

LA CITOMETRIA DE FLUJO EN EL ESTUDIO DE TUMORES MEDIASTINALES RICOS EN ELEMENTOS LINFOIDES

GERARDO VIDES ALMONACID¹, ALEJANDRO GARCIA^{1, 2}, VALERIA DENNINGHOFF¹,
ALEJANDRA AVAGNINA¹, TERESA CASTIGLIONI³, BORIS ELSNER^{1, 3}

¹Servicio de Patología, ²Servicio de Citometría de Flujo, ³Centro de Patología (CDP), Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC) Buenos Aires

Resumen El mediastino anterior es un sitio frecuente de localización de tumores ricos en elementos linfoides.

La identificación correcta de cada entidad es de importancia en el tratamiento de los pacientes. En ocasiones puede plantearse el diagnóstico diferencial entre timoma y linfoma linfoblástico con fenotipo de precursor T (LLB-T). La Citometría de Flujo (CF) es una técnica complementaria útil para estos tumores de la cual se obtiene información cualitativa y cuantitativa. Revisamos 38 tumores mediastinales que tenían estudio de CF. Además comparamos los resultados de CF de timomas y tejido tímico normal con 42 casos de LLB-T de otras localizaciones anatómicas. De los 38 tumores mediastinales 6 eran lesiones benignas, 9 linfomas difusos de células grandes con fenotipo B (LDCG-B), 10 linfomas de Hodgkin (LH), 11 timomas y 2 LLB-T. En 24 casos la CF aportó información positiva, definiendo el inmunofenotipo de las células linfoides neoplásicas, o los linfocitos característicos que acompañan a los timomas. La CF en los 10 casos de LH y en 4 lesiones benignas permitió descartar otros tipos de linfoma (LDCG-B, LLB-T, etc.). Las marcaciones para CD3, CD4 y CD8 fueron las más útiles para el diagnóstico diferencial entre timomas y LLB-T. En conclusión, la CF es una técnica complementaria de utilidad que aporta información en lesiones mediastinales de manera rápida, requiriendo cantidades pequeñas de material, tanto para el diagnóstico inicial como para el monitoreo de estas enfermedades.

Palabras clave: mediastino, timoma, linfoma linfoblástico, citometría de flujo

Abstract *Flow cytometry for the study of mediastinal tumors with abundant lymphoid elements.* The anterior mediastinum is a common site of tumors with abundant lymphoid elements. Flow cytometry is a useful complementary technique to analyze this type of tumors, which provides qualitative and quantitative information. A differential diagnosis can be sometimes made between thymoma and precursor T-lymphoblastic lymphoma (T-LBL). Correct identification is of utmost importance for patient treatment. A total of 38 mediastinal tumors were analyzed, and samples were separated for flow cytometry. Flow cytometry data from thymomas and normal thymic tissue were compared with 42 cases of T-LBL from other anatomical locations. Among 38 mediastinal tumors, we found 6 benign lesions, 9 diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL), 10 Hodgkin lymphomas (HL), 11 thymomas and 2 T-LBL. Flow cytometry provided positive information in 24 cases, and defined lymphoid neoplastic cells immunophenotype or the typical lymphocytes accompanying thymomas. Flow cytometry helped differentiate 10 cases of HL and 4 benign lesions from other lymphomas (DLBCL, T-LBL, etc.). CD3, CD4 and CD8 expressions were most useful for the differential diagnosis of thymomas and T-LBL. To conclude, flow cytometry is a valid complementary technique, which promptly provides information on mediastinal lesions, requiring small quantities of tissue for both early diagnosis and follow up of these diseases.

Key words: mediastinum, thymoma, lymphoblastic lymphoma, flow cytometry

El mediastino anterior, situado delante del corazón y de los grandes vasos, es una región anatómica frecuentemente comprometida por diversos procesos tumorales, que en algunos casos pueden cursar con dramáticos cuadros compresivos, como el síndrome de la vena cava superior, que deben resolverse con celeridad y precisión¹⁻⁴.

La localización y características intrínsecas de estas lesiones tumorales (fibrosis, necrosis), así como problemas técnicos (atricción del tejido), pueden dificultar la obtención de muestras de tamaño y calidad adecuados para ser evaluadas por técnicas convencionales de hematoxilina y eosina (H&E) e inmunohistoquímica (IHQ), reduciendo las posibilidades de dar un diagnóstico certero y rápido. En el mediastino anterior podemos encontrar numerosas lesiones primarias de naturaleza tumoral y no tumoral²⁻⁶, así como también procesos neoplásicos secundarios, dependiendo del grupo etario a considerar.

Recibido: 23-V-2007

Aceptado: 11-X-2007

Dirección postal: Dr. Boris Elsner, Servicio de Patología, CEMIC, Galván 4102, 1431 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4546-8264 e-mail: patologia@cemic.edu.ar.

Entre estas lesiones debemos tener en cuenta varios tipos de linfomas y los timomas⁷⁻¹¹. En el examen histológico de estas lesiones ricas en linfocitos puede ser difícil diferenciar un timoma con predominancia de linfocitos, de un linfoma linfoblástico. Numerosos trabajos han planteado la importancia de la utilización de la citometría de flujo (CF) como método complementario en el estudio de este tipo de lesiones¹²⁻¹⁴. La CF sería de utilidad, no sólo por la rapidez con la que se puede emitir un resultado sino también por la posibilidad de obtener información cualitativa y cuantitativa de cada uno de los marcadores evaluados. Por CF el LLB-T y los timocitos¹³⁻¹⁵ comparten la expresión de varios marcadores lo cual puede complicar su diferenciación. Tanto en el LLB-T como en los timomas (especialmente en los que predomina el componente linfocitario) podemos encontrar un gran número de células linfoides T con fenotipo inmaduro¹⁶. Las células T se originan de las células linfoides progenitoras *committed* que provienen de células pluripotenciales de la médula ósea. La maduración de las células T precursoras ocurre en la corteza tímica, donde comienza el proceso de diferenciación hacia timocitos CD4 y CD8 negativos que posteriormente adquieren ambos marcadores. En una etapa final, en la médula, los timocitos expresan un solo de los dos marcadores descritos, el linfocito T *helper* se convierte en CD4+/CD8- y el linfocito T citotóxico será CD4-/CD8+. Este gradiente de maduración tímica normal se observa también en los elementos linfoides que acompañan a las células epiteliales tumorales en los timomas, lo que no ocurre en el LLB-T. La identificación de cada uno de estos cuadros es de vital importancia en el manejo de los pacientes, ya que la evolución y tratamiento son muy diferentes, motivo por el cual es imprescindible hallar parámetros fidedignos en la evaluación de dichas entidades en la práctica diaria¹⁹.

El objetivo del trabajo es evaluar la utilidad de la CF como metodología que aportaría información de importancia diagnóstica a partir de muestras pequeñas, en pocas horas, complementando los métodos convencionales de estudio citológico o histológico con inclusión en parafina, coloración con H&E y eventual utilización de IHQ, en el estudio de este tipo de neoplasias.

Materiales y métodos

Se incluyeron en el estudio retrospectivo 38 casos de lesiones benignas y malignas ubicadas en el mediastino anterior obtenidas entre 1998 y 2004, que provienen de los archivos del CEMIC y del CDP, de las cuales se separó material para CF durante la biopsia intra-operatoria. Los individuos con lesiones mediastinales fueron 13 mujeres y 25 hombres con un rango de edad entre 2 y 81 años, y una mediana de 49 años.

Se separó rutinariamente una muestra de tejido en fresco para CF cuando el alto contenido de elementos linfoides o sus características morfológicas, observadas durante la biopsia intra-operatoria, planteaban como diagnóstico diferencial

una neoplasia hematológica. El resto del material fue fijado en formol *buffer* para luego ser incluido en parafina para su estudio histopatológico. En algunas ocasiones puede plantearse el diagnóstico diferencial entre timoma y LLB-T, sobre todo en muestras de punción aspiración o biopsia, o en material proveniente de mediastinoscopias, porque ambas pueden tener localización mediastinal y porque suelen presentar un inmunofenotipo semejante, como presencia de poblaciones positivas para CD3 citoplasmático (CD3c) y negativas para CD3 de superficie (CD3s), coexpresión de CD4 y CD8 y marcación positiva para TdT. Por este motivo comparamos los resultados del estudio de CF de los 11 casos diagnosticados como timomas y 2 casos como hiperplasia tímica, con 42 casos de LLB-T de otras localizaciones anatómicas [13/42 ganglios linfáticos, 15/42 muestras de médula ósea, 10/42 de sangre periférica (SP) y 4/42 de líquido cefalorraquídeo (LCR)], evaluando la marcación en términos de positivo/negativo y de intensidad, prestando especial atención al patrón general de los gráficos de la CF, especialmente aquellos correspondientes a la doble marcación para CD7/CD3s y CD4/CD8. Para realizar el estudio histopatológico las biopsias fueron fijadas con una solución *buffer* de formol y embebidas en parafina. Se realizaron cortes de 3 mm los cuales fueron coloreados con H&E. En algunos casos se realizaron técnicas de IHQ. Las muestras de tejido fresco destinadas al estudio de CF fueron disgregadas mecánicamente. El material obtenido fue lavado dos veces con *buffer* PBS y centrifugado a 1500 rpmn. durante 15 minutos. Las muestras se dividieron en tubos con un recuento final de 5×10^5 células y fueron marcadas con 20 µl de los siguientes anticuerpos mono y policlonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) y *peridinin chlorophyll protein* (PerCP): CD7 (FITC), CD8 (FITC), CD23 (FITC), CD38 (PE), de *Immunotech* (Marsella, Francia), CD3 (PE), CD4 (PE), CD5 (FITC), CD10 (FITC y PE), CD14 (PE), CD19 (PE y PerCP), CD20 (PE), CD45 (FITC y PerCP) de *Becton Dickinson* (San José, CA, EE.UU.), κ: *kappa* (FITC), λ: *lambda* (FITC y PE) de (DAKO, Dinamarca). Los tubos fueron incubados en la oscuridad a 4 °C durante 30 minutos. Las células fueron lavadas con solución salina tamponada (PBS) durante 15 minutos. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendieron con PBS. Se adquirieron y analizaron con un citómetro de flujo *FACScan* de *Becton Dickinson Immunocytometry Systems* utilizando el programa *CELL Quest*. Se realizó un análisis multiparamétrico de las distintas poblaciones celulares basado en las propiedades morfológicas: *Forward Scatter (FSC)* y *Side Scatter (SSC)* y en la intensidad de la fluorescencia. Las poblaciones leucocitarias se diferenciaron basándose en FSC, SSC y la expresión de CD45.

Resultados

Basándose en el estudio histológico, IHQ y CF se diagnosticaron 6 lesiones no neoplásicas y 32 lesiones neoplásicas (Tabla 1 y Gráfico 1):

1. Linfoma difuso de células grandes con fenotipo B (LDCG-B): La edad estaba comprendida entre 24 y 72 años con una mediana de 46 años.

En todos los casos la CF demostró una población linfoide mayoritaria con fenotipo B, positiva para CD45, CD19, CD20 y CD23 con restricción para cadenas livianas *kappa* en 4/9 casos, para *lambda* en 2/9 casos, no identificándose cadenas livianas de superficie en 3/9 casos.

TABLA 1.– Resultados de las 32 neoplasias mediastinales, en base al diagnóstico histopatológico complementado con IHQ o CF

LDCGB 9/32 casos

- 5/32 Linfomas difusos de células grandes B.
- 4/32 Linfomas mediastinales tímicos de células grandes B

LH 10/32 casos

- 2/32 LH esclerosis nodular
- 6/32 LH celularidad mixta
- 2/32 LH variante clásica rica en linfocitos

Timomas 11/32 casos

- 4/32 Timomas tipo AB
- 2/32 Timomas tipo B1
- 3/32 Timomas tipo B2
- 2/32 Timomas tipo B3

LLB-T 2/32 casos

LDCGB: linfoma difuso de células grandes B; LH: linfoma de Hodgkin; LLB-T: leucemia/linfoma linfoblástico con fenotipo precursor T; IHQ: inmunohistoquímica; CF: citometría de flujo.

2. Linfoma de Hodgkin (LH): La edad estaba comprendida entre 20 y 60 años con una mediana de 39 años.

En todos los casos la CF evidenció como indicio indirecto el infiltrado predominantemente linfoide que acompaña a las células neoplásicas, constituido mayoritariamente por linfocitos T CD4+ (*helper*).

3. Timomas: los cuales fueron diagnosticados de acuerdo con la clasificación de la OMS²⁰. La edad estaba comprendida entre 40 y 81 años con una mediana de 56 años.

Junto con los timomas agrupamos 2 casos con diagnóstico de hiperplasia tímica, ya que los hallazgos de la CF son los mismos.

En todos los casos la CF mostró marcación positiva para CD45, CD7, CD2 y CD5, con una expresión de CD3s variable (en *smear*), siendo la característica fenotípica más notoria el patrón de marcación para CD4 y CD8. Con estos marcadores se diferenciaban 4 subpoblaciones linfoides T en diversos estadios de maduración que remedaban el gradiente de diferenciación tímico. La más inmadura era doble negativo (CD4-/CD8-), la de maduración intermedia doble positivo (CD4+/CD8+) y las más maduras (CD4+/CD8- y CD4-/CD8+).

4. Leucemia/linfoma linfoblástico con fenotipo de precursor T (LLB-T): con edades de 25 y 26 años, en los cuales la CF mostró una población positiva para CD7, CD2, CD5, CD10, CD71 y CD45 (débil). La expresión con TdT fue positiva. Los 2 casos fueron negativos para CD4 y CD8.

Por otro lado se agregaron a estas 38 muestras de lesiones mediastinales, 42 muestras con diagnóstico de

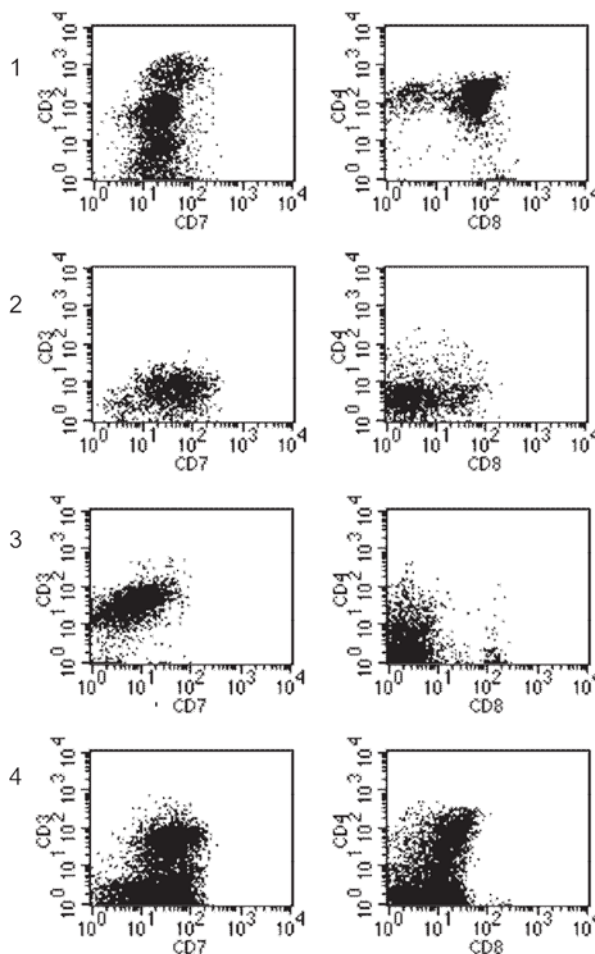


Fig. 1.– Patrones de marcación para CD7/CD3 de superficie y CD8/CD4. Patrón 1: característico de timoma. Patrones 2-4: corresponden a leucemia/linfoma linfoblástico con fenotipo precursor T (LLB-T).

leucemia/linfoma linfoblástico con fenotipo de precursor T extramediastinal. La edad estaba comprendida entre 2 y 45 años con una mediana de 31 años.

Todos fueron positivos para CD45, CD7, CD2 y CD5, 34/42 casos (81%) tenían marcación negativa para CD3s, no observándose patrón en *smear*. Con respecto a la marcación para CD4/CD8, se observaron 21/42 casos (50%) doble negativo, 13/42 (31%) doble positivo, 5/42 (12%) positivos sólo para CD4 y 3/42 (7%) positivos sólo para CD8.

De las 6/38 muestras no neoplásicas (16.8%), 2/6 correspondieron a hiperplasia tímica (ya analizadas con los timomas), 1/6 a tejido linfoide normal, 2/6 a inflamación granulomatosa necrotizante y 1/6 a tejido fibroso.

Discusión

En el mediastino podemos encontrar una diversidad de lesiones ricas en elementos linfoides, entre las cuales

los linfomas difusos de células grandes B y los linfomas de Hodgkin representan la mayoría de los casos^{1, 4, 5, 7, 8}. Existen entidades menos frecuentes como los timomas (especialmente aquellos con predominio de linfocitos) que pueden plantear dificultades diagnósticas principalmente en material proveniente de punciones, mediastinoscopias o derrames pleurales, que en ocasiones son hipocelulares o están atriccionados debido al método de obtención y a la fibrosis que acompaña frecuentemente a estos tumores.

Si bien el grupo etario y la presentación clínica suelen orientar el diagnóstico correcto, en ocasiones diferenciar un LLB-T de un timoma con predominio linfocitario puede plantear algunas dificultades. Los elementos linfoides que acompañan a la proliferación de células epiteliales que conforman los timomas poseen un patrón de expresión CD4 y CD8 característico y constante en la evaluación por CF, que remeda el proceso de maduración normal en el timo. La mayoría de la población de timocitos coexpresan CD4 y CD8. Además se observan pequeñas poblaciones que expresan uno de los dos marcadores o ninguno de ellos, indicando timocitos en distintos estadios madurativos. En cambio, en el LLB-T se observa una gran población de células linfoides blásticas que coexpresan CD4 y CD8 en proporciones variables, con un patrón más aleatorio y homogéneo que el encontrado en los timomas¹⁷⁻¹⁹. La similitud morfológica de estas lesiones ricas en elementos linfoides con los métodos convencionales de H&E puede hacer demorar el diagnóstico al tener que requerir de métodos complementarios de IHQ para conocer el fenotipo de las células estudiadas.

De los 38 casos evaluados la CF aportó datos positivos en 24 casos que incluyeron los 9 LDCG-B y los 2 LLB-T (definiendo el inmunofenotipo de las células linfoides neoplásicas), así como en los 11 timomas y las 2 hiperplasias tímicas, definiendo el fenotipo de los elementos linfoides acompañantes, el cual, en nuestra opinión es tan característico que circunscribe el diagnóstico diferencial a estas dos entidades; pudiendo incluirse eventualmente algunas otras lesiones benignas del timo mucho más raras (quistes, etc.).

En los 10 casos de LH y en 4 casos de lesiones neoplásicas, no fue posible definir la lesión aunque pudimos excluir otros tipos de linfoma como LDCG-B, LLB-T, etc. Tanto la marcación positiva o negativa principalmente para CD3, CD4 y CD8, como la intensidad de dicha marcación fueron muy variables en los LLB-T en comparación con los timomas, permitiendo en todos nuestros casos un diagnóstico correcto.

Como complemento del estudio cito o histopatológico, la CF es una técnica útil para el diagnóstico de estos tumores, obteniéndose información cualitativa y en algunas ocasiones cuantitativa. Es de suma utilidad en lesiones mediastinales porque permite emitir un informe de manera confiable y rápida, requiriendo cantidades pe-

queñas de material. Permite en general diferenciar correctamente timoma y LLB-T, en muestras de punción aspiración o biopsias. Las principales limitaciones de la evaluación por CF son lesiones con marcada esclerosis y aquellos donde el material fue escaso y no fue posible realizar un panel de marcación completo para fenotipificar correctamente la entidad¹⁸. La CF aportó valiosa información al estudio histológico, permitiendo en el caso de los LLB-T un diagnóstico rápido en situaciones que pueden requerir tratamiento inmediato en cuadros agudos.

Agradecimiento: A Valeria P. Melia, de la Unidad de Investigación Dr. Barón, por la traducción al inglés del resumen del trabajo.

Bibliografía

1. Chan J. Tumors of the lymphoreticular system. In: Fletcher C (ed). Diagnostic histopathology of tumors. 2nd Ed. London: Churchill Livingstone, 2000, p 1270-90.
2. Dehner LP. Germ cell tumors of the mediastinum. *Semin Diagn Pathol* 1990; 7: 266-84.
3. Swanson P. Soft tissue neoplasms of the mediastinum. *Semin Diagn Pathol* 1991; 8: 14-34.
4. Strollo D, Rosado-de-Christenson M, Jett J. Primary mediastinal tumors. Part 1: Tumors of the anterior mediastinum. *Chest* 1997; 112: 511-22.
5. Strickler J, Kurtin P. Mediastinal lymphoma. *Semin Diagn Pathol* 1991; 8: 2-13.
6. Palestro G, Chiarle R, Marx A, Müller-Hermelink H. World Health Organization Classification of Tumours. Tumors of the thymus. Tumors of the lung, pleura, thymus and heart. Pathology and genetics. Lyon: IARC Press, 2004.
7. Yousef S, Weiss L, Warnke R. Primary mediastinal non-Hodgkin's lymphomas: a morphologic and immunologic study of 19 cases. *Am J Clin Pathol* 1985; 83: 676-80.
8. Suster S. Primary large-cell lymphomas of the mediastinum. *Semin Diagn Pathol* 1999; 16: 51-64.
9. Davis R, Dorfman R, Warnke R. Primary large-cell lymphoma of the thymus: a diffuse B-cell neoplasm presenting as primary mediastinal lymphoma. *Hum Pathol* 1990; 21: 1262-8.
10. Sander C, Jaffe E, Gebhardt F, Yano T, Medeiros L. Mediastinal lymphoblastic lymphoma with an immature B-cell immunophenotype. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 300-5.
11. Petersdorf S, Wood D. Lymphoproliferative disorders presenting as mediastinal neoplasms. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 12: 290-300.
12. Shiyong L, Juco J, Mann K, Holden J. Flow cytometry in the differential diagnosis of lymphocyte-rich thymoma from precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 268-74.
13. Nakajima J, Takamoto S, Oka T, Tanaka M, Takeuchi E, Murakawa T. Flow cytometric analysis of lymphoid cells in thymic epithelial neoplasms. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000; 18: 287-92.
14. Gorczyca W, Tugulea S, Liu Xiaoyu Li Z, Yl Wong J, Weisberger J. Flow cytometry in the diagnosis of mediastinal tumors with emphasis on differentiating thymocytes from precursor T-Lymphoblastic lymphoma/leukemia. *Leuk Lymph* 2004; 45: 529-38.

15. Yokoyama T, Tanahashi M, Tateyama H, Yamakawa Y, Kiriyasma M, Fujii Y. Flow-cytometric diagnosis of thymoma using needle biopsy specimens. *Surg Today* 2003; 33: 163-8.
16. Inoue M, Fujii Y, Okumura M, Miyoshi S, Shiono H, Fukuhara K, et al. T-cell development in human thymoma. *Pathol Res Pract* 1999; 195: 541-7.
17. Chan J. Precursor lymphoblastic lymphoma. In: Fletcher C (ed). *Diagnostic histopathology of tumors*. 2nd Ed. London: Churchill Livingstone, 2000, p 1134-8.
18. Gorczyca W. Flow cytometry limitations. In: Gorczyca W (ed). *Flow cytometry in neoplastic hematology. Morphologic-immunophenotypic correlation*. 1st Ed. Oxon: Taylor & Francis, 2006, p 74-80.
19. Gorczyca W. Identification of blasts. In: Gorczyca W (ed). *Flow cytometry in neoplastic hematology. Morphologic-immunophenotypic correlation*. 1st Ed. Oxon: Taylor & Francis, 2006, p 51-64.
20. Rosai J, Sobin L. *World Health Organization Histological Classification of Tumors. Histological typing of tumors on the thymus*. 2nd Ed. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1999.

Cuando escribo prescindo con facilidad de la compañía y recuerdo de los libros, por temor a que interrumpen mi forma. En verdad, los buenos autores me abrumen en exceso y me desalientan. Imito voluntariamente a aquel pintor que, habiendo pintado muy mal unos gallos, prohibía a sus aprendices que llevasen gallos auténticos a su taller. Necesitaría también imitar al músico Antigénesis, quien cuando tenía que tocar, ordenaba que antes o después de él se presentasen malos músicos a su auditorio. Pero me cuesta esfuerzo deshacerme de Plutarco, que, por lo universal rico, en toda ocasión (por extravagante que vuestro tema sea) se ingerirá en él y os tenderá una mano liberal e inagotable, plena de tesoros y embellecimientos. Pero me enoja que de tal modo esté expuesto al saqueo de los que le espigan. Yo casi nunca le pongo mano sin sacar de él alón o pechuga.

Michel de Montaigne (1533-1592)

Ensayos (1580-1588). *Sobre los versos de Virgilio*. Libro III, V, pp 79-80.

Traducción de Juan G. de Luaces. Buenos Aires: Hyspamérica, 1984