad de Coimbra S/N, 37007 Salamanca, Spain. e-mail: orfao@usal.es

mAb, monoclonal antibody; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue; MCL, mantle cell lymphoma; MFI, mean fluorescence intensity; NHL, non-Hodgkin lymphoma; nMZL, nodal marginal zone lymphoma; NPV, negative predictive value; PB, peripheral blood; pDCN, plasmacytoid dendritic cell neoplasm; PCR, polymerase chain reaction; PCM, plasma cell malignancy; pDCN, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm; PLL, polymphocytic leukaemia; PPV, positive predictive value; RP, reactive processes; SMZL, splenic marginal zone lymphoma; ST, solid tumour; tFL, transformed follicular lymphoma; T-NHL, T cell non-Hodgkin lymphoma; TP, true positive cases; T-ALL, T cell acute lymphoblastic leukaemia

Introduction

Diagnosis and classification of malignant lymphoma into World Health Organization (WHO) categories are essential steps in the clinical management of chronic B cell leukaemias and lymphomas.¹ For decades now, fine-needle aspiration (FNA) cytology has been proposed as a useful tool for the diagnostic screening of patients with easily accessible enlarged lymph nodes for early, cost-effective distinction between benign/reactive and malignant disease conditions.^{2–15} More recently, combined usage of cytology and flow cytometry (FCM) immunophenotyping analysis of FNA samples has been found to contribute to an improved classification of B cell non-Hodgkin lymphomas (B-NHL) into WHO categories, especially for low-grade B cell lymphomas.^{11–13,16–20} In contrast, the accuracy of FNA alone versus excisional biopsy for both primary diagnosis and classification of malignant lymphoma remains controversial.^{21–24} Although many studies have reported concordance rates between FNA studies and histology of >80% (range: 76–97%),^{6,10,12,13,16,18,19,25–31} it is recommended that analysis of FNA samples should not replace tissue biopsy studies, because of the existence of false negative cases in all reported series. In turn, very heterogeneous results have been reported regarding the contribution of FNA studies versus lymph node histology for the diagnostic subclassification of B-NHL with concordance rates of between <50% and 87%, depending upon the type of lymphoma;^{12,13,16–20,28} in this regard, FNA-based studies are considered frequently to be of limited utility for the classification of lymphoma, because they do not provide information on the histology of the tumour.^{24,32–34} Thus, at present no consensus agreement exists about the precise utility of FNA evaluation for the diagnosis and subclassification of malignant lymphoma. Although it is clear that in many instances it may obviate the need for tissue biopsy, these situations have not been established precisely, with a few exceptions (i.e. for documenting disease recurrence, assessment of transformation into a higher tumour grade and when open biopsy is impractical).^{2,5,7,30,35} In addition, the information

about the independent value of FCM immunophenotyping versus conventional cytological analyses of FNA samples on the diagnostic screening of lymphoma is limited,^{13,20,25,36,37} as most reports have focused upon the utility of FNA cytology combined with FCM versus histopathology.

In this study, we evaluated prospectively the potential contribution of FCM immunophenotyping (versus conventional cytological and histological studies) in the diagnostic screening of FNA samples, and in further subclassification of B-NHL into specific WHO categories.

Material and methods

PATIENTS AND SAMPLES

A total of 448 consecutive FNA samples from 400 patients – 213 males (53%) and 187 (47%) females – were studied prospectively in parallel at both the Cytometry and Pathology Services of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain), between February 2002 and October 2007. The mean age of patients at the time of entering the study was 53 ± 22 years (range 3–96 years); 321 cases were analysed at diagnosis and 79 (all corresponding to patients diagnosed previously with NHL) were studied at relapse ($n = 77$) or at disease progression ($n = 2$). In most patients ($n = 374$) only one sample was studied while two, three and four samples were analysed in 18, six and two cases, respectively. According to the final diagnosis, samples were distributed as follows: reactive process (RP), 155; Hodgkin lymphoma (HL), 29; B-NHL, 132; T-NHL, 12; solid tumour (ST), 49; plasma cell malignancy (PCM), 14; acute myeloblastic leukaemia (AML), 2; T cell acute lymphoblastic leukaemia (T-ALL), 5; and blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (pDCN), 1. The remaining 49 samples were not evaluable by flow cytometry ($n = 14$) and/or conventional cytology ($n = 46$).

Most specimens ($n = 370$) were lymph node FNA samples, while the remaining 78 specimens corresponded to subcutaneous ($n = 38$), breast ($n = 8$) and thyroid nodules ($n = 5$), mediastinal ($n = 5$), abdomi-

nal ($n = 3$), renal ($n = 2$), palate ($n = 2$), pulmonary, retroperitoneal, parotid, ocular orbit, scapular, inguinal, thigh and infratemporal-sphenoidal masses ($n = 1$, each), a hepatic nodule and suprahyoid, urinary tract, testis, transbronchial, gum and sternal lesions ($n = 1$, each). Each sample was collected after informed consent was given by each patient and the study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Salamanca.

CYTOMORPHOLOGICAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL ANALYSES

FNA specimens were collected by an experienced cytopathologist using 20-ml syringes equipped with a syringe holder and a 23-gauge needle (0.6×25 mm), as described elsewhere.^{16,38–40} Either two or three air-dried, ethanol-fixed smears were stained from each FNA sample using Papanicolaou and/or haematoxylin-eosin (H&E)^{41–44} for conventional cytological analyses. Whenever indicated, immunocytochemistry was performed for disease classification after smears had been fixed with methanol and stained, with appropriate monoclonal antibodies (mAb) as described previously⁴⁵ (Table S1b). All slides were assessed by an experienced cytopathologist.

IMMUNOPHENOTYPIC STUDIES

Half of each FNA specimen was placed in 1 ml of a sterile saline solution, and processed immediately for further FCM immunophenotyping. Briefly, samples (100 μ l) were stained using a direct immunofluorescence stain-and-then-lyse technique, described previously in detail,⁴⁶ with the following four or five-colour combination of seven (or eight) fluorochrome-conjugated mAb – fluorescein isothiocyanate (FITC)/phycoerythrin (PE)/peridinin chlorophyll protein (PerCP)/allophycocyanin (APC) [(and allophycocyanin-cyanin7 (APCCy7)] (screening tube) – CD8, anti-sIg λ /CD56, anti-sIg κ /CD4, CD19/CD3/(CD45) (Table S1a). In addition to the mAb reagents, 100 μ l of premixed Perfect Count™ beads (Cytognos SL, Salamanca, Spain) were added to each stained specimen immediately prior to FCM measurement in order to calculate absolute cell counts.^{47,48} After staining, samples were run at low speed on either a FACSCalibur or a FACSCantoII flow cytometer (Becton/Dickinson Biosciences, San José, CA, USA; BDB), and information stored about all events corresponding to nucleated cells present in the sample. For data analysis, the INFINICYT™ software program (Cytognos SL, Salamanca, Spain) was used.

Antigen expression was used to identify the different types of cells present in the sample and were classified as negative (–), dimly positive (+d), positive (+) and strongly positive (++) using arbitrary relative linear mean fluorescence intensity (MFI) cut-off values of 1–5, 5–10¹, 10¹–10² and >10² (data obtained with the FACSCalibur analogical flow cytometer; scale range: 10⁰–10⁴ and of 0–10², 10²–10³, 10³–10⁴ and >10⁴ (data obtained with the FACSCantoII digital flow cytometer; scale range: 0–264, 144). FCM B cell (mono)clonality was defined by a sIg κ /sIg λ ratio of either >3 or <0.5.^{17,31} T cell (mono)clonality was suspected by FCM whenever a CD4/CD8 ratio >4 or <0.7 was found, a major CD4⁺/CD8⁺ or CD4[–]/CD8[–] T cell population was detected, and/or an otherwise aberrant T cell population was identified (e.g. underexpression of CD3 or CD4). For those samples where presence of an aberrant/clonal cell population was suspected, the study was extended, with additional disease-orientated panels of reagents (Table S1a), to confirm the immunophenotypic diagnosis. To classify B-NHL into specific disease categories according to the immunophenotypic pattern of clonal B cells, recommended criteria according to the WHO classification¹ were followed, together with previous data reported by our group;^{46,49} for example, the differential phenotypic profile for CD10, cytbc12 and CD38 is useful to distinguish BL (CD10⁺/++/cytbc12^{–/+d}/CD38⁺⁺), FL (CD10⁺/++/cytbc12⁺⁺/CD38^{+d}) and DLBCL (CD10^{–/+}/cytbc12^{–/+d}/CD38^{+d}).

HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSES

Lymph node excision or biopsies from extranodal tissues were performed in 161 samples from 148 patients. Briefly, tissue specimens were fixed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin and sliced into 3- μ m sections. Afterwards, specimens were stained with H&E and evaluated with an optical microscope (Nikon Y-THM, Tokyo, Japan) using conventional approaches. Whenever appropriate, tissue sections were also stained by conventional immunohistochemistry (immunoperoxidase technique)⁵⁰ using an immunostainer (Vision Biosystem, Newcastle, UK), with the mAbs listed in the immunohistochemistry section of Table S1b. Appropriate positive and negative controls were used in parallel. Two experienced pathologists evaluated the slides routinely; in addition, in case of any discrepancy (between histology, FCM and/or cytology), specimens were reviewed further a third time and, whenever required, frozen tissue sections restained to confirm the histological diagnosis.

ANALYSIS OF TCR AND IGH GENE REARRANGEMENTS

In those samples in which discrepant diagnostic findings were obtained between FCM, cytology and/or histology and either B or T cell clonality was suspected by one or more methods, TCRG and IGH gene rearrangements were assessed by well-established polymerase chain reaction (PCR) techniques⁵¹ using the BIOMED-2 TCRG⁵² and combined IGH and IGK gene-based probes and protocols, respectively.⁵³

INTERPHASE FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION (iFISH) STUDIES

Analysis of the genetic abnormalities associated with B-NHL or other B cell chronic lymphoproliferative disorders (B-CLPD) was performed using multicolour iFISH techniques which have been described in detail previously.^{54,55} The specific probes used for the detection of trisomy 12, del(11q22.3), del(11q23), del(17p13.1), del(6q21), del(7q) and del(13q14.3), as well as 14q32 gene rearrangement, t(11;18)(q21;q21), t(14;18)(q32;q21), t(11;14)(q13;q32), t(8;14)(q24;q32), c-MYC and BCL6 gene rearrangements, are shown in Table S1b.

STATISTICAL METHODS

Relative frequencies and median, mean, standard deviation (SD), range and the 25th and 75th percentiles were calculated using the SPSS version 15.0 software program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) for categorical and continuous variables, respectively. Either the Mann–Whitney *U*-test or the Kruskal–Wallis test were used to determine the statistical significance of the differences observed between two or more groups for non-paired continuous variables. *P*-values ≤ 0.05 were considered to be statistically significant.

The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were calculated using a subset of 167 cases which were analysed in parallel by cytology, flow cytometry and histopathology and, whenever required for the classification of the disease, also by cytogenetics/molecular techniques and clinical follow-up ($n = 48$). Among other cases, this series included 82 patients with CLPD in which additional clinical/follow-up information was available for subclassification into specific WHO categories. Sensitivity was calculated as TP/TP + FN (TP: true positive cases; FN: false negative cases), specificity as TN/TN + FP (TN: true negative cases; FP: false positive cases), PPV as TP/TP + FP and NPV as TN/TN + FN.

Results

The vast majority (89%) of all 448 FNA samples investigated ($n = 399$ samples from 364 patients) were considered to be informative by both cytology and FCM immunophenotyping (mean number of cells analysed by FCM: $2.2 \times 10^6 \pm 3.5 \times 10^6$; range 4.2×10^2 – 32×10^6). The other 49 (11%) samples, corresponding to 36 patients, could not be evaluated due to insufficient material or peripheral blood (PB) contamination; from them, three samples were not evaluable from these patients by FCM, 35 were not adequate for cytological analyses and 11 samples could not be analysed by both techniques.

DIAGNOSTIC SCREENING OF FNA: FCM IMMUNOPHENOTYPING VERSUS CONVENTIONAL CYTOLOGY

A concordant diagnosis between conventional cytology and FCM immunophenotyping was obtained in 372 of 399 FNA samples (93%) (Data S1); in 161 of the total 399 samples, diagnosis was confirmed further by histological studies; among these, full concordance between cytology, histology and FCM was found in 140 patients (87% of all specimens analysed with histology) (Table 1).

A detailed description of the distribution of lymphocyte subsets in lymph node FNA samples with concordant diagnosis ($n = 323$) for the different diagnostic categories is shown in Figure S1.

In the remaining 27 FNA samples (7%) corresponding to 22 patients, discordant results were reported by FCM versus cytology and/or histology (Table 2). Overall, 15 of 22 discordant cases (68%) were initially classified correctly by FCM, while in the remaining seven cases the final diagnosis was concordant with that of either cytology and/or histology; the most discordant cases ($n = 20$) had a final diagnosis of NHL (11 B-NHL and four T-NHL) or other haematological malignancies ($n = 5$); the remaining two cases corresponded to a final diagnosis of HL (Table 2). Among those 27 discordant samples, in seven of 11 cases diagnosed with B-NHL (62%; cases 6–12 in Table 2), final diagnosis of B-NHL was confirmed confirmed, as correctly suspected by FCM, but not by cytology. In the remaining four of 11 discordant B-NHL cases, FCM results were consistent with RP (cases 2, 3 and 4 in Table 2) or RP versus ST (case 5 in Table 2), but compatible with B-NHL by cytological and histological studies; unfortunately, in these four latter cases clonality could not be confirmed by PCR/FISH analyses. In turn, the most discordant T-NHL cases (five of six)

Table 1. Distribution of samples showing concordant results by screening flow cytometry (FCM) immunophenotyping and conventional cytology according to diagnosis

Diagnosis	No. of FNA samples/ total samples (%)
RP or HL	181/184 (98%)
Type I lymphadenitis	35/35*
Type II lymphadenitis	36/37*
Other reactive processes	83/83*
HL	27/29*
B-NHL	121/132 (92%)
T-NHL	6/12 (50%)
ST	47/49 (96%)
PCM	11/14 (79%)
AML	1/2 (50%)
T-ALL	5/5 (100%)
pDCN	0/1 (0%)
Total samples	372/399 (93%)

Results expressed as number of concordant samples/total samples (percentage between brackets) within each diagnostic group. *Unclassifiable by FCM.

FCM, flow cytometry; FNA, fine-needle aspirate sample; RP, reactive process; HL, Hodgkin's lymphoma; B-NHL, B-cell non-Hodgkin lymphoma; T-NHL, T-cell non-Hodgkin lymphoma; ST, solid tumor; PCM, plasma cell malignancy; AML, acute myeloid leukemia; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia; pDCN, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm.

were classified correctly by FCM, with a negative cytology (Table 2). Thus, it should have emphasized that all cases classified initially by FCM as B-NHL and T-NHL were finally considered to have B- and T-NHLs respectively. The only exception was case 11, in which coexistence of B- and T-NHL was detected by cytology/histology and confirmed by molecular techniques, while only the B cell clone could be detected by FCM (Table 2). Similarly, the initial diagnosis made by FCM was confirmed in all other cases with a haematological malignancy other than NHL (i.e. AML, PCM and pDCN). In the remaining discrepant case (case 17) the correct diagnosis was not suspected by FCM (diagnosis of ST was established while a RP was suspected by FCM). It is noteworthy that in none of the FNA samples, small populations of B-NHL/clonal B cells

that could reflect 'false positive' results by immunophenotyping (similar to monoclonal B cell lymphocytosis in PB samples, for example), were detected.⁵⁶

In order to evaluate more precisely the utility of FCM versus conventional cytology for the diagnostic screening of FNA samples, we compared the sensitivity and specificity (and their corresponding predictive values) of both approaches in a subset of 167 samples (including 82 B-NHL/B-CLPD) in which complete histological, molecular/genetic, clinical and/or outcome data were available (Table 3). Overall, the sensitivity of FCM for the diagnosis of RP was higher than that of conventional cytology (100% versus 94%, respectively), with similar specificity (96% versus 94%, respectively; Table 3). However, it should be noted that the FCM screening multicolour combination of mAb tested was not useful for the specific diagnosis of HL; consequently, FCM immunophenotyping could not distinguish HL infiltration from reactive lymph nodes and the former cases were thus classified together with RP by FCM. In addition, FCM was clearly more sensitive than conventional cytology for the diagnostic screening of CLPD (sensitivity of 96% versus 94% for B-NHL and of 92% versus 64% for T-NHL, respectively), while both approaches showed similar specificities (Table 3). Similarly, the specificity of FCM for the diagnosis of ST was 100%, although its sensitivity decreased to 95% versus 100% by conventional cytology (Table 3, upper panel).

ROLE OF FCM IMMUNOPHENOTYPING OF FNA SAMPLES VERSUS HISTOPATHOLOGY IN THE SUBCLASSIFICATION OF B-NHL INTO WHO CATEGORIES

A total of 82 FNA samples from 71 patients with an established diagnosis of B-CLPD who had complete clinicobiological, haematological, histopathological, immunophenotypic and molecular/genetic data at diagnosis were included in this part of the study. For these cases the overall concordance rate between FCM and conventional histology was 74% (61 of 82), with the following distribution according to specific WHO categories: follicular lymphoma (FL), 25 of 31 (81%) cases; diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), 15 of 19 (79%); mantle cell lymphoma (MCL), nine of nine (100%); B cell chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL), four of four; Burkitt lymphoma (BL), 3/4; lymphoplasmacytoid lymphoma (LPL), 3/5; mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-lymphoma, one of three; prolymphocytic leukaemia (PLL), one of one splenic marginal zone lymphoma (sMZL), one of one (case) and nodal

Table 2. Discordant results between flow cytometry (FCM), conventional cytology and histopathology at diagnostic screening

Case no.	Age/Sex	Final diagnosis	FCM	Cytology	Histological diagnosis	PCR/FISH
1	35/M	RP	RP	ST	RP	–
2	74/M	B-NHL *	RP	ST versus NHL	B-NHL	Inconclusive
3	85/F	B-NHL *	RP	NHL	B-NHL	Inconclusive
4	19/F	B-NHL *	RP	RP	B-NHL	–
5	80/M	B-NHL *	RP versus ST	RP	B-NHL	Inconclusive
6	79/M	B-NHL	B-NHL	RP	–	Clonal B cells
7	88/F	B-NHL	B-NHL	RP	–	Inconclusive
8	41/F	Clonal B cells	Clonal B cells	RP	RP	Clonal B cells
9	73/F	HL + B-NHL	B-NHL	NHL	HL	nuc ish (<i>IGH</i> ×3), (<i>BCL2</i> × 3), (<i>IGH</i> con <i>BCL2</i> × 2) Clonal B cells
10	71/M	ST + B-NHL	ST + B-NHL	ST	ST	No genetic abnormalities Numerical alterations in ST cells
11	74/M	B-NHL + T-NHL	B-NHL	NHL	T-NHL	Clonal B cells + TCRβ ⁺
12	73/F	B-NHL + T-NHL	B-NHL + T-NHL	NHL	T-NHL	Clonal B cells + TCRβ ⁺
13	75/F	T-NHL	T-NHL	NHL	B-NHL	TCRβ ⁺
14	36/M	T-NHL	T-NHL	RP	T-NHL	TCRβ ⁺
15	77/M	T-NHL	T-NHL versus RP	NHL	T-NHL	TCRβ ⁺
16	73/F	HL + T-NHL	T-NHL	HL	HL	TCRβ ⁺
17	80/F	ST	RP	ST	–	–
18	64/M	PCM	RP	Suggestive of PCM	–	–
19	48/M	PCM	PCM	RP	–	–
20	58/M	PCM	PCM	RP	–	–
21	47/M	AML	AML	RP	Granulocytic sarcoma	–
22	44/F	pDCN	pDCN	Granulocytic sarcoma	Granulocytic sarcoma	–

*Final diagnosis was established on the basis of both histopathological features (CD20⁺/Ki67^{+/++} large cells, usually showing diffuse pattern of tissue infiltration) and clinical follow-up. Neither kappa/lambda analysis by immunohistochemistry nor molecular/genetic evaluations were conclusive.

FCM, flow cytometry; PCR, polymerase chain reaction; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; M, male; F, female; RP, reactive process; ST, solid tumor; AML, acute myeloid leukemia; PCM, plasma cell malignancy; pDCN, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm; HL, Hodgkin's lymphoma; B-NHL, B-cell non-Hodgkin lymphoma; T-NHL, T-cell non-Hodgkin lymphoma; –, not determined.

Table 3. Sensitivity (PPV) and specificity (NPV) of flow cytometry [FCM versus conventional cytology for the diagnostic screening of FNA samples from patients with a complete diagnostic work up ($n = 167$) (upper panel)], including the specific classification of B-NHL/B-CLPD samples ($n = 82$) into specific World Health Organization (WHO) disease entities (lower panel)

	Sensitivity (PPV)		Specificity (NPV)	
	FCM (%)	Cytology (%)	FCM (%)	Cytology (%)
RP	100 (77)	94 (64)	96 (100)	94 (99)
HL	NA	94 (100)	0 (89)	100 (99)
T-NHL	92 (100)	64 (100)	100 (99)	100 (98)
ST	95 (100)	100 (95)	100 (99)	99 (100)
B-NHL	96 (100)	94 (100)	100 (92)	100 (92)
Total	83 (100)	90 (99)	100 (40)	94 (51)
WHO subgroups of B-NHL	FCM (%)	Histology (%)	FCM (%)	Histology (%)
FL	94 (100)	87 (96)	100 (96)	98 (93)
DLBCL	100 (95)	79 (75)	98 (100)	92 (93)
MCL	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)
BL	100 (80)	75 (60)	99 (100)	97 (99)
Other B-CLPD	71 (92)	93 (81)	98 (93)	96 (96)

FCM, flow cytometry; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; RP, reactive process; HL, Hodgkin's lymphoma; B-NHL, B-cell non-Hodgkin lymphoma; FL, follicular lymphoma; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; MCL, mantle cell lymphoma; BL, Burkitt's lymphoma; T-NHL, T-cell non Hodgkin lymphoma; ST, solid tumor; CLPD, chronic lymphoproliferative disorder.

marginal zone lymphoma (nMZL) none of three. The remaining two samples corresponded to the CLL/SLL-like clone from case 8 (see Table 4) and to the BL-like clone from case 6 (see Table 4); both B cell populations were detected by FCM but not by histology.

Discrepant results were observed between FCM and histopathology in 21 FNA samples (26%), corresponding to 18 patients (Table 4). Discordant diagnoses corresponded to FL ($n = 6/31$, 19%), BL ($n = 1/4$), nMZL ($n = 3/3$), MALT lymphoma ($n = 2/5$), sMZL ($n = 1/1$), DLBCL ($n = 4/19$, 21%) and LPL ($n = 2/5$ cases). Three of six discrepant FL cases (cases 3, 4 and 5) were classified correctly by FCM, while diagnosed as DLBCL by histology. Despite this, the three cases showed a diffuse growth pattern and a relatively high Ki67 expression. In addition to the presence of a typical phenotypic pattern of FL ($CD10^{+}/cytbc12^{+}/CD38^{+}$) in the samples analysed, by both histology and FCM in parallel, a histological diagnosis of FL made in other enlarged lymph nodes, together with the patient behaviour during follow-up, were definitive to classify case 3 as FL, while the presence of $t(14;18)^{+}$ (in the absence of BCL6 gene rearrange-

ments) in all tumour cells supported the diagnosis of FL in cases 4 and 5. In another two discrepant FL cases (cases 1 and 2), the opposite happened. However, it should be noted that these latter two cases (cases 1 and 2, Table 4) displayed an atypical FL phenotype (e.g. the presence of CD10 without overexpression of cytbc12 in case 2), and genetic features, e.g. the absence of $t(14;18)$. The other case (case 6) was a relapsed FL with $t(14;18)$ in the absence of c-MYC gene rearrangements, which was diagnosed as compatible with BL by both histology and FCM. One BL case with c-MYC gene rearrangements was suspected correctly by FCM but not by histology (case 7, Table 4). Similarly, all discrepant sMZL (case 13, Table 4), LPL (cases 17 and 18, Table 4) and DLBCL cases (cases 14 and 15, Table 4) were suspected correctly by FCM. Conversely, with the extended B cell characterization panel of mAbs used, FCM could not specifically assign three of three nMZL (cases 8–10, Table 4) and two of three MALT lymphomas (cases 11 and 12, Table 4) into specific small-cell WHO diagnostic categories, and could simply exclude diagnosis of other WHO B-NHL subtypes (Table 4).

Table 4. Subclassification of B-NHL into World Health Organization (WHO) diagnostic categories: discordant results between FCM and histopathology

Case no.	Age/sex	Final diagnosis	FCM diagnosis	Histopathological diagnosis	iFISH cytogenetics	iFISH probes tested
1	33/M	FL	NHL (FSC/SSC ^{intermediate})*	FL	nuc ish (<i>BCL6</i> × 3) [48/200] nuc ish (<i>IGH</i> × 2)(5')/ <i>IGH</i> sep 3'/ <i>IGH</i> × 1 [42/110]	LSI <i>BCL6</i> , LSI <i>IgH</i> /MYC/CEP8, LSI <i>IgH</i> , LSI <i>IgH</i> /CCND1, LSI <i>IgH</i> /BCL2, LSI <i>MALT1</i>
2	44/M	FL	NHL (FSC/SSC ^{low})+	FL	No abnormalities	LSI MYC, LSI <i>IgH</i> /BCL2
3	50/M	FL	FL	DLBCL	nuc ish (<i>MALT</i> × 3) [40/100]	LSI <i>BCL6</i> , LSI <i>IgH</i> /BCL2, LSI <i>MALT1</i>
4	47/F	FL	FL	DLBCL	nuc ish (<i>IGH</i> × 3), (<i>BCL2</i> × 3), (<i>IGH</i> con <i>BCL2</i> × 2) [47/116]	LSI <i>BCL6</i> , LSI <i>IgH</i> /MYC/CEP8, LSI <i>IgH</i> /BCL2
5	69/M	FL	FL versus tFL	DLBCL	nuc ish (<i>IGH</i> × 3), (<i>BCL2</i> × 3), (<i>IGH</i> con <i>BCL2</i> × 2) [86/100]	LSI <i>IgH</i> /BCL2, LSI <i>BCL6</i>
6†	76/M	tFLS	FL + BL	BL	nuc ish (<i>IGH</i> × 3), (<i>BCL2</i> × 3), (<i>IGH</i> con <i>BCL2</i> × 2) [52/100]	LSI <i>IgH</i> /MYC/CEP8, LSI <i>IgH</i> /BCL2
7	72/F	BL	BL	DLBCL	nuc ish (<i>C-MYC</i> × 3) [81/100]	LSI <i>BCL6</i> , LSI MYC, LSI <i>IgH</i> /MYC/CEP8
8†	82/M	nMZL	CLL + NHL	MZL	i nuc ish (<i>CCND1</i> × 3) [74/100] ii idem (<i>IGH</i> × 4), (<i>MALT-1</i> × 6) [63/100] iii idem (<i>IGH</i> , <i>MALT-1</i>) × 5 [15/100]	LSI <i>IgH</i> /CCND1, LSI <i>IgH</i> /BCL2
9	60/F	nMZL	NHL (FSC/SSC ^{intermediate})*	MZL	No abnormalities	LSI D7S486/CEP7 (7q31/7P11.1-q11.1), LSI <i>IgH</i> /BCL2
10	58/F	nMZL	NHL*	MZL	No abnormalities	LSI <i>IgH</i> , LSI <i>IgH</i> /BCL2
11	67/F	MALT Lymphoma	DLBCL	MALT Lymphoma	No abnormalities	LSI <i>IgH</i> /BCL2
12	62/M	MALT Lymphoma	NHL*	MZL	nuc ish (<i>IGH</i> , <i>BCL2</i>) × 3 [16/100]	LSI <i>IgH</i> /CCND1, LSI <i>IgH</i> /BCL2, LSI <i>MALT1</i> ,
13	61/M	sMZL	sMZL	MALT Lymphoma	nuc ish (<i>BCL6</i> , <i>MALT1</i>) × 3 [13/100], [22/200]	LSI <i>BCL6</i> , LSI <i>IgH</i> /CCND1, LSI <i>API2</i> /MALT1, LSI <i>IgH</i> /BCL2
14	74/M	DLBCL	DLBCL	FL GRADE II	i nuc ish (<i>BCL6</i> × 3) [30/200], ii idem (<i>BCL6</i> × 4) [102/200]	LSI <i>BCL6</i> , LSI <i>IgH</i> /MYC/CEP8, LSI <i>IgH</i> /BCL2, LSI <i>MALT1</i>
15	48/M	DLBCL	DLBCL†	BL	No abnormalities	LSI MYC, LSI <i>IgH</i> /CCND1, LSI <i>IgH</i> /BCL2
16	74/F	DLBCL	LBCL	B-CLPD	No abnormalities	LSI <i>IgH</i> /MYC/CEP8

Table 4. (Continued)

Case no.	Age/sex	Final diagnosis	FCM diagnosis	Histopathological diagnosis	iFISH cytogenetics	iFISH probes tested
17	81/M	LPL	LPL versus LBCL	DLBCL	i nuc ish (<i>SEC63</i> × 1), (<i>IGH</i> × 2) (<i>5'IGH</i> sep 3' <i>IGH</i> × 1) [55/98] ii idem (<i>C-MYC</i> × 3) [25/100]	LSI BCL6, 6q21 specific/ α -satellite 6 probe cocktail, LSI IgH, LSI IgH/MYC/CEP8, LSI IgH/BCL2
18	89/F	LPL	LPL	MZL	No abnormalities	LSI IgH/CCND1, LSI IgH/BCL2

The specific loci involved in the translocations analysed are described in the Material and methods section.

*Atypical immunophenotype different from CLL/SLL, mantle cell lymphoma (MCL), hairy cell leukaemia (HCL), FL, BL, DLBCL, sMZL, immunoblastic lymphoma, B lymphoblastic lymphoma and compatible with other B-NHL.

†Different from typical t(14;18) + FL.

‡Two aberrant B cell populations were identified by FCM but not by histopathology.

§Patient diagnosed previously as FL by histology. The FNA sample included in the present study was obtained at relapse.

¶Two samples, both from the same patient diagnosed with DLBCL.

FCM, flow cytometry; NHL, non-Hodgkin lymphoma; FL, follicular lymphoma; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; tFL, transformed follicular lymphoma; BL, Burkitt's lymphoma; CLL/SLL, B-cell chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma; LBCL, large B-cell lymphoma; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue; nMZL, nodal zone marginal lymphoma; sMZL, splenic zone marginal lymphoma; LPL, lymphoplasmacytic lymphoma; B-CLPD, B-cell chronic lymphoproliferative disorder not specified.

Overall, the assignment of B-NHL to specific WHO diagnostic categories provided by FCM (versus histopathology) was confirmed in 10 of 18 discrepant cases (56% versus 38%), corresponding to 12 of 21 samples (57% versus 33%). Accordingly, FCM showed a greater sensitivity (91%; range 94–100%) than histopathology (84%; range 75–100%) for the majority of B-NHL subgroups (Table 3), including FL (94% versus 87%), DLBCL (100% versus 79%) and BL (100% versus 75%). In contrast, the sensitivity of histopathology was higher than that of FCM (67% versus 33%) for MALT and marginal zone lymphomas. In turn, the specificity of FCM was similar to that of histopathology (range 98–100% versus 92–100%, respectively) for all WHO groups of B-NHL (Table 3). Diagnosis of MCL and CLL/SLL was suspected correctly by both FCM and histology in all cases.

Discussion

At present, the contribution of FNA studies to the diagnosis of lymphoproliferative disorders is well established^{6,8,20,27} mainly when FCM is combined with cytology.^{8,12,18,27,28,37,57,58} However, most studies aiming at the assessment of the utility of FNA on primary diagnosis of tissue samples have compared the utility of combining FCM and cytology versus cytology alone,^{11,12} while very few reports have focused on the comparison between FCM alone versus cytology.^{20,36,59} In turn, the efficiency of FNA analyses in the diagnosis and classification of lymphoma without examination of tissue sections remains controversial.^{6,8,14,16,22,26,31,60,61} In the present work we attempted to determine the precise contribution of FCM immunophenotyping applied to the study of FNA samples for both primary diagnosis of enlarged lymphoid and other tissues and further subclassification of B-NHL into specific WHO disease entities.

In a first step we compared FCM versus cytology FNA analysis. In this regard, it should be noted that both techniques could be applied to most samples. However, similar to what has been described for other samples with low/limited cellularity (e.g. CSF),⁴⁸ FCM was applicable to a higher percentage of cases than cytology because of limited numbers of cells for microscopic analyses (data not shown). Among those samples in which the cells present in FNA samples could be evaluated by both techniques, our results showed a high degree of agreement between FCM, after applying the single-screening multicolour tube described here, and FNA cytology (plus histology, whenever available) with <10% discrepant cases. It is noteworthy that diagnosis of most discrepant cases was initially orientated

correctly by FCM, while misclassified by cytology and/or histology, including two-thirds of discrepant B-NHL cases, all discrepant T-NHL and most discrepant haematological malignancies other than NHL. Overall, these results confirm and extend previous observations about the utility of FCM analysis of FNA samples, performed in parallel to conventional cytological and histopathological studies.^{20,31,36,59} Accordingly, even if used alone, FCM immunophenotyping showed a higher efficiency than conventional cytology because of a greater sensitivity in the classification of RP, B-NHL and T-NHL, in the absence of false positive NHL cases. If we take into account that: (i) an approach used as a screening diagnostic tool would ideally have a high sensitivity (to identify all positive cases); (ii) RP and NHL represent the vast majority of cases in whom FNA analysis of enlarged lymph nodes is indicated; and (iii) no false positive T-NHL cases were detected by FCM, it could be concluded that FCM should be performed systematically on FNA samples for diagnostic screening purposes. In addition, to our knowledge this is the first study that shows a higher efficiency of FCM versus conventional cytology/histology in the diagnosis of T-NHL. In fact, with few exceptions,⁶² previous reports have indicated that immunophenotyping is not an adequate approach to diagnose T-NHL and that histopathology should be considered as the gold standard in this regard.^{6,17,18,20,24,27,28,63,64} Conversely, cytological analysis of FNA was superior to FCM in distinguishing HL from reactive lymph nodes at this screening step, since the single multicolour tube used for immunophenotyping of FNA specimens did not allow discrimination between HL infiltration and RP. Based on these data, together with the above referred findings, it could be concluded, as also recommended by others,^{6,14,27,28,37,57,65} that combined usage of FCM immunophenotyping and conventional cytology would be mandatory for the diagnostic screening of FNA samples, since information provided by the two approaches is complementary, and not redundant.

In turn, alternative antibody panels⁶⁶ should also be evaluated to investigate the utility of FCM in distinguishing RP versus HL in FNA samples. The question then remains about when to proceed to perform an excisional biopsy, after diagnostic screening by FCM and conventional cytology had been performed, on a FNA specimen. In this regard, it should be noted that although combined FCM and cytological analysis of FNA samples proved to be able to distinguish reliably between reactive and neoplastic conditions, three of 154 cases diagnosed as having RP by both FCM and cytology (after excluding HL) developed NHL (two B cell and one T cell NHL) after a median follow-up of 5 years

(data not shown). Interestingly, histological analyses performed initially in all three cases were also consistent with RP. In turn, two cases (cases 4 and 5, Table 2) evaluated as RP by both FCM and conventional cytology were diagnosed finally with B-NHL (DLBCL) on histopathological grounds, because of a diffuse pattern of tissue infiltration by CD20⁺/Ki67^{+/++} large cells; although clinical follow-up showed behaviour consistent with NHL, neither B cell clonality at the molecular level nor genetic abnormalities associated to large B cell lymphoma could be demonstrated in both cases (data not shown). These results are in line with previous findings, which indicate that the most common scenario for a false negative FCM result occurs in large B cell lymphomas, as the viability of large neoplastic cells may drop rapidly during processing of FNA specimens^{4,30,31,34} and neoplastic B cells from DLBCL may lack expression of *slg* light chains.^{27,30,67} Therefore, in case of high suspicion of NHL (particularly aggressive B cell NHL), biopsy of lymphoid tissue may be recommended after FNA analysis, even if FCM and conventional cytology are concordant with a diagnosis of RP.

At present, subclassification of B-NHL by FCM immunophenotyping of FNA alone is highly controversial.^{5,7,8,12,13,16,26,27,31,58,65,68} When compared to histopathology analysis (considered as the gold standard), the sensitivity and specificity of immunophenotyping of FNA specimens in subtyping B-NHL into specific WHO disease entities range between 63% and 94% and 88% and 100%, respectively,^{12,13,31,37,58} depending mainly upon the type of lymphoma. In this regard, the specific B-NHL subtypes usually accounting for a higher rate of discrepant cases include DLBCL, transformed FL and other aggressive lymphomas, including BL,^{13,37,58} which is not surprising, as it has been reported that morphology, immunophenotype and even genetics may overlap between DLBCL, BL and FL,⁶⁹ suggesting the existence of a clinicopathological spectrum of some aggressive B cell NHL, which is still not understood completely.

In contrast to most papers published in the literature, in this study we used the final WHO diagnosis (including histopathology, molecular/genetic data and clinical follow-up), instead of the histological diagnosis *per se* as the reference diagnosis to which FCM and cytological/histopathological findings were compared. Despite this, it should be emphasized that FCM diagnoses presented here were made independently of the genetic information provided by iFISH and any other molecular or clinical data. Overall, our results show a relatively high concordance rate between histopathology and FCM, with approximately

one-fourth of cases showing discrepant results. As could be expected, those disease entities where immunophenotyping plays a greater role in their diagnosis (e.g. MCL and CLL) showed the highest concordance rate; this is probably related to the usage of a higher number of immunophenotypic markers by FCM which are of utility in such categories versus the relatively limited IHC antibody panels. In turn, discrepant cases comprised mainly FL, DLBCL and BL (in line with previous studies^{13,37,58}), in addition to marginal-zone and LPL lymphomas. Interestingly, the accuracy of FCM (in terms of both sensitivity and specificity) in classifying FL, DLBCL and BL was higher than that of cytology/histopathology, whereas the latter was more sensitive in the diagnosis of marginal-zone derived NHL. Altogether, these results suggest that both FCM and histology provide complementary information and that only in cases of MCL and CLL/SLL the need for tissue biopsy could be omitted.

In summary, our results show that multiparameter FCM immunophenotyping enhances significantly the diagnostic ability of conventional cytological analysis of FNA, playing a crucial role in a rapid and accurate differential diagnosis between RP, B-NHL, T-NHL and other haematological malignancies. In addition, further more detailed FCM immunophenotype characterization of FNA samples also contributes to a more precise diagnostic subclassification of B-NHL into WHO disease entities when combined with histopathology and genetic/molecular data.

Acknowledgements

This work has been supported partially by the RTICC RD06/0020/0035-FEDER, and FIS 08/90881 grants, from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid, Spain. JM Sayagués is supported by CP05/00321 grant, from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid, Spain.

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL *et al.* WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th edn. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2008.
2. Cafferty LL, Katz RL, Ordóñez NG, Carrasco CH, Cabanillas FR. Fine needle aspiration diagnosis of intraabdominal and retroperitoneal lymphomas by a morphologic and immunocytochemical approach. *Cancer* 1990; **65**: 72–77.
3. Skoog SJ, Evans CP, Hayward IJ, Griffin JL, Hitchcock CL. Flow cytometry of fine needle aspirations of the Sprague–Dawley rat testis: defining normal maturation and the effects of multiple biopsies. *J. Urol.* 1991; **146**: 620–623.
4. Zander DS, Iturraspe JA, Everett ET, Massey JK, Braylan RC. Flow cytometry. In vitro assessment of its potential application for diagnosis and classification of lymphoid processes in cytologic preparations from fine-needle aspirates. *Am. J. Clin. Pathol.* 1994; **101**: 577–586.
5. Dunphy CH, Ramos R. Combining fine-needle aspiration and flow cytometric immunophenotyping in evaluation of nodal and extranodal sites for possible lymphoma: a retrospective review. *Diagn. Cytopathol.* 1997; **16**: 200–206.
6. Zardawi IM, Jain S, Bennett G. Flow-cytometric algorithm on fine-needle aspirates for the clinical workup of patients with lymphadenopathy. *Diagn. Cytopathol.* 1998; **19**: 274–278.
7. Jeffers MD, Milton J, Herriot R, McKean M. Fine needle aspiration cytology in the investigation on non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Pathol.* 1998; **51**: 189–196.
8. Young NA, Al-Saleem TI, Ehya H, Smith MR. Utilization of fine-needle aspiration cytology and flow cytometry in the diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma. *Cancer* 1998; **84**: 252–261.
9. Stewart CJ, Duncan JA, Farquharson M, Richmond J. Fine needle aspiration cytology diagnosis of malignant lymphoma and reactive lymphoid hyperplasia. *J. Clin. Pathol.* 1998; **51**: 197–203.
10. Nicol TL, Silberman M, Rosenthal DL, Borowitz MJ. The accuracy of combined cytopathologic and flow cytometric analysis of fine-needle aspirates of lymph nodes. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000; **114**: 18–28.
11. Landgren O, Porwit MacDonald A, Tani E *et al.* A prospective comparison of fine-needle aspiration cytology and histopathology in the diagnosis and classification of lymphomas. *Hematol. J.* 2004; **5**: 69–76.
12. Zeppa P, Marino G, Troncone G *et al.* Fine-needle cytology and flow cytometry immunophenotyping and subclassification of non-Hodgkin lymphoma: a critical review of 307 cases with technical suggestions. *Cancer* 2004; **102**: 55–65.
13. Bangerter M, Brudler O, Heinrich B, Griesshamner M. Fine needle aspiration cytology and flow cytometry in the diagnosis and subclassification of non-Hodgkin's lymphoma based on the World Health Organization classification. *Acta Cytol.* 2007; **51**: 390–398.
14. Swart GJ, Wright C, Brundyn K *et al.* Fine needle aspiration biopsy and flow cytometry in the diagnosis of lymphoma. *Transfus. Apher. Sci.* 2007; **37**: 71–79.
15. Barroca H, Marques C, Candeias J. Fine needle aspiration cytology diagnosis, flow cytometry immunophenotyping and histology in clinically suspected lymphoproliferative disorder: a comparative study. *Acta Cytol.* 2008; **52**: 124–132.
16. Dong HY, Harris NL, Preffer FI, Pitman MB. Fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis and classification of primary and recurrent lymphoma: a retrospective analysis of the utility of cytomorphology and flow cytometry. *Mod. Pathol.* 2001; **14**: 472–481.
17. Mayall F, Darlington A, Harrison B. Fine needle aspiration cytology in the diagnosis of uncommon types of lymphoma. *J. Clin. Pathol.* 2003; **56**: 821–825.
18. Mourad WA, Tulbah A, Shoukri M *et al.* Primary diagnosis and REAL/WHO classification of non-Hodgkin's lymphoma by fine-needle aspiration: cytomorphologic and immunophenotypic approach. *Diagn. Cytopathol.* 2003; **28**: 191–195.
19. Sigstad E, Dong HP, Davidson B, Berner A, Tierens A, Risberg B. The role of flow cytometric immunophenotyping in improving the diagnostic accuracy in referred fine-needle aspiration specimens. *Diagn. Cytopathol.* 2004; **31**: 159–163.

20. Laane E, Tani E, Bjorklund E *et al.* Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma. *Cytometry* 2005; **64**: 34–42.
21. Hajdu SI, Melamed MR. Limitations of aspiration cytology in the diagnosis of primary neoplasms. *Acta Cytol.* 1984; **28**: 337–345.
22. Carter TR, Feldman PS, Innes DJ Jr, Frierson HF Jr, Frigly AF. The role of fine needle aspiration cytology in the diagnosis of lymphoma. *Acta Cytol.* 1988; **32**: 848–853.
23. Wakely PE Jr. Fine-needle aspiration cytopathology in diagnosis and classification of malignant lymphoma: accurate and reliable? *Diagn. Cytopathol.* 2000; **22**: 120–125.
24. Hehn ST, Grogan TM, Miller TP. Utility of fine-needle aspiration as a diagnostic technique in lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2004; **22**: 3046–3052.
25. Ravinsky E, Morales C, Kutryk E, Chrobak A, Paraskevas F. Cytodiagnosis of lymphoid proliferations by fine needle aspiration biopsy. Adjunctive value of flow cytometry. *Acta Cytol.* 1999; **43**: 1070–1078.
26. Henrique RM, Sousa ME, Godinho MI, Costa I, Barbosa IL, Lopes CA. Immunophenotyping by flow cytometry of fine needle aspirates in the diagnosis of lymphoproliferative disorders: a retrospective study. *J. Clin. Lab. Anal.* 1999; **13**: 224–228.
27. Meda BA, Buss DH, Woodruff RD *et al.* Diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma. The usefulness and limitations of combined fine-needle aspiration cytomorphology and flow cytometry. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000; **113**: 688–699.
28. Liu K, Stern RC, Rogers RT, Dodd LG, Mann KP. Diagnosis of hematopoietic processes by fine-needle aspiration in conjunction with flow cytometry: a review of 127 cases. *Diagn. Cytopathol.* 2001; **24**: 1–10.
29. Bangerter M, Hildebrand A, Griesshammer M. Combined cytomorphologic and immunophenotypic analysis in the diagnostic workup of lymphomatous effusions. *Acta Cytol.* 2001; **45**: 307–312.
30. Gong JZ, Williams DC Jr, Liu K, Jones C. Fine-needle aspiration in non-Hodgkin lymphoma: evaluation of cell size by cytomorphology and flow cytometry. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002; **117**: 880–888.
31. Demurtas A, Accinelli G, Pacchioni D *et al.* Utility of flow cytometry immunophenotyping in fine-needle aspirate cytologic diagnosis of non-Hodgkin lymphoma: a series of 252 cases and review of the literature. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2010 Jul; **18**(4): 311–322.
32. Katz RL. Controversy in fine-needle aspiration of lymph nodes. A territorial imperative? *Am. J. Clin. Pathol.* 1997; **108**: S3–S5.
33. Sandhaus LM. Fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of lymphoma. The next step. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000; **113**: 623–627.
34. Siebert JD, Weeks LM, List LW *et al.* Utility of flow cytometry immunophenotyping for the diagnosis and classification of lymphoma in community hospital clinical needle aspiration/biopsies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000; **124**: 1792–1799.
35. Greer JP, Macon WR, Lamar RE *et al.* T-cell-rich B-cell lymphomas: diagnosis and response to therapy of 44 patients. *J. Clin. Oncol.* 1995; **13**: 1742–1750.
36. Robins DB, Katz RL, Swan F Jr, Atkinson EN, Ordonez NG, Huh YO. Immunotyping of lymphoma by fine-needle aspiration. A comparative study of cytospin preparations and flow cytometry. *Am. J. Clin. Pathol.* 1994; **101**: 569–576.
37. Mathiot C, Decaudin D, Klijanienko J *et al.* Fine-needle aspiration cytology combined with flow cytometry immunophenotyping is a rapid and accurate approach for the evaluation of suspicious superficial lymphoid lesions. *Diagn. Cytopathol.* 2006; **34**: 472–478.
38. Stewart FW. The diagnosis of tumors. *Am. J. Pathol.* 1933; **9**(Suppl): 801–813.
39. Godwin JT. Aspiration biopsy: technique and application. *Ann. NY Acad. Sci.* 1956; **63**: 1348–1373.
40. Cardozo P. The cytologic diagnosis of lymph node punctures. *Acta Cytol.* 1984; **8**: 194–205.
41. Disbrey B, Rack J. *Histological laboratory methods*. London, UK: E. & S. Livingstone, 1970.
42. Bahr GF. Some considerations of basic cell chemistry. *Compendium in cytopreparatory techniques*, 4th edn. Chicago: Tutorials of cytology, 1974; 1–6.
43. Danos M. Fixatives for cytologic use. In Keebler CM, Reagan JW, Wied GL eds. *Compendium on cytopreparatory techniques*, 4th edn. Chicago: Tutorials of cytology, 1976; 7–9.
44. Gubin D. Hematoxylin-and-eosin staining of fine needle aspirate smears. *Acta Cytol.* 1985; **29**: 648–650.
45. Abati A, Fetsch P, Filie A. If cells could talk. The application of new techniques to cytopathology. *Clin. Lab. Med.* 1998; **18**: 561–583.
46. Sanchez ML, Almeida J, Vidriales B *et al.* Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 2002; **16**: 1460–1469.
47. Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A. Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. *AIDS (UK)* 2005; **19**: 261–271.
48. Quijano S, Lopez A, Manuel Sancho J *et al.* Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J. Clin. Oncol.* 2009; **27**: 1462–1469.
49. Menendez P, Vargas A, Bueno C *et al.* Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. *Leukemia* 2004; **18**: 491–498.
50. Sevilla DW, Gong JZ, Goodman BK *et al.* Clinicopathologic findings in high-grade B-cell lymphomas with typical Burkitt morphologic features but lacking the MYC translocation. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; **128**: 981–991.
51. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; **17**: 2257–2317.
52. Evans PA, Pott C, Groenen PJ *et al.* Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007; **21**: 207–214.
53. Bruggemann M, White H, Gaulard P *et al.* Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936. *Leukemia* 2007; **21**: 215–221.
54. Tabernero D, San Miguel JF, Garcia-Sanz M *et al.* Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence *in situ* hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *Am. J. Pathol.* 1996; **149**: 153–161.
55. Quijano S, Lopez A, Rasillo A *et al.* Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA

- ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry* 2008; **74**: 139–149.
56. Nieto WG, Almeida J, Romero A *et al*. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* 2009; **114**: 33–37.
 57. Chhieng DC, Cohen JM, Cangiarella JF. Cytology and immunophenotyping of low- and intermediate-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas with a predominant small-cell component: a study of 56 cases. *Diagn. Cytopathol.* 2001; **24**: 90–97.
 58. Dey P, Amir T, Al Jassar A *et al*. Combined applications of fine needle aspiration cytology and flow cytometric immunophenotyping for diagnosis and classification of non Hodgkin lymphoma. *Cyto J.* 2006; **3**: 24.
 59. Simsir A, Fetsch P, Stetler-Stevenson M, Abati A. Immunophenotypic analysis of non-Hodgkin's lymphomas in cytologic specimens: a correlative study of immunocytochemical and flow cytometric techniques. *Diagn. Cytopathol.* 1999; **20**: 278–284.
 60. Russell J, Orell S, Skinner J, Seshadri R. Fine needle aspiration cytology in the management of lymphoma. *Aust. NZ J. Med.* 1983; **13**: 365–368.
 61. Pontifex AH, Haley L. Fine-needle aspiration cytology in lymphomas and related disorders. *Diagn. Cytopathol.* 1989; **5**: 432–435.
 62. Salameire D, Le Bris Y, Fabre B *et al*. Efficient characterization of the TCR repertoire in lymph nodes by flow cytometry. *Cytometry A* 2009; **75**: 743–751.
 63. Chung J, Gong G, Huh J, Khang SK, Ro JY. Flow cytometric immunophenotyping in fine-needle aspiration of lymph nodes. *J. Korean Med. Sci.* 1999; **14**: 393–400.
 64. Mayall F, Dray M, Stanley D, Harrison B, Allen R. Immunoflow cytometry and cell block immunohistochemistry in the FNA diagnosis of lymphoma: a review of 73 consecutive cases. *J. Clin. Pathol.* 2000; **53**: 451–457.
 65. Gupta R, Naseem S, Kashyap R, Paul L. Role of fine-needle aspirate immunophenotyping by flow cytometry in rapid diagnosis of lymphoproliferative disorders. *Diagn. Cytopathol.* 2007; **35**: 381–385.
 66. Fromm JR, Thomas A, Wood BL. Flow cytometry can diagnose classical hodgkin lymphoma in lymph nodes with high sensitivity and specificity. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009; **131**: 322–332.
 67. Bertram HC, Check IJ, Milano MA. Immunophenotyping large B-cell lymphomas. Flow cytometric pitfalls and pathologic correlation. *Am. J. Clin. Pathol.* 2001; **116**: 191–203.
 68. Mourad WA, al Nazer M, Tulbah A. Cytomorphologic differentiation of Hodgkin's lymphoma and Ki-1+ anaplastic large cell lymphoma in fine needle aspirates. *Acta Cytol.* 2003; **47**: 744–748.
 69. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB *et al*. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2010; **34**: 327–340.

Supporting Information

Additional Supporting information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Relative distribution of T lymphocyte (A–F) and B cell (E–J) subsets in lymph node samples with concordant flow cytometry and cytological diagnosis ($n = 323$) distributed according to final diagnosis (results expressed as percentage of cells from the whole sample).

Table S1. (a) Antibody (Ab) reagents and DNA probes used for the immunophenotypic and genetic characterization of FNA samples, respectively. (b) Antibody (Ab) reagents and DNA probes used for the immunophenotypic and genetic characterization of FNA samples, respectively.

Data S1. Results.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

3.2.1- ARTÍCULO 2.1: Expresión aberrante de tetraspaninas en los síndromes linfoproliferativos crónicos B y su relación con la maduración linfoide B normal.

OBJETIVO: Las tetraspaninas son un grupo de proteínas de membrana con cuatro dominios transmembrana involucradas en procesos de adhesión celular, motilidad y apoptosis, siendo aún desconocidos los mecanismos mediante los cuáles están implicadas en estos procesos. Aunque la expresión de algunas de estas moléculas está limitada a las células linfoides y mieloides, la mayoría de las tetraspaninas están también ampliamente expresadas en muchos tipos celulares no hematopoyéticos.

En la membrana celular, las tetraspaninas están presentes como moléculas libres o interaccionando con otras proteínas, entre las que se incluyen otras tetraspaninas, integrinas, moléculas HLA de clase II, el receptor de células T o varias moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Junto a esta capacidad de interacción con otras múltiples proteínas, la diversidad en la composición de las tetraspaninas les confiere una amplia variabilidad en cuanto a sus propiedades de señalización, y hace que cambios en su patrón de expresión vayan asociados a una redistribución celular en cuanto al estado funcional y/o de desarrollo. Si bien se ha identificado la expresión de niveles alterados de tetraspaninas en distintos tipos de carcinomas, en los que además con frecuencia la baja expresión de algunas de estas moléculas se ha asociado a un peor pronóstico, la información sobre el patrón de expresión de tetraspaninas en síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC)-B sigue siendo limitada.

El objetivo del presente trabajo se ha centrado en analizar la distribución y el patrón de expresión de varias proteínas de la familia de las tetraspaninas y algunos de sus ligandos, tanto en células B normales como neoplásicas, con el fin de establecer su posible utilidad clínica en diferentes subtipos de SLPC-B.

MÉTODOS: Analizamos un total de 84 muestras, de las cuáles 17 correspondían a individuos sanos (9 muestras de sangre periférica, 6 de médula ósea y 2 muestras de ganglio linfático reactivo) y 67 a pacientes de nuevo diagnóstico (41 muestras de sangre periférica, 25 de médula ósea y una muestra de ganglio linfático). De éstos, 55 correspondían a SLPC-B -leucemia linfática crónica B (LLC-B), n=28; leucemia prolinfocítica (LPL), n=1; tricoleucemia (TL), n=2; linfoma de células del manto (LCM), n=3; linfoma de la zona marginal esplénico (LZME), n=1; linfoma de zona marginal extranodal de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), n=5; linfoma folicular (LF), n=2; linfoma B difuso de célula grande (LBDCG), n=1, linfoma de Burkitt (LB), n=2; mieloma múltiple (MM), n=5; gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), n=5; y 12 a leucemia linfoblástica aguda de precursores B (LLA-B).

El análisis inmunofenotípico de las células B de las muestras incluidas en el estudio se realizó mediante citometría de flujo, empleando un panel de anticuerpos monoclonales combinados en 3 o 4 fluorescencias distintas (FITC/ PE/ PerCPCy5.5/ APC): CD63/CD53/CD19 o CD38; CD9/CD37/CD19 o CD38; y CD21/CD81/HLA-DR/CD19 o CD38. En todos los casos, y para cada uno de los antígenos analizados en las células B, la expresión de cada marcador se evaluó en términos de intensidad media de fluorescencia (MFI).

En un total de 72 muestras en las que se evaluó la expresión de la totalidad de los marcadores estudiados, se realizó un análisis de “cluster” con el programa J-Express Pro V2.1 para determinar la posible asociación entre los patrones de expresión de las proteínas analizadas en las distintas neoplasias y su contrapartida normal. Posteriormente, se evaluó el valor predictivo de los patrones de expresión normales de tetraspaninas y otras moléculas relacionadas con ellas, a la hora de clasificar las células B neoplásicas de acuerdo con su estadio madurativo.

RESULTADOS: Comprobamos que los niveles de expresión de las tetraspaninas varían a lo largo de la maduración B, detectándose niveles elevados de CD9 y CD81 en los estadios iniciales de mayor inmadurez (precursores B CD34⁺ y

CD34⁺), en los que por el contrario, los niveles de expresión de CD53 y CD37 son muy bajos; por el contrario, en las células B CD10⁺CD34⁺ la situación es inversa, observándose una disminución de los niveles de expresión de CD9 y CD81 y un aumento de CD53 y CD37, patrón similar al detectado en los linfocitos B maduros de SP, MO y ganglio linfático. En las células plasmáticas que recirculan a la médula ósea desde los tejidos linfoides se observa una pérdida de expresión de CD37, junto a re-expresión de CD9, no mostrando ya estas proteínas un patrón de expresión paralelo de CD53 y CD81, respectivamente.

Si nos centramos en las células B neoplásicas y comparamos su patrón de expresión de tetraspaninas y otras proteínas relacionadas con ellas, con el patrón observado en células B normales, a pesar de que en general discurren paralelamente, se observan diferencias entre ambos grupos. Así, respecto a su contrapartida normal, se detecta sobre-expresión de CD53 y CD37 junto a una disminución significativa de CD81 y expresión aumentada de CD63 en las células B neoplásicas de LLA-B. Lo mismo ocurre en las neoplasias de células B maduras, donde se observa expresión alterada de antígenos concretos en algunos grupos diagnósticos, como por ejemplo niveles anormalmente bajos de CD81 y CD37 y elevados de CD53 en los pacientes con LLC-B/LPL, asociándose estas alteraciones a distinto comportamiento clínico de la enfermedad. De forma similar, se observaron patrones de expresión alterados de CD53 en los linfomas MALT/LZME y la TL.

En términos globales, con el análisis de “cluster” se distinguían claramente tres grupos de neoplasias de células B distintos, respecto a la expresión de tetraspaninas. Estos comprendían las neoplasias de células B inmaduras (LLA-B), las neoplasias de células B maduras (SLPC-B y LNH-B) y las neoplasias de células plasmáticas, agrupándose la mayoría de los pacientes analizados junto con su contrapartida normal. Por otra parte, el uso combinado de cinco tetraspaninas y tres moléculas asociadas a tetraspaninas permitió distinguir las células B normales de las neoplásicas

con una especificidad del 100% y una sensibilidad que variaba entre el 30%-69% en los SLPC-B distintos de la LLC-B y del 100% en la LLA-B y la LLC-B.

CONCLUSIÓN: En conjunto, nuestros resultados muestran la existencia de tres patrones diferentes de expresión de tetraspaninas a lo largo de la maduración de las células B, asociándose la expresión de CD9 y CD81 al estadio de precursor B inmaduro, la de CD37 y CD53 a las células B maduras periféricas y la de CD9 y CD53 a las células plasmáticas que han recirculado a la MO desde los tejidos linfoides secundarios; estos patrones probablemente reflejan las interacciones que se producen en las células B a lo largo de su maduración, de tal manera que la pérdida de CD9 y CD81 en los linfocitos B maduros de la médula ósea podría estar relacionada con la capacidad de migrar de esas células desde la MO a otros tejidos, de acuerdo con la asociación descrita previamente en otros estudios entre la pérdida de algunas de estas proteínas y la ocurrencia de metástasis. Además, la identificación de patrones fenotípicos aberrantes asociados a distintas neoplasias linfoides B pone de manifiesto la utilidad de estas proteínas, junto con otros marcadores asociados a células B, no solo en la clasificación de estas neoplasias, sino también en la detección de enfermedad mínima residual. Aunque seguimos sin conocer el significado exacto de estos fenotipos aberrantes, pensamos que estos podrían reflejar alteraciones genéticas específicas.

Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation

S Barrena^{1,2}, J Almeida^{1,2}, M Yunta¹, A López^{1,2}, N Fernández-Mosteirín³, M Giralt³, M Romero⁴, L Perdiger⁵, M Delgado¹, A Orfao^{1,2} and PA Lazo¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; ²Servicio de Citometría, Universidad de Salamanca and Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ³Servicio de Hematología, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain; ⁴Hematología-hemoterapia, Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid, Spain; and ⁵Servicio de Hematología, Hospital de Alcañiz, Teruel, Spain

Tetraspanin proteins form signaling complexes between them and with other membrane proteins and modulate cell adhesion and migration properties. The surface expression of several tetraspanin antigens (CD9, CD37, CD53, CD63, and CD81), and their interacting proteins (CD19, CD21, and HLA-DR) were analyzed during normal B-cell maturation and compared to a group of 67 B-cell neoplasias. Three patterns of tetraspanin expression were identified in normal B cells. The first corresponded to bone marrow CD10⁺ B-cell precursors (BCP) which showed high expression of CD81 and CD9, low reactivity for CD53 and negativity for CD37. CD10⁺ B-lymphocytes showed downregulation of CD9/CD81 and upregulation of CD53/CD37. Plasma cells showed re-expressed CD9 and down-regulated CD37. Hierarchical clustering analysis of flow cytometry immunophenotypic data showed a good correlation between the tumor differentiation stage and the pattern of tetraspanin expression, with all analyzed individual samples classified into three major groups, independently of their normal or neoplastic origin. Despite this, neoplastic B-cells frequently showed aberrantly high/low expression of the different markers analyzed. Interestingly, in B-cell chronic lymphocytic leukemia, abnormal expression of CD53 and CD9 were associated with different patterns of disease infiltration, which would support the role of these molecules on modulating adhesion and migration of neoplastic B cells.

Leukemia (2005) 19, 1376–1383. doi:10.1038/sj.leu.2403822; published online 2 June 2005

Keywords: tetraspanin; B cells; B-cell neoplasias; B-cell maturation; immunophenotype; flow cytometry

Introduction

Tetraspanin proteins are a group of structurally related membrane proteins involved in cell adhesion^{1–7} motility^{8–16} and apoptosis;¹⁷ the exact mechanisms through which they modulate these processes remains unknown. They have four common transmembrane domains with four, six or eight cysteine residues and a CCG motif in the largest extracellular loop.^{18,19} In all, 25 members have been identified so far. Although the expression of some of these molecules is limited almost exclusively to lymphoid or myeloid cells (eg CD37), most tetraspanin are widely expressed in many non, hematopoietic cell types (eg CD9, CD63 and CD81).^{20,21} Mammalian cells simultaneously express several tetraspanin antigens, which might form specific complexes on the plasma membrane.^{15,18,22–24}

On the cell surface, tetraspanin antigens are present either as free molecules or through interaction with other proteins.^{25,26} These interacting proteins include other tetraspanins, integrins—particularly those with the $\beta 1$ subunit^{22,27–30}—HLA class II molecules—eg HLA DR^{31–33}—, CD19,^{34,35} the T-cell receptor^{36,37} and several other members of the immunoglobulin superfamily.³⁸ As an example, CD81 binds to a CD19/CD21 complex on B-cells,³⁹ as well as to CD9 and CD82.³⁵ The diversity in the composition of tetraspanins, and those proteins interacting with the tetraspanin-containing membrane complexes allows for a larger plasticity of their signaling properties.^{15,23,24} Overall, it is likely that the pattern of expression of tetraspanin proteins is a major determining factor in the specific adhesion and homing properties of a cell,⁴⁰ and that changes in this profile will be followed by a redistribution of the cell within the organism in terms of its developmental stage or functional state. As a result of the complex pattern of tetraspanin gene expression, it is very likely that the adhesion and migration properties of tumor cells are also influenced by the alteration in the composition of cell-specific tetraspanin protein complexes.

Abnormal levels of tetraspanin antigens have been identified in many different types of carcinomas.^{41,42} In general, low expression of some individual molecules has been related to a poor prognosis. Accordingly, low levels of CD63 in melanomas⁴³ as well as in colon carcinomas⁴² indicated a higher metastatic potential. Additional correlations between abnormally low levels of tetraspanin molecules and poor prognosis have been reported for CD9 in the lung,⁹ oral,⁴⁴ cervical⁴⁵ and breast carcinomas⁸ and for CD82 in the prostate,^{12,46,47} breast⁴⁸ and lung cancer.⁴⁹ Interestingly, re-expression of CD9⁵⁰ and CD82¹² in the tumor cells increases their adhesion and subsequently reduces their motility. Regarding CD53, its reduced expression in normal cells is associated with a syndrome very similar to leukocyte adhesion defects, characterized by recurrent infections.⁵¹

In the present study, we have quantitatively analyzed the distribution and the pattern of expression of several tetraspanin antigens in normal and neoplastic human B cells. Our results show a high frequency of aberrant expression of tetraspanin molecules in tumor B cells. Despite this, the overall pattern of expression of these proteins during normal B-cell maturation correlated with the stage of maturation arrest in B-cell neoplasias, which could be of help for diagnostic purposes.

Materials and methods

Controls and patients

Analysis of the expression of tetraspanin molecules and other functionally related surface proteins along the normal B-cell

Correspondence: Dr PA Lazo, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca, Spain; Fax: +34 923 294 795; E-mail: plazozbi@usal.es

Received 4 February 2005; accepted 18 April 2005; published online 2 June 2005

differentiation was performed on a total of 17 normal samples obtained from subjects without any known disease and with normal blood cell counts: six bone marrow (BM) and nine peripheral blood (PB) samples obtained from an identical number of healthy adult volunteers and two reactive lymph node samples. In turn, normal residual plasma cells (PC) were analyzed in three BM samples from an identical number of patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS).

In addition, a total of 25 BM, 41 PB and one lymph node sample from a total of 67 newly diagnosed untreated patients with clonal B-cell malignancies, were studied. Diagnosis of the different B-cell malignancies was based on clinical, morphologic, immunophenotypic and molecular criteria, according to the WHO classification.⁵² Patients were distributed as follows: CD34⁺ precursor B acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), eight patients—BII: seven, one being t(bcr/abl)⁺, BIII: 1–;⁵³ CD34⁺ precursor B-ALL, four patients—all BIII (one with t(8;14)⁺ and another with t(12;21)⁺);⁵³ B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), 28 patients—25 typical (typ) and three atypical (atyp) B-CLL–; prolymphocytic leukemia (PLL), one patient; hairy cell leukemia (HCL), two; mantle cell lymphoma (MCL), three—all being t(11;14)⁺; splenic marginal zone lymphoma (SMZL), one; MALT lymphoma, five cases; follicular lymphoma (FL), two patients—both being t(14;18)⁺; bcl6⁺ diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), one patient; Burkitt's lymphoma, two patients—one being t(8;14)⁺; multiple myeloma (MM), five patients; and MGUS, five cases. Samples from both the patients and the controls were obtained after informed consent, according to the Ethics Committee of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain).

Flow cytometry immunophenotypic studies

All normal and neoplastic PB and BM samples were collected in tubes containing K₃-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant. BM samples were immediately diluted 1/1 (vol/vol) in phosphate-buffered saline (PBS). Lymph node samples were obtained by fine-needle aspiration, according to well-established procedures. Immunophenotypic studies were performed on erythrocyte-lysed samples using well-established direct immunofluorescence stain, lyse and then wash procedures.⁵⁴ Nucleated cells (1–2 × 10⁶ cells in 100 µl/test) were stained using the following three- and four-color combinations of monoclonal antibodies (MoAb) directly conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridin chlorophyll protein (PerCP) and for four color combinations allophycocyanine (APC): CD63/CD53/CD19 or CD38; CD9/CD37/CD19 or CD38 and CD21/CD81/HLA-DR/CD19 or CD38. The source of the MoAb was as follows: CD19 (clone SJ25C1), CD38 (clone HB7) and anti-HLA-DR (clone L243) were purchased from Becton Dickinson Biosciences (–BDB– San José, CA, USA), CD53 (clone HI29) and CD81 (clone JS81) were from PharMingen (San Diego, CA, USA), CD9 (clone CLB-thromb/8,4E1) and CD63 (clone CLBGran/12) from Immunotech (Marseille, France), CD21 (clone 1F8) from DakoCytomation (Glostrup, Denmark) and CD37 (clone HH1) from DIATEC AS (Oslo, Norway). Stained cells were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer using the CellQuest software program (BDB). For those samples that had a low proportion of neoplastic cells (<10% of the whole sample cellularity), as well as in all normal and MGUS samples, a two-step acquisition procedure was

performed. In the first step, information was stored on a minimum of 3 × 10⁴ nucleated cells corresponding to the whole sample cellularity. In the second step, acquisition through an electronic 'live gate' was carried out; in normal BM and PB samples, as well as in samples from immature and mature B-cell malignancies, the electronic 'live gate' was drawn on the CD19⁺ region in which B-cells are located, while in BM samples from normal individuals, MGUS and MM patients a 'live gate' drawn on the CD38⁺⁺⁺ region was applied in order to specifically select PC. In this second step, information on a minimum of 10⁴ CD19⁺ B-cells or CD38⁺⁺⁺, PC was stored. For data analysis, the Paint-A-Gate PRO software (BDB) was used. Expression of tetraspanin molecules was assessed in the following subpopulations of CD19⁺ B-cells and/or CD38⁺⁺⁺ PC: BM CD34⁺/CD19⁺ B-cell precursors (BCP), BM CD34⁺/CD19⁺ BCP, PB CD19⁺ mature B lymphocytes, lymph node CD19⁺ B cells and BM CD38⁺⁺⁺ PC. For each antigen analyzed, the intensity of expression was evaluated by the mean fluorescence intensity (MFI), observed for the specific cell population under analysis and expressed either as absolute MFI values (arbitrary relative linear units scaled from 0 to 10⁴) or as a percentage of the maximum MFI observed for that antigen in normal B cells.

Statistical methods and hierarchical clustering analysis

Mean values and their standard deviation, as well as median, range, 25 and 75th percentiles and 95% confidence intervals were calculated for each variable. Statistical analyses were performed with the SPSS 11.0 software program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). For the evaluation of the statistical significance of the differences observed between groups, the Mann–Whitney *U*-test was used. *P* values ≤0.05 were considered to be associated with statistical significance. In B-cell neoplasias, antigen overexpression and underexpression were defined as an MFI higher or lower than the 95% confidence interval observed for its expression in the corresponding normal B-cell counterpart, respectively. Sensitivity and specificity were defined as TP/TP + FN and TN/TN + FP, respectively, where TP are true positives, TN true negatives, FN false negatives and FP correspond to false positives.

Hierarchical clustering analysis was performed using those 72 samples in which all markers of the panel had been tested. Clustering was run using standard correlation coefficients; for the cluster method, a similarity metric and average linkage was used.⁵⁵ The MFI value obtained for each marker tested was introduced into a dedicated database system (Microsoft Excel, Microsoft, Seattle, WA, USA). A ratio between the MFI obtained for each marker and the mean MFI value obtained for that marker in all normal samples tested was then calculated. Clustering was performed after median centering and normalizing the fluorescence ratios. A logarithmic (base 2) transformation was applied to the values of this ratio for individual data sets. The resulting normalized log₂ ratios were used for further statistical analyses with the J-Express Pro V2.1 software (MolMine AS, Bergen, Norway).

In order to explore the predictive value of the normal patterns of expression of tetraspanins and other related molecules, to properly classify neoplastic B cells according to their stage of maturation arrest, a class predictor was built using a weighted voting algorithm evaluated with a leave-one-out cross validation. For this purpose, a training set of normal B-cell populations (*n* = 20) grouped into three classes was used: (1) normal BM BCP; (2) normal mature BM, PB and lymph node B-lympho-

cytes; and (3) normal BM PC. The accuracy of the predictor was then tested in a set of 51 neoplastic populations of B cells using the nearest shrunken centroids method (PAM software; details may be found at <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/PAM>).⁵⁶

Results

Expression of tetraspanin antigens and other related molecules during normal B-cell maturation

In normal BM, three subpopulations of CD19⁺ B cells were identified by their differential expression of the CD10 and CD34 antigens. These subsets corresponded to three stages of increasingly mature B-cells: (I) CD34⁺/CD10⁺, (II) CD34⁺/CD10⁺, and (III) CD34⁺/CD10⁺ (Figure 1). In addition, normal PC were also identified in control BM samples by their extremely high CD38 expression. Mature B lymphocytes from both PB and reactive lymph node samples were also studied.

The relative expression of all tetraspanin antigens changed during normal B-cell development, except CD63—which was always detected at very low levels on the surface of all B-lineage cells (Figures 1 and 2). Accordingly, the early CD34⁺/CD10⁺ and late CD34⁺/CD10⁺ BCP displayed relatively high levels of CD9 and CD81, but barely detectable amounts of CD37 and CD53; as these cells differentiated into CD10⁺ B cells, a significant reduction of CD9 and CD81 expression towards undetectable amounts was observed, in association with a dramatic increase in the levels of surface CD37 and CD53. Interestingly, CD10⁺/CD34⁺ B-lymphocytes in the BM and B lymphocytes from both normal PB and lymph nodes showed a similar pattern of tetraspanin expression: high reactivity for CD53 and CD37 and dim/negative expression of CD81 and CD9. In turn, PC that have recirculated from lymphoid tissues back to the BM, lost expression of CD37 and

regained reactivity for CD9, dissociating their expression from CD53 and CD81, respectively.

Expression of tetraspanin antigens and other related molecules in neoplastic B cells

In general, a parallel expression of individual tetraspanin molecules was found in normal and neoplastic B cells. Despite this, significant differences existed between the two groups (Figure 2).

Concerning BCP-ALL (left columns from all panels in Figure 2) variable levels of most tetraspanin antigens were detected in both the CD34⁺ and CD34⁺ patient groups. However, as compared to normal CD34⁺/CD10⁺ BCP, CD34⁺ BCP-ALL cases showed overexpression of both CD37 ($P=0.05$) and CD53 ($P=0.05$) while CD34⁺ BCP-ALL displayed a significantly reduced CD81 ($P=0.003$) expression and higher reactivity for CD63 ($P=0.005$) in comparison with normal CD34⁺ BCP. No additional significant differences were observed in either group, regarding the expression of other tetraspanin molecules. Table 1 shows the exact percentage of BCP-ALL cases showing abnormally high and low amounts of each of the proteins analyzed.

Among mature/peripheral chronic B-cell leukemias and non-Hodgkin's lymphomas (middle-left columns from all panels in Figure 2), a pattern of expression of tetraspanin molecules similar to that of normal mature PB and lymph node B-lymphocytes, was observed. Despite this, abnormal expression of specific antigens was found in several individual diagnostic subgroups (summarized in Table 1). Accordingly, in B-CLL/PLL cases, identical patterns of expression of tetraspanin molecules were observed as those found for normal mature circulating B-lymphocytes, with low CD9 and CD81 expression and strong reactivity for CD37 and CD53. In spite of this, B-CLL/PLL patients showed aberrantly low levels of CD81 ($P=0.004$) and CD37 ($P\leq 0.001$) and abnormally high amounts of CD53 ($P=0.005$) as compared to normal PB B cells. Interestingly, among B-CLL cases, aberrantly increased expression of CD53 and decreased reactivity for CD9 correlated with the pattern of *in vivo* tissue distribution of neoplastic B cells. Accordingly, increased reactivity for CD53 was associated with a higher frequency of lymph node involvement ($P=0.02$) and greater PB lymphocytes counts ($P=0.02$), while cases with decreased expression of CD9 showed a more pronounced BM infiltration ($P=0.03$) and lower PB platelet counts ($P=0.02$).

In a similar way, although B-NHL generally displayed a similar profile of tetraspanin molecule expression as normal circulating PB/lymph node B cells, a significantly higher expression of CD53 was observed in MALT/SZML patients ($P=0.05$). Although only two HCL were studied, both displayed an almost identical tetraspanin immunophenotype with aberrantly high expression of CD53 and CD63, with respect to both normal mature B lymphocytes and PC (Figure 2).

Clonal PC from patients with MGUS and MM (right columns in all panels in Figure 2), showed a rather similar pattern of tetraspanin antigen expression. Once compared to normal B cells, this pattern was more closely related to that of normal BM PC. Nevertheless, clonal PC from MM showed significantly reduced CD9 expression ($P=0.01$), as compared to their normal counterparts. Another striking characteristic of tetraspanin antigen expression in clonal PC relates to the higher amounts of CD63 detected in MGUS as compared to normal ($P=0.09$) and MM ($P=0.03$) PC, which were at least twenty-fold over those detected in any normal B cells.

Figure 1 Pattern of expression of tetraspanins during normal B-cell maturation. For each molecule, results are expressed in percent values relative to the maximum value (100%) detected. The absolute values observed for each antigen are presented in Figure 2. Arrows indicate the location of changes in the pattern of tetraspanin antigen expression. The levels of expression of surface CD63 (data not shown) were always low and similar in all maturation stages analyzed, except in plasma cells (see Figure 2). PB: peripheral blood. PC: plasma cells.

Figure 2 Expression of the CD9, CD37, CD53, CD63 and CD81 tetraspanin molecules in neoplastic B cells (gray boxes) as compared to their normal counterparts (white boxes). Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) in arbitrary units scaled from 0 to 10^4 . The phenotype of subpopulations of CD19⁺ BCP, mature CD19⁺ lymphocytes and CD38⁺⁺ plasma cells for both normal and neoplastic B-cells, are shown in the right, middle-left and left columns of each panel, respectively; the four middle-right panel corresponds to HCL cases. Boxes extend from the 25 to the 75th percentiles; the line in the middle and the vertical lines represent median values and 95% confidence intervals, respectively. * $P \leq 0.05$ with respect to normal bone marrow (BM) cells; ** $P \leq 0.05$ with respect to normal peripheral blood (PB); † $P \leq 0.05$ with respect to reactive lymph node (RLN); # $P \leq 0.05$ with respect to clonal PC from MGUS. BCP-ALL: B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia; B-CLL/PLL: B-cell chronic lymphocytic leukemia/prolymphocytic leukemia; FL: follicular lymphoma; DLBCL/BURKITT'S LYMPHOMA: diffuse large B-cell lymphoma/ Burkitt's lymphoma; MALT-L/SMZL: mucos-associated lymphoid tissue lymphoma/splenic marginal zone lymphoma; MCL: mantle cell lymphoma; MGUS: monoclonal gammopathy of undetermined significance; PC: plasma cells; MM: multiple myeloma; NA: not analyzed.

Abnormally high expression of the CD21 tetraspanin-associated molecule was found in both CD34⁺ ($P=0.02$) and CD34⁺ ($P=0.007$) BCP-ALL and MM ($P=0.01$). In turn, significantly reduced levels of CD19 were detected in MALT/SMZL ($P=0.01$), MCL ($P=0.02$), MGUS ($P=0.03$) and MM ($P=0.03$), as well as in a significant proportion (41%) of all B-CLL patients (Tables 1 and 2). In contrast, the pattern of expression of HLADR was similar in neoplastic B cells and their normal counterparts.

Classification of B-cell neoplasias according to the expression of tetraspanin and tetraspanin-associated antigens

Multivariate analysis of flow cytometry data was initially performed using tools that are usually employed for the analysis of microarray gene expression, although in this study the values reflect protein rather than RNA levels. Results of this analysis are

shown in Figure 3. As it illustrates, similar tumors were clustered together, and at the same time were grouped with the corresponding normal B-cell population, except for two MM cases classified together with immature B cells. Overall, three major groups of B-cell neoplasias were clearly defined: (1) BCP-ALL; (2) mature B-cell neoplasias (B-cell chronic lymphoproliferative disorders plus B-cell NHL); and (3) PC dyscrasias. Their normal counterparts included: (1) CD10⁺ BM BCP; (2) mature BM, PB or reactive lymph node B lymphocytes; and (3) BM PC. This is a significant finding taking into consideration the low number of markers included in the analysis.

Table 1 Frequency of abnormally increased/decreased expression of tetraspanin and tetraspanin-related molecules in B-cell leukemias/lymphomas

	BCP ALL <i>n</i> = 12	B-CLL/PLL <i>n</i> = 29	Other B-CLPD <i>n</i> = 16	MGUS/MM <i>n</i> = 10
CD53				
Decreased	25	7	0	0
Increased	25	64	56	10
CD63				
Decreased	0	0	0	0
Increased	75	79	6	20
CD81				
Decreased	75	90	0	0
Increased	17	0	36	0
CD37				
Decreased	25	69	0	0
Increased	25	7	6	0
CD9				
Decreased	50	29	0	0
Increased	25	11	19	0
CD19				
Decreased	17	41	0	100
Increased	67	35	19	0
CD21				
Decreased	0	0	0	0
Increased	100	10	0	20
HLADR				
Decreased	36	0	0	0
Increased	27	18	0	10

Results expressed as percentage of cases.

Figure 3 Hierarchical cluster analysis of surface expression of five tetraspanin antigens (CD63, CD53, CD9, CD81, CD37) and three tetraspanin-associated proteins (CD19, CD21, HLADR) in normal (*n* = 20) and neoplastic B cells (*n* = 52). Mean fluorescence intensity (MFI) values obtained for each antigen by flow cytometry immunophenotyping were imported and analyzed. Rows represent the individual subpopulation of B cells analyzed from both normal and neoplastic samples and columns represent the normalized log₂ ratios of the MFI obtained for each marker divided by the mean MFI value obtained for that marker in all normal samples tested, for each protein analyzed. The relative level of expression of each molecule is represented in a color code: red represents expression greater than the mean, green represents expression lower than the mean and the color intensity represents the magnitude of the deviation from the mean; as indicated, the scale extends from ratios of -6.678 to +6.678 (log 2 units).

Table 2 Clinical and biological characteristics of B-CLL patients associated with the pattern of expression of tetraspanin molecules

	CD53		CD9	
	Normal/decreased	Increased	Decreased	Normal/increased
Adenomegalies	14%	69%*	29%	62%
Diffuse pattern of BM infiltration	50%	11%	100%*	10%
% Lymphocytes in BM	67 ± 30	51 ± 27	93 ± 1*	43 ± 21
PB platelet counts (× 10 ⁹ /l)	194 ± 120	206 ± 63	137 ± 64*	235 ± 72
PB lymphocyte counts (× 10 ⁹ /l)	9 ± 5	25 ± 17*	19 ± 14	20 ± 17

Categorical variables shown as percentage of cases within each group. Continuous variables shown as mean ± standard deviation. BM: bone marrow; PB: peripheral blood. **P* < 0.05 in comparison to normal/decreased or normal/increased cases.

In order to investigate the predictive value of the patterns of expression of tetraspanin and other related molecules during normal B-cell maturation, a supervised prediction model was built to identify three classes: (1) BM BCP; (2) mature BM, PB and lymph node B lymphocytes; and (3) BM PC. For this purpose a training set which included all normal B-cell populations ($n=20$) and a leave-one-out crossvalidation scheme were used. The predictor contained eight phenotypic variables and assigned the withheld sample to the appropriate class with 100% accuracy. Once this model was tested with the neoplastic samples ($n=51$) it showed an overall accuracy of 88%, the percentage of correctly classified samples ranging from 70% of the PC dyscrasias to 100% of all mature B-cell leukemias and lymphomas. Despite this, it should be noted that combined use of the five tetraspanin and three tetraspanin-associated molecules studied here allowed the specific (100% specificity) distinction between normal and neoplastic B cells with a sensitivity ranging from 20% in PC dyscrasias and 69% in B-cell chronic lymphoproliferative disorders other than B-CLL to 100% in both BCP-ALL and B-CLL.

Discussion

Analysis of the reactivity for the CD9, CD37, CD53 and CD81 tetraspanin antigens showed the occurrence of important changes in their expression during normal B-cell maturation. Accordingly, our results show the existence of three different combinations of tetraspanin expression during B-cell maturation: CD9/CD81 in the early BM BCP, CD37/CD53 in mature/peripheral B lymphocytes, and CD9/CD53 in PC that have passed through secondary lymphoid tissues and reentered the BM.

Among other processes, tetraspanins are involved in cell adhesion.^{57,58} Thus, the observation of distinct patterns of tetraspanin expression during B-cell maturation may reflect the occurrence of different cellular interactions and homing properties. In line with this hypothesis, the more mature BM B lymphocytes lost CD9 and CD81 when they got ready to migrate and leave the BM. These findings are in line with previous observations in carcinomas, where loss of any of these proteins has been shown to correlate with a worse prognosis,⁸ associated with a higher metastatic potential. The molecular basis of the differential pattern of tetraspanin expression remains unknown, since of the four antigens mentioned, only the promoters of the CD9⁵⁹ and CD53 genes⁶⁰ have been partially characterized. Alternative gene expression of CD9, CD37 or CD53 has also been detected in different types of renal⁶¹ and prostate carcinomas.⁶²

The expression of at least three different combinations of tetraspanin antigens during normal B-cell maturation suggests that distinct patterns of expression of these proteins might also be found in B-cell neoplasias. Overall, the analysis of the pattern of expression of the four tetraspanin antigens indicated that there is a relatively high degree of correlation between normal and neoplastic cells, and that the tumors can be classified according to their putative stage of maturation arrest based on the pattern of tetraspanin expression. Accordingly, mature/peripheral B-cell leukemias and lymphomas tended to express high levels of CD37 and CD53, while those derived from BCP-ALL and clonal PC coexpressed CD9 with either CD81 or CD53, respectively. Based on these markers, only two MM cases showing the highest amounts of CD81 on PC were misclassified. Despite these phenotypic

similarities, neoplastic B-cells showed variable levels of expression of one or more of these proteins that were frequently expressed at abnormally low or high amounts per cell. Interestingly, some of these phenotypic aberrations were common to most patients within a specific disease group. In fact, CD81 was aberrantly underexpressed in virtually all B-CLL cases and in up to 75% of BCP-ALL patients; in turn, CD63 was overexpressed in around three quarters of all BCP-ALL and B-CLL patients. An intriguing finding regarding CD63 expression is its upregulation on MGUS, but not on myelomatous PC, in comparison to normal PC. CD63 is mostly an intracellular antigen present on the membrane of endosomes and other intracellular vesicles that becomes expressed on the cell surface after degranulation.^{63,64} Interestingly, we have recently shown that clonal PC from MGUS but not MM show an increased surface expression of HLA-I molecules;⁶⁵ further investigations are required to clarify the potential relationship between the increased HLA-I and CD63 expression on clonal PC from MGUS. Altogether, these results point out the utility of these tetraspanin molecules in combination with other B-cell-associated markers, not only for the diagnostic classification of B-cell neoplasias but also for the identification of aberrant phenotypes that could be used for monitoring minimal disease levels.^{54,66,67} Although the exact significance of such phenotypic aberrations still needs to be established, they might reflect specific genetic abnormalities. In fact a careful comparison of B-CLL/PLL cases with 13q- ($n=6$) and those who did not have these abnormalities ($n=14$) showed that the intensity of expression of CD21 was significantly higher in the former group of patients (MFI of CD21: 58 ± 40 vs 26 ± 26 ; $P=0.05$). However, due to the relatively limited number of cases included in each specific cytogenetic category in most diagnostic groups, definitive conclusions about these phenotypic/genotypic associations require further study in larger groups of patients. Nevertheless, it should be noted that once a well-characterized diagnostic entity such as B-CLL was considered the pattern of expression of CD9 and CD53, tetraspanins were associated with the pattern of *in vivo* tissue involvement. Accordingly, abnormally high reactivity for CD53 was associated with greater PB and lymph node infiltration. Previous studies have shown that ligation of CD53 antigen protects lymphoid cells from apoptosis,¹⁷ an important property for mature/peripheral memory lymphocytes. Accordingly, overexpression of CD53 could render B-CLL cells more adapted to survive in PB and lymph nodes. In contrast, decreased CD9 expression on B-CLL cells was related to a higher BM involvement and decreased numbers of platelets in PB. CD9 has been shown to function as a motility/migration brake when reintroduced in some carcinoma cells.⁹ At the same time it has been associated with a higher metastatic potential,⁸ which could help to explain the relationship observed between CD9 expression and the pattern of BM involvement.

In summary, in the present study, we show that during normal B-cell maturation there are two switches in tetraspanin antigen expression occurring in the BM, in the transition from CD10+ BCP to CD10- B lymphocytes, and later on during terminal differentiation into antibody-secreting BM PC. Interestingly, the pattern of tetraspanin antigen expression on the surface of neoplastic B cells shows great similarities to their normal counterpart allowing discrimination between different B-cell neoplasms. Despite this, neoplastic B cells frequently show aberrant expression of specific tetraspanin molecules that could be used for the investigation of minimal disease.

Acknowledgements

This work was supported by grants from MEC SAF2004-02900 (PAL) and SAF 2002-03096 (AO), Fondo de Investigación Sanitaria P102-0585 (PAL), Junta de Castilla y León SA01/04 and CSI18/03 (PAL), and Fundación Memoria Samuel Solórzano Barruso (PAL).

References

- Masellis-Smith A, Jensen GS, Seehafer JG, Slupsky JR, Shaw AR. Anti-CD9 monoclonal antibodies induce homotypic adhesion of pre-B cell lines by a novel mechanism. *J Immunol* 1990; **144**: 1607–1613.
- Lazo PA, Cuevas L, Gutierrez del Arroyo A, Orue E. Ligation of CD53/OX44, a tetraspan antigen, induces homotypic adhesion mediated by specific cell–cell interactions. *Cell Immunol* 1997; **178**: 132–140.
- Cao L, Yoshino T, Kawasaki N, Sakuma I, Takahashi K, Akagi T. Anti-CD53 monoclonal antibody induced LFA-1/ICAM-1-dependent and -independent lymphocyte homotypic cell aggregation. *Immunobiology* 1997; **197**: 70–81.
- Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 89–109.
- Shibagaki N, Hanada K, Yamashita H, Shimada S, Hamada H. Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA-1/ICAM-1-mediated cell-cell adhesion: functional association between CD82 and LFA-1 in T cell activation. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 4081–4091.
- Lagaudriere-Gesbert C, Le Naour F, Lebel-Binay S, Billard M, Lemichez E, Boquet P et al. Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity. *Cell Immunol* 1997; **182**: 105–112.
- Yanez-Mo M, Alfranca A, Cabanas C, Marazuela M, Tejedor R, Ursa MA et al. Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol* 1998; **141**: 791–804.
- Miyake M, Nakano K, Ieki Y, Adachi M, Huang C, Itoi S et al. Motility related protein 1(MRP1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Res* 1995; **55**: 4127–4131.
- Higashiyama M, Taki T, Ieki Y, Adachi M, Huang C, Koh T et al. Reduced motility related protein-1(MRP1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1995; **55**: 6040–6044.
- Longo N, Yanez-Mo M, Mittelbrunn M, de la Rosa G, Munoz ML, Sanchez-Madrid F et al. Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells. *Blood* 2001; **98**: 3717–3726.
- Zhang XA, Lane WS, Charrin S, Rubinstein E, Liu L. EW12/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003; **63**: 2665–2674.
- Zhang XA, He B, Zhou B, Liu L. Requirement of the p130CAS-Crk coupling for metastasis suppressor KAI1/CD82-mediated inhibition of cell migration. *J Biol Chem* 2003; **278**: 27319–27328.
- Berditchevski F, Odintsova E. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol* 1999; **146**: 477–492.
- Yanez-Mo M, Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F. Tetraspanins and intercellular interactions. *Microcirculation* 2001; **8**: 153–168.
- Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2003; **19**: 397–422.
- Reid ME. Tetraspanin: red blood cells and beyond. *Blood* 2004; **104**: 2211–2212.
- Yunta M, Lazo PA. Apoptosis protection and survival signal by the CD53 tetraspanin antigen. *Oncogene* 2003; **22**: 1219–1224.
- Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**: 1189–1205.
- Boucheix C, Duc GHT, Jasmin C, Rubinstein E. Tetraspanins and malignancy. *Exp Rev Mol Med* 2001; 31 January: <http://www-ermm.cbuc.cam.ac.uk/01002381.htm>.
- Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997; **11**: 428–442.
- Okochi H, Mine T, Nashiro K, Suzuki J, Fujita T, Furue M. Expression of tetraspanins transmembrane family in the epithelium of the gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol* 1999; **29**: 63–67.
- Berditchevski F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 2001; **114**: 4143–4151.
- Yunta M, Lazo PA. Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal* 2003; **15**: 559–564.
- Tarrant JM, Robb L, van Spriell AB, Wright MD. Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface. *Trends Immunol* 2003; **24**: 610–617.
- Hemler ME. Integrin associated proteins. *Current Biol* 1998; **10**: 578–585.
- Hemler ME. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* 2001; **155**: 1103–1108.
- Shaw AR, Domanska A, Mak A, Gilchrist A, Dobler K, Visser L et al. Ectopic expression of human and feline CD9 in a human B cell line confers beta 1 integrin-dependent motility on fibronectin and laminin substrates and enhanced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1995; **270**: 24092–24099.
- Radford KJ, Thorne RF, Hersey P. CD63 associates with transmembrane 4 superfamily members, CD9 and CD81, and with B1 integrins in human melanoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **222**: 13–18.
- Rubinstein E, Poindessous-Jazat V, Le Naour F, Billard M, Boucheix C. CD9, but not other tetraspans, associates with the B1 integrin precursor. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 1919–1927.
- Serru V, Le Naour F, Billard M, Azorsa DO, Lanza F, Boucheix C et al. Selective tetraspan–integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem J* 1999; **340** (Part 1): 103–111.
- Szollósi J, Horejsi V, Bene L, Angelisova P, Damjanovich S. Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J Immunol* 1996; **157**: 2939–2946.
- Kropshofer H, Spindeldreher S, Rohn TA, Platania N, Grygar C, Daniel N et al. Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide–MHC class II complexes. *Nat Immunol* 2002; **3**: 61–68.
- Engering A, Pieters J. Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells. *Int Immunol* 2001; **13**: 127–134.
- Sato S, Miller AS, Howard MC, Tedder TF. Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81/Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19. *J Immunol* 1997; **159**: 3278–3287.
- Horvath G, Serru V, Clay D, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E. CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J Biol Chem* 1998; **273**: 30537–30543.
- Iwata S, Kobayashi H, Miyake-Nishijima R, Sasaki T, Souta-Kuribara A, Nori M et al. Distinctive signaling pathways through CD82 and beta1 integrins in human T cells. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 1328–1337.
- Puls KL, Hogquist KA, Reilly N, Wright MD. CD53, a thymocyte selection marker whose induction requires a lower affinity TCR–MHC interaction than CD69, but is up-regulated with slower kinetics. *Int Immunol* 2002; **14**: 249–258.
- Stipp CS, Orlicky D, Hemler ME. FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific CD81- and CD9- associated protein. *J Biol Chem* 2001; **276**: 4853–4862.
- Tedder TF, Inaoki M, Sato S. The CD19–CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* 1997; **6**: 107–118.
- Vanderkerken K, Van Camp B, De Greef C, Vande Broek I, Asosingh K, Van Riet I. Homing of the myeloma cell clone. *Acta Oncol* 2000; **39**: 771–776.
- Testa JE, Brooks PC, Lin JM, Quigley JP. Eukaryotic expression cloning with an antimetastatic monoclonal antibody identifies a

- tetraspanin (PETA-3/CD151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res* 1999; **59**: 3812–3820.
- 42 Sordat I, Decraene C, Silvestre T, Petermann O, Auffray C, Pietu G et al. Complementary DNA arrays identify CD63 tetraspanin and alpha3 integrin chain as differentially expressed in low and high metastatic human colon carcinoma cells. *Lab Invest* 2002; **82**: 1715–1724.
- 43 Hotta H, Ross AH, Huebner K, Isobe M, Wendeborn S, Chao MV et al. Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res* 1988; **48**: 2955–2962.
- 44 Sautsuka J, Ryu F, Kameyama T, Mekada E. Reduced expression of CD9 in oral squamous cell carcinoma: CD9 expression inversely related to high prevalence of lymph node metastasis. *J Oral Pathol Med* 2001; **30**: 73–79.
- 45 Sauer G, Windisch J, Kurzeder C, Heilmann V, Kreienberg R, Deissler H. Progression of cervical carcinomas is associated with down-regulation of CD9 but strong local re-expression at sites of transendothelial invasion. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 6426–6431.
- 46 Dong J, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT et al. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* 1995; **268**: 884–886.
- 47 Zhang XA, Kazarov AR, Yang X, Bontrager AL, Stipp CS, Hemler ME. Function of the tetraspanin CD151-alpha6beta1 integrin complex during cellular morphogenesis. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 1–11.
- 48 Huang CI, Kohno N, Ogawa E, Adachi M, Taki T, Miyake M. Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. *Am J Pathol* 1998; **153**: 973–983.
- 49 Adachi M, Taki T, Konishi T, Huang CI, Higashiyama M, Miyake M. Novel staging protocol for non-small-cell lung cancers according to MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 gene expression. *J Clin Oncol* 1998; **16**: 1397–1406.
- 50 Ikegami S, Koyama M, Yamaoka M, Sasada R, Miyake M. Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP1/CD9) DNA. *J Exp Med* 1993; **177**: 1231–1237.
- 51 Mollinedo F, Fontan G, Barasoain I, Lazo PA. Recurrent infectious diseases in human CD53 deficiency. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; **4**: 229–231.
- 52 Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 3835–3849.
- 53 Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; **9**: 1783–1786.
- 54 Sanchez ML, Almeida J, Vidriales B, Lopez-Berges MC, Garcia-Marcos MA, Moro MJ et al. Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 2002; **16**: 1460–1469.
- 55 Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; **403**: 503–511.
- 56 Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 6567–6572.
- 57 Yanez-Mo M, Tejedor R, Rousselle P, Sanchez-Madrid F. Tetraspanins in intercellular adhesion of polarized epithelial cells: spatial and functional relationship to integrins and cadherins. *J Cell Sci* 2001; **114**: 577–587.
- 58 Cook GA, Longhurst CM, Grgurevich S, Cholera S, Crossno Jr JT, Jennings LK. Identification of CD9 extracellular domains important in regulation of CHO cell adhesion to fibronectin and fibronectin pericellular matrix assembly. *Blood* 2002; **100**: 4502–4511.
- 59 Le Naour F, Prenant M, Francastel C, Rubinstein E, Uzan G, Boucheix C. Transcriptional regulation of the human CD9 gene: characterization of the 5'-flanking region. *Oncogene* 1996; **13**: 481–486.
- 60 Hernandez-Torres J, Yunta M, Lazo PA. Differential cooperation between regulatory sequences required for human CD53 gene expression. *J Biol Chem* 2001; **276**: 35405–35413.
- 61 Higgins JP, Shinghal R, Gill H, Reese JH, Terris M, Cohen RJ et al. Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray. *Am J Pathol* 2003; **162**: 925–932.
- 62 Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K et al. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2004; **101**: 811–816.
- 63 Martin-Martin B, Nabokina SM, Blasi J, Lazo PA, Mollinedo F. Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis. *Blood* 2000; **96**: 2574–2583.
- 64 Mahmudi-Azer S, Downey GP, Moqbel R. Translocation of the tetraspanin CD63 in association with human eosinophil mediator release. *Blood* 2002; **99**: 4039–4047.
- 65 Pérez-Andrés M, Almeida J, Martín-Ayuso M, Moro MJ, Martín-Núñez G, Galende J et al. Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia* 2005; **in press**.
- 66 Lucio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E 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**: 419–427.
- 67 Vidriales MB, Perez JJ, Lopez-Berges MC, Gutierrez N, Ciudad J, Lucio P et al. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value. *Blood* 2003; **101**: 4695–4700.

3.2.2- ARTÍCULO 2.2: Identificación y discriminación de síndromes linfoproliferativos crónicos biclonales de acuerdo con el patrón de expresión de tetraspaninas.

OBJETIVO: Las tetraspaninas son proteínas que entre otras funciones modulan las propiedades de adhesión y migración de las células; a pesar de que seguimos sin conocer cuál es la función específica de estas moléculas, hoy se sabe que modulan la función biológica de aquellas moléculas que se asocian al complejo formado por las tetraspaninas. Por tanto, el patrón de expresión de las tetraspaninas y de las moléculas asociadas a éstas puede influir y modular las características de adhesión y migración tanto de células normales como de células tumorales. En el sistema hematopoyético, la maduración de las células B se asocia con cambios en el patrón de expresión de las tetraspaninas y se ha sugerido que las células B neoplásicas muestran un patrón fenotípico similar a su contrapartida normal en idéntico estadio madurativo. El objetivo del presente trabajo se ha centrado en analizar el patrón de expresión de varias proteínas de la familia de las tetraspaninas y moléculas asociadas a las mismas y valorar su utilidad en la discriminación de dos poblaciones de células B patológicas presentes en un mismo paciente.

MÉTODOS: En este trabajo se describe el caso de una paciente adulta diagnosticada de síndrome linfoproliferativo crónico (SLPC)-B biclonal, con coexistencia de una leucemia linfática crónica B (LLC-B) y un linfoma esplénico de la zona marginal (LZME). Las células B neoplásicas correspondientes a ambos SLPC estaban relacionadas con estadios de maduración cercanos de la línea linfoide B, y podían discriminarse entre ellas por la expresión diferente de marcadores convencionales como CD19 y CD5, lo cual permitió el análisis de la expresión de un total de cinco tetraspaninas (CD37, CD9, CD53, CD81 y CD63) de forma individualizada en cada una de las poblaciones de células B tumorales.

RESULTADOS: Los dos clones de células B coexistentes en el mismo paciente mostraron un patrón diferente de expresión de tetraspaninas, especialmente

de CD53, CD81 y CD37. Así, las células con fenotipo de LLC-B tenían un patrón CD53⁻, CD37⁻ y CD81⁺, mientras que las células B tumorales del LEZM eran CD53⁺, CD37⁺ y CD81⁻. Merece destacar que la expresión de CD53 se ha relacionado con protección frente a la apoptosis, lo cuál podría estar relacionado con la supervivencia prolongada de las células neoplásicas en la LLC-B. Sugerimos que los diferentes patrones de expresión de las tetraspaninas en las células B neoplásicas, según el subtipo diagnóstico al que pertenecen, reflejarían las diferentes propiedades de adhesión de estas células, pudiendo así afectar a las características migratorias de las mismas.

CONCLUSIÓN: Desde el punto de vista práctico, nuestros resultados sugieren que la determinación del patrón de expresión de las tetraspaninas puede contribuir a mejorar la caracterización y la discriminación de diferentes neoplasias de células B, especialmente cuando éstas coexisten en pacientes con síndromes linfoproliferativos crónicos B de tipo biclonal.

- 3 Ferrando AA, Neuberg DS, Dodge RK, Paietta E, Larson RA, Wiernik PH *et al.* Prognostic importance of *TLX1* (*HOX11*) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2004; **363**: 535–536.
- 4 Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC *et al.* Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002; **1**: 75–87.
- 5 Kees UR, Heerema NA, Kumar R, Watt PM, Baker DL, La MK *et al.* Expression of *HOX11* in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia can occur in the absence of cytogenetic aberration at 10q24: a study from the Children's Cancer Group (CCG). *Leukemia* 2003; **17**: 887–893.
- 6 Ballerini P, Blaise A, Busson-Le Coniat M, Su XY, Zucman-Rossi J, Adam M *et al.* *HOX11L2* expression defines a clinical subtype of pediatric T-ALL associated with poor prognosis. *Blood* 2002; **100**: 991–997.
- 7 Cavé H, Suciu S, Preudhomme C, Poppe B, Robert A, Uyttebroeck A *et al.*, for the EORTC-CLG. Clinical significance of *HOX11L2* expression linked to t(5:14)(q35;q32), of *HOX11* expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood* 2004; **103**: 442–450.
- 8 Asnafi V, Beldjord K, Boulanger E, Comba B, Le Tuteur P, Estienne M *et al.* Analysis of TCR, pT α , and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. *Blood* 2003; **101**: 2693–2703.
- 9 Berger R, Dastugue N, Busson M, van den Akker J, Pérot C, Ballerini P, *et al.*, on behalf of the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). t(5;14)/*HOX11L2*-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia. A collaborative study of the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). *Leukemia* 2003; **17**: 1851–1857.

Discrimination of biclonal B-cell chronic lymphoproliferative neoplasias by tetraspanin antigen expression

Leukemia(2005) **19**, 1708–1709. doi:10.1038/sj.leu.2403858;
published online 23 June 2005

TO THE EDITOR

The adhesion and migration properties of a cell and its interaction with stroma or other cells are modulated, among others, by tetraspanin proteins.¹ Tetraspanin antigens are a family of 28 membrane proteins widely expressed in different cell types. Each cell type displays a specific pattern of expression of several tetraspanins that interact among themselves forming a tetraspanin complex. This complex forms a new type of membrane microdomain^{1,2} that interacts with other membrane proteins, such as integrins, CD19, CD21, HLA-class II antigens and some growth factor receptors.² The specific function of the tetraspanin proteins is not well understood, but they clearly modulate the biological function of the associated molecules in the complex.³ Therefore, the pattern of expression of tetraspanin and tetraspanin-associated molecules can modulate the adhesion and migration characteristics of both normal and tumor cells. In the hematopoietic system, B-cell maturation is associated with changes in the pattern of expression of tetraspanins.⁴ Also in, B-cell malignancies, the tetraspanin phenotype appears to reflect the differentiation stage of the cell of origin, and thus can be of use in tumor phenotyping.⁴

Here, we report a case of an adult female diagnosed with a biclonal B-cell lymphoproliferative disorder, with coexistence of B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and splenic marginal zone B-cell lymphoma (SMZL)⁵ – two tumors closely related with respect to their B-cell maturation stage, – and attempted their discrimination by the determination of the pattern of tetraspanin antigen expression. For this purpose, five tetraspanin antigens were simultaneously analyzed. Discrimination between the two B-cell clones could be achieved based on

conventional markers because of their different reactivity for CD5 and CD19 (B-CLL cells were CD5⁺/CD19^{dim} and SMZL cells were CD5⁺/CD19⁺⁺) as illustrated in Figure 1 (panel b). The following tetraspanin antigens were studied: CD37 (B-cell specific), CD53 (restricted to lymphoid-myeloid lineages), CD9 and CD81 (expressed in most cell types, including hematopoietic and epithelial cells), and CD63 (mostly present in endosomes). In addition, the reactivity for the CD19, CD21 and HLA-DR tetraspanin-associated molecules was determined by multicolor flow cytometry, as previously described.⁵

Interestingly, the two distinct B-cell clones showed a different pattern of expression of several tetraspanin antigens and tetraspanin-associated molecules (Figure 1). Accordingly, three of the five tetraspanin antigens studied (CD53, CD81 and CD37) could be used to clearly discriminate between the two clonal B-cell populations in a similar way to the CD19 and CD5 markers, especially if the CD53/CD81 and CD37/CD81 combinations were used in double-staining with different fluorochromes; B-CLL cells were CD53⁺, CD81⁺ and CD37⁺ while SMZL cells were CD53⁺, CD81⁺ and CD37⁺. In turn, the CD19 tetraspanin-associated molecule was also differentially expressed by the two distinct B-cell clones, while CD21 and HLADR could not be used to discriminate between the two tumor clones. It should be noted that in B cells, CD19 forms part of a signaling complex of which tetraspanins are a major component; however, until now such complexes have been characterized only for CD81⁶ and CD81 forms complexes with other tetraspanins.^{1,2} The varying composition of the tetraspanins-CD19-CD21 complexes on the two neoplastic B-cell populations suggests that the complex composition, and therefore the signaling, are different in each of the two coexisting B-cell clones.⁷ Functionally, it is interesting to note that CD53 is an antigen whose engagement protects cells from apoptosis, and thus could be related to the prolonged survival of B-CLL, but not SMZL, neoplastic B-cells.³ In addition, the observation of the existence of a different pattern of tetraspanin expression could also reflect the existence of different adhesion properties for each tumor cell population, and thus affect their migration characteristics.

From a practical point of view, our results suggest that determination of tetraspanin antigens can contribute to improving the characterization and discrimination of different B-cell

Correspondence: PA Lazo, Centro de Investigación del Cáncer, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca, Spain; Fax: +34 923 294 795; E-mail: plazozbi@usal.es
Received 4 May 2005; accepted 30 May 2005; published online 23 June 2005

Figure 1 Illustrative bivariate dot plots of a peripheral blood (PB) sample from a patient with two distinct neoplastic B-cell clones, one corresponding to a CD19⁺/CD5⁺ B-cell chronic lymphocytic leukemia (red dots, with lower light scatter characteristics) and the other to a CD19⁺/CD5⁻ splenic marginal zone lymphoma (blue dots) top right and middle. Note that clearly different patterns of expression for the CD53 (top right), CD81 (bottom left), CD37 (bottom middle) and CD19 (bottom right) antigens were observed in each of the two B-cell clones. Immunophenotypic studies were performed on erythrocyte-lysed (PB) samples using well-established stain, lyse and then wash procedures.⁸ Finally, cells were resuspended in 0.5 ml of PBS and analyzed in a FACSCalibur flow cytometer using the CellQuest software program (BDB). The source of the MoAb was as follows: CD19, CD38 and anti-HLA-DR were purchased from Becton Dickinson Biosciences (BDB- San José, CA, USA), CD53 and CD81 were from PharMingen (San Diego, CA), CD9 and CD63 from Immunotech (Marseille, France), CD21 from DakoCytomation (Glostrup, Denmark) and CD37 from DIATEC.com AS (Oslo, Norway).

malignancies, especially once diagnosis of biclonal B-lymphoproliferative disorder is suspected.

Acknowledgements

This work was supported by Grants from MEC SAF2004-02900 (PAL) and SAF 2002-03096 (AO), Fondo de Investigación Sanitaria PI02-0585 (PAL), and Fundación Memoria Samuel Solórzano Barruso (PAL).

S Barrena^{1,2}
J Almeida^{1,2}
M Yunta¹
A López^{1,2}
J Díaz-Mediavilla^{1,2}
A Orfao¹
PA Lazo¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular del
Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer,
CSIC-Universidad de Salamanca, Salamanca,
Spain; and

²Servicio de Citometría, Universidad de
Salamanca and Hospital Universitario de
Salamanca, Salamanca, Spain

References

- Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; **19**: 397–422.
- Yunta M, Lazo PA. Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal* 2003; **15**: 559–564.
- Yunta M, Lazo PA. Apoptosis protection and survival signal by the CD53 tetraspanin antigen. *Oncogene* 2003; **22**: 1219–1224.
- Barrena S, Almeida J, Yunta M, López A, Fernández-Mosteirín N, Giral M *et al*. Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell neoplasias and its correlation with normal B-cell maturation. *Leukemia* 2005; **19**: in press.
- Sanchez ML, Almeida J, Gonzalez D, Gonzalez M, Garcia-Marcos MA, Balanzategui A *et al*. Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* 2003; **102**: 2994–3002.
- Cherukuri A, Shoham T, Sohn HW, Levy S, Brooks S, Carter R *et al*. The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts. *J Immunol* 2004; **172**: 370–380.
- Tedder TF, Inaoki M, Sato S. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* 1997; **6**: 107–118.
- Sanchez ML, Almeida J, Vidrales B, Lopez-Berges MC, Garcia-Marcos MA, Moro MJ *et al*. Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 2002; **16**: 1460–1469.

3.3.- ARTÍCULO 3: Análisis automático de patrones fenotípicos basado en el estudio de componentes principales *versus* análisis convencional, en la clasificación inmunofenotípica de los síndromes linfoproliferativos crónicos B: un paso adelante en la estandarización clínica de los estudios inmunofenotípicos.

OBJETIVO: En los últimos años, la caracterización inmunofenotípica de las hemopatías malignas en general y de los síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC)-B en particular, se ha transformado en un proceso complejo y de una dificultad progresivamente mayor, debido en gran medida al empleo de paneles más amplios de anticuerpos y a la definición de un número creciente de entidades diagnósticas incluidas en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Tradicionalmente, el análisis de los datos de los estudios inmunofenotípicos realizados por citometría de flujo se lleva a cabo de forma individualizada para cada alícuota de una misma muestra marcada con una combinación diferente de anticuerpos; posteriormente, un experto realiza la interpretación global del perfil fenotípico de las células B neoplásicas, asignando cada caso a uno de los diferentes subtipos diagnósticos de la OMS de SLPC-B. En este trabajo proponemos y evaluamos una herramienta automática para la clasificación fenotípica de los SLPC-B empleando análisis de componentes principales, y comparamos los resultados obtenidos con el nuevo método respecto a las estrategias analíticas convencionales.

MÉTODOS: En el presente trabajo hemos analizado el inmunofenotipo de las células B neoplásicas de 205 pacientes empleando citometría de flujo y un panel de anticuerpos monoclonales y policlonales combinados en 4 fluorescencias distintas (FITC/PE/PerCPCy5.5/APC): FMC7/CD24/CD19/CD34, CD22/23/CD19/CD20, CD103/CD25/CD19/CD11c, CD43/CD79b/CD19/-, sIgM/sIgk/CD19/CD5, sIgμ/CD27/CD19/- y Cybcl2/CD10/CD19/CD38. Para el análisis de componentes principales, en cada caso se fusionaron los ficheros de datos correspondientes a cada

alícuota de una misma muestra que contenía información sobre las células B neoplásicas, mediante el programa INFINICYT (Cytognos SL, Salamanca, España). Una vez fusionados en un único fichero de datos, se procedió al cálculo de la reactividad de cada célula analizada para aquellos marcadores incluidos en el panel pero evaluados en otras alícuotas (INFINICYT), utilizándose como parámetros comunes a todos los tubos CD19, FSC (dispersión frontal de luz) y SSC (dispersión lateral de luz); con ello obtuvimos un nuevo fichero único que contenía información sobre todos y cada uno de los parámetros analizados con el panel completo de anticuerpos empleado, para cada una de las células B neoplásicas de cada paciente.

De los 205 casos incluidos en el estudio, 30 -10 leucemias linfáticas crónicas (LLC)-B típicas, 10 linfomas de células del manto (LCM), y 10 linfomas foliculares (LF)-correspondían a casos que fueron utilizados para crear tres grupos de referencia: LLC-B, LCM y LF. Una vez creados los grupos de referencia, cada uno de los demás casos problema (n=175) se comparó a título individual con los 3 pares posibles de grupos de referencia (LLC-B vs. LCM, LLC-B vs. LF y LCM vs. LF), hasta un total de 525 comparaciones, empleando análisis de componentes principales. Fruto de dichas comparaciones, cada caso se clasificó como LLC-B, LCM, LF u otro SLPC-B diferente de los tres anteriores, y los resultados de dicha clasificación se compararon con el diagnóstico final de cada caso, establecido de acuerdo a los criterios de la OMS. Así mismo, dicho análisis de componentes principales permitió conocer los marcadores de mayor utilidad en la clasificación de los SLPC-B en los tres subtipos diagnósticos para los cuáles se establecieron grupos de referencia.

RESULTADOS: La mayoría de los 175 casos analizados (155/175, 89%) se clasificaron correctamente de acuerdo a los resultados del análisis de componentes principales, siendo los valores predictivos positivo y negativo del 89% y 96%, respectivamente. El nuevo sistema de análisis de datos mostró mayor eficiencia en el caso de la LLC-B típica, LCM y LF respecto a los otros SLPC-B y la LLC-B atípica.

Desde el punto de vista práctico, los marcadores de mayor utilidad fueron: 1) CD23, CD5, CD27, CD10, CD43, CD20 y CD38 en la distinción entre LLC-B y LF; 2) CD23, CD38, CD20, sIgM, CD79b, y FMC7 en el diagnóstico diferencial entre LLC-B y LCM y; 3) CD5, sIgM, CD79b, FMC7 y CD19 en la diferenciación entre LF y LCM.

CONCLUSIÓN: En resumen, la herramienta basada en el análisis de componentes principales propuesta en el presente trabajo para la clasificación inmunofenotípica de los SLPC-B, constituye una aproximación prometedora en la estandarización de la interpretación de los perfiles inmunofenotípicos de células B neoplásicas de pacientes con LLC-B, LCM, LF y otros SLPC-B, su clasificación en entidades bien definidas y la evaluación de la utilidad de los paneles de anticuerpos empleados.

ORIGINAL ARTICLE

Automated pattern-guided principal component analysis vs expert-based immunophenotypic classification of B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a step forward in the standardization of clinical immunophenotyping

ES Costa¹, CE Pedreira², S Barrena³, Q Lecrevisse³, J Flores³, S Quijano³, J Almeida³, M del Carmen García-Macias⁴, S Bottcher⁵, JJM Van Dongen⁶ and A Orfao³, on behalf of the EuroFlow Consortium

¹Pediatrics Institute Martagão Gesteira—IPPMG, Federal University of Rio de Janeiro—UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil; ²Faculty of Medicine and COPPE—Engineering Graduate Program, Federal University of Rio de Janeiro—UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil; ³Cytometry Service, Department of Medicine and Cancer Research Center (IBMCC, University of Salamanca-CSIC), University of Salamanca, Salamanca, Spain; ⁴Department of Pathology, University Hospital, University of Salamanca, Salamanca, Spain; ⁵University of Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany and ⁶Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands

Immunophenotypic characterization of B-cell chronic lymphoproliferative disorders (B-CLPD) is becoming increasingly complex due to usage of progressively larger panels of reagents and a high number of World Health Organization (WHO) entities. Typically, data analysis is performed separately for each stained aliquot of a sample; subsequently, an expert interprets the overall immunophenotypic profile (IP) of neoplastic B-cells and assigns it to specific diagnostic categories. We constructed a principal component analysis (PCA)-based tool to guide immunophenotypic classification of B-CLPD. Three reference groups of immunophenotypic data files—B-cell chronic lymphocytic leukemias (B-CLL; $n=10$), mantle cell (MCL; $n=10$) and follicular lymphomas (FL; $n=10$)—were built. Subsequently, each of the 175 cases studied was evaluated and assigned to either one of the three reference groups or to none of them (other B-CLPD). Most cases (89%) were correctly assigned to their corresponding WHO diagnostic group with overall positive and negative predictive values of 89 and 96%, respectively. The efficiency of the PCA-based approach was particularly high among typical B-CLL, MCL and FL vs other B-CLPD cases. In summary, PCA-guided immunophenotypic classification of B-CLPD is a promising tool for standardized interpretation of tumor IP, their classification into well-defined entities and comprehensive evaluation of antibody panels.

Leukemia (2010) 24, 1927–1933; doi:10.1038/leu.2010.160; published online 16 September 2010

Keywords: haematological malignancies; flow cytometry; immunophenotyping; FCS data; principal component analysis; B-cell chronic lymphoproliferative disorders

Introduction

Currently, flow cytometers used in most clinical diagnostic laboratories are not equipped with enough multicolor capabilities to address many frequent clinical questions directed to immunophenotyping with only one combination of monoclonal antibodies.^{1–7} In order to overcome such limitation, several aliquots of the same sample are stained in parallel with a panel

of different, but partially overlapping monoclonal antibody (MAb) combinations.^{1,2,8–13} Recently, we have proposed a mathematical approach which allows direct calculation of the immunophenotypic features of individual cellular events for an unlimited number of flow cytometric parameters; the end result is a single data file where individual cells are characterized for all markers tested in a sample, for every individual aliquot measured.¹⁴ This new approach has proven to be of great utility for the automated distinction between normal and neoplastic cells coexisting in peripheral blood (PB), even when the latter are present at very low frequencies.¹⁵ However, no study has been reported so far, in which a similar strategy is applied to compare the immunophenotypic patterns of neoplastic cells from individual patients with hematological malignancies, for example, B-cell chronic lymphoproliferative disorders (B-CLPD), with ≥ 1 set of reference cases of well established World Health Organization (WHO) entities; such a tool could be of great help for the interpretation of IPs, particularly in complex or atypical cases.

In this study, we describe an automated pattern-guided principal component analysis (PCA)¹⁴ approach for the classification of flow cytometry data. For its evaluation, a group of small B-cell chronic leukemias and lymphomas was selected as a model to compare the performance of the new approach here proposed vs the WHO classification. Small B-cell CLPD are particularly suited for this type of evaluation because complex, highly heterogeneous and partially overlapping immunophenotypic features are observed within these patients, for the different WHO diagnostic groups.^{1,2,9,16–19} Evaluation of the overall IPs of neoplastic B-cells typically requires multiple markers ($n \geq 20$) in 3- to 10-color stainings^{1,2,9,16–19} and interpretation by highly experienced professionals. Finally, despite clear consensus recommendations and guidelines have been proposed,^{7,20–22} variable staining profiles are obtained when different MAb clones, fluorochrome conjugates and commercial sources are used. Because of this and other factors, disturbing levels of variability are generated among different centers as well as among different professionals within the same laboratory, as regards final interpretation of the IPs of neoplastic B-cells in small B-cell CLPD; this is particularly true for cases which display immunophenotypic features that only show partial overlap with well defined entities, for example: atypical chronic lymphocytic leukemia (CLL).²³

Here, we built a new PCA-based procedure for both assignment of individual cases to specific WHO diagnostic subgroups

Correspondence: Professor A Orfao, Department of Medicine, Centro de Investigacion del Cancer (Instituto de Biologia Molecular y Celular del Cancer; CSIC-USAL), Paseo de la Universidad de Coimbra, s/n, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca 37007, Spain.
E-mail: orfao@usal.es

Received 29 March 2010; revised 9 June 2010; accepted 17 June 2010; published online 16 September 2010

and identification of the most informative markers in differentiating among them. The panel used for the construction of this new approach was chosen among those 3- and 4-color panels, currently in-use, before the design of 8-color EuroFlow panels. Overall, our results suggest that this new procedure can be of great help for the standardization of immunophenotypic interpretation of diagnostic B-CLPD samples, and at the same time it provides a valuable tool for the design of new comprehensive multicolor antibody panels support, both for diagnosis and minimal residual disease monitoring of B-CLPD and other hematological malignancies.

Materials and methods

Patients and samples

EDTA-anticoagulated PB ($n=99$), bone marrow ($n=105$) samples plus one pleural effusion were collected at diagnosis from 205 patients suffering from small B-cell CLPD—118 males and 87 females; median age of 66 years (range: 26–93 years). According to the WHO criteria,²⁴ patients were grouped as follows: B-cell chronic lymphocytic leukemias (B-CLL), 120 patients (100 typical and 20 atypical B-CLL cases); lymphoplasmacytic lymphoma, 5 cases; mantle cell lymphoma (MCL), 34 cases; splenic marginal zone lymphoma, 5 cases; mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, 7 cases, and follicular lymphoma (FL), 34 patients.

Median PB lymphocyte counts at diagnosis were of 18.6×10^9 lymphocytes/l (range: $0.8\text{--}286 \times 10^9$ lymphocytes/l); in turn, the mean percentage of neoplastic B-cells in the samples analyzed was of $36.9 \pm 27.9\%$ (range: 0.2–96.8%)—median of 58.2% (range 2.1–96.8%) vs 13.7% (range: 0.2–90.9%) in PB vs bone marrow samples, respectively. All individuals gave their informed consent before entering the study and the study was approved by the local Ethical Committee of the University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain).

Flow cytometry immunophenotyping

For the research purposes of the study, the following multi-parameter flow cytometry panel of 3- and 4-color combinations of MAb—fluorescein isothiocyanate/ phycoerythrin/ peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 (PerCP Cy5.5)/ allophycocyanin (APC)—tested in every individual sample, was used: FMC7/CD24/CD19/CD34, CD22/CD23/CD19/CD20, CD103/CD25/CD19/CD11c, CD43/CD79b/CD19/–, surface immunoglobulin (slg) λ /(slg) κ /CD19/CD5, slgM/CD27/CD19/– and cytoplasmic Cybcl2/CD10/CD19/CD38.

In every case, a stain, lyse and then wash, direct immunofluorescence technique was used following consensus recommendations.^{21,25} Briefly, pre-titrated amounts of each MAb in a combination were added to separate aliquots containing $0.12\text{--}1 \times 10^6$ white blood cells in 100 μ l of sample, depending on the white blood cells count of each sample, for example, appropriate dilution with phosphate-buffered saline (pH = 7.4) was performed for samples with nucleated cell counts $>10 \times 10^9$ /l, and gentle mixed. After 15 min of incubation, at room temperature in the darkness, 2 ml of FACS lysing solution (Becton/Dickinson Biosciences—BD, San Jose, CA, USA), diluted 1/10 (v/v) in distilled water, was added; after gentle mixing, another incubation was performed, (10 min at room temperature in the darkness). Samples were then washed in 4 ml phosphate-buffered saline/ aliquot (5 min at 540 g) and measured in a FACSCalibur flow cytometer (BD). For immunophenotypic

staining of surface immunoglobulins, the cells were washed twice in 2 ml phosphate-buffered saline with 0.5% albumin/ aliquot, before staining with the corresponding antibodies. For immunophenotypic staining of Cybcl2, the Fix and Perm reagent kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used, strictly following the recommendations of the manufacturer.

Information about 5×10^4 leukocytes/aliquot was acquired and stored, using the CellQUEST software (BD). For samples with low B-cell percentages ($<10\%$), additional information about $\geq 5 \times 10^4$ CD19⁺/SSC^{lo} B-cells was acquired through an electronic *live gate* set on a CD19 vs sideward light scatter (SSC) dot plot, and stored using the CellQUEST software, as previously described.¹⁷

Merge of flow cytometry data files and calculation of flow cytometric data

Merge of data files corresponding to different aliquots of each individual sample and calculation of flow cytometry data were performed as previously described in detail,¹⁴ after gating on CD19⁺ neoplastic B-cells. Briefly, CD19⁺ neoplastic B-cells were selected for each data file with the INFINICYT software (Cytognos SL, Salamanca, Spain), using conventional gating strategies based on their unique patterns of antigen expression,¹⁹ as illustrated in Supplementary Figure 1. Information restricted to the selected neoplastic B-cells was stored in new separate data files corresponding to each individual sample aliquot. Then, data about neoplastic B-cells contained in each of these new data files for each multicolor staining performed on individual samples was merged into a single data file using the INFINICYT software program. Afterward, information about each individual parameter contained in this new merged file, which was not actually measured for an individual event, was calculated for the overall panel of markers analyzed; such calculation was done for each event measured using the calculation function of the INFINICYT software, based on nearest-neighbour statistical tools.^{26,27} For this purpose, those three parameters which were measured in common in every multicolor staining, forward light scatter (FSC) and SSC, as well as CD19 PerCP Cy5.5, were used to search for each event's nearest-neighbour. All other immunophenotypic parameters were only measured for the subset of cellular events corresponding to the specific multicolor staining from the whole multi-tube panel where they were specifically assessed; calculation of the values for each of these latter parameters (for individual cellular events) where they were not directly assessed, was based on the assignment of those values observed for their nearest-neighbour event contained in another aliquot of the same sample, for which staining for those specific parameters had been performed.

After merging the original 4-color (6-parameter) data files and calculating the 'missing' values initially lacking for each individual event, a single data file containing information about all parameters measured in all multicolor stainings, for each of the events recorded, was obtained. Therefore, each of the merged/calculated data file finally contained information about all parameters measured ($n=20$); which were: FSC, SSC, CD19, CD22, CD23, CD20, CD103, CD25, CD11c, FMC7, CD24, CD34, CD43, CD79b, slgM, CD27, CD5, Cybcl2, CD10 and CD38, for each of the $\geq 2.0 \times 10^5$ events analyzed per sample (four aliquots/sample each containing information about $\geq 5 \times 10^4$ B-cell events). slg κ and slg λ measurements were excluded from the calculated data files as light chain restriction varies among slg κ + and slg λ + cases, and thus its staining can not be used as a single parameter for disease classification.

Generation of reference data files for specific small B-cell CLPD WHO entities

Three reference groups corresponding to three different small B-cell CLPD entities (typical B-CLL, MCL and FL) were generated with a subgroup of 30 B-CLPD cases. For these three groups, 10 typical B-CLL, 10 MCL and 10 FL cases were randomly selected from the 205 small B-cell CLPD cases analyzed. Supplementary Table 1 shows detailed phenotypic and genetic features of these 30 reference cases (reference data set), as well as of the other 175 patients (testing set) analyzed.

Afterward, PCA was applied and graphically visualized through the automated population separator (APS) view of the INFINICYT software (Figures 1a–c). In this APS view, the first (x axis) and second (y axis) principal components are used to produce a bidimensional representation of phenotypic profiles. Each principal component is a linear combination of parameters with distinct weights, allowing for a bidimensional representation with most of the information of the original higher dimension space being preserved. We opted for PCA for two reasons: (1) it reduces dimensionality of feature space by restricting attention to those directions along which the scatter is greater; (2) linear combinations are easy to compute. The first and second principal components were used since others (third, fourth and so on) did not provide significantly relevant additional information for the discrimination among cases with different diagnosis.

In the next step, each case was tested (PCA) against the three 'reference-groups' in a one vs one comparison: B-CLL vs MCL, B-CLL vs FL and MCL vs FL, (Figures 1d–f, respectively), for a total of 525 comparisons (175 cases tested for three comparisons/case). The set of 30 reference cases were excluded in this testing out of sample phase. For each comparison, individual data files corresponding to neoplastic B-cells from each sample

were merged with each of the three previously constructed pairs of reference data files. For classification purposes, the first vs second principal components of the PCA transformation,^{15,28} were considered (APS representation shown in Figure 1).

Afterward, mean PCA 1 and PCA 2 values were calculated for the neoplastic B-cell events corresponding to each tested case and the reference cases and represented in the PCA space (APS view of the first vs second principal components) as a single square dot (Figures 1g–i). The tested case was then assigned to its nearest reference entity in the APS space, except if it fell outside the three reference groups, to which it was compared; in this latter situation, patients were classified as different from all three reference groups (for example, other B-CLPD). Finally, we compared the results of PCA-analysis of only immunophenotypes against the full WHO clinical diagnosis established on the basis of the patients' clinical features, histopathology and cytogenetics besides conventional immunophenotyping. Subsequently, we calculated the sensitivity, specificity, positive predictive (PPV) and negative predictive (NPV) values of the new (PCA-guided) approach for the diagnosis of B-cell CLPD, using the WHO classification as a gold standard.

Other statistical methods

All numerical and coded data derived from flow cytometric studies were introduced in a database using the SPSS program (SPSS 15.0, Chicago, IL, USA). For each continuous variable analyzed, mean values and their standard deviation (s.d.), as well as the median and the 95% confidence interval, were calculated. In order to assess the statistical significance of differences observed between groups, the Mann–Whitney *U*-test was used. *P*-values <0.05 were considered to be associated with statistical significance.

Figure 1 Illustrating example of the CLL vs MCL (a, d and g), CLL vs FL (b, e and h) and FL vs MCL (c, f and i) one vs one comparisons of flow cytometry data files corresponding to the three B-CLPD reference groups as classified by the PCA projections (first vs second principal components). The PCA based classification profile obtained for four cases tested is displayed: a typical CLL (brown dots), one FL (dark green dots), a MCL (dark blue dots) and a lymphoplasmacytic lymphoma (LPL; black dots). In a–f, each dot corresponds to a single cell event, whereas in panels g–h, mean principal component 1 vs principal component 2 values for each case (same PCA as in panels d–f, respectively), are shown.

Results

As described above, three reference groups of 10 cases each were established and compared in a one vs one basis; these three reference groups contained 'reference' typical B-CLL, FL and MCL cases colored in red, green and blue in Figure 1, respectively. Then, each of the one vs one comparison was represented in a PCA space defined by the first vs the second principal components (Figures 1a–c). Each case from the test group was compared in the same three PCA spaces against the pairs of B-CLL vs MCL, B-CLL vs FL and MCL vs FL reference groups, as illustrated for four different cases in Figures 1g–i. Based on these comparisons, each case was classified as typical CLL, MCL, FL or other B-CLPD. For each comparison, we recorded the sequence of parameters which had the greater weight in the discrimination between each pair of diagnostic B-CLPD entities and their relative contribution to such discrimination value for each comparison (Supplementary Table 2). The most informative markers were: (1) CD23, CD5, CD27, CD10, CD43, CD20 and CD38 for the discrimination between B-CLL vs FL; (2) CD23, CD38, CD20, slgM, CD79b and FMC7 for B-CLL vs MCL and (3) CD5, slgM, CD27, CD10, CD25 and CD19 for the distinction between MCL vs FL (Supplementary Table 2).

Table 1 Sensitivity, specificity and both positive and negative predictive values of the PCA-based classification approach for B-CLPD according to the expression of CD22, CD23, CD20, CD103, CD25, CD11c, CD43, CD79b, FMC7, CD24, CD34, CD5, slgM, CD27, Cytbcl2, CD10 and CD38 on neoplastic B-cells

Diagnostic Subgroups	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
Total B-CLL	91%	100%	100%	88%
Typical B-CLL	99%	100%	100%	99%
Atypical B-CLL	55%	100%	100%	89%
MCL	97%	96%	77%	99%
FL	92%	98%	85%	99%
Other	59%	94%	53%	96%
Total	89%	96%	89%	96%

Abbreviations: B-CLPD, B-cell chronic lymphoproliferative diseases; B-CLL, B-cell chronic lymphocytic leukemia; MCL, mantle cell lymphoma; FL, follicular lymphoma; PCA, principal component analysis.

Table 2 Frequency of B-CLPD cases classified according to the WHO, assigned to the different reference subgroups using the proposed phenotype-based PCA classification approach

WHO diagnostic subgroups	Immunophenotypic subgroups defined by the automated PCA classification approach			
	B-CLL	MCL	FL	Other
Typical B-CLL	89/90 (99%)	0 (0%)	0 (0%)	1/90 (1%) ^a
Atypical B-CLL	11/20 (55%)	1/20 (5%) ^b	0 (0%)	8/20 (40%)
MCL	0 (0%)	23/24 (96.8%)	1/24 (4.2%) ^c	0 (0%)
FL	0 (0%)	2/24 (9.5%) ^d	22/24 (91.7%)	0 (0%)
Other	0 (0%)	4/17 (23.5%)	3/17 (17.7%)	10/17 (58.8%)

Abbreviations: B-CLPD, B-cell chronic lymphoproliferative disorders; B-CLL, chronic lymphocytic leukemia; MCL; mantle cell lymphoma; FL, follicular lymphoma; PCA, principal component analysis; WHO, World Health Organization.

^aOne B-CLL case with a CD23⁺ phenotype and both del(11q) and del(13q).

^bAtypical B-CLL case with a CD20⁺⁺⁺ and FMC7⁺⁺ phenotype.

^cCase corresponding to a t(11;14)⁺ MCL with a CD5⁺ phenotype and additional del(17p).

^dBoth cases corresponded to a FL with t(14;18)⁺, which were unclassifiable as such on histopathological grounds alone; one of them had a CD5⁺ phenotype in association with trisomy 12.

Overall, the efficiency of the approach here evaluated for correct assignment of the 175 B-CLPD cases analyzed to the three pre-established reference groups was of 89% ($n=155/175$) with a specificity of 89% and a sensitivity of 96%; the positive and negative predictive values were of 89 and 96%, respectively (Table 1).

In detail, 88/89 (99%) typical B-CLL cases and 11/20 (55%) atypical B-CLL patients were correctly assigned to the B-CLL group. From the other 9 atypical B-CLL patients, 8 were classified as not clearly belonging to any of the three reference groups, and the other case was misclassified as MCL (Table 2 and Supplementary Table 3). Interestingly, 5/8 misclassified cases of atypical B-CLL had multiple atypical phenotypic characteristics (for example, CD20^{hi}, FMC7^{hi} and CD79b^{hi}). Furthermore, these atypical B-CLL cases had trisomy 12, either as the sole genetic abnormality ($n=3$) or in association with del(13q) ($n=1$) or del(17q) ($n=1$), 1/8 showed del(17q) and 1/8 had del(13q) (Supplementary Table 1); in turn, the misclassified case (case ID: 29), showed del(11q) in the absence of t(11;14) (Supplementary Table 1). Based on these results, the sensitivity and specificity reached for typical B-CLL were of 99 and 100%, respectively, and for all B-CLL cases—typical plus atypical—of 91 and 100%, respectively (PPV of 100% and NPV of 88%) (Table 1).

Regarding MCL cases, 23/24 (96.8%) patients were correctly assigned to the MCL (Table 2 and Supplementary Table 3); the other MCL patient was misclassified as FL; of note this case (case ID: 120) showed t(11;14) in association with del(17p), besides an atypical CD5⁺ immunophenotype, in the absence of t(14;18) (Table 2 and Supplementary Table 3). Based on these results, a sensitivity of 97% and a specificity of 96% were obtained for the MCL group, with a NPV of 99% and a PPV of 77% (Table 1).

Similarly, most (22/24 cases; 91.7%) FL cases were also correctly assigned to the FL group (Table 2 and Supplementary Table 3). Of note, the two misclassified cases were assigned to the MCL group; interestingly, these two patients could not be diagnosed on histopathological grounds alone, but they both showed the presence of t(14;18) in association with trisomy 12, and no t(11;14); one of these cases had a CD5⁺ phenotype (Supplementary Table 1). Based on these results, the overall sensitivity and specificity for correct assignment of FL cases were of 92 and 98%, respectively (PPV of 85% and NPV of 99%) (Table 1).

In all, 10 out of the other 17 (58.8%) small B-cell CLPD studied (5 lymphoplasmacytic lymphoma, 7 mucosa-associated

lymphoid tissue lymphomas and 5 splenic marginal zone lymphoma) were correctly identified as different from B-CLL, FL and MCL. Four of the other seven cases were assigned to the MCL group and three to the FL group (Table 2 and Supplementary Table 3); none of them was misclassified as belonging to the B-CLL group. Thus, the overall sensitivity and specificity for this latter group was of 59 and 94%, respectively (NPV of 53% and PPV 96%).

Discussion

Currently, the utility of immunophenotyping is highly variable and heterogeneous depending on the specific IP of the individual cases investigated.^{8,9,11–13,29} As an example, among B-CLPD it is recognized that immunophenotyping is extremely powerful in the differential diagnosis between typical B-CLL, hairy cell leukemia and other disease entities; its reliability progressively decreases from MCL and FL to MZL.^{30–32} Several factors contribute to such variability, which include: (i) the lack of robust individual markers to efficiently define each disease entity, leading to the need for interpretation of complex IPs; (ii) the biological variability of individual disease entities, with overlapping features between different WHO diagnostic subgroups and (iii) the lack of standardized criteria and procedures for interpretation of complex flow cytometry profiles.^{9,16–19,22}

Initially, efforts have mainly concentrated on the identification of new, highly informative markers;^{7,18,30–33} this has led to the use of progressively large panels of reagents. Latter on, standardization efforts have focused on providing recommendations and guidelines as regards: (i) the specific techniques applied for sample preparation and staining, (ii) the most informative, mandatory markers and (iii) scoring systems for standardized clear-cut definition of individual disease entities.^{7,20,21} Altogether, these efforts have improved the reproducibility of immunophenotyping, but at the expense of increasing the complexity of interpretation of the flow cytometric data, which typically requires highly-qualified and experienced professionals.⁷

In a certain way, in the last decades an objective technique such as multiparameter flow cytometry immunophenotyping, has progressively evolved into a process based on a relative subjective expert-based interpretation of histograms and bivariate dot plots (for example, 'FCM images') similar to that of conventional pathology ('morphological and histopathological microscopic images').³⁴ More recently, attempts have been made to apply expert supervised algorithms and approaches (for example, Bayesian algorithms) to a more accurate classification of B-CLPD and other hematological neoplasias.^{10,35} However, in these studies, values for individual markers are either expressed as mean/median values (for example, mean fluorescence intensity) for a cell population or they are translated into an arbitrary categorical classification of negative vs positive and dim vs bright patterns of marker expression, before the use of the derived algorithm; this *a priori* manipulation of data, may introduce a bias with a negative impact on the performance of the algorithm used.

In this study, we applied and evaluated a mathematical procedure, which has been recently proposed, for the classification of individual patients into pre-established and well-defined WHO diagnostic entities. A detailed description of the mathematical algorithm has been previously reported by our group¹⁵ and they have become widely available as friendly tools incorporated into commercial flow cytometry data analysis software. For this propose, we selected a model of

heterogeneous overlapping diseases—small B-CLPD—to perform a retrospective study of a series of 205 PB and bone marrow patient samples (30 samples were used to build the model and the other 175 to test it). The new mathematical tools used allow calculation of the complete immunophenotypic information derived from distinct aliquots of the same sample, for every individual cell measured in all sample aliquots;¹⁴ In addition, they permit generation of reference data files containing information about neoplastic B-cells from several patients which are selected as representative of individual, well-defined WHO entities (for example, B-CLL, MCL and FL); afterward, unsupervised pattern recognition multivariate analysis—for example PCA—^{15,28} can be easily applied to compare each case interrogated against (for example, two) reference disease groups. In fact, in our study, to reduce the dimensionality of the data, we just considered the first vs second principal components. Noteworthy, this procedure showed an overall efficiency of >85%, for the classification of a relatively large group of small B-cell CLPD into specific WHO disease groups. To the best of our knowledge, this is the first time that such a procedure, based on information derived from phenotypic profiling of individual tumor cells, is proposed to guide/help the expert on the interpretation of their overall immunophenotypic pattern, in the diagnostic work-up of hematological malignancies. The level of efficiency reached was particularly high among typical CLL, MCL and FL with only a few ($n=4$) discrepant cases: one corresponded to an atypical CD5⁺ MCL, another to a CD5⁺ FL and a third case to a FL which could also not be classified as such, based on strict histopathological or immunophenotypic criteria alone.

Despite this, 11% of false or undetermined diagnoses were found which is higher than desirable. Noteworthy, most of the cases were found among those disease entities for which reference IP groups were not used in our study (for example: splenic marginal zone lymphoma, lymphoplasmacytic lymphoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas, as well as in atypical B-CLL). Although this could be viewed as a failure of the newly proposed procedure, it more likely reflects the need for additional markers to be included in this MAb panel. In fact, it is generally known that with the restricted panel of reagents used, entities such as splenic marginal zone lymphoma and lymphoplasmacytic lymphoma can not be clearly defined on immunophenotypic grounds, requiring additional markers and information.^{25,36,37} Alternatively, some WHO diagnostic groups might actually correspond to a heterogeneous group of different disorders. In line with this latter hypothesis, it should be noted that a major fraction of all atypical B-CLL cases was actually properly classified as such, whereas another subgroup of patients was considered to be clearly different, not only from B-CLL, but also from MCL and FL. Further investigations on larger series of patients in which reference groups for atypical B-CLL and other small B-cell CLPD are also included, are required to define the precise value of this new tool in these and other subtypes of B-CLPD, as well as in acute leukemias and other hematological malignancies.

Overall, these results show that when combined with the mathematical approach used, currently available 3- and 4-color panels work relatively well, but they are suboptimal for the classification of some B-CLPD disease entities. Accordingly, with this new strategy the performance of a panel of reagents can be objectively monitored and evaluated in terms of its rate of failure, pointing to the need for improved panels. However, it should be noted that for each new panel designed, a new set of reference data files, which had been stained with it and measured under comparable conditions, is required.

In summary, here we describe a new powerful tool that can be used in the future to help expert-based interpretation of multiparameter flow cytometry immunophenotypic data in the subclassification of hematological malignancies. The proposed strategy may also contribute to a better definition of specific subgroups of diseases and to improve standardization of interpretation of flow cytometry data, and it can be applied for the evaluation of the performance of currently used antibody panels for immunophenotypic classification of B-CLPD and other malignancies.

Conflict of interest

Cytognos SL is part of the UE-supported EuroFlow Research Consortium, and has implemented some of the algorithms described in the present study, in its proprietary software INFINICYT; Cytognos SL has a contract license of several patents owned by the University of Salamanca, of which A Orfao, CE Pedreira and ES Costa are inventors. Other authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements

This work has been partially supported by the following Grants: Spanish Network of Cancer Research Centers (ISCIII RTICC-RD06/0020/0035-FEDER), FIS 08/90881 from the 'Fondo de Investigación Sanitaria', Ministerio de Ciencia e Innovación (Madrid, Spain), Programa Hispano-Brasileño de Cooperación Universitaria Ref. PHB 2004-0800-PC (Ministerio de Educación y Ciencia) (Madrid, Spain), SA016-A-09 from the Consejería de Educación, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain, and CAPES/Ministério da Educação (Brasília, Brazil), the EuroFlow Consortium (Grant number LSHB-CT-2006-018708), from the European Commission and by the 'Acción Transversal del Cáncer' project through an agreement between the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Ministerio de Ciencia e Innovación (Madrid, Spain) and the Cancer Research Foundation of the University of Salamanca (Salamanca, Spain). CEP and ESC were partially supported by a grant from CNPq- Brazilian National Research Council, Brasília, Brazil (Ref: 305306/2004-9, 558147/2008-9 PDP and 478234/2007-4) and FAPERJ-Fundação de amparo à pesquisa do Rio de Janeiro, (Rio de Janeiro, Brazil) ('Pensa-Rio' project E-26/110.301/2007, E-26/102-781/2008 CNE and 'Jovens Pesquisadores' no 03/2006). CEP and ESC were partially supported by a grant from Fundación Carolina, Spain. QL was supported by a grant from Fundación Marcelino Botín (Madrid, Spain).

References

- 1 Bottcher S, Ritgen M, Buske S, Gesk S, Klapper W, Hoster E *et al.* Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: methods and significance of four-color flow cytometry compared to consensus IGH-polymerase chain reaction at initial staging and for follow-up examinations. *Haematologica* 2008; **93**: 551–559.
- 2 Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Bottcher S, Ghia P, Zehnder JL *et al.* International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2007; **21**: 956–964.
- 3 Ashman M, Sachdeva N, Davila L, Scott G, Mitchell C, Cintron L *et al.* Influence of 4- and 6-color flow cytometers and acquisition/analysis softwares on the determination of lymphocyte subsets in HIV infection. *Cytometry* 2007; **72**: 380–386.
- 4 Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results

- of an international consensus meeting. *Cytometry* 2001; **46**: 23–27.
- 5 Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med* 2007; **27**: 469–485, v.
- 6 Wood BL. Ten-color immunophenotyping of hematopoietic cells. Robinson JP *et al.* (eds). *Current Protocols in Cytometry* 2005; Chapter 6: Unit 6, p 21. John Wiley & Sons, Inc.: University of Washington, Seattle, Washington, USA.
- 7 Greig B, Oldaker T, Warzynski M, Wood B. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: recommendations for training and education to perform clinical flow cytometry. *Cytometry* 2007; **72** (Suppl 1): S23–S33.
- 8 Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, Lopez A, Henriques AF *et al.* Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* 2009; **114**: 33–37.
- 9 Braylan RC. Impact of flow cytometry on the diagnosis and characterization of lymphomas, chronic lymphoproliferative disorders and plasma cell neoplasias. *Cytometry A* 2004; **58**: 57–61.
- 10 Ratei R, Karawajew L, Lacombe F, Jagoda K, Del Poeta G, Kraan J *et al.* Discriminant function analysis as decision support system for the diagnosis of acute leukemia with a minimal four color screening panel and multiparameter flow cytometry immunophenotyping. *Leukemia* 2007; **21**: 1204–1211.
- 11 Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, Veltroni M, Schumich A, Maglia O *et al.* Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry* 2008; **74**: 331–340.
- 12 Quijano S, Lopez A, Rasillo A, Barrena S, Luz Sanchez M, Flores J *et al.* Association between the proliferative rate of neoplastic B cells, their maturation stage, and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: analysis of a series of 432 patients. *Blood* 2008; **111**: 5130–5141.
- 13 Bottcher S, Stilgenbauer S, Busch R, Bruggemann M, Raff T, Pott C *et al.* Standardized MRD flow and ASO IGH RQ-PCR for MRD quantification in CLL patients after rituximab-containing immunochemotherapy: a comparative analysis. *Leukemia* 2009; **23**: 2007–2017.
- 14 Pedreira CE, Costa ES, Barrena S, Lecrevisse Q, Almeida J, van Dongen JJ *et al.* Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions. *Cytometry A* 2008; **73**: 834–846.
- 15 Pedreira CE, Costa ES, Almeida J, Fernandez C, Quijano S, Flores J *et al.* A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Cytometry A* 2008; **73A**: 1141–1150.
- 16 Kaleem Z. Flow cytometric analysis of lymphomas: current status and usefulness. *Arch Pathol Lab Med* 2006; **130**: 1850–1858.
- 17 Rossmann ED, Lundin J, Lenkei R, Mellstedt H, Osterborg A. Variability in B-cell antigen expression: implications for the treatment of B-cell lymphomas and leukemias with monoclonal antibodies. *Hematol J* 2001; **2**: 300–306.
- 18 Matutes E. New additions to antibody panels in the characterization of chronic lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol* 2002; **55**: 180–183.
- 19 Sanchez ML, Almeida J, Vidriales B, Lopez-Berges MC, Garcia-Marcos MA, Moro MJ *et al.* Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 2002; **16**: 1460–1469.
- 20 Ruiz-Arguelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Duque RE, Orfao A. Report on the second Latin American consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Cytometry* 2006; **70**: 39–44.
- 21 Stetler-Stevenson M, Ahmad E, Barnett D *et al.* (eds). *Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells: Approved Guidelines*. 2nd edn. CLSI document H43-A2 ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, 2007.
- 22 Matutes E, Oscier D, Montalban C, Berger F, Callet-Bauchu E, Dogan A *et al.* Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 2008; **22**: 487–495.

- 23 Morice WG, Kurtin PJ, Hodnefield JM, Shanafelt TD, Hoyer JD, Remstein ED *et al*. Predictive value of blood and bone marrow flow cytometry in B-cell lymphoma classification: comparative analysis of flow cytometry and tissue biopsy in 252 patients. *Mayo Clinic Proceedings* 2008; **83**: 776–785.
- 24 Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J *et al*. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting; Airlie House Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 3835–3849.
- 25 Macey MG, McCarthy DA, Milne T, Cavenagh JD, Newland AC. Comparative study of five commercial reagents for preparing normal and leukaemic lymphocytes for immunophenotypic analysis by flow cytometry. *Cytometry* 1999; **38**: 153–160.
- 26 Cover TM. Nearest Neighbor Pattern Classification. *IEEE Trans Inform Theory* 1967; **13**: 21–27.
- 27 Duda RO, Hart P, Stork GD 2001. Unsupervised Learning and Clustering. In: Duda RO, Hart PE, Stork GD (eds). *Pattern Classification*, 2nd edn. John Wiley: New York, 526–527.
- 28 Jolliffe I 2004. *Principal component Analysis*, 2nd edn. Springer: New York.
- 29 Ratei R, Basso G, Dworzak M, Gaipa G, Veltroni M, Rhein P *et al*. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia* 2009; **23**: 528–534.
- 30 Mourad WA, Tulbah A, Shoukri M, Al Dayel F, Akhtar M, Ali MA *et al*. Primary diagnosis and REAL/WHO classification of non-Hodgkin's lymphoma by fine-needle aspiration: cytomorphologic and immunophenotypic approach. *Diagn Cytopathol* 2003; **28**: 191–195.
- 31 Baseggio L, Traverse-Glehen A, Petinataud F, Callet-Bauchu E, Berger F, French M *et al*. CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica* 2010; **95**: 604–612.
- 32 Goldaniga M, Ferrario A, Cortelazzo S, Guffanti A, Pavone E, Ambrosetti A *et al*. A multicenter retrospective clinical study of CD5/CD10-negative chronic B cell leukemias. *Am J Hematol* 2008; **83**: 349–354.
- 33 Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D. Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res* 2007; **20**: 367–384.
- 34 Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ *et al*. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry* 2007; **72** (Suppl 1): S14–S22.
- 35 Matutes E, Kothari R, Balachander T. Immunophenotypic diagnosis of acute leukemia by using decision tree induction. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. *Lab Invest* 1999; **79**: 205–212.
- 36 Gachard N, Salviat A, Boutet C, Arnoulet C, Durrieu F, Lenormand B *et al*. Multicenter study of ZAP-70 expression in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia using an optimized flow cytometry method. *Haematologica* 2008; **93**: 215–223.
- 37 Cro L, Morabito F, Zucal N, Fabris S, Lionetti M, Cutrona G *et al*. CD26 expression in mature B-cell neoplasia: its possible role as a new prognostic marker in B-CLL. *Hematol Oncol* 2009; **27**: 140–147.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

IV.- Discusión

Bajo el término de SLPC se engloba una amplia variedad de neoplasias malignas de linfocitos maduros que infiltran SP, MO y otros tejidos, incluyendo los ganglios linfáticos, entre otros órganos [1][70][176][342]. Actualmente, el diagnóstico y la clasificación de las neoplasias linfoides se basa en la utilización de un amplio conjunto de información aportada por diferentes técnicas, para encuadrar un caso concreto en una categoría diagnóstica de la OMS [1]; de esta manera, no solo se tienen en cuenta el cuadro clínico del paciente, las características morfológicas de las células y su patrón de distribución tisular, sino también el perfil inmunofenotípico y las alteraciones genéticas/moleculares de las células tumorales. En lo que respecta a los estudios inmunofenotípicos, su incorporación y empleo rutinarios en el estudio de los SLPC ha sido posible gracias a los avances alcanzados en instrumentos de medición y a la posibilidad de realizar marcajes simultáneos con múltiples anticuerpos, con ello se ha comprobado que la aplicación sistemática de los estudios inmunofenotípicos resulta de gran utilidad tanto en el diagnóstico de clonalidad como en la caracterización fenotípica de los SLPC dirigida a su clasificación. En general hay acuerdo unánime al considerar que la citometría de flujo es una técnica sensible, específica, fiable y reproducible para la identificación de células linfoides aberrantes/clonales, al menos cuando se aplica a muestras “convencionales” (SP y MO), siendo su eficiencia claramente superior a la de las técnicas morfológicas a la hora de establecer el diagnóstico de clonalidad [151][153]. Más controvertida sin embargo, resulta su utilidad en el diagnóstico inicial de los SLPC-B y T en muestras obtenidas por PAAF, donde el análisis histológico realizado sobre el tejido biopsiado permanece como técnica diagnóstica de referencia; por este motivo nos planteamos como primer objetivo de este trabajo doctoral evaluar la utilidad de la citometría de flujo aplicada sobre muestras obtenidas por PAAF, no solo en el diagnóstico inicial, sino también (lo que resulta más controvertido) en la clasificación de los SLPC-B en las distintas categorías de la OMS. Esto último se fundamenta en el hecho de que la mayoría de los linfomas y otros SLPC presentan patrones inmunofenotípicos característicos, que contribuyen a

diferenciar entre los distintos subgrupos diagnósticos, especialmente en los SLPC de línea B [1][70][176][245][436][437][438].

Durante muchos años se ha considerado que las células neoplásicas de los SLPC-B reflejan las características de distintas subpoblaciones de células B normales, bloqueadas en estadios madurativos concretos. En las últimas décadas, son numerosos los trabajos en los que se han analizado las características fenotípicas de las células B normales [7] [68][78][77][79][80][439][440], proporcionando una referencia imprescindible para la correcta caracterización fenotípica de las células B neoplásicas e identificación de sus rasgos madurativos [77][441][442][443]. Fruto de estos estudios, hoy se sabe que las células B neoplásicas (además de parecerse a ciertos estadios madurativos de la diferenciación linfocítica B normal, que nos ayudan a establecer el origen más probable de la neoplasia), muestran patrones de expresión de proteínas alterados (aberraciones fenotípicas), probablemente debido a las alteraciones genéticas y moleculares adquiridas por la célula neoplásica y/o su interacción con el micromedioambiente tumoral [176]. Esto supone que cada patrón fenotípico sea característico de cada grupo diagnóstico de SLPC-B, ya que reflejaría, al menos en parte, las alteraciones genéticas subyacentes en cada categoría de enfermedad. No obstante, hay que tener en cuenta la existencia de cierto grado de solapamiento en los perfiles inmunofenotípicos entre las diferentes categorías diagnósticas, lo cual resta especificidad a la citometría de flujo a la hora de clasificar los SLPC-B. Con la finalidad de encontrar nuevos marcadores que nos permitieran diferenciar de forma más eficaz las células linfocíticas normales y las células neoplásicas, y a la vez perfeccionar la clasificación de estas últimas en categorías OMS, nos propusimos como segundo objetivo de este trabajo de tesis doctoral evaluar la posible utilidad de las proteínas de la familia de las tetraspaninas (y concretamente de aquellas que tienen funciones relevantes en la respuesta de las células B) en el diagnóstico y clasificación de los SLPC-B.

Sin duda, la incorporación al laboratorio clínico de citometría de un número creciente de marcadores útiles para establecer patrones fenotípicos altamente característicos de cada entidad, hace que la dificultad a la hora de interpretar los patrones fenotípicos complejos y variables de cada caso, sea progresivamente mayor, incluso si es realizada por un experto [279][168][175][444]; esto podría afectar negativamente la reproducibilidad de los resultados; por este motivo, consideramos un objetivo prioritario de nuestro trabajo doctoral el diseño e implementación de nuevas estrategias de análisis de datos obtenidos por citometría de flujo, que faciliten una evaluación más objetiva de la eficacia de los paneles de anticuerpos empleados para la clasificación de los SLPC-B (al menos para los más frecuentes y representativos), y que a la vez faciliten información sobre la contribución de los diferentes marcadores a la clasificación diagnóstica.

1.- Utilidad de la citometría de flujo en el diagnóstico y clasificación de los LNH y SLPC en muestras de PAAF

Pese a que desde hace décadas existen otras técnicas disponibles para el diagnóstico de las neoplasias linfoides [209-210, 223-224, 445-446], tradicionalmente este se ha apoyado primordialmente en los estudios citológicos e histopatológicos de muestras de tejido. Teniendo en cuenta que el estudio citológico de la muestra obtenida por punción del ganglio linfático es fácil de realizar, y que la técnica es rápida y relativamente económica, prácticamente hay acuerdo unánime en defender su utilización como primera línea de investigación para el rastreo de clonalidad en pacientes que debutan con linfadenopatía [231, 447], y solo un grupo relativamente reducido de autores no están de acuerdo con su empleo sistemático en esta fase del diagnóstico inicial [446, 448]. Ahora bien, si el estudio de la muestra de PAAF hace sospechar la existencia de un linfoma, e incluso en aquellos casos en los que pese a una citología negativa hay evidencia clara de malignidad, se procede a realizar la

biopsia de la adenopatía, para establecer el diagnóstico de certeza con el estudio histológico e inmunohistoquímico.

Con la incorporación en los últimos años de técnicas complementarias a la citología, realizadas sobre la muestra obtenida por PAAF, como la citometría de flujo multiparamétrica, y más recientemente las técnicas genéticas y moleculares, muchos grupos empezaron a plantearse la posibilidad real de sustituir la biopsia por estos métodos aplicados sobre la muestra obtenida por punción en combinación con la citología convencional [213, 219-220, 445, 449]. La mayoría de ellos están de acuerdo en que la incorporación del análisis inmunofenotípico de la muestra de PAAF complementa y mejora considerablemente los resultados de la citología, y que es una técnica bastante precisa en el rastreo diagnóstico de malignidad [210, 219, 231, 445]; no obstante, concluyen que la PAAF no puede reemplazar por completo a la biopsia del tejido (ya que prácticamente en todas las series hay casos de linfoma que requieren del estudio anatomopatológico de la pieza quirúrgica para la confirmación diagnóstica), y existe controversia entre los distintos trabajos, en lo que respecta a las indicaciones de la biopsia tras la realización de la PAAF. En este sentido una revisión detallada de la literatura pone de manifiesto que existe una gran heterogeneidad entre los diferentes trabajos publicados, motivo que puede explicar la controversia existente entre ellos acerca de las indicaciones de la biopsia: i) el diseño de los estudios es variado, de forma que unos son prospectivos y otros retrospectivos (en general, sólo los estudios más recientes son prospectivos); ii) existen sesgos de selección de los casos (en unos trabajos se excluyen los casos de infiltración por carcinoma, en otros se incluyen sólo las muestras de pacientes en los que hay una alta sospecha de padecer linfomas, o incluso sólo se incluyen determinados tipos de linfoma) y; iii) se emplean diferentes criterios para establecer la clonalidad B o T, entre otros factores. Además, hay que tener en cuenta que en la gran mayoría de estos trabajos no se ha hecho una evaluación de la utilidad de la citometría de flujo en el diagnóstico y

clasificación de los linfomas y SLPC de forma independiente a la citología convencional y a la histología convencionales [220, 222].

Ante estos antecedentes, nos planteamos llevar a cabo un estudio prospectivo con la finalidad de evaluar la contribución de la CMF como herramienta diagnóstica para establecer la malignidad vs. benignidad de la lesión y, en el caso de tratarse de un SLPC-B, para clasificarlo en las distintas categorías de la OMS, de forma independiente a las técnicas de citología/histología convencionales. Respecto al primer objetivo (utilidad de la citometría de flujo frente a la citología convencional en el diagnóstico inicial realizado sobre muestras de PAAF), nuestros resultados demuestran en primer lugar que ambas técnicas pueden aplicarse sobre la gran mayoría (399/448, 89%) de las muestras obtenidas por PAAF. Sólo el 11% restante de las muestras (49/448) se consideraron no valorables, al no poder realizarse sobre ellas el estudio completo, debido fundamentalmente a la escasez de células obtenidas en la punción. No obstante, merece destacar que la citometría de flujo pudo aplicarse a un número de estas muestras no valorables más elevado que la citología, pese a que las muestras se distribuyan a partes iguales para ambas técnicas. Así, en el 72% de estas 49 muestras (35/49) pudo realizarse el estudio inmunofenotípico, pero no el citológico; solo en 3 de estas 49 muestras (6%) no se realizó el estudio fenotípico y sí el citológico, y en las 11 restantes (22%) no fue posible aplicar ninguna de las dos técnicas.

Considerando el total de muestras evaluables, en las que por tanto se aplicaron ambas técnicas, solo se observó discordancia entre la citometría de flujo y/o la citología con respecto al diagnóstico final en menos del 7% de ellas (27/399 muestras, correspondientes a 22 casos). El grado de discordancia variaba sobre todo dependiendo del grupo diagnóstico, de manera que el mayor número de casos discordantes para ambas técnicas se observaba en los LNH-B (11/132; 8%), seguido de los LNH-T (6/12; 50%) y las neoplasias mieloides y plasmocitomas (5/17; 25%). Por

el contrario, en los casos finalmente diagnosticados como proceso reactivo/linfoma de Hodgkin la discordancia era mínima (3/184; 2%). Merece destacar que en la gran mayoría de los casos discordantes (15/22; 68%) los resultados de la citometría de flujo coincidían con el diagnóstico final. En estos casos se incluían las dos terceras partes de los LNH-B discrepantes, y la inmensa mayoría de los LNH-T (84%) y de los casos discrepantes correspondientes a otras neoplasias hematológicas diferentes de LNH (80%); por el contrario, solo en la tercera parte de los casos discrepantes el diagnóstico final coincidía con los resultados de la citología y/o histología. Por tanto, nuestros resultados no solo confirman la utilidad de la citometría de flujo aplicada al estudio diagnóstico inicial de las muestras obtenidas por PAAF, como ya se ha defendido en estudios previos en los que estudian en paralelo la citometría de flujo y la morfología [231][157][218][450], sino que además muestran que, incluso cuando se valoró la citometría de flujo de forma independiente, ésta era más eficaz que la citología convencional en el estudio diagnóstico inicial de las muestras de PAAF, que se reflejó en una sensibilidad más elevada en la clasificación inicial de los procesos reactivos/LH, LNH-B y LNH-T, sin detectarse ningún caso falso positivo.

Teniendo en cuenta que: i) un requisito que debe cumplir una técnica para que ésta sea útil como estrategia de rastreo diagnóstico es que tenga una elevada sensibilidad (con el fin de detectar todos los casos positivos o con enfermedad maligna), ii) la mayoría de los casos en los se indica la realización de PAAF corresponden a PR y LNH y, iii) no se han detectado casos falsos positivos de LNH-T, podemos concluir que la citometría de flujo debería aplicarse de forma sistemática con finalidad diagnóstica en las muestras de PAAF. Además, merece destacar que nuestro trabajo constituye el primer estudio en el que se obtiene una eficiencia elevada al comparar la citometría de flujo con las técnicas citológicas/histológicas en el diagnóstico de LNH-T, al contrario de lo que se ha descrito en otros trabajos, que consideran que el análisis inmunofenotípico no es la mejor herramienta para el

diagnóstico de los LNH-T [219][217][144][231][446][210][222][451][226]. Pese a estos datos, no es recomendable en absoluto la aplicación de la citometría en sustitución de la citología, ya que esta última mostró una mayor eficiencia (en términos tanto de sensibilidad como de especificidad) a la hora de diferenciar entre PR y LH, debido a que la combinación de anticuerpos empleada en este estudio no permite la discriminación por citometría entre estas dos situaciones. Por tanto, de acuerdo con la recomendación de otros grupos [219][449][210][222][228][452][453], nuestros resultados sugieren que la combinación de ambas técnicas (citometría de flujo y citología convencional), en términos generales debería ser de uso obligado para el rastreo diagnóstico en muestras de PAAF, ya que la información aportada por ambas técnicas es complementaria, y no redundante.

Una cuestión más discutida es cuándo está indicado realizar la biopsia del ganglio, después del estudio inicial de rastreo mediante citometría de flujo y citología. La actuación general es obviar la biopsia, en el caso de que el estudio diagnóstico inicial muestre claramente que se trata de un proceso reactivo (una vez descartada por citología la posibilidad de que se trate de un linfoma de Hodgkin). En nuestro trabajo, se pudo discriminar de forma correcta entre proceso reactivo y neoplásico a partir del estudio realizado sobre las muestras de PAAF en el 98% de los casos; sin embargo, el 2% restante de los casos (3/154) fueron diagnosticados inicialmente como PR tanto por citometría como por citología, pero desarrollaron un linfoma a los 5 años del estudio diagnóstico inicial (2 casos mostraron un LNH-B y un caso un LNH-T). Cabe destacar que el análisis histológico de estos 3 casos (realizado igualmente al diagnóstico), fue en ese momento concordante con el estudio realizado por citometría de flujo y por citología sobre las muestras obtenidas por punción, y por tanto se descartó en ese momento infiltración por linfoma. A su vez, en 2 de los casos discordantes que fueron inicialmente diagnosticados como PR por citometría de flujo y por citología, la histología fue concordante con LBDCG en el momento del diagnóstico,

ya que se observó un patrón de infiltración difuso compuesto por células grandes CD20⁺/Ki67^{+/++}; a pesar de que no se detectaron anomalías genéticas ni se pudo hacer la confirmación de la naturaleza clonal de la infiltración linfoide por técnica de PCR, el seguimiento clínico de los pacientes fue concordante con infiltración por dicho tipo de LNH. Considerando que estos son auténticos falsos negativos del estudio realizado sobre las muestras de PAAF, nuestros resultados apoyan los hallazgos de otros grupos, en relación con el hecho de que las circunstancias en las que es más probable que se den casos falsos negativos por citometría de flujo ocurren en aquellos casos que tienen infiltración por LNH de célula B grande, donde la viabilidad de las células B cae rápidamente durante el procesamiento de la muestra, y no se evidencia clonalidad por el cociente $\text{slg}\kappa/\text{slg}\lambda$, debido a que estas células pueden no expresar inmunoglobulina de superficie. La posibilidad, aunque pequeña, de que la citometría/citología aplicadas sobre las muestras obtenidas por punción se asocien a resultados falsos negativos, especialmente en linfomas agresivos, nos lleva a recomendar la realización de la biopsia del tejido en aquellos casos en los que exista una alta sospecha clínica de infiltración por linfoma agresivo, incluso cuando tanto por citometría como por citología convencional el diagnóstico es concordante y concluyente con PR. En aquellos casos en los que la sospecha clínica de SLPC sea baja, y el estudio de la muestra de PAAF (uso combinado de la citometría de flujo y la citología) sea concordante con PR (habiéndose descartado linfoma de Hodgkin por el estudio citológico), entonces puede obviarse la realización de la biopsia.

Como hemos mencionado anteriormente, en la actualidad existe importante controversia acerca de la posible utilidad de la CMF aplicada sobre muestras de PAAF para la clasificación de los LNH-B en categorías diagnósticas de la OMS. En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se han comparado el análisis inmunofenotípico realizado sobre muestras de PAAF y el análisis histológico e inmunohistoquímico del tejido obtenido mediante biopsia, técnica que sigue siendo

considerada la técnica de elección o “*gold standard*” para la clasificación de los linfomas en subtipos diagnósticos [157, 209-211, 213, 215, 220, 445, 453-456]. La eficiencia del inmunofenotipo en estos estudios a la hora de clasificar los LNH-B en las distintas categorías según las clasificaciones REAL/OMS es muy variable, oscilando la sensibilidad alcanzada entre un 63% y un 94% y la especificidad entre un 88% y un 100% [215][211][157][228][456]. Uno de los factores que más influye en esta heterogeneidad de los resultados obtenidos por los distintos grupos de autores radica en el tipo de linfoma analizado. Así, los resultados más discrepantes entre las dos técnicas se refieren principalmente a los subtipos de LBDCG, LF transformados y otros SLPC-B agresivos, incluyendo el LB, hallazgo que no resulta sorprendente, si tenemos en cuenta que en la última clasificación de la OMS (1) se hace especial hincapié en la existencia de casos con características morfológicas, fenotípicas e incluso genéticas, mixtas y que se superponen con las de los LBDCG, LF y LB [457]; esto probablemente refleja la existencia de un espectro clínicopatológico variable en algunos subtipos de linfomas agresivos, que aún no alcanzamos a conocer en profundidad.

Una de las novedades de nuestro estudio respecto a otros análisis centrados en determinar el papel de la CMF en la clasificación de los linfomas, es el hecho de que nuestro “*gold standard*” no ha sido exclusivamente la histología/histoquímica de la biopsia, sino que los resultados del estudio inmunofenotípico se han comparado con lo que hemos denominado el “diagnóstico final”, al que se ha llegado no solo teniendo en cuenta criterios morfológicos, sino también los datos genéticos/moleculares, junto al cuadro clínico y el comportamiento evolutivo de los pacientes. No obstante, hay que reseñar que los diagnósticos a los que se llegó con la citometría de flujo se realizaron de forma independiente a los resultados genéticos, moleculares y clínicos, que se recogieron con posterioridad al estudio inmunofenotípico.

En términos globales, nuestros datos ponen de manifiesto la existencia de un grado de concordancia relativamente alto entre la CMF y la histología (74%) en la

subclasificación de los LNH-B, de manera que solo aproximadamente una cuarta de los casos fueron discrepantes entre ambas técnicas, o con el diagnóstico final. Un análisis detallado del grado de acuerdo entre las dos técnicas por grupos diagnósticos reveló que la concordancia era del 100% en aquellas categorías en las que está bien establecida la utilidad diagnóstica de la CMF, como el LCM (9/9 casos concordantes) y la LLC-B/LLBCP (4/4 casos concordantes). En consonancia con otros estudios [211][228][456], los subtipos de linfoma B en los que encontramos mayor grado de discrepancia fueron los LB (1/4; 25%), LBDCG (4/19; 21%) y LF (6/31; 19%), además de los linfomas de zona marginal (3/3, 100%) y los LLP (2/5, 40%).

Comparando los datos obtenidos por CMF e histología, pudimos comprobar que la precisión del análisis inmunofenotípico era claramente superior a la histología para clasificar los LNH-B dentro de las categorías de LF, LBDCG y LB, con una sensibilidad del 94%-100% versus 75%-87% de la histología. Por otro lado, la histología resultó ser más sensible que la CMF a la hora de clasificar los linfomas de zona marginal, incluidos los de tipo MALT, (sensibilidad de 93% para la histología vs. 71% para la citometría); probablemente este hallazgo refleja el hecho de que en el momento actual no se dispone de marcadores inmunofenotípicos que nos permitan establecer con precisión el diagnóstico de linfomas de zona marginal, o de linfomas tipo MALT, a diferencia de otros subgrupos que sí presentan patrones fenotípicos bien definidos mediante citometría de flujo, como el LCM o la LLC-B/LLBCP .

Por consiguiente, nuestros resultados sugieren que ambas técnicas (citometría de flujo aplicada sobre muestras de PAAF e histología/inmunohistoquímica de la pieza quirúrgica obtenida por biopsia) deben considerarse complementarias, y por tanto, deberían aplicarse en paralelo para lograr una clasificación correcta de los LNH-B; solo podría obviarse la necesidad de realizar la biopsia en aquellos casos en los que los análisis inmunofenotípico y genético/molecular fueran compatibles con LCM o LLC-B/LLBCP.

2.- Patrón aberrante de expresión de tetraspaninas en los SLPC-B y su relación con la maduración normal.

Como hemos comentado anteriormente, durante muchos años se ha considerado que las células B neoplásicas estaban bloqueadas en estadios madurativos concretos, mostrando características fenotípicas similares a las de su contrapartida normal. Desde un punto de vista práctico, los distintos estudios que se han desarrollado para caracterizar fenotípicamente las células B normales nos permiten la correcta caracterización del estadio madurativo de las células B neoplásicas y a la vez detectar alteraciones fenotípicas en las mismas. En este sentido, un requisito previo a la determinación de la utilidad del análisis de la expresión de diferentes moléculas (en nuestro caso las tetraspaninas) en los distintos tipos de SLPC-B es conocer el patrón de expresión de estas mismas moléculas a lo largo de la diferenciación linfóide B, desde los estadios más tempranos de los precursores CD34⁺ hasta el más diferenciado, de célula plasmática. En conjunto, nuestros resultados muestran cambios significativos en la expresión de las tetraspaninas CD9, CD53, CD37 y CD81 durante la maduración de las células B normales, de manera que existirían tres patrones de expresión distintos, correspondiendo cada uno de ellos a tres estadios de maduración de las células B normales. Así, se observa expresión de CD9/CD81 en los precursores de células B más inmaduros presentes en MO normal, de CD37/CD53 en los linfocitos B maduros, y de CD9/CD53 en las células plasmáticas que recirculan a la MO desde los órganos linfoides secundarios. Teniendo en cuenta el papel relevante de las tetraspaninas en la adhesión y migración celulares, como se ha descrito de forma detallada en la *Introducción*, el hecho de observar distintos patrones de expresión de estas moléculas durante la maduración linfóide B normal podría reflejar las interacciones que ocurren entre las células B y las propiedades de migración de las mismas hacia sus nichos. De acuerdo con esta presunción, la capacidad de migración de los linfocitos B maduros de la MO estaría relacionada con

la pérdida de expresión de CD9 y CD81, de forma similar a lo que se ha descrito en células tumorales de diferentes tipos de carcinomas, en los que la pérdida de expresión de alguna de estas proteínas en las células tumorales se relaciona con un elevado potencial de migración metastática, y por tanto con un peor pronóstico [458].

Nuestra hipótesis de partida fue que si los patrones de expresión de las cuatro tetraspaninas varían a lo largo de la diferenciación linfoide B normal, y son típicos de cada estadio madurativo, también podrían reflejar el grado madurativo de la neoplasia, y ser útiles para la clasificación de los distintos tipos de SLPC-B. Efectivamente, comprobamos que había una elevada correlación en el patrón de expresión de estas cuatro tetraspaninas entre las células B neoplásicas y su contrapartida normal, de manera que se distinguían claramente tres grupos de neoplasias de células B distintos respecto a la expresión de tetraspaninas: las leucemias de células B maduras/periféricas (diversos SLPC-B y LNH-B), que tendían a expresar niveles elevados de CD37 y CD53, de forma similar al linfocito B maduro normal, las derivadas de precursores de células B (coexpresión de CD9 y CD81) y las neoplasias de células plasmáticas, que coexpresaban CD9 y CD53. De hecho, aplicando la estrategia de clasificación descrita en el apartado de Material y Métodos (análisis de “cluster”), comprobamos que prácticamente todas las neoplasias B incluidas en este análisis, se agrupaban junto con su contrapartida normal; solo se clasificaron alejados de su contrapartida normal dos mielomas múltiples, que mostraban expresión de niveles anormalmente elevados de CD81.

A pesar de las similitudes fenotípicas encontradas entre las células B normales y las células B neoplásicas, en estas últimas se observaron niveles variables y aberrantes (tanto de forma aumentada como disminuida) de expresión de una o más de estas proteínas, siendo importante destacar que algunas de estas aberraciones fenotípicas fueron comunes a la mayoría de los pacientes dentro de cada grupo diagnóstico específico. Así, a modo de ejemplo, CD81 se expresaba de forma anormalmente baja en los casos de LLC-B y de forma anormalmente elevada en el

75% de los casos de las LLA-B; por el contrario, CD63 estaba sobre-expresado en aproximadamente tres cuartas partes de las LLA-B y LLC-B. Con respecto a las células plasmáticas neoplásicas, merece destacar que, respecto a las células plasmáticas normales, los niveles de CD63 se encontraban aumentados en las GMSI, pero no en las células plasmáticas de los pacientes con MM. CD63 es principalmente un antígeno intracelular presente en la membrana de los endosomas y otras vesículas intracelulares, cuya expresión en la superficie celular ocurre con la desgranulación y la fusión de la membrana de lisosomas y endosomas con la membrana citoplasmática [459][460]. Recientemente se ha comprobado que las células plasmáticas clonales de las GMSI (pero no las del MM), muestran un incremento en la expresión de moléculas HLA-I en su superficie [341], aunque se requiere de más información para definir la relación que pudiera existir entre la expresión incrementada de moléculas HLA-I y de CD63 en las células plasmáticas clonales de las GMSI. Aunque de forma similar tampoco se conoce el posible significado de los patrones alterados de expresión de tetraspaninas en otras neoplasias B, el conocimiento de la función de estas moléculas en la diferenciación normal nos puede ayudar a definirlo mejor. En este sentido, estudios previos han sugerido que la unión de CD53 protege a las células linfoides de la apoptosis [461], una característica de los linfocitos de memoria maduros/periféricos. Teniendo en cuenta la asociación existente en la LLC-B entre sobre-expresión de CD53 por las células tumorales y el mayor grado de infiltración de SP y ganglios linfáticos, es posible que la sobre-expresión de CD53 pueda favorecer la supervivencia de las células de la LLC-B en estos tejidos. Por el contrario, niveles disminuidos de expresión de CD9 en la LLC-B se han relacionado con una mayor infiltración de MO y mayor grado de trombopenia; en este sentido, se ha demostrado que CD9 tiene un papel primordial en la motilidad/migración de células carcinomatosas [462], de manera que su expresión disminuida en células de carcinoma se ha asociado a un elevado poder metastático del tumor [458], lo que podría ayudar a explicar la relación

observada entre la expresión disminuida de CD9 y el mayor grado de infiltración de la MO en pacientes con LLC-B.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran la utilidad de estas cuatro tetraspaninas, en combinación con otros marcadores asociados a células B, no solo para la clasificación diagnóstica de las neoplasias linfoides B, sino también para la identificación de fenotipos aberrantes que pueden ser utilizados para la monitorización de enfermedad mínima residual [7][179][463]. Aunque el significado exacto de tales aberraciones fenotípicas todavía no se ha establecido, deberían reflejar alteraciones genéticas específicas. Sin embargo, debido al número limitado de casos incluido en cada categoría genética específica en la mayoría de los grupos diagnósticos, no pueden derivarse conclusiones definitivas sobre las asociaciones fenotípicas/genotípicas; para ello es necesaria la realización de estudios en series más amplias de pacientes.

En resumen, en lo que se refiere a este apartado, nuestros resultados muestran la existencia de tres patrones diferentes de expresión de tetraspaninas a lo largo de la maduración de las células B, asociándose la expresión de CD9 y CD81 al estadio de precursor B inmaduro, la de CD37 y CD53 a las células B maduras periféricas y la de CD9 y CD53 a las células plasmáticas que han recirculado a la MO desde los tejidos linfoides secundarios. Así mismo merece destacar que la determinación del patrón de expresión de tetraspaninas en las células B neoplásicas presenta grandes similitudes con su contrapartida normal y puede contribuir a mejorar la caracterización y discriminación de distintas neoplasias de células B, incluso cuándo coexisten en pacientes con síndromes linfoproliferativos crónicos B de tipo biclonal. A pesar de esto, las células B neoplásicas frecuentemente muestran expresión aberrante de tetraspaninas concretas, lo que podría utilizarse para la investigación de enfermedad mínima residual.

3.- Estandarización del análisis automático de patrones fenotípicos basado en el estudio de componentes principales, aplicado a la clasificación inmunofenotípica de los síndromes linfoproliferativos crónicos B.

Actualmente, la utilidad de la citometría de flujo aplicada al estudio de clasificación diagnóstica de leucemias y linfomas es variable en las diferentes categorías de enfermedad, dado que depende en gran medida del perfil inmunofenotípico de las células tumorales de cada caso individual [168][175][279][444][464][465]. Por ejemplo, en el caso concreto de los SLPC-B, se sabe que el análisis inmunofenotípico mediante citometría de flujo es muy útil en el diagnóstico de la LLC-B y TL, siendo menos útil para la clasificación de los LCM, LF y de forma particular para los linfomas de zona marginal [144][466][467]. Tal variabilidad en la eficacia de la citometría de flujo para clasificar los SLPC-B se relaciona con varios factores. En primer lugar, con la carencia de marcadores individuales específicos para cada entidad, de manera que se hace necesaria la interpretación de perfiles inmunofenotípicos complejos, más o menos típicos de cada enfermedad; en segundo lugar, con la propia variabilidad biológica de las distintas entidades, que hace que sus características se superpongan entre las distintas categorías diagnósticas de la OMS. Finalmente, con la falta de procedimientos y criterios estandarizados para la interpretación de estos perfiles inmunofenotípicos complejos [84][155][168][468][469][470].

Los esfuerzos iniciales encaminados a solventar estos problemas relacionados con la clasificación de los SLPC-B mediante citometría de flujo, se centraron en identificar nuevos marcadores que fueran informativos y a ser posible específicos de cada entidad [144][466][467][469][471][472], lo que ha supuesto el empleo de paneles cada vez más amplios de anticuerpos. Posteriormente, los esfuerzos se enfocaron en la estandarización de los procedimientos, y por tanto en formular recomendaciones y directrices en lo que respecta a las técnicas específicas

para el procesamiento de las muestras, a los marcadores más informativos considerados de uso obligado para clasificar ciertas entidades y, a definir sistemas de puntuación para la definición de las distintas categorías diagnósticas [471][473][474]. Todos estos esfuerzos han contribuido sin duda a mejorar la reproducibilidad del análisis inmunofenotípico en el estudio diagnóstico de las hemopatías malignas en general y de los SLPC en particular, pero a expensas de aumentar progresivamente la complejidad en la interpretación de los datos obtenidos por citometría de flujo. Ello supone la necesidad de que haya expertos en citometría, altamente cualificados en la interpretación de estos perfiles fenotípicos complejos [471]. Hasta ahora, para clasificar un caso determinado dentro de una categoría diagnóstica concreta, la estrategia que sigue el profesional especializado consiste en aplicar métodos convencionales (“manuales”) de análisis de datos, basados en la visualización bidimensional de los parámetros medidos, con la finalidad de identificar y caracterizar las distintas poblaciones celulares presentes en una muestra. Teniendo en cuenta la complejidad cada vez mayor de los paneles de estudio, este análisis convencional de los datos de citometría adquiere un componente de subjetividad no despreciable, relacionado claramente con el grado de experiencia del operador, que a su vez afecta negativamente a la reproducibilidad de los resultados. En cierto modo, el procedimiento de análisis se ha convertido en un proceso basado en una interpretación de histogramas y diagramas de puntos coloreados, de forma similar al proceso interpretativo que sigue el patólogo (imágenes morfológicas e histopatológicas mediante microscopía) [475]. Más recientemente, se han intentado aplicar algoritmos supervisados y orientados por expertos, que permitan clasificar de forma más precisa los SLPC-B y otras neoplasias hematológicas [476][477]; sin embargo, con relativa frecuencia, previamente a la aplicación de dichos algoritmos en estas estrategias se hace una interpretación *a priori* de los datos de forma que por ejemplo, los valores de los marcadores individuales se expresan bien como valores de media/mediana de intensidad de fluorescencia para una población celular concreta, o bien se traducen a

un valor arbitrario semicuantitativo de intensidad de expresión de antígenos, (negativo vs. positivo, o débil vs. intenso), que a su vez puede suponer un sesgo que resta valor al algoritmo diagnóstico.

Por todo ello, un objetivo prioritario de este trabajo de tesis doctoral ha sido establecer un método objetivo de clasificación fenotípica de los distintos SLPC-B en las diferentes categorías diagnósticas de la OMS; para ello, hemos aplicado y evaluado un procedimiento basado en el análisis de componentes principales [478], y hemos comparado los resultados obtenidos con este nuevo método con las estrategias de análisis convencional. Siguiendo el procedimiento descrito de forma detallada en el trabajo de Pedreira et al. [479], inicialmente realizamos una fusión de los ficheros de datos de cada caso, procedentes de todas las alícuotas de una misma muestra, marcadas con diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales que contenían al menos un marcador común, que nos permitía identificar y seleccionar la población de interés (en este caso CD19 para identificar las células B patológicas), además de las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC); una vez fusionados en un único fichero de datos, realizamos el cálculo de la reactividad de cada célula analizada para aquellos marcadores incluidos en el panel, pero medidos en otras alícuotas. Con ello obtuvimos finalmente un único fichero de datos que contenía información sobre todos y cada uno de los parámetros analizados con el panel completo, para cada una de las células B neoplásicas de cada caso.

Las herramientas que se utilizaron para hacer la fusión y estimación de los datos están disponibles en el nuevo programa de análisis de datos de citometría de flujo INFINICYT [479], que de esta manera nos permitió además generar grupos de referencia, cada uno de los cuales contenía información sobre las células neoplásicas de varios pacientes, representativos de las distintas categorías diagnósticas de SLPC-B de la clasificación de la OMS. En concreto, se crearon tres grupos de referencia diagnóstica (LLC-B, LCM y LF), obtenidos a partir de 30 casos típicos de cada categoría, de acuerdo con los criterios de la OMS.

Una vez creados los grupos de referencia (n=10 de cada grupo), cada caso problema incluido en el estudio (n=175) se comparó con los 3 pares posibles de grupos de referencia (LLC-B vs. LCM, LLC-B vs. LF y LCM vs. LF), empleando un análisis de componentes principales (aunque para reducir la dimensionalidad de los datos, solamente consideramos el primer y segundo componente principal). Al comparar este procedimiento de clasificación con el diagnóstico final de cada caso, comprobamos que la mayoría de ellos (89%) se clasificaron correctamente. El nivel de eficiencia alcanzado fue particularmente elevado en la LLC-B típica, el LCM y el LF, respecto a otros SLPC-B y la LLC-B atípica. Además esta estrategia de análisis permitió conocer los marcadores mas informativos para la clasificación de los SLPC-B en los tres subtipos diagnósticos para los cuáles se establecieron grupos de referencia: 1) CD23, CD5, CD27, CD10, CD43, CD20 y CD38 en la distinción entre LLC-B y LF; 2) CD23, CD38, CD20, sIgM, CD79b, y FMC7 en el diagnóstico diferencial entre LLC-B y LCM y; 3) CD5, sIgM, CD79b, FMC7 y CD19 en la diferenciación entre LF y LCM.

En el restante 11% de los casos esta estrategia no permitió clasificar correctamente a los pacientes, que en su mayoría correspondían a aquellas entidades para las cuáles no disponíamos de grupos de referencia (p. ej. LZME, LLP y linfoma tipo MALT, así como LLC-B atípica), que permitiesen definir con precisión el inmunofenotipo de estas entidades [480][481][482]. Estos resultados demuestran la necesidad de incorporar marcadores adicionales al panel de anticuerpos utilizado, para la correcta filiación diagnóstica de estos grupos de SLPC-B.

En nuestro conocimiento, este constituye el primer intento de proponer un procedimiento, con base en la información obtenida a partir de los perfiles fenotípicos de las células tumorales individuales, para orientar/ayudar a los expertos en la interpretación de los patrones inmunofenotípicos y facilitar la caracterización diagnóstica de las neoplasias hematológicas. La herramienta propuesta, en el presente trabajo para la clasificación inmunofenotípica de los SLPC-B, basada en el análisis de componentes principales, constituye una aproximación prometedora en la

estandarización de la interpretación de los perfiles inmunofenotípicos de células B neoplásicas de pacientes con LLC-B, LCM, LF y otros SLPC-B, y su clasificación en entidades bien definidas, y constituye un primer paso para la automatización de los análisis inmunofenotípicos. Además, permite evaluar de forma objetiva y reproducible la utilidad de los paneles de anticuerpos empleados respecto a su finalidad, apuntando además la necesidad de mejorar las combinaciones de anticuerpos si no se alcanza de forma óptima esta finalidad.

V.- Conclusiones

En relación con la utilidad de la citometría de flujo en el diagnóstico y clasificación de los LNH y SLPC en muestras de PAAF:

1.- La citometría de flujo muestra un elevado grado de acuerdo con la citología y la histología, en el diagnóstico inicial de muestras obtenidas mediante PAAF, de tal forma que la información que proporciona es complementaria, y mejora la capacidad diagnóstica de ambos métodos convencionales, lo que apoya la utilización sistemática de la citometría de flujo en el diagnóstico inicial de muestras de PAAF.

2.- Con respecto a la clasificación diagnóstica de los LNH-B en los distintos subgrupos de la OMS, la citometría de flujo junto con la histología, proporcionan información complementaria y solamente en aquellos casos en los que el diagnóstico final es de LLC-B/LLBCP o LCM, se podría plantear la opción de obviar la realización de la biopsia del tejido.

En relación con la expresión de tetraspaninas en los síndromes linfoproliferativos crónicos B y su asociación con la maduración linfoide B normal:

3.- Los patrones de expresión de tetraspaninas a lo largo de la maduración de las células B probablemente reflejan las interacciones que desarrollan las células B con el micromedioambiente durante su diferenciación, de tal manera que la pérdida de CD9 y CD81 en los linfocitos B maduros de MO podría estar relacionada con la capacidad de esas células de migrar a otros tejidos.

4.- La identificación de patrones fenotípicos aberrantes asociados a la expresión de tetraspaninas en distintas neoplasias linfoides B pone de manifiesto la

utilidad potencial de estas moléculas, junto con otros marcadores asociados a células B, en la clasificación de los SLPC-B, así como en la detección de enfermedad mínima residual.

En relación con la estandarización del análisis automático de patrones fenotípicos basado en el estudio de componentes principales, en la clasificación inmunofenotípica de los síndromes linfoproliferativos crónicos B:

5.- La utilización de análisis multivariantes como el análisis de componentes principales propuesto en el presente trabajo, para la clasificación inmunofenotípica de los SLPC-B, constituye una estrategia prometedora en la estandarización de la interpretación de los perfiles inmunofenotípicos de células B neoplásicas de pacientes con LLC-B, LCM, LF y otros SLPC-B y su clasificación en entidades bien definidas, así como en la evaluación de la utilidad de los paneles de anticuerpos empleados para estos fines.

VI.- Bibliografía

1. 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.
2. Ravandi, F. and S. O'Brien, *Chronic lymphoid leukemias other than chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment*. Mayo Clin Proc, 2005. **80**(12): p. 1660-74.
3. Harris, N.L., et al., *World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting- Airlie House, Virginia, November 1997*. J Clin Oncol, 1999. **17**(12): p. 3835-49.
4. Campana, D., et al., *Human B cell development. I. Phenotypic differences of B lymphocytes in the bone marrow and peripheral lymphoid tissue*. J Immunol, 1985. **134**(3): p. 1524-30.
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. Loken, M.R., et al., *Flow cytometric analysis of normal B lymphoid development*. Pathol Immunopathol Res, 1988. **7**(5): p. 357-70.
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. Hagman, J. and K. Lukin, *Transcription factors drive B cell development*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(2): p. 127-34.
9. Schebesta, M., B. Heavey, and M. Busslinger, *Transcriptional control of B-cell development*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(2): p. 216-23.
10. Schebesta, M., P.L. Pfeffer, and M. Busslinger, *Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 473-85.
11. van Zelm, M.C., et al., *Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5912-22.
12. 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): p. 1-13.
13. Porwit-MacDonald, A., et al., *BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)*. Leukemia, 2000. **14**(5): p. 816-25.
14. Bennett, I.M., et al., *Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1845-56.
15. Spits, H., L.L. Lanier, and J.H. Phillips, *Development of human T and natural killer cells*. Blood, 1995. **85**(10): p. 2654-70.

16. Spits, H., et al., *Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells*. Immunol Rev, 1998. **165**: p. 75-86.
17. Lima M, A.J., Bárcena P, García-Montero A, Queirós ML, Santos AH, Algueró MC, Abuín I, Fuertes M, Bermejo, Fisac P, De las Heras N, Mayayo P, Ruis-Cabello, Giralt M, San Miguel J, Orfao A. , *Diagnóstico biológico: Inmunofenotipo de las células NK*. . Haematologica (supl 1), 2004. **89**: p. 255-260.
18. Nagasawa, T., *Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 107-16.
19. Allen, C.D., T. Okada, and J.G. Cyster, *Germinal-center organization and cellular dynamics*. Immunity, 2007. **27**(2): p. 190-202.
20. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *Antigen-specific memory B cell development*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 487-513.
21. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(1-2): p. 73-83.
22. Espeli, M., et al., *Initiation of pre-B cell receptor signaling: common and distinctive features in human and mouse*. Semin Immunol, 2006. **18**(1): p. 56-66.
23. Egawa, T., et al., *The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor*. Immunity, 2001. **15**(2): p. 323-34.
24. Stoddart, A., R.J. Ray, and C.J. Paige, *Analysis of murine CD22 during B cell development: CD22 is expressed on B cell progenitors prior to IgM*. Int Immunol, 1997. **9**(10): p. 1571-9.
25. Zhu, J., et al., *Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3706-12.
26. Tokoyoda, K., et al., *Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development*. Immunity, 2004. **20**(6): p. 707-18.
27. Pelayo, R., et al., *Life before the pre-B cell receptor checkpoint: specification and commitment of primitive lymphoid progenitors in adult bone marrow*. Semin Immunol, 2006. **18**(1): p. 2-11.
28. Hillion, S., et al., *Signaling pathways regulating RAG expression in B lymphocytes*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(7): p. 599-604.
29. Cambier, J.C., *Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)*. J Immunol, 1995. **155**(7): p. 3281-5.
30. Loffert, D., et al., *Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development*. Immunity, 1996. **4**(2): p. 133-44.
31. Abbas AK, L.A., Pillai S. , *Cellular and Molecular Immunology.*, ed.: MO: WB Saunders Company. St. Louis, 2007

32. Hess, J., et al., *Induction of pre-B cell proliferation after de novo synthesis of the pre-B cell receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1745-50.
33. Sims, G.P., et al., *Identification and characterization of circulating human transitional B cells*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4390-8.
34. Cuss, A.K., et al., *Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1506-16.
35. Lee, J., et al., *Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4116-26.
36. Caraux, A., et al., *Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells*. Haematologica, 2010. **95**(6): p. 1016-20.
37. Suryani, S., et al., *Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells*. Blood, 2010. **115**(3): p. 519-29.
38. Radic, M.Z. and M. Zouali, *Receptor editing, immune diversification, and self-tolerance*. Immunity, 1996. **5**(6): p. 505-11.
39. Chen, C., E.L. Prak, and M. Weigert, *Editing disease-associated autoantibodies*. Immunity, 1997. **6**(1): p. 97-105.
40. Thomas, M.D., B. Srivastava, and D. Allman, *Regulation of peripheral B cell maturation*. Cell Immunol, 2006. **239**(2): p. 92-102.
41. Allen, C.D., et al., *Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5*. Nat Immunol, 2004. **5**(9): p. 943-52.
42. Klein, U., et al., *Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2639-44.
43. Hennino, A., et al., *FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis*. J Exp Med, 2001. **193**(4): p. 447-58.
44. Wasserstrom, H., et al., *Memory B cells and pneumococcal antibody after splenectomy*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3684-9.
45. Allen, C.D. and J.G. Cyster, *Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function*. Semin Immunol, 2008. **20**(1): p. 14-25.
46. Park, C.S., et al., *Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6676-83.
47. Yoon, S.O., et al., *Notch ligands expressed by follicular dendritic cells protect germinal center B cells from apoptosis*. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 352-8.
48. Good, K.L., D.T. Avery, and S.G. Tangye, *Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells*. J Immunol, 2009. **182**(2): p. 890-901.
49. Maurer, D., et al., *IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset*. J Immunol, 1992. **148**(12): p. 3700-5.

50. Tangye, S.G., et al., *Functional requirements for interactions between CD84 and Src homology 2 domain-containing proteins and their contribution to human T cell activation*. J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2485-95.
51. Bernasconi, N.L., N. Onai, and A. Lanzavecchia, *A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4500-4.
52. Fecteau, J.F. and S. Neron, *CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4621-9.
53. Tangye, S.G. and D.M. Tarlinton, *Memory B cells: effectors of long-lived immune responses*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2065-75.
54. Tangye, S.G., et al., *Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27*. J Exp Med, 1998. **188**(9): p. 1691-703.
55. Espeli, M., et al., *Impaired B-cell development at the pre-BII-cell stage in galectin-1-deficient mice due to inefficient pre-BII/stromal cell interactions*. Blood, 2009. **113**(23): p. 5878-86.
56. Tokoyoda, K., et al., *Organization and maintenance of immunological memory by stroma niches*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2095-9.
57. Almeida, J., et al., *Immunophenotypic and DNA content characteristics of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance*. Pathol Biol (Paris), 1999. **47**(2): p. 119-27.
58. Guikema, J.E., et al., *CD27 is heterogeneously expressed in multiple myeloma: low CD27 expression in patients with high-risk disease*. Br J Haematol, 2003. **121**(1): p. 36-43.
59. Harada, H., et al., *Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells*. Blood, 1993. **81**(10): p. 2658-63.
60. Terstappen, L.W., et al., *Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry*. Blood, 1990. **76**(9): p. 1739-47.
61. Angelin-Duclos, C., et al., *Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5462-71.
62. Gonzalez-Garcia, I., et al., *Immunization-induced perturbation of human blood plasma cell pool: progressive maturation, IL-6 responsiveness, and high PRDI-BF1/BLIMP1 expression are critical distinctions between antigen-specific and nonspecific plasma cells*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 4042-50.
63. Lampert, I.A., S. Van Noorden, and A.C. Wotherspoon, *Centrocytoid plasma cells of the germinal center*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2005. **13**(2): p. 124-31.
64. Menendez, P., et al., *Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation*. Leukemia, 2004. **18**(3): p. 491-8.
65. Ocqueteau, M., et al., *Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the*

- differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. Am J Pathol, 1998. 152(6): p. 1655-65.*
66. Vescio, R.A., et al., *The hematopoietic stem cell antigen, CD34, is not expressed on the malignant cells in multiple myeloma. Blood, 1994. 84(10): p. 3283-90.*
67. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers, *Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. J Exp Med, 1998. 188(9): p. 1679-89.*
68. Perez-Andres, M., et al., *Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. Cytometry B Clin Cytom, 2010. 78 Suppl 1: p. S47-60.*
69. Deneys, V., et al., *Reference values for peripheral blood B-lymphocyte subpopulations: a basis for multiparametric immunophenotyping of abnormal lymphocytes. J Immunol Methods, 2001. 253(1-2): p. 23-36.*
70. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. J Clin Pathol, 1989. 42(6): p. 567-84.*
71. Matutes E, W.I., Sainati L, De Oliveira MP, Cayovsky D, *Advances in the lymphoproliferative disorders. Review of our experience in the study of over 1000 cases. Biol Clin Hematol, 1989. 11: p. 53-62.*
72. Matutes, E., et al., *The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. Leukemia, 1994. 8(10): p. 1640-5.*
73. Matutes, E., et al., *The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. Blood, 1994. 83(6): p. 1558-62.*
74. Matutes, E., *Immunophenotype of the chronic lymphoproliferative disorders. Haematologica, 1998. 83: p. 193-8.*
75. Montserrat, E., *Chronic lymphoproliferative disorders. Curr Opin Oncol, 1997. 9(1): p. 34-41.*
76. Matutes, E., et al., *The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. Leuk Lymphoma, 1994. 14 Suppl 1: p. 57-61.*
77. Ciudad, J., et al., *Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. Haematologica, 1998. 83(12): p. 1069-75.*
78. Dworzak, M.N., et al., *Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. Blood, 1998. 92(9): p. 3203-9.*

79. De Waele, M., et al., *Different expression of adhesion molecules on CD34+ cells in AML and B-lineage ALL and their normal bone marrow counterparts*. Eur J Haematol, 1999. **63**(3): p. 192-201.
80. Weir, E.G., et al., *A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for residual disease detection*. Leukemia, 1999. **13**(4): p. 558-67.
81. Klein, U., R. Kuppers, and K. Rajewsky, *Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1288-98.
82. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers, *Phenotypic and molecular characterization of human peripheral blood B-cell subsets with special reference to N-region addition and J kappa-usage in V kappa J kappa-joints and kappa/lambda-ratios in naive versus memory B-cell subsets to identify traces of receptor editing processes*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **246**: p. 141-6; discussion 147.
83. Wuchter, C., et al., *Detection of acute leukemia cells with mixed lineage leukemia (MLL) gene rearrangements by flow cytometry using monoclonal antibody 7.1*. Leukemia, 2000. **14**(7): p. 1232-8.
84. Sanchez, M.L., et al., *Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation*. Leukemia, 2002. **16**(8): p. 1460-9.
85. Lynch, E.F., P.A. Jones, and S.H. Swerdlow, *CD43 and CD5 antibodies define four normal and neoplastic B-cell subsets: a three-color flow cytometric study*. Cytometry, 1995. **22**(3): p. 223-31.
86. Fecteau, J.F., G. Cote, and S. Neron, *A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3728-36.
87. Erazo, A., et al., *Unique maturation program of the IgE response in vivo*. Immunity, 2007. **26**(2): p. 191-203.
88. Achatz-Straussberger, G., et al., *Limited humoral immunoglobulin E memory influences serum immunoglobulin E levels in blood*. Clin Exp Allergy, 2009. **39**(9): p. 1307-13.
89. Moir, S., et al., *Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals*. J Exp Med, 2008. **205**(8): p. 1797-805.
90. Rakhmanov, M., et al., *Circulating CD21low B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13451-6.
91. Mei, H.E., et al., *Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2461-9.

92. Odendahl, M., et al., *Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1614-21.
93. Mohr, E., et al., *Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature*. J Immunol, 2009. **182**(4): p. 2113-23.
94. Gonzalez-Garcia, I., et al., *Increased survival is a selective feature of human circulating antigen-induced plasma cells synthesizing high-affinity antibodies*. Blood, 2008. **111**(2): p. 741-9.
95. Agematsu, K., *Memory B cells and CD27*. Histol Histopathol, 2000. **15**(2): p. 573-6.
96. Stetler-Stevenson, M. and R.C. Braylan, *Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders*. Semin Hematol, 2001. **38**(2): p. 111-23.
97. Trentin, L., et al., *B lymphocytes from patients with chronic lymphoproliferative disorders are equipped with different costimulatory molecules*. Cancer Res, 1997. **57**(21): p. 4940-7.
98. Cariappa, A. and S. Pillai, *Antigen-dependent B-cell development*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(2): p. 241-9.
99. Kuppers, R., et al., *Cellular origin of human B-cell lymphomas*. N Engl J Med, 1999. **341**(20): p. 1520-9.
100. Bleul, C.C., J.L. Schultze, and T.A. Springer, *B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement*. J Exp Med, 1998. **187**(5): p. 753-62.
101. Heinonen, K.M. and C. Perreault, *Development and functional properties of thymic and extrathymic T lymphocytes*. Crit Rev Immunol, 2008. **28**(5): p. 441-66.
102. de la Hera, A., et al., *Function of CD44(Pgp-1) homing receptor in human T cell precursors*. Int Immunol, 1989. **1**(6): p. 598-604.
103. Wu, L., *T lineage progenitors: the earliest steps en route to T lymphocytes*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(2): p. 121-6.
104. Marquez, C., et al., *The development of T and non-T cell lineages from CD34+ human thymic precursors can be traced by the differential expression of CD44*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 475-83.
105. Kasinrerk, W., et al., *Enhancement of human lymphocyte proliferative response to purified protein derivative by an anti-interleukin-2 receptor alpha chain antibody (CD25)*. Immunology, 1994. **83**(1): p. 33-7.
106. Schuurman, H.J., D. van Wichen, and R.A. de Weger, *Expression of activation antigens on thymocytes in the 'common thymocyte' stage of differentiation*. Thymus, 1989. **14**(1-3): p. 43-53.
107. Sotzik, F., A. Boyd, and K. Shortman, *Surface antigens of human thymocyte populations defined by CD3, CD4 and CD8 expression: CD1a is expressed by mature thymocytes but not peripheral T cells*. Immunol Lett, 1993. **36**(1): p. 101-6.

108. Clayberger, C.K.C., *T-cell and NK-cell immunity*. 4th edition ed. Hoffman: Hematology: Basic Principles and Practice, ed. C. Livingstone. 2005.
109. Michie, C.A., et al., *Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms*. Nature, 1992. **360**(6401): p. 264-5.
110. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
111. Lima, M., et al., *The "ex vivo" patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states*. Blood Cells Mol Dis, 2002. **28**(2): p. 181-90.
112. Lima, M., et al., *Immunophenotype and TCR-Vbeta repertoire of peripheral blood T-cells in acute infectious mononucleosis*. Blood Cells Mol Dis, 2003. **30**(1): p. 1-12.
113. Appay, V., *The physiological role of cytotoxic CD4(+) T-cells: the holy grail?* Clin Exp Immunol, 2004. **138**(1): p. 10-3.
114. Namekawa, T., et al., *Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis*. J Immunol, 2000. **165**(2): p. 1138-45.
115. van Bergen, J., et al., *Phenotypic and functional characterization of CD4 T cells expressing killer Ig-like receptors*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6719-26.
116. Bitmansour, A.D., et al., *Clonotypic structure of the human CD4+ memory T cell response to cytomegalovirus*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1151-63.
117. Gamadia, L.E., et al., *Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2686-92.
118. Laky, K., C. Fleischacker, and B.J. Fowlkes, *TCR and Notch signaling in CD4 and CD8 T-cell development*. Immunol Rev, 2006. **209**: p. 274-83.
119. Loza, M.J., et al., *Human peripheral CD2-/lo T cells: an extrathymic population of early differentiated, developing T cells*. Int Immunol, 2005. **17**(9): p. 1213-25.
120. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. Blood, 2008. **112**(3): p. 461-9.
121. Fehniger, T.A., et al., *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity*. Blood, 2003. **101**(8): p. 3052-7.
122. Lanier, L.L., et al., *The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes*. J Immunol, 1986. **136**(12): p. 4480-6.
123. Ferlazzo, G., et al., *The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1455-62.
124. Freud, A.G., et al., *A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 295-304.

125. Mattei, F., et al., *IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1179-87.
126. Kennedy, M.K., et al., *Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice*. J Exp Med, 2000. **191**(5): p. 771-80.
127. Koka, R., et al., *Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice*. J Exp Med, 2003. **197**(8): p. 977-84.
128. Mrozek, E., P. Anderson, and M.A. Caligiuri, *Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells*. Blood, 1996. **87**(7): p. 2632-40.
129. Freud, A.G., et al., *Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 1033-43.
130. Lima, M., et al., *Immunophenotypic characterization of normal blood CD56+lo versus CD56+hi NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties*. Blood Cells Mol Dis, 2001. **27**(4): p. 731-43.
131. Geiselhart, A., et al., *Comparative analysis of the immunophenotypes of decidual and peripheral blood large granular lymphocytes and T cells during early human pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 1995. **33**(4): p. 315-22.
132. King, A., et al., *Expression of CD3 epsilon, CD3 zeta, and RAG-1/RAG-2 in decidual CD56+ NK cells*. Cell Immunol, 1998. **183**(2): p. 99-105.
133. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3146-51.
134. Jacobs, R., et al., *CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 3121-7.
135. Sedlmayr, P., et al., *Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56dim+ and CD56bright+ natural killer cell subpopulations*. Int Arch Allergy Immunol, 1996. **110**(4): p. 308-13.
136. Li, C.Y. and L.T. Yam, *Cytochemistry and immunochemistry in hematologic diagnoses*. Hematol Oncol Clin North Am, 1994. **8**(4): p. 665-81.
137. Dunphy, C.H., *Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology*. Arch Pathol Lab Med, 2004. **128**(9): p. 1004-22.
138. Harris, N.L., et al., *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group*. Blood, 1994. **84**(5): p. 1361-92.
139. Tatsumi, J., Y. Tatsumi, and N. Tatsumi, *Counting and differential of bone marrow cells by an electronic method*. Am J Clin Pathol, 1986. **86**(1): p. 50-4.
140. d'Onofrio, G., et al., *Evaluation of the Abbott Cell Dyn 4000 automated fluorescent reticulocyte measurements: comparison with manual, FACScan and Sysmex R1000 methods*. Clin Lab Haematol, 1997. **19**(4): p. 253-60.

141. Mori, Y., et al., *Automation of bone marrow aspirate examination using the XE-2100 automated hematology analyzer*. Cytometry B Clin Cytom, 2004. **58**(1): p. 25-31.
142. Das, D.K., *Value and limitations of fine-needle aspiration cytology in diagnosis and classification of lymphomas: A review*. Diagn Cytopathol, 1999. **21**(4): p. 240-9.
143. Sandhaus, L.M., *Fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of lymphoma. The next step*. Am J Clin Pathol, 2000. **113**(5): p. 623-7.
144. Mourad, W.A., et al., *Primary diagnosis and REAL/WHO classification of non-Hodgkin's lymphoma by fine-needle aspiration: cytomorphologic and immunophenotypic approach*. Diagn Cytopathol, 2003. **28**(4): p. 191-5.
145. Costa, E.S., et al., *A new automated flow cytometry data analysis approach for the diagnostic screening of neoplastic B-cell disorders in peripheral blood samples with absolute lymphocytosis*. Leukemia, 2006. **20**(7): p. 1221-30.
146. Trabuio, E., et al., *Performance of automated platelet quantification using different analysers in comparison with an immunological reference method in thrombocytopenic patients*. Blood Transfus, 2009. **7**(1): p. 43-8.
147. Kickler, T.S., *Clinical analyzers. Advances in automated cell counting*. Anal Chem, 1999. **71**(12): p. 363R-365R.
148. Meusers, P. and G. Brittinger, *[R.E.A.L. classification of non-Hodgkin lymphoma from the clinico-oncologic viewpoint]*. Praxis (Bern 1994), 1998. **87**(23): p. 793-800.
149. Little, J.V., et al., *Flow cytometric analysis of lymphoma and lymphoma-like disorders*. Semin Diagn Pathol, 1989. **6**(1): p. 37-54.
150. Craig, F.E. and K.A. Foon, *Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms*. Blood, 2008. **111**(8): p. 3941-67.
151. Orfao, A., et al., *Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions*. Clin Chem, 1999. **45**(10): p. 1708-17.
152. Basso, G., et al., *New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias*. Haematologica, 2001. **86**(7): p. 675-92.
153. Davis, B.H., et al., *2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications*. Cytometry B Clin Cytom, 2007. **72 Suppl 1**: p. S5-13.
154. D'Ostilio, A., et al., *[Clinical uses of flow cytometry in hematological oncology]*. Recent Prog Med, 1997. **88**(4): p. 157-65.
155. Kaleem, Z., *Flow cytometric analysis of lymphomas: current status and usefulness*. Arch Pathol Lab Med, 2006. **130**(12): p. 1850-8.
156. Cady, F.M. and W.G. Morice, *Flow cytometric assessment of T-cell chronic lymphoproliferative disorders*. Clin Lab Med, 2007. **27**(3): p. 513-32, vi.
157. Demurtas, A., et al., *Utility of Flow Cytometry Immunophenotyping in Fine-needle Aspirate Cytologic Diagnosis of Non-Hodgkin Lymphoma: A Series of 252 Cases and Review of the Literature*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2009.

158. Quijano, S., et al., *Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry*. J Clin Oncol, 2009. **27**(9): p. 1462-9.
159. Orfao, A., et al., *Acute lymphoblastic leukemia (ALL): detection of minimal residual disease (MRD) at flow cytometry*. Leuk Lymphoma, 1994. **13 Suppl 1**: p. 87-90.
160. Bene, M.C., et al., *Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias*. Haematologica, 1999. **84**(11): p. 1024-34.
161. Ortuno Giner, F.J. and A. Orfao, *[Applicability of flow cytometry in the diagnosis and immunophenotyping follow-up of acute leukemias]*. Med Clin (Barc), 2002. **118**(11): p. 423-36.
162. Hernandez-Campo, P.M., et al., *Detailed immunophenotypic characterization of different major and minor subsets of peripheral blood cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. Transfusion, 2008. **48**(7): p. 1403-14.
163. van de Loosdrecht, A.A., et al., *Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes*. Haematologica, 2009. **94**(8): p. 1124-34.
164. Orfao, A., et al., *Flow cytometric analysis of mast cells from normal and pathological human bone marrow samples: identification and enumeration*. Am J Pathol, 1996. **149**(5): p. 1493-9.
165. Escribano, L., et al., *Immunophenotypic characterization of human bone marrow mast cells. A flow cytometric study of normal and pathological bone marrow samples*. Anal Cell Pathol, 1998. **16**(3): p. 151-9.
166. Escribano, L., et al., *Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: When and how to do it. Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA)*. Cytometry B Clin Cytom, 2004. **58**(1): p. 1-8.
167. Escribano, L., et al., *Flow cytometric analysis of normal and neoplastic mast cells: role in diagnosis and follow-up of mast cell disease*. Immunol Allergy Clin North Am, 2006. **26**(3): p. 535-47.
168. Braylan, R.C., *Impact of flow cytometry on the diagnosis and characterization of lymphomas, chronic lymphoproliferative disorders and plasma cell neoplasias*. Cytometry A, 2004. **58**(1): p. 57-61.
169. Bellido, M., et al., *Rapid and simple immunophenotypic characterization of lymphocytes using a new test*. Haematologica, 1998. **83**(8): p. 681-5.
170. Alexander, H.D., G.M. Markey, and T.C. Morris, *Diagnostic value of clonality of surface immunoglobulin light and heavy chains in malignant lymphoproliferative disorders*. Am J Hematol, 1994. **46**(3): p. 256.
171. Perea, G., et al., *Clinical utility of bone marrow flow cytometry in B-cell non-Hodgkin lymphomas (B-NHL)*. Histopathology, 2004. **45**(3): p. 268-74.
172. S. Böttcher , A.R., J. Flores ,P. Lucio ,R. de Tute ,A. Mendonça ,Q. Lecrevisse ,T. Kalina ,M. Kneba ,J.J.M. van Dongen ,A. Orfao ,EuroFlow Consortium. On behalf of the

- (Kiel, Germany), *Improved differential diagnosis between WHO-defined mature B-cell malignancies using integrated 8-color flow cytometry and novel software for multivariate analysis of immunophenotypic data*. Haematologica 2009. **94**[suppl.2] p. 273 abs. 0670.
173. Montillo, M., T. Schinkoethe, and T. Elter, *Eradication of minimal residual disease with alemtuzumab in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) patients: the need for a standard method of detection and the potential impact of bone marrow clearance on disease outcome*. Cancer Invest, 2005. **23**(6): p. 488-96.
174. Vuillier, F., et al., *Evaluation of residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients in clinical and bone-marrow remission using CD5-CD19 markers and PCR study of gene rearrangements*. Leuk Lymphoma, 1992. **7**(3): p. 195-204.
175. Quijano, S., et al., *Association between the proliferative rate of neoplastic B cells, their maturation stage, and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: analysis of a series of 432 patients*. Blood, 2008. **111**(10): p. 5130-41.
176. Orfao A, A.J., Sánchez ML, San Miguel J. , *Immunophenotypic diagnosis of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders other than chronic lymphocytic leukemia*. GB Faget, Eds: Chronic lymphocytic leukemia: Molecular Genetics, Biology, Diagnosis and Management. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 2003: p. 173-199.
177. Sausville, J.E., et al., *Minimal residual disease detection in hairy cell leukemia. Comparison of flow cytometric immunophenotyping with clonal analysis using consensus primer polymerase chain reaction for the heavy chain gene*. Am J Clin Pathol, 2003. **119**(2): p. 213-7.
178. Bottcher, S., et al., *Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: methods and significance of four-color flow cytometry compared to consensus IGH-polymerase chain reaction at initial staging and for follow-up examinations*. Haematologica, 2008. **93**(4): p. 551-9.
179. Sanchez, M.L., et al., *Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone*. Blood, 2003. **102**(8): p. 2994-3002.
180. Ortonne, N., et al., *Value of the CD8-CD3 ratio for the diagnosis of mycosis fungoides*. Mod Pathol, 2003. **16**(9): p. 857-62.
181. Matutes, E. and D. Catovsky, *Classification of mature T-cell leukemias*. Leukemia, 2003. **17**(8): p. 1682-3; author reply 1683.
182. Matutes, E., *Chronic T-cell lymphoproliferative disorders*. Rev Clin Exp Hematol, 2002. **6**(4): p. 401-20; discussion 449-50.
183. Lima, M., et al., *Utility of flow cytometry immunophenotyping and DNA ploidy studies for diagnosis and characterization of blood involvement in CD4+ Sezary's syndrome*. Haematologica, 2003. **88**(8): p. 874-87.

184. Jamal, S., et al., *Immunophenotypic analysis of peripheral T-cell neoplasms. A multiparameter flow cytometric approach*. Am J Clin Pathol, 2001. **116**(4): p. 512-26.
185. Rockman, S.P., *Determination of clonality in patients who present with diagnostic dilemmas: a laboratory experience and review of the literature*. Leukemia, 1997. **11**(6): p. 852-62.
186. Hu, H., et al., *Expression of T-cell receptor alpha and beta variable genes in normal and malignant human T cells*. Br J Haematol, 1993. **84**(1): p. 39-48.
187. Langerak, A.W., et al., *Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalphabeta T-cell proliferations*. Blood, 2001. **98**(1): p. 165-73.
188. Lima, M., et al., *Immunophenotypic analysis of the TCR-Vbeta repertoire in 98 persistent expansions of CD3(+)/TCR-alphabeta(+) large granular lymphocytes: utility in assessing clonality and insights into the pathogenesis of the disease*. Am J Pathol, 2001. **159**(5): p. 1861-8.
189. Sandberg, Y., et al., *TCRgammadelta+ large granular lymphocyte leukemias reflect the spectrum of normal antigen-selected TCRgammadelta+ T-cells*. Leukemia, 2006. **20**(3): p. 505-13.
190. van den Beemd, R., et al., *Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls*. Cytometry, 2000. **40**(4): p. 336-45.
191. Geursen, A., et al., *Population study of T cell receptor V beta gene usage in peripheral blood lymphocytes: differences in ethnic groups*. Clin Exp Immunol, 1993. **94**(1): p. 201-7.
192. McLean-Tooke, A., et al., *T cell receptor Vbeta repertoire of T lymphocytes and T regulatory cells by flow cytometric analysis in healthy children*. Clin Exp Immunol, 2008. **151**(1): p. 190-8.
193. Vallejo, A.N., *Age-dependent alterations of the T cell repertoire and functional diversity of T cells of the aged*. Immunol Res, 2006. **36**(1-3): p. 221-8.
194. Posnett, D.N., et al., *Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy"*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 609-18.
195. Kovaïou, R.D., et al., *Age-related differences in phenotype and function of CD4+ T cells are due to a phenotypic shift from naive to memory effector CD4+ T cells*. Int Immunol, 2005. **17**(10): p. 1359-66.
196. Khan, N., et al., *Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1984-92.
197. Shimomura, T., et al., *Oligoclonal accumulation of T cells in peripheral blood from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol, 1996. **95**(4): p. 732-7.
198. Direskeneli, H., et al., *Oligoclonal T cell expansions in patients with Behcet's disease*. Clin Exp Immunol, 1999. **117**(1): p. 166-70.

199. Okajima, M., et al., *Analysis of T cell receptor Vbeta diversity in peripheral CD4 and CD8 T lymphocytes in patients with autoimmune thyroid diseases*. Clin Exp Immunol, 2009. **155**(2): p. 166-72.
200. Bristeau-Leprince, A., et al., *Human TCR alpha/beta+ CD4-CD8- double-negative T cells in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome express restricted Vbeta TCR diversity and are clonally related to CD8+ T cells*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 440-8.
201. Lima, M., et al., *Clinicobiological, immunophenotypic, and molecular characteristics of monoclonal CD56-/dim chronic natural killer cell large granular lymphocytosis*. Am J Pathol, 2004. **165**(4): p. 1117-27.
202. Boudewijns, M., J.J. van Dongen, and A.W. Langerak, *The human androgen receptor X-chromosome inactivation assay for clonality diagnostics of natural killer cell proliferations*. J Mol Diagn, 2007. **9**(3): p. 337-44.
203. Kim, H.S., et al., *Whole blood Epstein-Barr virus DNA load as a diagnostic and prognostic surrogate: extranodal natural killer/T-cell lymphoma*. Leuk Lymphoma, 2009. **50**(5): p. 757-63.
204. Zambello, R., et al., *Expression and function of KIR and natural cytotoxicity receptors in NK-type lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1797-805.
205. Gattazzo, C., et al., *Lack of expression of inhibitory KIR3DL1 receptor in patients with NK-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes*. Haematologica, 2010.
206. Yonescu, R., et al., *Cytogenetic characterization of natural killer cell leukemia*. Cancer Genet Cytogenet, 2008. **183**(2): p. 125-30.
207. Fischer, L., et al., *Skewed expression of natural-killer (NK)-associated antigens on lymphoproliferations of large granular lymphocytes (LGL)*. Hematol Oncol, 2006. **24**(2): p. 78-85.
208. Epling-Burnette, P.K., et al., *Dysregulated NK receptor expression in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes*. Blood, 2004. **103**(9): p. 3431-9.
209. Jeffers, M.D., et al., *Fine needle aspiration cytology in the investigation on non-Hodgkin's lymphoma*. J Clin Pathol, 1998. **51**(3): p. 189-96.
210. Meda, B.A., et al., *Diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma. The usefulness and limitations of combined fine-needle aspiration cytomorphology and flow cytometry*. Am J Clin Pathol, 2000. **113**(5): p. 688-99.
211. Bangerter, M., et al., *Fine needle aspiration cytology and flow cytometry in the diagnosis and subclassification of non-Hodgkin's lymphoma based on the World Health Organization classification*. Acta Cytol, 2007. **51**(3): p. 390-8.
212. Nicol, T.L., et al., *The accuracy of combined cytopathologic and flow cytometric analysis of fine-needle aspirates of lymph nodes*. Am J Clin Pathol, 2000. **114**(1): p. 18-28.

213. Dong, H.Y., et al., *Fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis and classification of primary and recurrent lymphoma: a retrospective analysis of the utility of cytomorphology and flow cytometry*. Mod Pathol, 2001. **14**(5): p. 472-81.
214. Sigstad, E., et al., *The role of flow cytometric immunophenotyping in improving the diagnostic accuracy in referred fine-needle aspiration specimens*. Diagn Cytopathol, 2004. **31**(3): p. 159-63.
215. Zeppa, P., et al., *Fine-needle cytology and flow cytometry immunophenotyping and subclassification of non-Hodgkin lymphoma: a critical review of 307 cases with technical suggestions*. Cancer, 2004. **102**(1): p. 55-65.
216. Gong, J.Z., et al., *Fine-needle aspiration in non-Hodgkin lymphoma: evaluation of cell size by cytomorphology and flow cytometry*. Am J Clin Pathol, 2002. **117**(6): p. 880-8.
217. Mayall, F., A. Darlington, and B. Harrison, *Fine needle aspiration cytology in the diagnosis of uncommon types of lymphoma*. J Clin Pathol, 2003. **56**(11): p. 821-5.
218. Robins, D.B., et al., *Immunotyping of lymphoma by fine-needle aspiration. A comparative study of cytopspin preparations and flow cytometry*. Am J Clin Pathol, 1994. **101**(5): p. 569-76.
219. Zardawi, I.M., S. Jain, and G. Bennett, *Flow-cytometric algorithm on fine-needle aspirates for the clinical workup of patients with lymphadenopathy*. Diagn Cytopathol, 1998. **19**(4): p. 274-8.
220. Henrique, R.M., et al., *Immunophenotyping by flow cytometry of fine needle aspirates in the diagnosis of lymphoproliferative disorders: A retrospective study*. J Clin Lab Anal, 1999. **13**(5): p. 224-8.
221. Chhieng, D.C., J.F. Cangiarella, and J.M. Cohen, *Fine-needle aspiration cytology of lymphoproliferative lesions involving the major salivary glands*. Am J Clin Pathol, 2000. **113**(4): p. 563-71.
222. Liu, K., et al., *Diagnosis of hematopoietic processes by fine-needle aspiration in conjunction with flow cytometry: A review of 127 cases*. Diagn Cytopathol, 2001. **24**(1): p. 1-10.
223. Zander, D.S., et al., *Flow cytometry. In vitro assessment of its potential application for diagnosis and classification of lymphoid processes in cytologic preparations from fine-needle aspirates*. Am J Clin Pathol, 1994. **101**(5): p. 577-86.
224. Siebert, J.D., et al., *Utility of flow cytometry immunophenotyping for the diagnosis and classification of lymphoma in community hospital clinical needle aspiration/biopsies*. Arch Pathol Lab Med, 2000. **124**(12): p. 1792-9.
225. Bertram, H.C., I.J. Check, and M.A. Milano, *Immunophenotyping large B-cell lymphomas. Flow cytometric pitfalls and pathologic correlation*. Am J Clin Pathol, 2001. **116**(2): p. 191-203.
226. Mayall, F., et al., *Immunoflow cytometry and cell block immunohistochemistry in the FNA diagnosis of lymphoma: a review of 73 consecutive cases*. J Clin Pathol, 2000. **53**(6): p. 451-7.

227. Mathur, S. and K. Verm, *Peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified vs. Hodgkin's lymphoma on fine needle aspiration cytology*. Acta Cytol, 2005. **49**(4): p. 373-7.
228. Mathiot, C., et al., *Fine-needle aspiration cytology combined with flow cytometry immunophenotyping is a rapid and accurate approach for the evaluation of suspicious superficial lymphoid lesions*. Diagn Cytopathol, 2006. **34**(7): p. 472-8.
229. Fromm, J.R., A. Thomas, and B.L. Wood, *Flow cytometry can diagnose classical hodgkin lymphoma in lymph nodes with high sensitivity and specificity*. Am J Clin Pathol, 2009. **131**(3): p. 322-32.
230. Kussick, S.J., et al., *Prominent clonal B-cell populations identified by flow cytometry in histologically reactive lymphoid proliferations*. Am J Clin Pathol, 2004. **121**(4): p. 464-72.
231. Laane, E., et al., *Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma*. Cytometry B Clin Cytom, 2005. **64**(1): p. 34-42.
232. Gascoyne, R.D., *Establishing the diagnosis of lymphoma: from initial biopsy to clinical staging*. Oncology (Williston Park), 1998. **12**(10 Suppl 8): p. 11-6.
233. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
234. Margulies, D.H., *Monoclonal antibodies: producing magic bullets by somatic cell hybridization*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2451-2.
235. Jennings, C.D. and K.A. Foon, *Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy*. Blood, 1997. **90**(8): p. 2863-92.
236. Anderson, K.C., et al., *Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation*. Blood, 1984. **63**(6): p. 1424-33.
237. Chan, L.C., et al., *The spectrum of chronic lymphoproliferative disorders in Hong Kong. A prospective study*. Leukemia, 1997. **11**(11): p. 1964-72.
238. Rawstron, A.C., et al., *Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy*. Blood, 2001. **98**(1): p. 29-35.
239. Wells, D.A., et al., *Occult B cell malignancies can be detected by three-color flow cytometry in patients with cytopenias*. Leukemia, 1998. **12**(12): p. 2015-23.
240. Crotty, P.L., B.R. Smith, and G. Tallini, *Morphologic, immunophenotypic, and molecular evaluation of bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphoma*. Diagn Mol Pathol, 1998. **7**(2): p. 90-5.
241. Gudgin, E.J. and W.N. Erber, *Immunophenotyping of lymphoproliferative disorders: state of the art*. Pathology, 2005. **37**(6): p. 457-78.
242. DiGiuseppe, J.A. and M.J. Borowitz, *Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias*. Semin Oncol, 1998. **25**(1): p. 6-10.

243. NCCLS.H42-1--*Clinical Applications of Flow Cytometry: quality assurance and immunophenotype of lymphocytes; approved Guideline*. NCCLS document H42-A[ISBN 1-56238-364-7]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1998 2006.
244. Chen, Y.H., et al., *Immunophenotypic variations in hairy cell leukemia*. Am J Clin Pathol, 2006. **125**(2): p. 251-9.
245. Gomez Pescie, M., et al., *[Mantle cell lymphoma vs. atypical chronic lymphocytic leukemia. Use of immunohistochemistry, flow cytometry and molecular biology for their adequate typing]*. Medicina (B Aires), 2005. **65**(5): p. 419-24.
246. Hus, I., et al., *The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. Ann Oncol, 2006. **17**(4): p. 683-90.
247. Maljaei, S.H., et al., *Usefulness of CD45 density in the diagnosis of B-cell chronic lymphoproliferative disorders*. Indian J Med Sci, 2005. **59**(5): p. 187-94.
248. Braylan, R.C., et al., *Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting*. Cytometry, 2001. **46**(1): p. 23-7.
249. Stevenson, F.K., et al., *The occurrence and significance of V gene mutations in B cell-derived human malignancy*. Adv Cancer Res, 2001. **83**: p. 81-116.
250. Alizadeh, A., et al., *The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1999. **64**: p. 71-8.
251. Alizadeh, A.A. and L.M. Staudt, *Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(2): p. 219-25.
252. Rozman, C. and E. Montserrat, *Chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 1995. **333**(16): p. 1052-7.
253. Matos, D.M., et al., *Adhesion molecule profiles of B-cell non-Hodgkin's lymphomas in the leukemic phase*. Braz J Med Biol Res, 2006. **39**(10): p. 1349-55.
254. Palumbo, G.A., et al., *CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Res, 2009. **33**(9): p. 1212-6.
255. Brunetti, L., et al., *CD200/OX2, a cell surface molecule with immuno-regulatory function, is consistently expressed on hairy cell leukaemia neoplastic cells*. Br J Haematol, 2009. **145**(5): p. 665-7.
256. Hulkkonen, J., et al., *Surface antigen expression in chronic lymphocytic leukemia: clustering analysis, interrelationships and effects of chromosomal abnormalities*. Leukemia, 2002. **16**(2): p. 178-85.
257. Zucchetto, A., et al., *CD49d in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlated expression with CD38 and prognostic relevance*. Leukemia, 2006. **20**(3): p. 523-5; author reply 528-9.

258. Crespo, M., et al., *ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2003. **348**(18): p. 1764-75.
259. Orchard, J.A., et al., *ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia*. Lancet, 2004. **363**(9403): p. 105-11.
260. Bomben, R., et al., *Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study*. Blood, 2007. **109**(7): p. 2989-98.
261. Damle, R.N., et al., *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1840-7.
262. Wiestner, A., et al., *ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4944-51.
263. Hamblin, T.J., et al., *CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease*. Blood, 2002. **99**(3): p. 1023-9.
264. Stilgenbauer, S., et al., *Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course*. Leukemia, 2002. **16**(6): p. 993-1007.
265. Bain, B.J. and D. Catovsky, *The leukaemic phase of non-Hodgkin's lymphoma*. J Clin Pathol, 1995. **48**(3): p. 189-93.
266. Bennett JM, J.G., Mecucci C, *Morphologic, immunologic and cytogenetic classification of the chronic (mature) B and T lymphoid leukemias: fourth meeting of the MIC Cooperative Study Group*. Cancer Res, 1990. **50**: p. 2212.
267. San Miguel, J., GMOAyc. En: *Tratado de Alergología e Inmunología Clínica. Vol II: Inmunopatología General*. Ed Sociedad Española de Inmunología Clínica, ed. L. SA. 1995.
268. Marti, G.E., et al., *Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis*. Br J Haematol, 2005. **130**(3): p. 325-32.
269. Klein, U., et al., *Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells*. Immunol Rev, 1998. **162**: p. 261-80.
270. Stevenson, F.K. and F. Caligaris-Cappio, *Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4389-95.
271. Chiorazzi, N., K.R. Rai, and M. Ferrarini, *Chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 804-15.
272. Klein, U., et al., *Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1625-38.
273. Kuppers, R., *Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 251-62.

274. Geiger, K.D., et al., *CD5-positive B cells in healthy elderly humans are a polyclonal B cell population*. Eur J Immunol, 2000. **30**(10): p. 2918-23.
275. Karhu, R., et al., *More extensive genetic alterations in unmutated than in hypermutated cases of chronic lymphocytic leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 2003. **37**(4): p. 417-20.
276. Schade, U., et al., *Bone marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is related to immunoglobulin heavy-chain variable region mutation status and expression of 70-kd zeta-associated protein (ZAP-70)*. Hum Pathol, 2006. **37**(9): p. 1153-61.
277. Maurer, K., et al., *Immunoglobulin gene segment usage, location and immunogenicity in mutated and unmutated chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2005. **129**(4): p. 499-510.
278. Catherwood, M.A., et al., *ZAP-70 mRNA quantification in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. Eur J Haematol, 2006. **76**(4): p. 294-8.
279. Nieto, W.G., et al., *Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach*. Blood, 2009. **114**(1): p. 33-7.
280. Rawstron, A.C., et al., *Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2289-90.
281. Almeida, J., et al., *CLL-like B-lymphocytes are systematically present at very low numbers in peripheral blood of healthy adults*. Leukemia, 2011.
282. Catovsky, D., *Chronic lymphoproliferative disorders*. Curr Opin Oncol, 1995. **7**(1): p. 3-11.
283. Melo, J.V., D. Catovsky, and D.A. Galton, *The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. II. Patterns of evolution of 'prolymphocytoid' transformation*. Br J Haematol, 1986. **64**(1): p. 77-86.
284. Ruchlemer, R., et al., *B-prolymphocytic leukaemia with t(11;14) revisited: a splenomegalic form of mantle cell lymphoma evolving with leukaemia*. Br J Haematol, 2004. **125**(3): p. 330-6.
285. Krishnan, B., E. Matutes, and C. Dearden, *Prolymphocytic leukemias*. Semin Oncol, 2006. **33**(2): p. 257-63.
286. Bouroncle, B., *Clínica, biología y formas variantes de tricoleucemia.*, ed. L.B.e.a.E.d.H.I.E.S.U.d. Salamanca. 1992.
287. Frassoldati, A., et al., *Hairy cell leukemia: a clinical review based on 725 cases of the Italian Cooperative Group (ICGHCL). Italian Cooperative Group for Hairy Cell Leukemia*. Leuk Lymphoma, 1994. **13**(3-4): p. 307-16.
288. Polliack, A., *Hairy cell leukemia and allied chronic lymphoid leukemias: current knowledge and new therapeutic options*. Leuk Lymphoma, 1997. **26 Suppl 1**: p. 41-51.
289. Troussard, X. and G. Flandrin, *Hairy cell leukemia. An update on a cohort of 93 patients treated in a single institution. Effects of interferon in patients relapsing after*

- splenectomy and in patients with or without maintenance treatment. *Leuk Lymphoma*, 1994. **14 Suppl 1**: p. 99-105.
290. Melo, J.V., D. Catovsky, and D.A. Galton, *The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. I. Clinical and laboratory features of 300 patients and characterization of an intermediate group*. *Br J Haematol*, 1986. **63**(2): p. 377-87.
 291. Del Giudice, I., et al., *IgVH genes mutation and usage, ZAP-70 and CD38 expression provide new insights on B-cell prolymphocytic leukemia (B-PLL)*. *Leukemia*, 2006. **20**(7): p. 1231-7.
 292. Forconi, F., et al., *Hairy cell leukemia: at the crossroad of somatic mutation and isotype switch*. *Blood*, 2004. **104**(10): p. 3312-7.
 293. Ahmad, E., D. Garcia, and B.H. Davis, *Clinical utility of CD23 and FMC7 antigen coexistent expression in B-cell lymphoproliferative disorder subclassification*. *Cytometry*, 2002. **50**(1): p. 1-7.
 294. Rozman, C., et al., *Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases*. *Blood*, 1984. **64**(3): p. 642-8.
 295. Boursnle, B.A., *Thirty-five years in the progress of hairy cell leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 1994. **14 Suppl 1**: p. 1-12.
 296. Troussard, X., F. Maloisel, and G. Flandrin, *Hairy cell leukemia. What is new forty years after the first description?* *Hematol Cell Ther*, 1998. **40**(4): p. 139-48.
 297. Nieto, W.G., et al., *Non-CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis in the general population: prevalence and phenotypic/genetic characteristics*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010. **78 Suppl 1**: p. S24-34.
 298. Bench, A.J., et al., *Molecular genetic analysis of haematological malignancies II: Mature lymphoid neoplasms*. *Int J Lab Hematol*, 2007. **29**(4): p. 229-60.
 299. Weisenburger, D.D. and J.O. Armitage, *Mantle cell lymphoma-- an entity comes of age*. *Blood*, 1996. **87**(11): p. 4483-94.
 300. Jaffe, E.S., M.A. Bookman, and D.L. Longo, *Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation--mantle zone lymphoma: a distinct subtype of B-cell lymphoma*. *Hum Pathol*, 1987. **18**(9): p. 877-80.
 301. Orchard, J., et al., *A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease*. *Blood*, 2003. **101**(12): p. 4975-81.
 302. Walsh, S.H., et al., *Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma*. *Blood*, 2003. **101**(10): p. 4047-54.
 303. Asaad, N.Y., M.M. Abd El-Wahed, and M.M. Dawoud, *Diagnosis and prognosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (B-CLL/SLL) and mantle cell lymphoma (MCL)*. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2005. **17**(4): p. 279-90.

304. Catovsky, D. and E. Matutes, *Splenic lymphoma with circulating villous lymphocytes/splenic marginal-zone lymphoma*. Semin Hematol, 1999. **36**(2): p. 148-54.
305. Goy, A., et al., *Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line M-1*. Leuk Lymphoma, 2004. **45**(6): p. 1255-60.
306. Lopez-Guillermo, A., et al., *Molecular response assessed by PCR is the most important factor predicting failure-free survival in indolent follicular lymphoma: update of the MDACC series*. Ann Oncol, 2000. **11 Suppl 1**: p. 137-40.
307. Alizadeh, A.A., et al., *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling*. Nature, 2000. **403**(6769): p. 503-11.
308. Lossos, I.S., et al., *Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes*. N Engl J Med, 2004. **350**(18): p. 1828-37.
309. Muris, J.J., et al., *Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma*. J Pathol, 2006. **208**(5): p. 714-23.
310. Rosenwald, A., et al., *The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma*. N Engl J Med, 2002. **346**(25): p. 1937-47.
311. Yamaguchi, M., et al., *De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients*. Blood, 2002. **99**(3): p. 815-21.
312. Czader, M., et al., *DNA image cytometry and the expression of proliferative markers (proliferating cell nuclear antigen and Ki67) in non-Hodgkin's lymphomas*. Mod Pathol, 1995. **8**(1): p. 51-8.
313. Winter, J.N., et al., *Prognostic implications of ploidy and proliferative activity in the diffuse, aggressive non-Hodgkin's lymphomas*. Blood, 1996. **88**(10): p. 3919-25.
314. Piris, M., et al., *CD30 expression in non-Hodgkin's lymphoma*. Histopathology, 1990. **17**(3): p. 211-8.
315. Hutchison, R.E., et al., *Diffuse small noncleaved cell lymphoma in children, Burkitt's versus non-Burkitt's types. Results from the Pediatric Oncology Group and St. Jude Children's Research Hospital*. Cancer, 1989. **64**(1): p. 23-8.
316. Davi, F., et al., *Burkitt-like lymphomas in AIDS patients: characterization within a series of 103 human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphomas. Burkitt's Lymphoma Study Group*. J Clin Oncol, 1998. **16**(12): p. 3788-95.
317. Blum, K.A., G. Lozanski, and J.C. Byrd, *Adult Burkitt leukemia and lymphoma*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3009-20.
318. Haralambieva, E., et al., *Clinical, immunophenotypic, and genetic analysis of adult lymphomas with morphologic features of Burkitt lymphoma*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(8): p. 1086-94.
319. Ogden, C.A., et al., *Enhanced apoptotic cell clearance capacity and B cell survival factor production by IL-10-activated macrophages: implications for Burkitt's lymphoma*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 3015-23.

320. Mollejo, M., et al., *Nodal and splenic marginal zone B cell lymphomas*. Hematol Oncol, 2005. **23**(3-4): p. 108-18.
321. Chacon, J.I., et al., *Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1648-54.
322. *A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project*. Blood, 1997. **89**(11): p. 3909-18.
323. Doglioni, C., et al., *High incidence of primary gastric lymphoma in northeastern Italy*. Lancet, 1992. **339**(8797): p. 834-5.
324. Attygalle, A.D., et al., *Atypical marginal zone hyperplasia of mucosa-associated lymphoid tissue: a reactive condition of childhood showing immunoglobulin lambda light-chain restriction*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3343-8.
325. Michael, C.W., P.H. Richardson, and C.W. Boudreaux, *Pulmonary lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue type: Report of a case with cytological, histological, immunophenotypical correlation, and review of the literature*. Ann Diagn Pathol, 2005. **9**(3): p. 148-52.
326. Rottnek, M., et al., *Primary dural mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphoma: case report and review of the literature*. J Neurooncol, 2004. **68**(1): p. 19-23.
327. Wenzel, C., et al., *CD5 expression in a lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type as a marker for early dissemination and aggressive clinical behaviour*. Leuk Lymphoma, 2001. **42**(4): p. 823-9.
328. Harris, N.L., et al., *The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997*. Ann Oncol, 1999. **10**(12): p. 1419-32.
329. Bossuyt, X., et al., *Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system*. Clin Chem, 1998. **44**(5): p. 944-9.
330. San Miguel, J.F., et al., *Immunophenotypic analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia*. Semin Oncol, 2003. **30**(2): p. 187-95.
331. Vega, F., et al., *Plasmablastic lymphomas and plasmablastic plasma cell myelomas have nearly identical immunophenotypic profiles*. Mod Pathol, 2005. **18**(6): p. 806-15.
332. Stellmacher, F., et al., *Bone marrow mastocytosis associated with IgM kappa plasma cell myeloma*. Leuk Lymphoma, 2004. **45**(4): p. 801-5.
333. Sezer, O., et al., *Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells*. Haematologica, 2001. **86**(8): p. 837-43.
334. Lemoli, R.M., et al., *Expression and functional role of c-kit ligand (SCF) in human multiple myeloma cells*. Br J Haematol, 1994. **88**(4): p. 760-9.
335. Lin, P., et al., *Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma*. Am J Clin Pathol, 2004. **121**(4): p. 482-8.

336. Pellat-Deceunynck, C., et al., *Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells*. Blood, 1994. **84**(8): p. 2597-603.
337. Pope, B., et al., *B7-2-positive myeloma: incidence, clinical characteristics, prognostic significance, and implications for tumor immunotherapy*. Blood, 2000. **96**(4): p. 1274-9.
338. San Miguel, J.F., et al., *Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1853-6.
339. Costello, R., et al., *Primary plasma cell leukaemia: a report of 18 cases*. Leuk Res, 2001. **25**(2): p. 103-7.
340. Garcia-Sanz, R., et al., *Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics*. Blood, 1999. **93**(3): p. 1032-7.
341. Perez-Andres, M., et al., *Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment*. Leukemia, 2005. **19**(3): p. 449-55.
342. Matutes, E., et al., *Clinical and laboratory features of 78 cases of T-prolymphocytic leukemia*. Blood, 1991. **78**(12): p. 3269-74.
343. Pekarsky, Y., et al., *Abnormalities at 14q32.1 in T cell malignancies involve two oncogenes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2949-51.
344. Yamaguchi, K. and K. Takatsuki, *Adult T cell leukaemia-lymphoma*. Baillieres Clin Haematol, 1993. **6**(4): p. 899-915.
345. Shimoyama, M., *Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87)*. Br J Haematol, 1991. **79**(3): p. 428-37.
346. Scott, C.S., et al., *Persistent clonal expansions of CD3+TCR gamma delta+ and CD3+TCR alpha beta+CD4-CD8- lymphocytes associated with neutropenia*. Leuk Lymphoma, 1994. **14**(5-6): p. 429-40.
347. Lamy, T. and T.P. Loughran, *Large Granular Lymphocyte Leukemia*. Cancer Control, 1998. **5**(1): p. 25-33.
348. Herling, M., et al., *A systematic approach to diagnosis of mature T-cell leukemias reveals heterogeneity among WHO categories*. Blood, 2004. **104**(2): p. 328-35.
349. Rose, M.G. and N. Berliner, *T-cell large granular lymphocyte leukemia and related disorders*. Oncologist, 2004. **9**(3): p. 247-58.
350. Semenzato, G., et al., *The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis*. Blood, 1997. **89**(1): p. 256-60.
351. Lima, M., et al., *TCRalphabeta+/CD4+ large granular lymphocytosis: a new clonal T-cell lymphoproliferative disorder*. Am J Pathol, 2003. **163**(2): p. 763-71.
352. Rodriguez-Caballero, A., et al., *Expanded cells in monoclonal TCR-alphabeta+/CD4+/NKa+/CD8-/dim T-LGL lymphocytosis recognize hCMV antigens*. Blood, 2008. **112**(12): p. 4609-16.

353. Garrido, P., et al., *Monoclonal TCR-Vbeta13.1+/CD4+/NKa+/CD8-/dim T-LGL lymphocytosis: evidence for an antigen-driven chronic T-cell stimulation origin*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4890-8.
354. Wlodarski, M.W., et al., *Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2769-80.
355. Ralfkiaer, E., *Immunohistological markers for the diagnosis of cutaneous lymphomas*. Semin Diagn Pathol, 1991. **8**(2): p. 62-72.
356. Catovsky, D., *Current approach to the biology and treatment of chronic lymphoid malignancies other than CLL*. Hematol Cell Ther, 1996. **38 Suppl 2**: p. S63-6.
357. Rozman, C.(ed). *Chronic lymphocytic leukemia and related disorders*. Baillière's Clin Haematol. Vol. 6. 1993.
358. Berger, R. and A. Bernheim, *Cytogenetic studies of Sezary cells*. Cancer Genet Cytogenet, 1987. **27**(1): p. 79-87.
359. Johnson, G.A., et al., *Chromosome studies in 17 patients with the Sezary syndrome*. Cancer, 1985. **55**(10): p. 2426-33.
360. Limon, J., et al., *Chromosome aberrations, spontaneous SCE, and growth kinetics in PHA-stimulated lymphocytes of five cases with Sezary syndrome*. Cancer Genet Cytogenet, 1995. **83**(1): p. 75-81.
361. Jones, D. and D.M. Dorfman, *Phenotypic characterization of subsets of T cell lymphoma: towards a functional classification of T cell lymphoma*. Leuk Lymphoma, 2001. **40**(5-6): p. 449-59.
362. Attygalle, A.D., et al., *Distinguishing angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified, using morphology, immunophenotype and molecular genetics*. Histopathology, 2007. **50**(4): p. 498-508.
363. Attygalle, A., et al., *Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10*. Blood, 2002. **99**(2): p. 627-33.
364. Grogg, K.L., et al., *Expression of CXCL13, a chemokine highly upregulated in germinal center T-helper cells, distinguishes angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified*. Mod Pathol, 2006. **19**(8): p. 1101-7.
365. Dorfman, D.M., et al., *Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma*. Am J Surg Pathol, 2006. **30**(7): p. 802-10.
366. Baseggio, L., et al., *Identification of circulating CD10 positive T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma*. Leukemia, 2006. **20**(2): p. 296-303.
367. Rizvi, M.A., et al., *T-cell non-Hodgkin lymphoma*. Blood, 2006. **107**(4): p. 1255-64.
368. Lee, S.S., et al., *Angioimmunoblastic T cell lymphoma is derived from mature T-helper cells with varying expression and loss of detectable CD4*. Int J Cancer, 2003. **103**(1): p. 12-20.

369. Went, P., et al., *Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score*. J Clin Oncol, 2006. **24**(16): p. 2472-9.
370. Ahmad, E., et al., *Flow cytometric immunophenotypic profiles of mature gamma delta T-cell malignancies involving peripheral blood and bone marrow*. Cytometry B Clin Cytom, 2005. **67**(1): p. 6-12.
371. Wei, S.Z., et al., *Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(24): p. 3729-34.
372. Belhadj, K., et al., *Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients*. Blood, 2003. **102**(13): p. 4261-9.
373. Khosravi Shahi, P. and V.M. Diaz Munoz de la Espada, *[Extranodal T/NK-cell lymphoma, nasal type: a case report and review of the literature]*. An Med Interna, 2005. **22**(12): p. 597-600.
374. Ho, F.C., et al., *Presence of Epstein-Barr virus DNA in nasal lymphomas of B and 'T' cell type*. Hematol Oncol, 1990. **8**(5): p. 271-81.
375. Chim, C.S., et al., *Primary nasal natural killer cell lymphoma: long-term treatment outcome and relationship with the International Prognostic Index*. Blood, 2004. **103**(1): p. 216-21.
376. Lee, J., et al., *Nasal-type NK/T cell lymphoma: clinical features and treatment outcome*. Br J Cancer, 2005. **92**(7): p. 1226-30.
377. Kwong, Y.L., *Natural killer-cell malignancies: diagnosis and treatment*. Leukemia, 2005. **19**(12): p. 2186-94.
378. Gniadecki, R., et al., *CD56+ lymphoma with skin involvement: clinicopathologic features and classification*. Arch Dermatol, 2004. **140**(4): p. 427-36.
379. Ng, S.B., et al., *Nasal-type extranodal natural killer/T-cell lymphomas: a clinicopathologic and genotypic study of 42 cases in Singapore*. Mod Pathol, 2004. **17**(9): p. 1097-107.
380. Yuan, C.M., et al., *Natural killer-like T-cell lymphoma of the small intestine with a distinct immunophenotype and lack of association with gluten-sensitive enteropathy*. Arch Pathol Lab Med, 2003. **127**(3): p. e142-6.
381. Zhang, W.Y., et al., *Features of intestinal T-cell lymphomas in Chinese population without evidence of celiac disease and their close association with Epstein-Barr virus infection*. Chin Med J (Engl), 2005. **118**(18): p. 1542-8.
382. Katoh, A., et al., *Gastrointestinal T cell lymphoma: predominant cytotoxic phenotypes, including alpha/beta, gamma/delta T cell and natural killer cells*. Leuk Lymphoma, 2000. **39**(1-2): p. 97-111.
383. Wright, D.H., *Enteropathy associated T cell lymphoma*. Cancer Surv, 1997. **30**: p. 249-61.

384. Schmitt-Graff, A., et al., *Intestinal T-cell lymphoma: a reassessment of cytomorphological and phenotypic features in relation to patterns of small bowel remodelling*. Virchows Arch, 1996. **429**(1): p. 27-36.
385. Willemze, R. and C.J. Meijer, *Primary cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders*. Hematol Oncol Clin North Am, 2003. **17**(6): p. 1319-32, vii-viii.
386. Lamant, L., et al., *High incidence of the t(2;5)(p23;q35) translocation in anaplastic large cell lymphoma and its lack of detection in Hodgkin's disease. Comparison of cytogenetic analysis, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and P-80 immunostaining*. Blood, 1996. **87**(1): p. 284-91.
387. Lamy, T. and T.P. Loughran, Jr., *Clinical features of large granular lymphocyte leukemia*. Semin Hematol, 2003. **40**(3): p. 185-95.
388. Oshimi, K., *Leukemia and lymphoma of natural killer lineage cells*. Int J Hematol, 2003. **78**(1): p. 18-23.
389. Kamarashev, J., et al., *Differential expression of cytotoxic molecules and killer cell inhibitory receptors in CD8+ and CD56+ cutaneous lymphomas*. Am J Pathol, 2001. **158**(5): p. 1593-8.
390. Melioli, G., et al., *Expansion of natural killer cells in patients with head and neck cancer: detection of "noninhibitory" (activating) killer Ig-like receptors on circulating natural killer cells*. Head Neck, 2003. **25**(4): p. 297-305.
391. Suzuki, R., et al., *Aggressive natural killer-cell leukemia revisited: large granular lymphocyte leukemia of cytotoxic NK cells*. Leukemia, 2004. **18**(4): p. 763-70.
392. Kwong, Y.L., et al., *CD56+ NK lymphomas: clinicopathological features and prognosis*. Br J Haematol, 1997. **97**(4): p. 821-9.
393. Loughran, T.P., Jr., *Clonal diseases of large granular lymphocytes*. Blood, 1993. **82**(1): p. 1-14.
394. Ryder, J., et al., *Aggressive natural killer cell leukemia: report of a Chinese series and review of the literature*. Int J Hematol, 2007. **85**(1): p. 18-25.
395. Oshimi, K., *Lymphoproliferative disorders of natural killer cells*. Int J Hematol, 1996. **63**(4): p. 279-90.
396. Oren, R., et al., *TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(8): p. 4007-15.
397. Wright, M.D., K.J. Henkle, and G.F. Mitchell, *An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of Schistosoma mansoni worms that closely resembles a human tumor-associated antigen*. J Immunol, 1990. **144**(8): p. 3195-200.
398. Yauch, R.L., et al., *Direct extracellular contact between integrin alpha(3)beta(1) and TM4SF protein CD151*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9230-8.
399. Tomlinson, M.G., A.F. Williams, and M.D. Wright, *Epitope mapping of anti-rat CD53 monoclonal antibodies. Implications for the membrane orientation of the Transmembrane 4 Superfamily*. Eur J Immunol, 1993. **23**(1): p. 136-40.

400. Seigneuret, M., et al., *Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40055-64.
401. Wright, M.D. and M.G. Tomlinson, *The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily*. Immunol Today, 1994. **15**(12): p. 588-94.
402. Charrin, S., et al., *The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 14329-37.
403. Boucheix, C., et al., *Tetraspanins and malignancy*. Expert Rev Mol Med, 2001. **2001**: p. 1-17.
404. Hemler, M.E., *Tetraspanin functions and associated microdomains*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(10): p. 801-11.
405. Wright, M.D., G.W. Moseley, and A.B. van Spriel, *Tetraspanin microdomains in immune cell signalling and malignant disease*. Tissue Antigens, 2004. **64**(5): p. 533-42.
406. Maecker, H.T., S.C. Todd, and S. Levy, *The tetraspanin superfamily: molecular facilitators*. FASEB J, 1997. **11**(6): p. 428-42.
407. Berditchevski, F., *Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 23): p. 4143-51.
408. Okochi, H., et al., *Expression of tetra-spans transmembrane family (CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 and CD82) in normal and neoplastic human keratinocytes: an association of CD9 with alpha 3 beta 1 integrin*. Br J Dermatol, 1997. **137**(6): p. 856-63.
409. Schwartz-Albiez, R., et al., *The B cell-associated CD37 antigen (gp40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein*. J Immunol, 1988. **140**(3): p. 905-14.
410. Rubinstein, E., et al., *CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins*. Eur J Immunol, 1996. **26**(11): p. 2657-65.
411. Berditchevski, F., M.M. Zutter, and M.E. Hemler, *Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins)*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(2): p. 193-207.
412. Hemler, M.E., B.A. Mannion, and F. Berditchevski, *Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1287**(2-3): p. 67-71.
413. Angelisova, P., I. Hilgert, and V. Horejsi, *Association of four antigens of the tetraspans family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins*. Immunogenetics, 1994. **39**(4): p. 249-56.
414. Rubinstein, E., et al., *CD9 antigen is an accessory subunit of the VLA integrin complexes*. Eur J Immunol, 1994. **24**(12): p. 3005-13.
415. Nakamura, K., R. Iwamoto, and E. Mekada, *Membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) and diphtheria toxin receptor-associated protein (DRAP27)/CD9 form a complex with integrin alpha 3 beta 1 at cell-cell contact sites*. J Cell Biol, 1995. **129**(6): p. 1691-705.

416. Berdichevski, F., G. Bazzoni, and M.E. Hemler, *Specific association of CD63 with the VLA-3 and VLA-6 integrins*. J Biol Chem, 1995. **270**(30): p. 17784-90.
417. Schick, M.R. and S. Levy, *The TAPA-1 molecule is associated on the surface of B cells with HLA-DR molecules*. J Immunol, 1993. **151**(8): p. 4090-7.
418. Berdichevski, F. and E. Odintsova, *Tetraspanins as regulators of protein trafficking*. Traffic, 2007. **8**(2): p. 89-96.
419. Hammond, C., et al., *The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3282-91.
420. Engering, A. and J. Pieters, *Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells*. Int Immunol, 2001. **13**(2): p. 127-34.
421. Bradbury, L.E., et al., *The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules*. J Immunol, 1992. **149**(9): p. 2841-50.
422. Sato, S., et al., *Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81/Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19*. J Immunol, 1997. **159**(7): p. 3278-87.
423. Horvath, G., et al., *CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30537-43.
424. Hotta, H., et al., *Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression*. Cancer Res, 1988. **48**(11): p. 2955-62.
425. Hotta, H., N. Takahashi, and M. Homma, *Transcriptional enhancement of the human gene encoding for a melanoma-associated antigen (ME491) in association with malignant transformation*. Jpn J Cancer Res, 1989. **80**(12): p. 1186-91.
426. Radford, K.J., J. Mallesch, and P. Hersey, *Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491)*. Int J Cancer, 1995. **62**(5): p. 631-5.
427. Sordat, I., et al., *Complementary DNA arrays identify CD63 tetraspanin and alpha3 integrin chain as differentially expressed in low and high metastatic human colon carcinoma cells*. Lab Invest, 2002. **82**(12): p. 1715-24.
428. Longo, N., et al., *Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3717-26.
429. Garcia-Lopez, M.A., et al., *Role of tetraspanins CD9 and CD151 in primary melanocyte motility*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(5): p. 1001-9.
430. Kawakami, Y., et al., *Tetraspanin CD9 is a "proteolipid," and its interaction with alpha 3 integrin in microdomain is promoted by GM3 ganglioside, leading to inhibition of laminin-5-dependent cell motility*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 34349-58.

431. Si, Z. and P. Hersey, *Expression of the neuroglandular antigen and analogues in melanoma. CD9 expression appears inversely related to metastatic potential of melanoma.* Int J Cancer, 1993. **54**(1): p. 37-43.
432. Huang, C.I., et al., *Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients.* Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 973-83.
433. Kusakawa, J., et al., *Reduced expression of CD9 in oral squamous cell carcinoma: CD9 expression inversely related to high prevalence of lymph node metastasis.* J Oral Pathol Med, 2001. **30**(2): p. 73-9.
434. Houle, C.D., et al., *Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression.* Gynecol Oncol, 2002. **86**(1): p. 69-78.
435. Sauer, G., et al., *Progression of cervical carcinomas is associated with down-regulation of CD9 but strong local re-expression at sites of transendothelial invasion.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(17): p. 6426-31.
436. Foon, K.A. and R.F. Todd, 3rd, *Immunologic classification of leukemia and lymphoma.* Blood, 1986. **68**(1): p. 1-31.
437. Babusikova, O. and L. Stevulova, *Analysis of surface and cytoplasmic immunoglobulin light/heavy chains by flow cytometry using a lysed-whole-blood technique: Implications for the differential diagnosis of B-cell malignancies.* Neoplasma, 2004. **51**(6): p. 422-30.
438. Konoplev, S., et al., *Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia.* Am J Clin Pathol, 2005. **124**(3): p. 414-20.
439. Deneys, V., et al., *Atypical lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma immunologically very close: flow cytometric distinction by the use of CD20 and CD54 expression.* Leukemia, 2001. **15**(9): p. 1458-65.
440. Groeneveld, K., et al., *Flow cytometric detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes.* Leukemia, 1996. **10**(8): p. 1383-9.
441. Stewart, C.C. and S.J. Stewart, *Immunological monitoring utilizing novel probes.* Ann N Y Acad Sci, 1993. **677**: p. 94-112.
442. Campana, D. and C.H. Pui, *Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance.* Blood, 1995. **85**(6): p. 1416-34.
443. Coustan-Smith, E., et al., *Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia.* Lancet, 1998. **351**(9102): p. 550-4.
444. Bottcher, S., et al., *Standardized MRD flow and ASO IGH RQ-PCR for MRD quantification in CLL patients after rituximab-containing immunochemotherapy: a comparative analysis.* Leukemia, 2009. **23**(11): p. 2007-17.
445. Young, N.A., et al., *Utilization of fine-needle aspiration cytology and flow cytometry in the diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma.* Cancer, 1998. **84**(4): p. 252-61.

446. Hehn, S.T., T.M. Grogan, and T.P. Miller, *Utility of fine-needle aspiration as a diagnostic technique in lymphoma*. J Clin Oncol, 2004. **22**(15): p. 3046-52.
447. Landgren, O., et al., *A prospective comparison of fine-needle aspiration cytology and histopathology in the diagnosis and classification of lymphomas*. Hematol J, 2004. **5**(1): p. 69-76.
448. Brandao, G.D., et al., *Grading follicular lymphomas in fine-needle aspiration biopsies: the role of ThinPrep slides and flow cytometry*. Cancer, 2006. **108**(5): p. 319-23.
449. Swart, G.J., et al., *Fine needle aspiration biopsy and flow cytometry in the diagnosis of lymphoma*. Transfus Apher Sci, 2007. **37**(1): p. 71-9.
450. Simsir, A., et al., *Immunophenotypic analysis of non-Hodgkin's lymphomas in cytologic specimens: a correlative study of immunocytochemical and flow cytometric techniques*. Diagn Cytopathol, 1999. **20**(5): p. 278-84.
451. Chung, J., et al., *Flow cytometric immunophenotyping in fine-needle aspiration of lymph nodes*. J Korean Med Sci, 1999. **14**(4): p. 393-400.
452. Chhieng, D.C., J.M. Cohen, and J.F. Cangiarella, *Cytology and immunophenotyping of low- and intermediate-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas with a predominant small-cell component: a study of 56 cases*. Diagn Cytopathol, 2001. **24**(2): p. 90-7.
453. Gupta, R., et al., *Role of fine-needle aspirate immunophenotyping by flow cytometry in rapid diagnosis of lymphoproliferative disorders*. Diagn Cytopathol, 2007. **35**(7): p. 381-5.
454. Dunphy, C.H. and R. Ramos, *Combining fine-needle aspiration and flow cytometric immunophenotyping in evaluation of nodal and extranodal sites for possible lymphoma: a retrospective review*. Diagn Cytopathol, 1997. **16**(3): p. 200-6.
455. Mourad, W.A., M. al Nazer, and A. Tulbah, *Cytomorphologic differentiation of Hodgkin's lymphoma and Ki-1+ anaplastic large cell lymphoma in fine needle aspirates*. Acta Cytol, 2003. **47**(5): p. 744-8.
456. Dey, P., et al., *Combined applications of fine needle aspiration cytology and flow cytometric immunphenotyping for diagnosis and classification of non Hodgkin lymphoma*. Cytojournal, 2006. **3**: p. 24.
457. Snuderl, M., et al., *B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma*. Am J Surg Pathol, 2010. **34**(3): p. 327-40.
458. Miyake, M., et al., *Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer*. Cancer Res, 1995. **55**(18): p. 4127-31.
459. Martin-Martin, B., et al., *Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis*. Blood, 2000. **96**(7): p. 2574-83.
460. Mahmudi-Azer, S., G.P. Downey, and R. Moqbel, *Translocation of the tetraspanin CD63 in association with human eosinophil mediator release*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4039-47.

461. Yunta, M. and P.A. Lazo, *Apoptosis protection and survival signal by the CD53 tetraspanin antigen*. *Oncogene*, 2003. **22**(8): p. 1219-24.
462. Higashiyama, M., et al., *Reduced motility related protein-1 (MRP-1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer*. *Cancer Res*, 1995. **55**(24): p. 6040-4.
463. Vidriales, M.B., et al., *Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value*. *Blood*, 2003. **101**(12): p. 4695-700.
464. Dworzak, M.N., et al., *Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008. **74**(6): p. 331-40.
465. Ratei, R., et al., *Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction*. *Leukemia*, 2009. **23**(3): p. 528-34.
466. Baseggio, L., et al., *CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases*. *Haematologica*, 2010. **95**(4): p. 604-12.
467. Goldaniga, M., et al., *A multicenter retrospective clinical study of CD5/CD10-negative chronic B cell leukemias*. *Am J Hematol*, 2008. **83**(5): p. 349-54.
468. Rossmann, E.D., et al., *Variability in B-cell antigen expression: implications for the treatment of B-cell lymphomas and leukemias with monoclonal antibodies*. *Hematol J*, 2001. **2**(5): p. 300-6.
469. Matutes, E., *New additions to antibody panels in the characterisation of chronic lymphoproliferative disorders*. *J Clin Pathol*, 2002. **55**(3): p. 180-3.
470. Matutes, E., et al., *Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria*. *Leukemia*, 2008. **22**(3): p. 487-95.
471. Greig, B., et al., *2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: recommendations for training and education to perform clinical flow cytometry*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2007. **72 Suppl 1**: p. S23-33.
472. Matutes, E., A. Wotherspoon, and D. Catovsky, *Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007. **20**(3): p. 367-84.
473. Ruiz-Arguelles, A., et al., *Report on the second Latin American consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2006. **70**(1): p. 39-44.
474. Stetler-Stevenson M, A.E., Barnett D, Braylan RC, DiGiuseppe JA, Marti G, Menozzi D, Oldaker T, Orfao A, Rabellino E, Stone EC, Walker C, *Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells*. Approved Guidelines. 2nd edn. CLSI document H43-A2 ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, 2007.

475. Wood, B.L., et al., 2006 *Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia*. Cytometry B Clin Cytom, 2007. **72 Suppl 1**: p. S14-22.
476. Ratei, R., et al., *Discriminant function analysis as decision support system for the diagnosis of acute leukemia with a minimal four color screening panel and multiparameter flow cytometry immunophenotyping*. Leukemia, 2007. **21**(6): p. 1204-11.
477. Cualing, H., R. Kothari, and T. Balachander, *Immunophenotypic diagnosis of acute leukemia by using decision tree induction*. Lab Invest, 1999. **79**(2): p. 205-12.
478. Pedreira, C.E., et al., *A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders*. Cytometry A, 2008. **73A**(12): p. 1141-50.
479. Pedreira, C.E., et al., *Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions*. Cytometry A, 2008. **73**(9): p. 834-46.
480. Macey, M.G., et al., *Comparative study of five commercial reagents for preparing normal and leukaemic lymphocytes for immunophenotypic analysis by flow cytometry*. Cytometry, 1999. **38**(4): p. 153-60.
481. Gachard, N., et al., *Multicenter study of ZAP-70 expression in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia using an optimized flow cytometry method*. Haematologica, 2008. **93**(2): p. 215-23.
482. Cro, L., et al., *CD26 expression in mature B-cell neoplasia: its possible role as a new prognostic marker in B-CLL*. Hematol Oncol, 2009. **27**(3): p. 140-7.