



TESIS DOCTORAL

**Neoplasia folicular in situ y
neoplasia de células del manto in situ:
incidencia y significado clínico**

**In situ follicular neoplasia and
in situ mantle cell neoplasia:
incidence and clinical significance**

Autora: Glenda Mariuxi Bermúdez Pinargote.

Directores de tesis:

Dr. Miguel Ángel Piris Pinilla.

Dr. Santiago Montes Moreno.

Servicio de Anatomía Patológica,

Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

Tutor de tesis:

Dr. Fidel Fernández Fernández.

Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

Facultad de Medicina- Universidad de Cantabria

Santander, España

2017

ÍNDICE

ÍNDICE	vii
ACRÓNIMOS	xi
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Linfoma folicular, linfoma de células del manto	1
1.2. Lesiones precursoras de linfomas: neoplasia folicular in situ; neoplasia de células del manto in situ. Definición y diagnóstico	5
1.2.1. Definición de NFIS y NCMIS	7
1.2.2. Diagnóstico	9
1.3. NFIS y NCMIS y su hallazgo en pacientes con procesos linfoproliferativos	14
1.3.1. Neoplasia folicular in situ (NFIS) y su asociación con linfomas	14
1.3.2. Neoplasia de células del manto in situ (NCMIS) y su asociación con linfomas	20
1.4. Propuestas de génesis y evolución de la NFIS y NCMIS	21
1.4.1. El evento más temprano de la tumorigénesis en las células B es la translocación	21
1.4.2. NFIS, LFP, LF un continuo	27

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
2.1. Hipótesis	31
2.2. Objetivos	32
3. DISEÑO DEL ESTUDIO, MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Diseño del estudio	33
3.2. Muestra	35
3.3. Técnicas de laboratorio	36
3.3.1. Técnicas de tinción	36
3.3.2. Hibridación fluorescente in situ	41
3.4. Métodos estadísticos	43
3.4.1. Medida de la frecuencia de NFIS/NCMIS	43
3.4.2. Otras medidas de frecuencia utilizadas	44
4. RESULTADOS	47
4.1. Casos con NFIS y NCMIS aislada e incidental	47
4.1.1. Casos de NFIS y NCMIS aislada e incidental en el cribado sistemático y retrospectivo de piezas de linfadenectomía	49
4.1.2. Casos de NFIS aislada e incidental procedentes de la consulta	60
4.2. Casos con NFIS/NCMIS en pacientes con sospecha clínica de proceso linfoproliferativo	61
4.2.1. Casos con NFIS no aislada	61
4.2.2. Casos con NCMIS no aislada	64
5. DISCUSIÓN	67

5.1. Incidencia de NFIS y NCMIS “incidental” en un cribado sistemático y retrospectivo de piezas de linfadenectomía	67
5.2. Riesgo de progresión a LF y LCM manifiesto en la Muestra retrospectiva	70
5.3. Asociación de NFIS y NCMIS con linfomas	73
5.3.1. NFIS y linfomas asociados	73
5.3.2. NCMIS y linfomas asociados	75
6. CONCLUSIONES	77
7. BIBLIOGRAFÍA	79
8. ANEXO: PUBLICACIÓN ORIGINAL	95
Material suplementario en formato digital anexo.....	95

ACRÓNIMOS

Ac: anticuerpo.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AID: deaminasa de citosina inducida por activación. “Activation induced cytosine deaminase”.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

“BA”: sonda de ruptura. “Break apart”.

BCL2: “B-cell lymphoma”.

CALLA: antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda. “Common acute lymphoblastic leukemia-associated”.

CG: centro germinal.

CGA: campo de gran aumento.

CMF: citometría de flujo.

CRS: células de Reed Sterberng.

EII: enfermedad inflamatoria intestinal.

ERM: enfermedad residual mínima.

“FISH”: hibridación fluorescente in situ. “Fluorescence in-situ hybridization”.

“FLBUS”: células B de tipo linfoma folicular de significado incierto.
“Follicular lymphoma-like B cells of uncertain significance”.

“FLLC”: células B tipo linfoma folicular. “Follicular lymphoma like cells”.

FS: folículo secundario.

“GIST”: tumor del estroma gastrointestinal. “Gastrointestinal stromal tumor”.

GL: ganglios linfáticos.

GMSI: gammapatía monoclonal de significado incierto.

He-Eo: hematoxilina-eosina.

HGC: técnica de hibridación genómica comparada.

icr: región de grupo intermedio. “Intermediate cluster region”.

Ig: inmunoglobulina.

IgH: inmunoglobulina pesada. “Immunoglobulin heavy chain”.

IHQ: inmunohistoquímica.

IPILF: Índice Pronóstico Internacional para linfoma folicular.

IPIM: Índice Pronóstico Internacional para linfoma de células del manto.

LBDCG: linfoma B difuso de célula grande.

LCM: linfoma de células del manto.

LCTP: linfoma de células T periférico.

LDH: lactato deshidrogenasa.

LF: linfoma folicular.

LFD: linfoma folicular duodenal.

LFP: infiltración parcial por linfoma folicular.

LH: linfoma de Hodgkin.

LHC: linfoma de Hodgkin clásico.

LLC/LLCP: leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico de células pequeñas.

LLP: linfoma linfoplasmocítico.

LMCB: linfocitosis monoclonal de células B.

LZME: linfoma de la zona marginal esplénica.

LZMG: linfoma de la zona marginal ganglionar.

“MALT”: Linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas o linfoma de la zona marginal extraganglionar. “Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma” or “extranodal marginal zone lymphoma” (“EMZL”).

mbr: región principal de grupos de puntos de ruptura. “Major breakpoint cluster region”.

“MCLBUS”: linfoma de células del manto in situ de significado incierto. “Mantle cell lymphoma uncertain significance”.

mcr: región menor de grupos de puntos de ruptura. “Minor breakpoint cluster region”.

MF: Micosis fungoide.

“MCLD”: desórdenes linfoproliferativos concurrentes múltiples.

“Multiple concurrent lymphoproliferative disorders”.

MM: mieloma múltiple.

MTC: grupo principal de translocación. “Major translocation cluster”.

NFIS: neoplasia folicular in situ. “In situ follicular neoplasia” (“ISFN”).

NCMIS: neoplasia de células del manto in situ. “In situ mantle cell neoplasia” (“ISM CN”).

“PCR”: reacción en cadena de la polimerasa. “Polymerase chain reaction”.

RAG 1/2: gen de activación de recombinación. “Recombination activating gene 1/2”.

“RT-PCR”: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa. “Reverse transcription polymerase chain reaction”.

SV40: virus del simio 40. “Simian virus 40”.

vcr: región de grupos variables. “Variable cluster region”.

ZM: zona del manto.

RESUMEN

El linfoma folicular (LF) es uno de los linfomas no Hodgkin más frecuente en adultos, el 20% de todos los linfomas, con una incidencia de 2,6 por 100 mil personas al año, una edad media de presentación en la sexta década y ligero predominio en mujeres en Europa. En los dos tercios de casos suele diagnosticarse en estadio III y IV. Está caracterizado por la translocación cromosómica t(14;18)(q32;q21).

El linfoma de células del manto (LCM) comprende el 3 al 10% aproximadamente de los linfomas no-Hodgkin. Ocurre en individuos con una mediana de edad sobre los 60 años con predominio en hombres. La mayoría de los pacientes son diagnosticados con enfermedad en estadio III o IV, con linfadenopatías, hepatoesplenomegalia, afectación de médula ósea y sangre periférica. Está caracterizado por la translocación t(11;14)(q13;q32).

El éxito terapéutico obtenido que conlleva la detección precoz de una neoplasia maligna y/o de su estado preneoplásico, explica el interés científico de la determinación de las lesiones precursoras. De ahí la importancia de las lesiones precursoras en el LF y LCM porque ambas son diagnosticadas en estadios avanzados lo que repercute negativamente en el pronóstico y supervivencia.

Actualmente se considera como potenciales precursores a la neoplasia folicular in situ (NFIS) y a la neoplasia de células del manto in situ (NCMIS). In situ, porque las células con t(14;18) o t(11;14) se

localizan de forma restringida a un compartimento tisular normalmente ocupado por su contraparte fisiológica.

La neoplasia folicular in situ (NFIS) y la neoplasia de células del manto in situ (NCMIS) son hallazgos histopatológicos de significación clínica indeterminada.

En este estudio se estableció como **objetivos** establecer la incidencia de NFIS y NCMIS “incidental” en un muestreo sistemático y retrospectivo de piezas de linfadenectomía de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de colon (201 casos) y carcinoma de mama (140 casos) durante 3 años consecutivos (1998-2000) y establecer el riesgo de progresión a LF y LCM manifiesto después de un seguimiento mínimo de 13 años. Así como también hacer una comparativa de la serie consecutiva de 3 años con una serie diferente de casos de NFIS o NCMIS procedentes de la consulta de Hematopatología.

Las técnicas de laboratorio utilizadas son métodos de tinción, hematoxilina eosina e inmunotinción BCL2, CD10, ciclina D1. Adicionalmente se realizó FISH.

La NFIS incidental y aislada fue identificada en 11/341 pacientes (3.23%), mientras que la NCMIS incidental y aislada se encontró en 2/341 pacientes (0,59%). Ninguno de los 13 casos de esta serie desarrolló linfoma manifiesto durante el periodo de seguimiento (rango 7-192 meses).

Una segunda serie de 17 casos de NFIS (16 casos) y NCMIS (1 caso) procedente de los archivos de consulta fue analizada, cinco casos fueron NFIS incidental y aislada y ninguno progresó a linfoma manifiesto.

En general, ninguno de los 16 casos con NFIS aislada en ambas series desarrolló LF manifiesto después de una mediana de seguimiento de 54 meses (rango 7 a 187 meses).

Sin embargo, los 12 casos con sospecha clínica de enfermedad linfoproliferativa mostraron asociación (en diferentes ganglios linfáticos) o combinación (en la misma muestra) de NFIS o NCMIS con otras neoplasias linfoides (LF, linfoma de la zona marginal esplénica, linfoma de la zona marginal ganglionar, linfoma de Hodgkin, linfoma difuso de célula B grande, leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico de células pequeñas, mieloma múltiple).

En conclusión, la relevancia clínica de la NFIS y NCMIS parece depender estrictamente del contexto clínico. En la serie de muestreo retrospectivo, la NFIS o NCMIS aislada e incidental tuvo un riesgo nulo de transformación a LF o LCM respectivamente.

Sin embargo, en los pacientes donde la neoplasia folicular in situ o neoplasia de células de manto in situ se diagnostican en el contexto de una sospecha clínica de proceso linfoproliferativo este hallazgo es más frecuente de lo esperado, sugiere un trastorno de base que facilita la emergencia de poblaciones clonales en células B y debe llevar a un estudio clínico riguroso.

ABSTRACT

Follicular lymphoma (FL) is one of the most common non-Hodgkin lymphomas in adults, for about 20% of all lymphomas, with an incidence of 2.6 per 100,000 people/yr.), with a median age in the 6th decade and slight predominance in European women. In two thirds of cases it is usually diagnosed in stage III and IV. It is characterized by chromosome translocation t(14; 18) (q32; q21).

Mantle cell lymphoma (MCL) comprises approximately 3% to 10% of non-Hodgkin's lymphomas. It occurs in individuals with a median age over 60 years with predominance in men. Most patients are diagnosed with stage III or IV disease, with lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, involvement of bone marrow and peripheral blood. It is characterized by chromosome translocation t(11;14)(q13;q32).

The therapeutic success obtained with the early detection of a malignant neoplasm and / or its preneoplastic state explains scientific interest in determination of precursor lesions. Therefore, the importance of precursor lesions in FL and MCL because both are diagnosed in advanced stages, which has a negative impact on prognosis and survival.

Actually, in situ follicular neoplasia" (ISFN) and in situ mantle cell neoplasia (ISMCN) are considered as potential precursors. In situ, because B cells with t(14; 18) or t(11; 14) are restricted to a tissue compartment normally occupied by its physiological counterpart.

In situ follicular neoplasia” (ISFN) and in situ mantle cell neoplasia (ISMCN) are histopathologic findings of undetermined clinical significance.

The **objective** of this study was to establish incidence of "incidental" ISFN and ISMCN in systematic and retrospective sampling of lymphadenectomy specimens from patients diagnosed with colorectal (201 cases) and breast (140 cases) adenocarcinoma during 3 consecutive years (1998-2000) and establish the risk of progression to FL and overt MCL after a minimum follow-up of 13 years. Also, to make a comparison between the consecutive series of 3 years with a different series of cases of ISFN or ISMCN from Hematopathology consultation files.

The laboratory techniques used are staining methods, hematoxylin eosin and immunostaining BCL2, CD10, cyclin D1. In addition, FISH was performed.

Incidental and isolated ISFN was identified in 11/341 patients (3.23%), whereas incidental and isolated ISMCN was found in 2/341 patients (0.59%). None of these 13 cases in this series developed overt lymphoma during the follow-up period (range 7-192 months).

In the second series of 17 cases of ISFN (16 cases) and ISMCN (1 case) from consultation files, five cases had incidental and isolated ISFN and none progressed to manifest lymphoma.

Overall, none of the 16 cases with incidental and isolated ISFN in both series developed overt FL after a median follow-up of 54 months (range 7 to 187 months).

However, the 12 cases with clinical suspicion of lymphoproliferative disease showed association (in different lymph nodes) or combination (in the same sample) of ISFN or ISMCN with other lymphoid neoplasms (LF, splenic marginal zone lymphoma, nodal marginal zone lymphoma, Hodgkin's lymphoma, diffuse large B-cell

lymphoma, chronic lymphocytic leukemia / small cell lymphocytic lymphoma, multiple myeloma).

In conclusion, the clinical relevance of ISFN and ISMCN seems to strictly depend on the clinical context. In the retrospective sampling series, isolated and incidental ISFN or ISMCN had zero risk of transformation to FL or MCL respectively.

However, when ISFN or ISMCN are diagnosed in the context of a clinical suspicion of lymphoproliferative disorder this finding is more frequent than expected, suggesting a basic disorder that facilitates the emergence of clonal B cells populations and should lead to a rigorous clinical study.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Linfoma folicular, linfoma de células del manto

El linfoma folicular (LF) es uno de los linfomas no Hodgkin más frecuente en adultos, el 20% (1) de todos los linfomas, con una incidencia de 2,6 por 100 mil personas al año (2), una edad media de presentación en la sexta década de vida y ligero predominio en mujeres en Europa (razón mujer: hombre de 1,7: 1) (1,3) y en varones en Estados Unidos (razón mujer: hombre de 1: 1,2-1,6) (6).

Su curso clínico es indolente, por la lenta expansión de sus células tumorales, en dos tercios de casos suele diagnosticarse en estadio III y IV. Presenta linfadenopatías asintomáticas durante años, compromiso de la médula ósea en el 70% de los pacientes y la afectación de otros órganos es poco frecuente. Los síntomas B y el incremento de lactato deshidrogenasa (LDH) se manifiestan en menos del 20% de los pacientes (4).

El LF está caracterizado por la traslocación cromosómica t(14;18)(q32;q21), encontrada en más del 90% de los casos (1). La determinación de graduación histológica del LF está basado en el conteo de centroblastos en 10 folículos neoplásicos. Se establecen 3 grados: grado 1 (0-5 centroblastos por campo de gran aumento, CGA), grado 2 (6-15 centroblastos por CGA) y grado 3 (>15 centroblastos por CGA). El grado 3 se subdivide en grado 3A, en el que los centrocitos todavía están presentes, y grado 3B, en el que se observan únicamente sábanas de centroblastos (1).

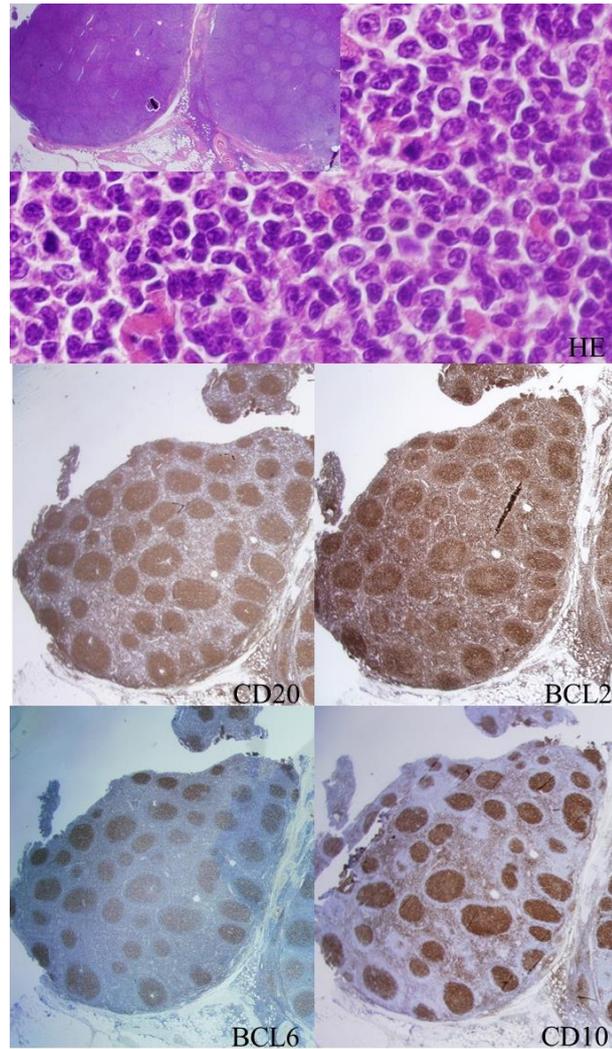


Figura 1.1 Linfoma folicular grado 1. Los folículos y las regiones interfoliculares contienen células B CD20+. Los folículos son BCL2+. BCL6 y CD10 son expresados en los folículos y en menor grado en las células neoplásicas interfoliculares.

El modelo de Índice Pronóstico Internacional para linfoma folicular (IPILF, en inglés “FLIPI”) establece 5 factores independientes como predictores de supervivencia. La presencia en puntuación 0,1,2 o 3 de estos factores adversos define un riesgo bajo (0-1), intermedio (2), o alto de enfermedad (3 o más) (7).

- 1) edad >60 años,
- 2) hemoglobina <12 g/dL,
- 3) LDH sérica >normal,
- 4) estadio III/IV de Ann Arbor y
- 5) número de áreas ganglionares involucradas >4.

Tabla 1.1 Índice Pronóstico Internacional para linfoma folicular, IPILF

Grupo de riesgo	Nº de factor de riesgo	SG a 5 años	SG a 10 años
Bajo riesgo	0-1	91%	71%
Riesgo intermedio	2	78%	51%
Alto riesgo	3 o más	52%	36%

Fuente: Solal-Celigny P (2004) (7).
SG:supervivencia global

En los pacientes asintómaticos con estadio bajo y sin citopenias está indicado el seguimiento clínico (“watch and wait”). Desde el desarrollo de anticuerpos (Ac) monoclonales, gracias a la ingeniería genética, el pronóstico del LF está en relación con la extensión de la enfermedad al diagnóstico y que sea sensible a la terapia con rituximab (Ac monoclonal específico contra el antígeno CD20) que ha mejorado la respuesta, duración y supervivencia global. Otros tratamientos como el trasplante de progenitores hematopoyéticos está indicado para enfermedad recurrente (4).

El linfoma de células del manto (LCM) comprende el 3 al 10% aproximadamente de los linfomas no-Hodgkin. Ocurre en individuos con una mediana de edad sobre los 60 años a razón entre hombre: mujer de 2:1 o más. La mayoría de los pacientes son diagnosticados con enfermedad en estadio III o IV, con linfadenopatías, hepatoesplenomegalia, afectación de médula ósea y sangre periférica (1).

El LCM es una neoplasia de células B generalmente con traslocación t(11;14)(q13;q32). El LCM clásico es una proliferación linfoide monomórfica con un patrón vagamente nodular o difuso. La mayoría de casos están compuestos por células linfoides pequeñas a medianas con un contorno nuclear ligero a marcadamente irregular, tipo centrocito (Figura 1.2). Se ha reconocido algunas variantes morfológicas, siendo las variantes blastoide y pleomórfica de importante significado clínico por su peor pronóstico (1).

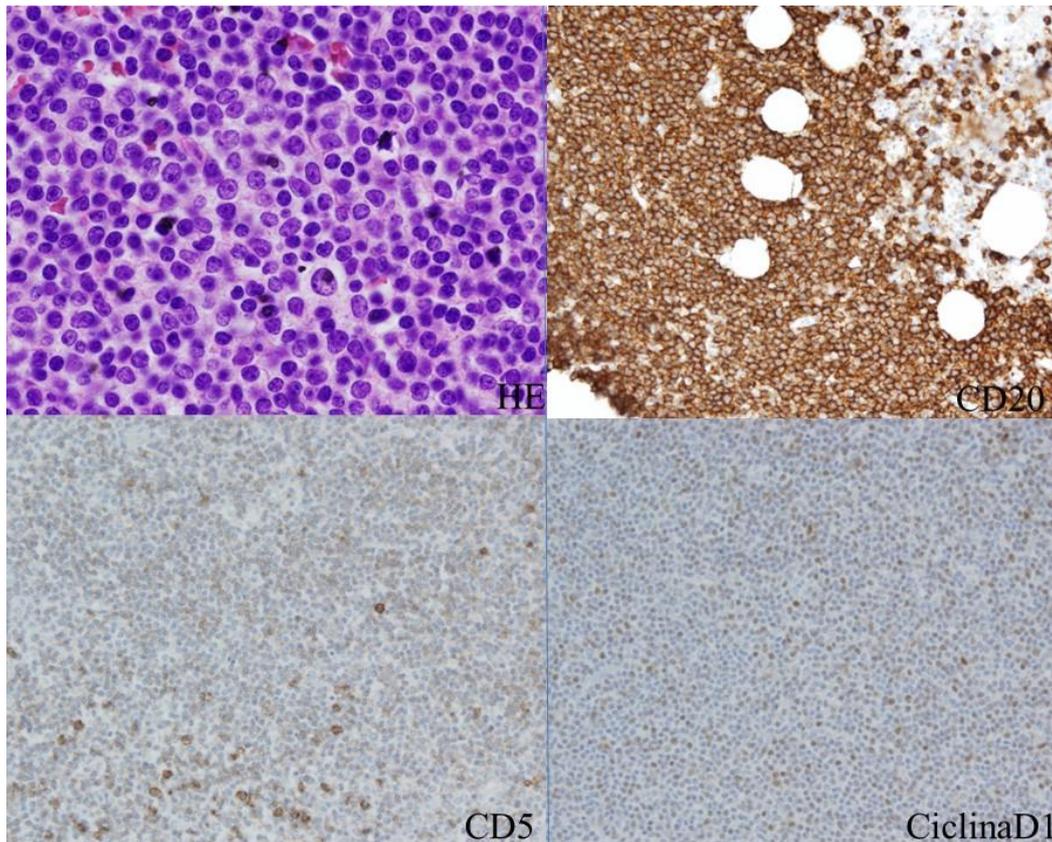


Figura 1.2 Linfoma de células del manto. Las células neoplásicas expresan positividad con ciclina D1 (nuclear), CD20 y CD5.

Aunque el LCM no ha sido graduado histológicamente, la evaluación de la fracción de proliferación sea por el conteo de figuras mitóticas o estimando la proporción de los núcleos Ki67+ han demostrado su utilidad en el pronóstico junto a parámetros clínicos (1).

El modelo de Índice Pronóstico Internacional para linfoma de células del manto (IPIM, en inglés “MIPI”) establece 4 parámetros clínicos independientes como predictores de menor supervivencia. La presencia en puntuación 0,1,2 o 3 de estos factores adversos define un riesgo bajo (0-3 puntos), intermedio (4 y 5 puntos), o alto de enfermedad (6 o más). Otorgando la mayor puntuación cuando (8):

- 1) edad es igual o mayor de 70 años,
- 2) ECOG 2-4,
- 3) LDH 1.5 veces el límite superior normal o más y
- 4) cifra de leucocitos igual o mayor de $15.000 \times 10^9/L$.

El LCM tiene una supervivencia media de 3 a 5 años, la mayoría de los pacientes no alcanzan una remisión completa duradera. Actualmente el LCM se cura sólo con el trasplante alogénico pero muy pocos pacientes cumplen los requisitos para este tratamiento (9).

No existe un tratamiento definido como de primera línea para aquellos que no son candidatos a estrategias agresivas. Para aquellos que sí lo son, se tratan con Ara C a dosis alta, como agente quimioterápico de inducción. Está en estudio la consolidación con radioinmunoterapia (isótopos radioactivos con agentes inmunitarios) o el mantenimiento con rituximab (9).

1.2. Lesiones precursoras de linfomas: neoplasia folicular in situ; neoplasia de células del manto in situ. Definición y diagnóstico

El éxito terapéutico obtenido que conlleva la detección precoz de una neoplasia maligna y/o de su estado preneoplásico, como ocurre por ejemplo en el cáncer de mama, cáncer en el cuello del útero, cáncer de colon y recto, explica el interés científico de la determinación de las lesiones precursoras.

Actualmente se ha incrementado la detección de posibles lesiones precursoras de neoplasias linfoides, de las cuales se requiere aún mayor conocimiento. Son lesiones que no cumplen criterios para el diagnóstico de linfoma establecido, aunque presentan algunas de sus características inmunofenotípicas y moleculares y han sido detectadas generalmente en personas sanas. Su riesgo de progresión a linfoma manifiesto en algunas es incierto lo cual ha sido reflejado en las diferentes nomenclaturas propuestas. Sirva de ejemplo la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y la linfocitosis monoclonal de células B (LMCB).

Entre otras lesiones posiblemente precursoras de neoplasias linfoides se puede mencionar: centros germinales (CG) progresivamente transformados, hiperplasia folicular con células B con restricción de cadenas ligeras, proliferación indolente de células plasmáticas, lesiones precursoras de linfoproliferaciones de células T y NK, hiperplasia linfoide reactiva asociada con EBV (10,11).

En el LF y LCM ha sido de importancia establecer las lesiones precursoras por ser ambos diagnosticados en estadios avanzados lo que repercute negativamente en el pronóstico y supervivencia. Para cada una de estas patologías se considera como potenciales precursores a dos lesiones que en el presente estudio serán referidas, según la actualización de la clasificación de las neoplasias linfoides, como neoplasia folicular in situ (NFIS) y neoplasia de células del manto in situ (NCMIS) (5).

El término in situ hace mención a la condición en la cual las células con $t(14;18)$ o $t(11;14)$ se localizan de forma restringida a un compartimento tisular normalmente ocupado por su contraparte fisiológica (por ejemplo los CG en el caso de la neoplasia folicular in situ).

La NFIS ha sido referida también como Células B de tipo linfoma folicular de significado incierto (del inglés “Follicular lymphoma-like B cells of uncertain significance”, “FLBUS”) (12, 13) por constituir un hallazgo diagnóstico con significado clínico incierto.

Actualmente, lo que se conoce es la presencia de NFIS en el 2.3% (3 casos) de 132 pacientes, a quienes les fueron biopsiados 1294 ganglios linfáticos (GL) reactivos extirpados por procesos inflamatorios o estadiaje de tumores sólidos en consultas realizadas durante 3 meses (14). En otro estudio la frecuencia fue del 2% obtenido al analizar 100 GL consecutivos con hiperplasia folicular (15).

Entre los sitios anatómicos donde han sido detectadas NFIS se encuentran GL aumentados de tamaño y disecados en el contexto de

procesos quirúrgicos (como hernia inguinal, obstrucción intestinal, diverticulitis, neoplasias) y no quirúrgicos, así como también en sitios extraganglionares como amígdalas, adenoides, colon (13), tiroides con tiroiditis linfocitarias (2), bazo (16). En los GL es detectada la NFIS en un solo GL o múltiples, de modo sincrónico o no y la recurrencia no es equivalente a la presencia de un linfoma manifiesto (13,17,18).

En estudios previos para establecer la frecuencia de NCMIS en GL reactivos, no se detectó ningún caso. Uno de estos estudios analizó 1292 GL en 131 pacientes de un periodo de 3 meses (19) y otro en 100 GL consecutivos con hiperplasia folicular reactiva (15), linfadenectomías donde también se investigó NFIS.

La NCMIS ha sido detectada en GL y sitios extraganglionares (tales como glándulas lagrimales, orofaringe, bazo, intestino, apéndice (15)) en el contexto de procesos quirúrgicos como apendicitis, neoplasias y otros no quirúrgicos. Puede tener presencia multifocal lo que demuestra que las células B t(11;14) están circulando (20).

1.2.1. Definición de NFIS y NCMIS

La neoplasia folicular in situ (NFIS) ha sido definida como la presencia de células B con características genéticas e inmunofenotípicas del linfoma folicular, pero con expresión fuertemente positiva para BCL2 y CD10 y limitada al centro germinal (CG) de los GL (21). Figura 1.3 y Figura 1.5.

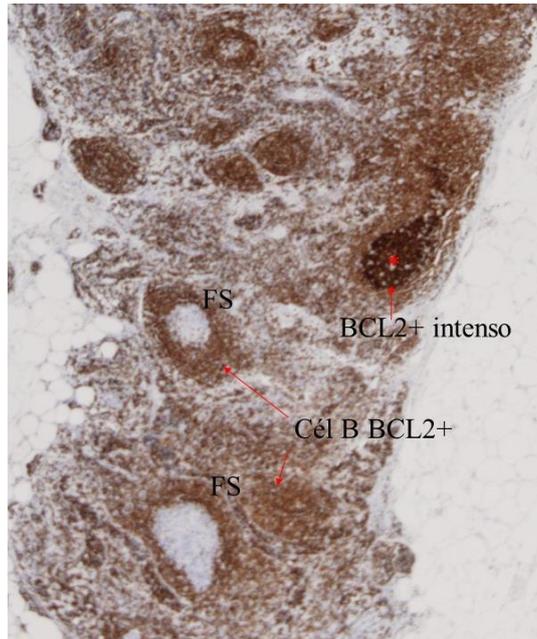


Figura 1.3 Neoplasia folicular in situ (NFIS). Se observa un folículo secundario (FS) con expresión intensa de BCL2, limitada a un centro germinal de bordes netos.

La neoplasia de células del manto in situ (NCMIS) es definida como la presencia de células B ciclina D1 positivas, usualmente con t(11;14) en una localización limitada a la zona interna del manto de un GL reactivo (22, 23). Ver figura 1.4.

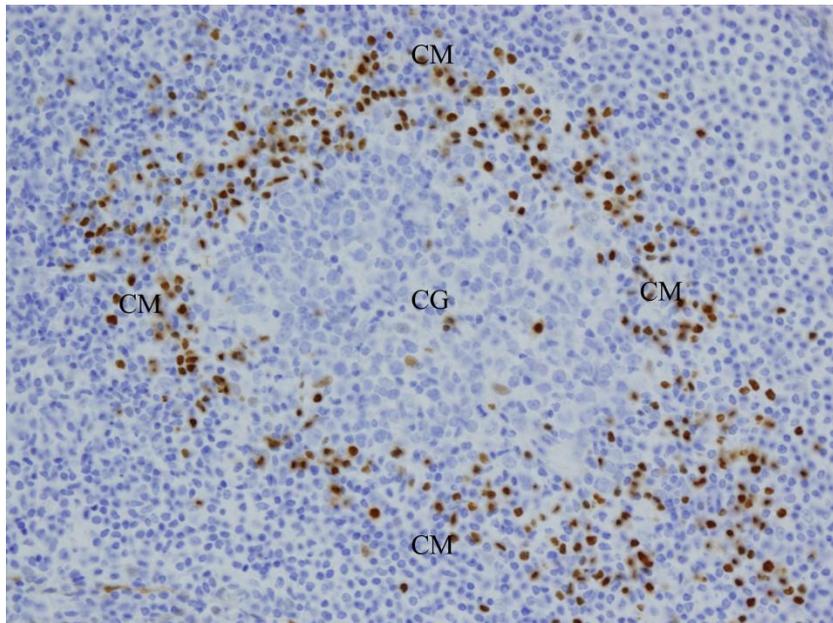


Figura 1.4 Neoplasia de células de manto in situ (NCMIS). Se observa células más internas del manto (CM) expresando ciclina D1 (tinción nuclear); CG, centro germinal.

1.2.2. Diagnóstico

1.2.2.1. Diagnóstico de NFIS: BCL2

BCL2 es una proteína de membrana de tipo integral de 25,000 de masa molecular relativa, codificada por el gen *BCL2* y se localiza en el lado citoplasmático de la membrana externa mitocondrial, en la envoltura nuclear y en el retículo endoplásmico (24, 25). En el tejido linfoide normal se detecta la proteína BCL2 en numerosos linfocitos T (timocitos) corticales, en casi todas las células B normales excepto en las células B monocitoides reactivas, centroblastos y centrocitos de CG (26).

La proteína BCL2 ha sido detectada también en algunos tejidos no linfoides, incluyendo epitelio de piel, glandular y mucosa gastrointestinal (27). En el epitelio normal, incluyendo la mucosa colorrectal, su expresión se detecta en las células basales donde están localizadas las células progenitoras o madres (28, 29).

La proteína BCL2 como resultante de la t(14;18) (q32;q21) se ha detectado sobre todo en los LF caracterizándolo, pero también en el linfoma B difuso de célula grande (LBDCG). Y en ciertos casos, su detección ayuda para el diagnóstico diferencial entre linfoma versus hiperplasia folicular (26, 30- 32). En la NFIS la proteína BCL2 muestra expresión intensa en el CG (21).

También de modo anómalo (comparando con epitelios normales o hiperplásicos) ha sido detectada la proteína BCL2 en tejidos no linfoides, tales como pólipos displásicos colorrectales y carcinomas colónicos (29). Incluso tiene valor pronóstico en el carcinoma de colon, son menos agresivos y progresan más lentamente aquellos en que la oncoproteína BCL2 puede ser detectada (33).

En el carcinoma de mama la detección de BCL2 se ha relacionado con una mejor respuesta a la quimioterapia, teniendo un valor pronóstico para evaluar la eficacia de los tratamientos (34). En los tumores mamarios

se ha observado que la sobreexpresión transgénica de BCL2 actúa como señal pro-proliferativa, pero por sí sola tampoco genera tumor mamario (35- 37) y sí bajo la influencia de la inducción por c-Myc, del antígeno tumoral grande del virus SV40 y de la ablación genética Bax (34).

BCL2 también es positivo en el 80% de carcinomas de tiroides pobremente diferenciados (insular) y en otros carcinomas; así como en un tercio de los tumores benignos y malignos de la vaina del nervio periférico entre otros tumores mesenquimáticos (38).

El 85 al 90% de los LF con la t(14,18) son positivos al Ac BCL2 standard (clon 124) que se une a una región fija del transcrito del gen silvestre *BCL2*. Aunque existe una buena correlación entre presencia de la traslocación y la expresión de BCL2, al momento se ha observado que en un 10% a 15% de los LF se detecta la traslocación, pero no la sobreexpresión IHQ de la proteína BCL2 (1) y en un 25 % lo opuesto, es decir se detecta la expresión de la proteína, pero no la traslocación (39).

Los resultados negativos en LF usando el Ac BCL2 standard se debe a una mutación puntual en el gen *BCL2* que altera el epítipo de reconocimiento del Ac convencional (27, 40). Otros mecanismos incluyen la fosforilación de otros residuos de la proteína (27). Por otra parte, en un 10-30% de LF no se detecta ni la translocación (14;18) ni la proteína BCL2 por tener translocación *BCL6/IgH*, o ser un LF de inmunofenotipo aberrante (1).

En los LF grado 1 o 2 BCL2 negativo se ha tenido que utilizar para visualizar la expresión de la proteína otros Ac diferente al estándar, como por ejemplo el clon 100D5, clon E17 y SP66 (41).

1.2.2.2. Diagnóstico de NFIS: CD10

El CD10 o CALLA (antígeno común de leucemia linfoblástica aguda, “Common acute lymphoblastic leukemia -associated”) es una

metalopeptidasa que se expresa en precursores linfoides y células normales del CG del folículo linfoide (38), por lo cual se lo emplea también como marcador del CG.

CD10 es positivo en el 60% de los casos de LF. La positividad es variable en LBDCG y en el mieloma múltiple (MM). Positivo en el 90% de leucemia linfoblástica aguda de células B y en la leucemia mieloide crónica en crisis blástica linfoide (38). En la NFIS el antígeno CD10 se expresa intensamente en el CG (21).

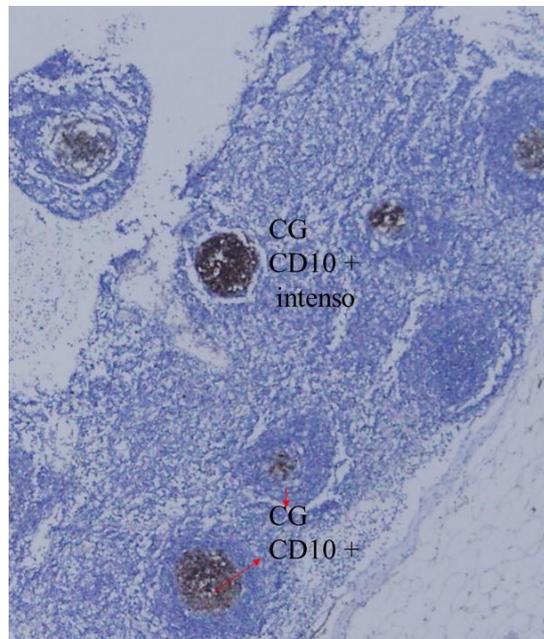


Figura 1.5 Neoplasia folicular in situ (NFIS): folículo secundario con tinción intensa CD10 del centro germinal (CG) y de borde bien definido. Se observan otros folículos secundarios con tinción del CG por CD10.

CD10 también es positivo en el 94% de linfoma de Burkitt, Burkitt like y linfoblástico B (38). Con la excepción de la leucemia linfoblástica T, la expresión de CD10 en neoplasias T es muy infrecuente, usualmente restringida a casos de linfoma T de fenotipo folicular (por ejemplo, linfoma T angioinmunoblástico) (1, 30, 31, 42, 43).

Se observa expresión de CD10 en otros tejidos no linfoides como en las células mioepiteliales de mama y en los conductos biliares; en tumores

no linfoides como en carcinomas de células renales y del pulmón, en mesoteliomas, en el melanoma maligno y en el sarcoma del estroma endometrial (38).

1.2.2.3. Diagnóstico de NCMIS: Ciclina D1

La ciclina D1 (llamada también BCL1 o PRAD 1) es una proteína de 36 kDa codificada por el gen *CCND1*. La familia de las ciclinas D regulan la actividad de las proteínas-quinasas en la fase G1 (que sigue a la fase de la mitosis) conduciéndola hacia la fase S (síntesis de ADN) del ciclo celular (26, 30), por eso su detección IHQ es nuclear y la tinción citoplasmática se considera inespecífica.

La ciclina D1 activa y regula a quinasas dependientes (CDCs) del ciclo celular CDC4 y CDC6 mediante la fosforilación e inactivación de la proteína retinoblastoma. Regula: diversos factores de transcripción y corre reguladores transcripcionales, el metabolismo celular, la diferenciación de las células grasas y la migración celular (44).

La sobreexpresión de la ciclina D1 está asociada con la tumorigénesis, en neoplasias linfoides está relacionada con la t(11:14) (q13 q32) (43). Se considera un marcador sensible (70-100%) y específico para LCM (45-47). También se expresa en 25% de las neoplasias de células plasmáticas y 10% de las leucemias de células peludas, aunque con una señal más débil. En la NCMIS la proteína ciclina D1 se expresa en las células de la capa más interna del manto (22, 23).

Se ha detectado su expresión en otras neoplasias no linfoides como en los carcinomas de mama, en los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, en los cánceres de esófago y en los carcinomas de células renales (44). Dentro de un mismo tumor la intensidad de positividad nuclear varía entre las células neoplásicas.

Con la ayuda de otras herramientas de laboratorio como la citometría de flujo (CMF) y técnicas moleculares (hibridación

fluorescente in situ, “FISH”; reacción en cadena de la polimerasa, “PCR”; secuenciación; técnica de hibridación genómica comparada, HGC) ha sido posible ampliar más el estudio de estas lesiones precursoras para un mayor conocimiento de las mismas.

Por ejemplo, una proporción de NFIS serían identificadas mediante CMF. Aunque típicamente la identificación del LF está basado en la tinción inmunohistoquímica (IHQ) de tejidos en parafina como parte del protocolo hospitalario en el hospital Valdecilla, a todo paciente con sospecha de proceso linfoproliferativo se envía muestra en “fresco” tanto al Servicio de Anatomía Patológica como al Servicio de Hematología para posibles estudios posteriores como CMF, “FISH” o citogenética.

Actualmente más y más linfadenopatías están siendo ahora evaluadas usando biopsias con aguja o aspiración con aguja fina siendo analizadas luego en el microscopio y en el citómetro de flujo. De tal modo que tanto las muestras procedentes del hospital como interconsultas interhospitalarias tienen un perfil fenotípico por CMF.

En la CMF las células B con restricción de cadenas ligeras CD10+ o células B CD10+ y BCL2+ se interpretan como reflejo de un linfoma de células B de origen CG (13) con excepciones como la hiperplasia folicular clonal, típicamente más vista en niños y adultos jóvenes (48) y una proporción de NFIS que también serían identificadas. Lo cual hay que tener en cuenta al analizar los resultados de CMF cuando solamente se trabaja con preparaciones citológicas, para no diagnosticar un LF de bajo grado existiendo la posibilidad de que sea una NFIS (13).

Pillai en su estudio con CMF detectó células B CD10+ y/o BCL2+ con restricción de cadena ligera en aproximadamente la mitad de los casos de NFIS y eran indistinguibles de las que son vistas en un LF o linfoma B difuso de célula grande (LBDCG) (13).

1.3. NFIS y NCMIS y su hallazgo en pacientes con procesos linfoproliferativos

1.3.1. Neoplasia folicular in situ (NFIS) y su asociación con linfomas

La NFIS se ha detectado en pacientes con LF y linfoma B difuso de célula grande (LBDCG) de forma previa, simultánea o subsecuente. En otros casos, se ha reportado la asociación de NFIS con otro tipo de neoplasias linfoproliferativas o no linfoproliferativas y con procesos inflamatorios.

En el 2002 se reportó una serie retrospectiva de casos de NFIS dónde el 44% (8/18) presentaba un LF asociado. El 8% (2/25) se asociaba a otras neoplasias linfoides distintas del LF (21). En ese estudio se definen por primera vez las características histopatológicas, inmunohistoquímicas y moleculares de la lesión y se sugiere la posibilidad de que la NFIS sea un precursor del LF.

Seis años después la clasificación de la OMS de neoplasias hematolinfoides reconoce el linfoma folicular in situ / neoplasia intrafolicular y el linfoma de células del manto in situ (1), debiéndose tal nomenclatura a las características inmunofenotípicas y genéticas coincidentes con LF y LCM respectivamente, así como por haber sido detectadas asociadas a LF o LCM, concurrente, previo y/o posterior.

Al no conocer la proporción de LF precedido por NFIS, se planteó si la situación es análoga a la leucemia linfocítica crónica (LLC) en la que prácticamente todos los casos están precedidos por LMCB (49) aunque su rango de progresión a LLC es de sólo 1-2% al año (50, 51). Y si acaso también ocurre en el LCM precedido de NCMIS o pequeños focos de células linfoides ciclina D1+ (15).

En el 2011, se definen con mayor precisión los criterios para realizar el diagnóstico diferencial entre NFIS e infiltración parcial de ganglio

linfático por linfoma folicular (LFP) (2) por el mismo equipo de investigación que publicó en el 2002.

Teniendo en cuenta esos criterios, al reclasificar los casos de NFIS y añadiendo otros observó que ya no un 23%, sino sólo el 5% de casos sin diagnóstico previo o concurrente de LF u otro proceso linfoproliferativo desarrolló LF durante el seguimiento (mediana: 41; rango:10-118 meses). La presencia de la NFIS en pacientes con linfoma se siguió evidenciando, aunque en un porcentaje menor, así encontraron que el 18% (6/34) de los pacientes con NFIS tuvieron LF previo o concurrente y, en 5 casos se observó la concurrencia de NFIS con otros linfomas distintos del LF (2).

Se ha planteado si la cuantificación del número de folículos afectados por NFIS se relaciona con el riesgo de desarrollar LF establecido. En relación con esto, en otros dos estudios se han medido el número absoluto de folículos secundarios (FS) involucrados, su proporción (FS BCL2+/N° FS), el grado de extensión dentro del FS individual y la densidad de FS anormales (FS BCL2+ por cm²) (2, 13).

En el estudio de Jegalian, 7 de 12 casos con linfoma asociado (incluyendo LF) tuvieron menor presencia de “in situ”, comparado con otros 6 de 20 casos sin linfoma asociado. En el único caso que desarrolló LF en el mismo sitio anatómico del diagnóstico previo de NFIS, la graduación fue baja (1A: < 5 FS BCL2+ y < de la mitad de los FS), mientras que en los casos de graduación 3B (>10 FS BCL2+ y ≥ de la mitad de los FS) no hubo relación con LF(2).

En el estudio de Pillai se observó una proporción significativamente incrementada de folículos BCL2+ en los casos donde las células B BCL2+ si eran detectadas por CMF comparando con aquellos casos en que no se las detectó con dicha técnica (P≤ 0.01), pero esa relación no se encontró considerando el número absoluto de FS BCL2+ (13). Ninguno de esos parámetros analizados han contribuido en la determinación de que casos de NFIS tienen mayor riesgo de progreso a linfoma manifiesto (5).

En las tres series publicadas con un número significativo de casos de NFIS, en el 3% (2/62) de los casos sin LF previo o concurrente se diagnosticó LF a los 15 y 29 meses después de la detección de la lesión in situ (en descripciones de casos aislados se ha detectado LF hasta varios años después). El 50% (39/78 casos) de las NFIS sin evidencia de neoplasia linfoide previa o concurrente no desarrollaron linfomas en el tiempo de seguimiento. El 21% de los casos con NFIS presentaron LF previo o síncrono. Y la asociación previa, concurrente o subsecuente de la NFIS a otros procesos linfoproliferativos no LF con o sin LF, fue del 28% (2, 13, 16). Ver Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Neoplasia folicular in situ (NFIS):
serie de casos previamente publicados

	Histopathology 2010 (16)	Blood 2011 (2)	Haematologica 2013 (13)	Total	%
Número de casos NFIS	13	34	31	78	
LF previo o síncrono	3/13 (23%)	6/34 (18%)	7/31 (23%)	16/78	21
LF subsecuente	1/10	1/28	0/24	2/62	3
Neopl. linfoide no LF: previa, concurrente o subsecuente	5 (38%)	5/34 (15%)	12/31 (39%)	22	28
Sin evidencia de neopl. linfoide previa, concurrente o subsecuente	5/13 (38%)	20/34 (59%)	14/31 (45%)	39/78	50

Neopl, neoplasia. La casilla linfoma folicular (LF) subsecuente, son aquellos pacientes que no tuvieron LF previo o síncrono al hallazgo de NFIS y desarrollaron LF durante el periodo de seguimiento.

Entre los procesos linfoproliferativos descritos al momento en la literatura asociados a NFIS se encuentran:

- LF (2, 13, 52- 59).
- LBDCG (2, 10, 16, 54, 58, 60, 61).
- linfoma de Hodgkin (LH) (2, 13, 16, 62).

- mieloma múltiple(MM) (16).
- linfoma de la zona marginal esplénico (LZME) (16).
- linfoma de la zona marginal ganglionar(LZMG) (2).
- leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico de células pequeñas (LLC/LLCP) (2, 13).
- linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas (“MALT”) (13).
- LCM (56).
- NCMIS (13, 53, 56).
- Micosis fungoide (MF) (13).
- linfoma de células T periférico (LCTP) (13, 55).
- linfoma linfoplasmocítico (LLP) (2).

La NFIS puede estar asociada con LF u otros linfomas de modo sincrónico, previo o posterior. Y dada la alta proporción de casos de NFIS asociados con otros linfomas B distintos de LF, hay investigadores que han propuesto que la NFIS quizás represente un fenómeno relacionado al inicio folicular de ciertos linfomas, antes que ser un precursor preneoplásico sólo del LF (63). A lo cual ha contribuido la observación de clonalidad de inmunoglobulinas (Ig) entre la NFIS y el linfoma asociado, mediante “PCR”.

“PCR” (“polymerase chain reaction”) es una técnica de biología molecular que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN de interés, partiendo de una mínima cantidad (64).

Las Ig son moléculas a través de las cuales realizan el reconocimiento antigénico los linfocitos B. Se las denomina Ig de cadena pesada (IgH) y de cadena ligera. Como las neoplasias linfoides son monoclonales y en la gran mayoría ocurre previamente el reordenamiento de los genes de las Ig todas las células tumorales hijas expresarán iguales reordenamientos en esos genes. Estudiar esos genes reordenados mediante

“PCR” Ig permite discriminar si en una muestra de tejido se está ante poblaciones de células linfoides B monoclonales o ante una proliferación B policlonal reactiva (análisis genotípico) (65- 67).

En el LF las cadenas pesadas y ligeras de las Ig muestran reordenamientos que pueden ser detectados hasta en un 90% en IgH (V-D-J) con la estrategia de “PCR” adecuada y en un 100% cuando a los primers dirigidos a IgH(V-D-J) se añaden primers para las cadenas ligeras (68)

Se han publicado casos que estudiando la secuencia génica de los productos de “PCR” de la NFIS y del LF los han relacionado clonalmente aunque con anormalidades genéticas secundarias, determinando que el LF procede de la misma clona (13,40,69). En la serie de Schmidt *et al* (69) en todos los casos, en los que se dio la coincidencia de NFIS y LF establecido se demostró la identidad clonal de ambas lesiones.

También se ha descrito relación clonal entre LF/LHC y LF/LCM diagnosticados en el mismo paciente (70-75) lo cual sustenta la posibilidad de la NFIS como lesión precursora tisular en común de algunos de estos otros tipos de linfoma y no solo del LF (63).

Ha contribuido al estudio de relación clonal entre lesiones in situ y LF, LBDCG y otros procesos linfoproliferativos asociados la técnica de captura por microdissección con láser (40, 69, 76, 77) que utiliza un microdisector láser (microscopio óptico acoplado a fluorescencia, a láser de infrarrojo o de UV, a un sistema de captura de muestras microdisseccionadas y a una cámara conectada a un ordenador para visualizar los tejidos a diseccionar). Los láseres que se utilizan evitan dañar la muestra (78), separan el componente de NFIS y minimizan la contaminación por tejido circundante.

Entre los procesos neoplásicos no linfoproliferativos descritos actualmente como asociados a NFIS se encuentran: melanoma (79), “gastrointestinal stromal tumor” (“GIST”) (16), carcinoma de mama (16)

(80), carcinoma de glotis (16), carcinoma de colon (16, 53, 81, 82) paraganglioma de cuerpo carotídeo (83), tumor de células germinales (2), carcinoma prostático (83), cáncer pulmonar (14, 81, 84), neoplasia mucinosa papilar de páncreas (14), carcinoma de células escamosas (13), carcinoma de células pequeñas (13), adenocarcinoma endometrial, adenocarcinoma cervical (81) y carcinoma renal (56).

Tabla 1.3 Neoplasia folicular in situ:
Tipos de neoplasias concurrentes

Series de casos previamente publicados	Histopathology 2010 (16)	Blood 2011 (2)	Haematologica 2013 (13)	Total
Linfoma de Hodgkin	2	1	1	4
LBDCG	0	0	3	3
LLC/LLCP	0	2	1	3
LZM	2 (esplénico)	1(G)	0	3
LCTP	0	0	2	2
MF	0	0	1	1
“MALT”	0	0	1 (pulmonar)	1
LLP	0	1	0	1
NCMIS	0	0	1	1
Total	4	5	10	19
Procesos linfoproliferativos no LF previos o en el seguimiento				
LBDCG	1	1	1 (Gástrico)	3
Linfoma de Hodgkin	0	0	1	1
LLC/LLCP	0	0	2	2
Otras neoplasias no linfoides				
Tumor de células germinales	0	1	0	1
“GIST”	1	0	0	1
Carcinoma de mama	1	0	0	1
Carcinoma de glotis	1	0	0	1
Carcinoma de colon	1	0	0	1

LBDCG, linfoma B difuso de célula grande; LLC/LLCP, leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico de células pequeñas; LZM, linfoma de la zona marginal; (G)ganglionar; LCTP, linfoma de células T periférico; MF, Micosis fungoide; “MALT” Linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas, LLP, linfoma linfoplasmocítico; NCMIS, neoplasia de células de manto in situ; “GIST”, tumor del estroma gastrointestinal.

1.3.2. Neoplasia de células del manto in situ (NCMIS) y su asociación con linfomas

La NCMIS se ha detectado en pacientes con LCM y otros linfomas de forma previa, simultánea o subsecuente, así como también con neoplasias no linfoproliferativas y procesos inflamatorios.

Al igual que en el LF, también en el LCM los genes de las Ig están reordenados. El reordenamiento clonal de los genes de cadena pesada y ligera de la Ig puede ser detectado entre el 88% (85) a virtualmente todos los casos de LCM (86).

Mediante “PCR”, se puede demostrar la presencia de idéntica clonalidad entre NCMIS y LCM (19) u otras neoplasias linfoides, comparando el amplicón o la secuenciación del reordenamiento de las Ig analizadas, estableciendo que hay identidad clonal si las células neoplásicas expresan similitud en el reordenamiento de esos genes.

Entre 17 casos de NCMIS publicados por diferentes investigadores y actualizados por Carvajal como serie, el 10% (1/10) de NCMIS sin LCM u otros procesos linfoproliferativos previos o concurrentes desarrolló LCM (a los 4 años de seguimiento) (87). En un caso con LCM, tras estudio retrospectivo, se detectó NCMIS en un apéndice extraída 4 años antes (88).

El 12% (3/17) presentó LCM previo o subsecuente (15). El 29% de las NCMIS fueron hallazgos sincrónicos en pacientes con diagnóstico de otros procesos linfoproliferativos no LCM (15, 53, 89). El 65% de los casos con diagnóstico de NCMIS no presentó LCM previo, concurrente o subsecuente, ni otras neoplasias linfoides durante 6 meses a 19,5 años de seguimiento (15, 22, 90).

La NCMIS se han encontrado en pacientes con procesos linfoproliferativos tales como: LZMG (89); LF con NFIS (53); LLC/LLCP (15); “MALT” (15); GMSI (20). O simultáneamente en pacientes con neoplasias no linfoides como: carcinoma colorrectal (53), cáncer de mama

(15), de próstata (15), de tiroides (91) y carcinoma células escamosas (91).

1.4. Propuestas de génesis y evolución de la NFIS y NCMIS

Se considera que en la génesis y evolución desde un estado lesional precursor y su posterior progreso a linfoma interviene la acumulación de numerosas alteraciones genéticas, epigenómicas y del microambiente.

1.4.1. El evento más temprano de la tumorigénesis en las células B es la translocación

1.4.1.1. NFIS y translocación t(14:18)(q32;q21)

Uno de los eventos más tempranos de la tumorigénesis en las células B es la translocación t(14:18)(q32;q21). Hay descripciones de pacientes en los que la translocación detectada en el tumor estaba presente algunos años antes del diagnóstico de LF (92, 93).

La translocación sitúa la región de unión (J) de *IgH* (banda 2 de la región 3) ubicada en el cromosoma 14 (al locus situado en la banda 1 de la región 2) en el brazo largo del cromosoma 18 que corresponde al gen *BCL2*, produciendo la sobreexpresión constitutiva de su proteína BCL2 y que las células tumorales sean resistentes a la apoptosis (2).

La mayoría de veces el punto de ruptura de la secuencia del gen *BCL2* en el cromosoma 18q21 ocurre en la región no traducida 3 prima, el 60-75% en una secuencia de 150 pb del exón 3, denominada región principal de grupos de puntos de ruptura (“major breakpoint cluster region”, *mbr*) y el 20% en la región menor de grupos de puntos de ruptura (“minor breakpoint cluster region”, *mcr*) localizado a 30kb de *mbr*.

En los casos restantes, el punto de ruptura ocurre fuera de esas áreas, tanto en la región de grupos variables (“variable cluster region”, *vcr*) o en

la región de grupo intermedio (“intermediate cluster region”, *icr*) entre *mbr* y *mcr* y que cómo punto de ruptura resultó ser hasta más común que *mcr* (94- 98) o en el extremo 5 prima del gen *BCL2* (99).

La translocación t(14;18) en LF está mediada por las enzimas de genes de activación de recombinación *RAG1/2* (“Recombination activating gene” *I/2*) (100). La estructura de la proteína BCL2 es normal porque los puntos de rupturas de la translocación están fuera de la región codificante del gen *BCL2* (27).

Para la detección de la translocación t(14;18)(q32;q21) y t(11;14)(q13;q32) han sido usadas múltiples técnicas, incluyendo cariotipo, “Southern blot”, “PCR” y “FISH” (39, 101, 102).

La “PCR” y “FISH” son técnicas altamente efectivas para el análisis de traslocación t(14;18) cuando existe disponible tejido sin fijar, mediante el empleo de secuencias complementarias a las secuencias de *BCL2/IgH* (39). Aunque modalidades de “PCR” (“nested PCR”, “multiplex PCR”, “RT-PCR”) se usan no sólo para confirmar diagnóstico sino también por ejemplo para seguimiento tras tratamiento para detectar enfermedad residual mínima (ERM) en sangre periférica.

Las células B que transportan la translocación y expresan BCL2 son denominadas células B t(14;18)+ o células B tipo linfoma folicular del inglés “follicular lymphoma like cells” (“FLLC”) (103).

Mediante “PCR” de alta sensibilidad se pueden detectar células B t(14;18)+ en sangre periférica en la población sana y en GL reactivos en el 14% (104- 108). Son encontradas en un 55% de adultos sanos, 13 veces más en la sangre periférica de individuos de más de 61 años en relación con grupos etarios más jóvenes de 20 años o menos (109); del 66% hasta el 80% en individuos mayores de 10 años según otros autores (110-112). Frecuencia mucho mayor que la incidencia del LF en la población, lo cual indica que pocas células B t(14;18)+ evolucionan a linfoma.

Las células B t(14;18)+ son más frecuente en varones (113). La frecuencia de la translocación t(14;18) a más de la edad, aumenta con el hábito tabáquico (27, 114) y la exposición a los pesticidas (115). La estimulación crónica mediada por antígenos a baja dosis podrían sutilmente mantener y o expandir las células BCL2+ a lo largo del envejecimiento del organismo (115).

La translocación t(14;18) se encuentra en el 85 al 90% de los LF como ya se mencionó al inicio, pero también en el 20-30 % de los pacientes con LBDCG (39). Fue la sobreexpresión de la oncoproteína BCL2 resultante de la translocación, lo que permitió su detección en 1984 y en esos linfomas inicialmente (28, 116), incluyendo a la teoría de presencia de oncogenes como causa de proliferación tumoral la expresión de proteínas anti-apoptóticas (117).

Los estudios que se realizaron en cultivos celulares demostraron que la proliferación inducida por un oncogén (señal pro-proliferativa) era insuficiente para alcanzar un estado temprano de pre-malignidad, que se requieren mecanismos de evasión de la muerte celular (antiapoptosis) que logren superar el mecanismo opuesto (muerte celular o apoptosis) para que se genere un tumor y que la activación anormal del gen *BCL2* (antiapoptótico) por la translocación era un evento frecuente y precoz en esa tumorigénesis (118).

Se ha propuesto que la NFIS representa la contraparte tisular de las células B t(14;18)+ circulantes al colonizar nichos de CG, por el hallazgo de NFIS en GL con células consideradas clonalmente idénticas a las halladas en la sangre periférica en base a monoclonalidad de *IgH*, detección de la translocación mediante “FISH” y secuenciación de la fusión detectada (de la región *mbr* del gen *BCL2* al JH6 del gen *IgH*) (119). Sin embargo, en otros estudios de secuenciación del ADN se ha encontrado diferencias entre la secuencia genética de las células B BCL2+ en sangre periférica y de la NFIS, aunque ambas son expansiones de células B

memoria post CG expresando baja afinidad de IgM y que han acumulado alta hipermutación somática (103).

La translocación t(14:18)(q32;q21) en las células B se cree que ocurre durante su génesis en la médula ósea, por la alta cantidad de células pre-B BCL2+. De esto se deriva la propuesta que las recaídas del linfoma incluso después de quimioterapia sean por células B BCL2+ residentes en la médula ósea y relativamente quiescentes por lo cual no son afectadas por el tratamiento, en lugar de células de LF de novo (103). Figura 1.6.

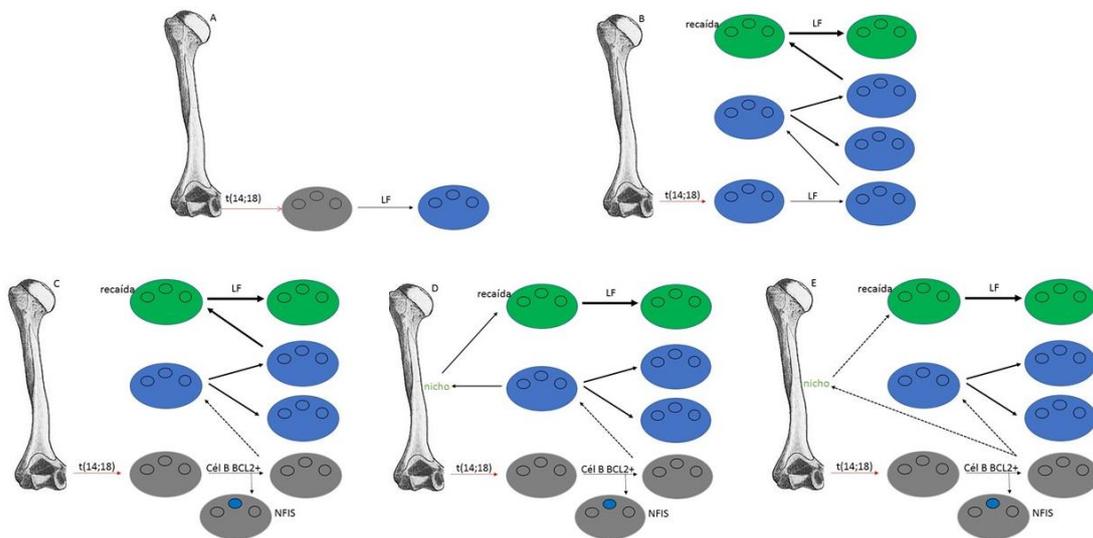


Figura 1.6 Modelos de génesis y evolución de las células B t(14:18)+. Basada en el diseño de Kluin (103). *Flecha roja punteada*: células circulantes B t(14:18)+ pre centro germinal (CG) sin acumulación de hipermutación somática (HMS). *Flecha negra punteada*: células B t(14:18)+ de memoria post CG. *Flecha negra continua*: células circulantes B t(14:18)+ de memoria post CG con acumulación de HMS que lo indica el grosor. *Ganglio linfático (GL) gris*: con células B sin t(14:18). *CG azul*: NFIS. *GL azul*: GL con LF. *GL verde*: GL con recaída de LF. **A.** La célula B t(14:18)+ surge como un error en la médula ósea (MO) que al expandirse en CG de GL/otros órganos linfoides y adquirir cambios oncogénicos adicionales origina LF. **B.** La heterogeneidad en la carga mutacional del LF se debe a una acumulación progresiva de mutaciones a lo largo del tiempo, dependiente de la frecuencia de re entrada en el CG y así a la exposición a la deaminasa de citosina inducida por activación (AID). **C.** Células B t(14:18)+ de memoria post CG circulantes en personas sanas pueden colonizar CG y dar lugar a NFIS. Pocas células B t(14:18)+ adquieren cambios oncogénicos adicionales tales como las mutaciones CREBBP que dan lugar al LF. **D.** Acorde a Wartenberg *et al*: pocas células LF pueden encontrar un nicho en la MO, estar relativamente quiescente, así escapar de la quimioterapia y repoblar el cuerpo después (células fundadoras), explicando porque no hay acumulación lineal de mutaciones somáticas en pacientes con LF (biopsias de recaídas con menos mutaciones que biopsias originales de diagnóstico). **E.** Similar que D, más la posibilidad que células B t(14:18)+ regresan a la MO dando posteriores recaídas.

En la Figura 1.6 se expone modelos de génesis y evolución de las células B $t(14;18)^+$ y que explicarían la variabilidad del patrón de hipermutación somática entre el LF inicial en relación a las recaídas que presenta menos mutaciones (Figura 1.6D, 1.5E). O la variabilidad entre LF y la NFIS concurrentes, donde la NFIS es $BCL2^+$ y el LF $BCL2^-$ (40). O los casos en que se ha evidenciado que dentro de cada linfoma no todas las células tumorales comparten la misma hipermutación somática, hay subclones, cada uno con su propia huella dactilar genética (Figura 1.6B).

Sin embargo, la translocación de *BCL2* y las demás alteraciones en el genoma no son suficiente para producir un tumor linfoide. Ha sido demostrado también que los linfomas derivados de células B del CG están caracterizados por frecuentes mutaciones en proteínas implicadas en regulación epigenética.

En el LF se han hallado mutaciones somáticas altamente recurrentes en genes de las enzimas modificadoras de histona: histona metiltransferasa *MLL2(KMT2D)* (89%) y *EZH2* (7,2%), la histona acetilasa, *CREBBP* (32,6%), *EP300* (8,7%) y *MEF2B* (15.3%) (120) (77). También frecuentes deleciones en miembros de la familia TNFR (*TNFRSF14*, *TNFRSF9*, *TNFRSF11A*) localizada en región 1p36, pérdidas evidenciadas también en el LFP y en el linfoma folicular duodenal (LFD) (77).

Además, se considera que el microambiente celular es importante para el desarrollo del linfoma, que células que interactúan de diferentes modos con las células B $BCL2^+$ terminan siendo sometidas como maquinaria para favorecer el crecimiento de estas últimas (120). Y se continúa estudiando los causales oncogénicos que contribuyen a la transformación de células B $BCL2^+$ a linfoma.

1.4.1.2. NCMIS y translocación $t(11;14)(q13;q32)$

Como con la $t(14;18)$ en el LF, la translocación $t(11;14)(q13;q32)$ es considerada como el evento primario en la patogénesis del LCM. La

yuxtaposición de la región de unión (banda 2 de la región 3) de la *IgH* en el cromosoma 14, al locus situado (en la banda 3 de la región 1) en el brazo largo del cromosoma 11 coloca al gen *CCND1/BCL1* bajo el control del potenciador de *IgH*, produciendo la sobreexpresión de ciclina D1, que es también regulador positivo del ciclo celular (121).

La detección de la translocación t(11;14) del LCM o NCMIS mediante “PCR” es menos exitosa porque los puntos de ruptura 11q13 están ampliamente distribuidos, aproximadamente el 30-50% están localizados en 1kb del segmento de ADN llamado grupo principal de translocación (“major translocation cluster”, “MTC”), pero el resto de traslocaciones involucra algunos sitios diferentes no fácilmente detectables mediante “PCR”. La detección de la translocación en la región “MTC” da positivo en el 30-50% de los casos (85, 102, 122).

Los test de “RT-PCR” cuantitativo en tejidos frescos o congelados detectan el incremento de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de ciclina D1 en un alto porcentaje de LCM (102, 123, 124) sin embargo su uso no está justificado cuando el “FISH” en relación a la t(11;14) detecta el 90% de los casos, aún en tejidos incluidos en parafina y es una técnica más rápida (125).

Además de la translocación t(11;14), se requieren otras aberraciones genómicas para completar la transformación maligna. Hay evidencia que los clones de *IgH/CCND1* existen circulando en la sangre periférica en personas sanas por años (más allá del tiempo medio de vida de los linfocitos B naive normales), que su frecuencia aumenta con el tiempo y que puede ser detectada simultáneamente con la translocación t(14;18) en un mismo sujeto (126).

De todos modos la translocación t(11;14) se detecta en un número mucho menor de personas sanas en relación a la t(14;18), del 1% (127) al 7% (126), probablemente por menor susceptibilidad de rotura del ADN en la secuencia del gen *CCND1* (121) y menor estado de maduración al

proceder de células B pre-CG, con limitada capacidad de expansión y/o con poca tendencia a recircular.

Y como ocurre entre las células B t(14;18) y el LF, la frecuencia de células B t(11;14) es mucho mayor que la incidencia del LCM en la población. Al ser menos frecuente la detección de células B t(11;14) y NCMIS hay menos estudios sobre los mismos en relación a diferencias genéticas con el LCM.

1.4.2. NFIS, LFP, LF un continuo

Ha sido propuesto un modelo donde la NFIS constituye el primer paso tisular con potencial y la infiltración parcial por linfoma folicular (LFP) un estado intermedio para el desarrollo de los subsiguientes que son el LF grado 1, 2 y el LF grado 3A (128). Un continuo donde la NFIS al parecer requiere eventos genéticos, epigenómicos y del microambiente celular para la expansión del clon como se mencionó anteriormente.

La NFIS histológicamente presenta arquitectura normal, con folículos de tamaño normal, folículos afectados no agrupados, bordes netos del CG anormal que contiene mayoritariamente centrocitos en todos los casos (2, 21). Inmunohistoquímicamente la NFIS presenta expresión muy intensa de BCL2 y CD10, confinada al CG por definición (2, 21). Existe un único caso publicado de NFIS con predominio de centroblastos, morfología de LF grado 3 en su mayoría BCL2 negativo (129) y células atípicas confinadas al CG.

Genéticamente la NFIS carece de alteraciones genéticas secundarias que se dan en el LF establecido, en cuanto a mutaciones en el gen *EZH2 Tyr641*, metilación de genes como *GRB10, EYA4, TWIST1, DAPK1, ETV1, GAS7, TUSC3* (69) evidenciadas mediante técnica de HGC (69,77), la cual analiza cambios en el número de copias (ganancias/pérdidas) del ADN de estudio en relación con otro de referencia mediante la cuantificación de la

intensidad de fluorescencia relativa de cada uno de los fluoróforos hibridados que emplea (130, 131). Ver Figura 1.7.

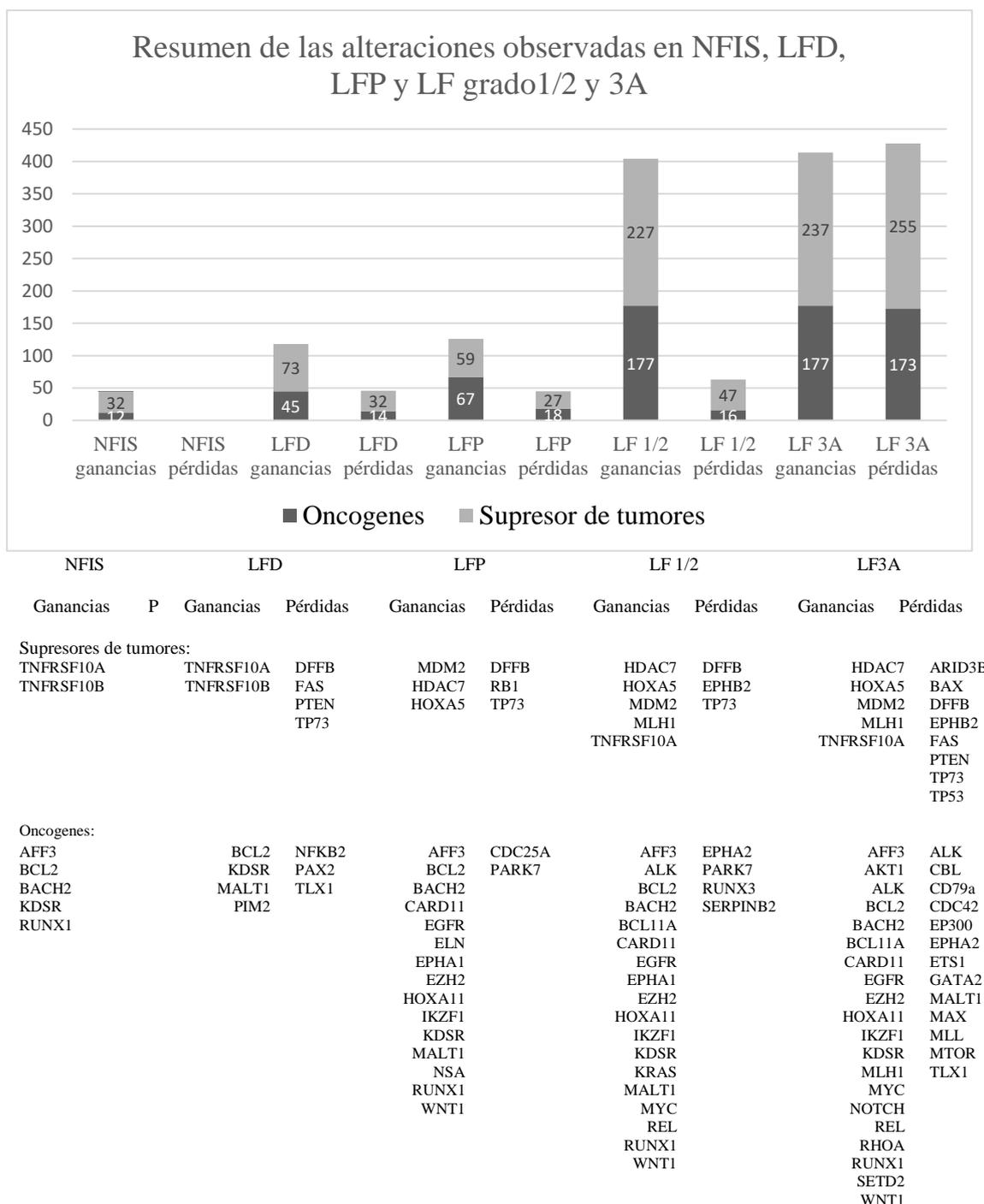


Figura 1.7 Modificado de Mamessier, *et al* (77). Resumen de las alteraciones observadas en neoplasia folicular in situ (NFIS), linfoma folicular duodenal (LFD), infiltración parcial por linfoma (LFP) y linfoma folicular (LF) grado 1-2 y 3A. (A) Oncogenes (negro) y genes supresores de tumores (gris) localizados en las ganancias o pérdidas presentadas por cada entidad. El número total de genes alterados en cada categoría está indicado en el centro de cada barra y algunos de los genes más relevantes están listados por debajo de las barras.

La infiltración parcial por linfoma folicular (LFP) se distingue de la NFIS, porque típicamente tiene alteración parcial de la arquitectura, con grupos de folículos anormales a menudo más grandes, con más centroblastos que en la NFIS, una demarcación menos clara entre el CG y zonas del manto (ZM). Con tinciones de IHQ se observa presencia extrafolicular de células neoplásicas CD10+ BCL2 + y al igual que en el LF tiene mayor variabilidad en la intensidad de BCL2 y CD10 (2).

El linfoma folicular duodenal (LFD) a pesar de compartir la t(14;18) es histológica y clínicamente una entidad diferente, se manifiesta en el duodeno como lesión aislada (132, 133) por lo cual no se lo incluye en el esquema de continuidad NFIS-LFP y LFm. El LFD quizás se inicie del mismo precursor t(14;18)+ saliente de la médula ósea o de uno que haya experimentado tránsito CG, lo cual quizás influya en el proceso (134) antes de establecerse en el duodeno sitio donde primero se expone al antígeno (132, 135).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Las traslocaciones $t(14;18)$ y $t(11;14)$ son eventos moleculares característicos del linfoma folicular (LF) y del linfoma de células del manto (LCM) respectivamente, que al momento se consideran como uno de los eventos más tempranos en su tumorigénesis, pero insuficientes para el desarrollo de un LF o LCM manifiesto.

Las lesiones definidas como neoplasia folicular in situ (NFIS) y neoplasia de células del manto in situ (NCMIS) se consideran la manifestación histopatológica de las células circulantes con $t(14:18)$ y $t(11:14)$ respectivamente y lesiones iniciales en el desarrollo de un linfoma, si bien su incidencia y riesgo de evolución a linfoma no están bien establecidos.

La hipótesis es que las lesiones de tipo NFIS y NCMIS encontradas de forma incidental y aislada presentan un bajo riesgo de transformación a linfoma.

2.2. Objetivos

a- Establecer la incidencia de NFIS y NCMIS “incidental” en un cribado sistemático y retrospectivo de piezas de linfadenectomía.

b- Establecer el riesgo de progresión a LF y LCM manifiesto en estas muestras, después de un seguimiento mínimo de 13 años.

c- Hacer una comparativa de la serie consecutiva de 3 años con una serie diferente de casos de NFIS o NCMIS procedentes de la consulta de Hematopatología.

3. DISEÑO DEL ESTUDIO, MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

El estudio descriptivo tiene dos partes. La primera es de tipo transversal, que nos permite cumplir el objetivo principal, de establecer la frecuencia de neoplasia folicular in situ (NFIS) y neoplasia de células de manto in situ (NCMIS) “incidental” en un cribado de 3 años consecutivos.

La segunda parte del estudio es de tipo longitudinal, diseñada para cumplir el segundo objetivo principal, el de establecer el riesgo de progresión a linfoma folicular (LF) y linfoma de células del manto (LCM) manifiesto con el seguimiento de la serie de casos obtenidos en la primera parte del trabajo.

Para lo cual, las muestras a seleccionar tenían que tener las siguientes características:

- que siendo estructuras anatómicas donde según la literatura se han detectado NFIS o NCMIS, también sean producto de eventos quirúrgicos muy frecuente en el hospital durante el año y por ende su recepción en el laboratorio de anatomía patológica y en lo posible unidades numerosas por cada evento quirúrgico. Si bien es cierto que ambas lesiones precursoras han sido detectadas en otros órganos linfoides o con tejido linfoide, más frecuentemente se ha detectado en ganglios linfáticos (GL).
- que procedan de pacientes de sexo masculino y femenino
- y sin diagnóstico de proceso linfoproliferativo (paciente “sano”).

Por lo cual se diseñó el estudio en muestras de linfadenectomías por estadiaje en pacientes con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma de colon y carcinoma de mama, que por la mediana de edad de presentación frecuente de estos carcinomas nos permitía también en el seguimiento por más de 10 años de los pacientes con NFIS o NCMIS estar dentro de la mediana de edad de presentación del LF y del LCM.

Para ello se realizó una búsqueda retrospectiva en la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla pacientes con tales diagnósticos desde el año 1998 hasta el 2000. De la base de datos se recogió:

Datos de filiación:

- Número de Historia clínica
- Edad
- Sexo

Datos anatomopatológicos:

- Número de biopsia
- Apartado de la muestra (bote)
- Descripción macroscópica, microscópica y diagnóstico anatomopatológico (incluye la descripción de GL).

Los datos clínicos, como patologías previas, estado al tiempo de seguimiento fueron obtenidos de las historias clínicas de los pacientes.

Para el procesamiento de la información, se creó una base de datos con la hoja de cálculo electrónica Excel.

Se recuperó del archivo de Anatomía Patológica los especímenes asociados a patología tumoral de mama y colon acorde a la base de datos elaborada.

Para lograr el tercer objetivo, de hacer una comparativa de la serie consecutiva de 3 años con una serie diferente de casos de NFIS o NCMIS,

se hizo una revisión y actualización de los datos clínicos y evolución de una serie de 17 casos con diagnóstico de NFIS o NCMIS recibidos en consulta de hematopatología desde enero del 2002 a enero del 2014. Información que fue solicitada y facilitada por los hospitales referentes.

Trece de los casos han sido ya publicados(16). Los GL de 5 de esos casos fueron tomados durante el procedimiento quirúrgico por sospecha o diagnóstico de procesos no linfoproliferativos por lo cual se los analiza en el apartado 4.1.2. Los casos en las cuales existía sospecha clínica y/o antecedente de proceso linfoproliferativo fueron analizadas en una sección aparte (4.2).

Entre ambas series, procedente de la cohorte retrospectiva y de la consulta de hematopatología, se compararían datos como la edad, sexo, proporción de afección de los GL por NFIS o NCMIS, la presencia o no de linfoma manifiesto en el seguimiento, tipo de linfoma y tiempo en presentarlo en relación a la fecha de detección de NFIS o NCMIS.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC Cantabria).

3.2. Muestra

Se revisaron las preparaciones, seleccionándose los cristales correspondientes a GL que a su vez fuesen representativos, es decir, con uno o más GL en cada cristal y que al menos un GL fuese igual o más grande que 0,5cm, con arquitectura preservada y al menos un centro germinal (CG) reactivo. Fueron seleccionados uno, máximo dos cortes de hematoxilina por paciente. Luego de verificar la disponibilidad de los correspondientes bloques de parafina, se obtuvo una muestra de 341 pacientes contabilizándose 946 ganglios, un promedio de 2,8 GL por paciente.

3.3. Técnicas de laboratorio

Los avances en las técnicas de laboratorio han permitido obtener mayor conocimiento sobre la patogénesis y evolución del LF, LCM y sus precursores in situ. En este apartado se tratará las técnicas de laboratorio utilizadas en el estudio retrospectivo.

3.3.1. Técnicas de tinción

La mayoría de las tinciones o colorantes utilizados para mejorar el contraste de los tejidos observados al microscopio, son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares.

3.3.1.1. Hematoxilina-eosina

Es una mezcla de colorantes frecuentemente utilizada en histología e histopatología, permite visualizar y diferenciar la estructura de los tejidos. La eosina produce el efecto de contracoloración de la hematoxilina. Al ser ácido tiñe elementos básicos como algunas proteínas, dando una coloración entre rosada a roja del citoplasma, membrana celular y ciertos elementos extracelulares. La hematoxilina es utilizada como un mordiente, al ser básica tiñe elementos ácidos de color azul violeta a negro como los núcleos celulares que tienen ADN y ácido ribonucleico (ARN) (136).

Con la hematoxilina-eosina los folículos primarios linfáticos se los visualiza como formaciones redondeadas de color azul violeta a diferencia de los folículos secundarios (FS) cuyo centro (CG) se observa más pálido que las células que lo rodea (zona del manto, ZM). Esta característica tintorial del CG se debe a la presencia de linfocitos con una cromatina nuclear menos condensada que la de linfocitos pequeños de folículos primarios y de la ZM en folículos secundarios (137).

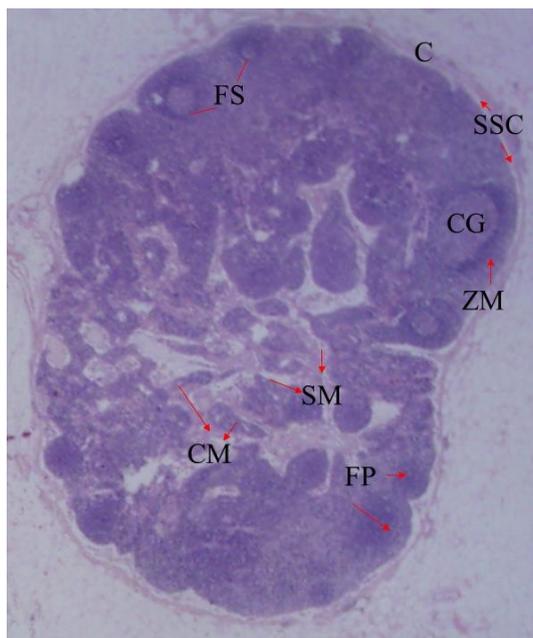


Figura 3.1 Ganglio linfático sin alteración en su arquitectura. Presenta varios folículos secundarios, FS o reactivos: centro germinal, CG (área pálida central) y zona del manto, ZM (zona más teñida). Se observa la cápsula, C; seno subcapsular, SSC; cordones medulares, CM; senos medulares, SM y folículos primarios, FP. Tinción hematoxilina-eosina.

3.3.1.2. Inmunohistoquímica (IHQ)

Como lo describe la definición la NFIS y la NCMIS son lesiones detectadas mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). La IHQ es una herramienta de tinción de elementos tisulares a través del uso de anticuerpos (Ac primario) que se unen específicamente al antígeno que se quiere detectar.

Estos anticuerpos (Ac) pueden estar ligados a una enzima o ésta unirse a otro Ac (Ac secundario) que reconoce y se une al Ac primario. Al añadir el sustrato de la enzima, se genera un producto visible donde se encuentra el elemento tisular buscado (más el Ac y la enzima) permitiendo a su vez identificar su localización dentro de la muestra tisular (64). Se han desarrollado diferentes técnicas de inmunodetección (Figura 3.2) y hay una variedad de antígenos reconocidos.

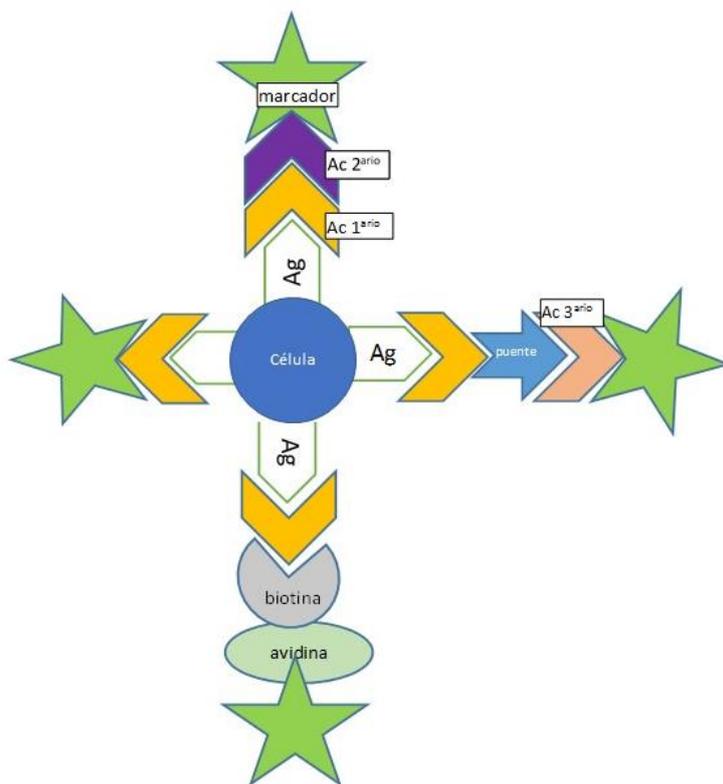


Figura 3.2 Esquema de la base molecular de variantes en técnicas de inmunohistoquímica.

Se realizó la inmunohistoquímica con anticuerpos para CD10, BCL2 (clones 124 y E17) y ciclina D1 a cada bloque de parafina correspondiente. Los detalles de los anticuerpos usados y los métodos de recuperación de antígeno, véase en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Detalles de los anticuerpos usados y los métodos de recuperación de antígeno

Anticuerpo	Clon	Fuente	Recuperación de antígeno	Dilución
BCL2	124	DAKO IR 614	20 min, EDTA pH9	RTU
BCL2(E17)	Clon E17	ABCAM 32124	20 min, Citrato pH6	1:200
CD10	56C6	DAKO ref IR648	20 min, EDTA pH9	RTU
Ciclina D1	EP12	DAKO ref IR083	20 min, EDTA pH9	RTU

Kit Envision Flex, Dako. Ref K802.
 “RTU”, listo para usar (“ready to use”).

En los casos con expresión IHQ de BCL2 o Ciclina D1 fueron analizados todos los demás GL disponibles (#139 GL) del mismo evento

quirúrgico, previos (#13GL, caso 17- NCMIS) o subsecuentes (# 9GL- caso 3- NFIS). Lo cual incrementó a 1107 el número total de GL analizados procedente de 343 linfadenectomías (341 pacientes).

De los 161 GL adicionales fueron analizados con CD10 y BCL2 los correspondientes a casos de NFIS y con BCL2, ciclinaD1 y CD10 los casos de NCMIS.

Los siguientes parámetros se registraron:

- número total de CG presentes.
- número de CG intensamente positivos para BCL2 y CD10.
- número de folículos con células de la ZM ciclina D1+.

Se consideró como *caso* de NFIS al que tuviese al menos un GL con presencia de células B con expresión intensa de BCL2 y CD10, limitada al centro germinal (CG) (21).

Se consideró como *caso* de NCMIS al que tuviese al menos un ganglio con presencia de células B ciclina D1 positivas en una localización limitada a la zona interna del manto de un GL reactivo (22, 23).

1) BCL2

Se usó el anticuerpo (Ac) BCL2 clon 124 de DAKO. Este Ac monoclonal de ratón marca las células que expresan la oncoproteína BCL2. Las células marcadas con el Ac muestran tinción citoplasmática (138) (Figura 1.3).

La infiltración de FS por células positivas para BCL2 fue graduada de acuerdo a Cong *et al* (21) considerando:

- el número de FS afectados:

1: <5

2: 6-10

3: >10

- y la proporción de FS afectos:

A: menos de la mitad de todos los folículos y

B: si la mitad o más de la mitad de los folículos del GL está afecta.

2) BCL2 E17

Se seleccionó el Ac monoclonal de conejo BCL2 clon E17 para detectar aquellos casos de NFIS que son BCL2 standard negativo por alteración del epítipo que reconoce el anticuerpo convencional. Las células marcadas con el Ac muestran tinción citoplasmática y de membrana (139).

3) CD10

El Ac monoclonal de ratón CD10 en la NFIS tiñe intensamente las células B en los CG. Las células marcadas con el Ac muestran tinción citoplasmática y de membrana (138). Ver Figura 1.5.

4) BCL1 /CICLINA D1

El Ac monoclonal de conejo BCL1/ciclina D1 muestra tinción nuclear (138) en aquellas células que expresan la proteína ciclina D1. Es la técnica de elección para el diagnóstico del LCM. En la NCMIS la

inmunotinción se visualiza en la capa más interna del manto (15). Ver Figura 1.4.

3.3.2. Hibridación fluorescente in situ

Adicionalmente en los casos de NFIS y de NCMIS fue investigada la translocación de *BCL2* y *CCDN1* respectivamente por la técnica hibridación fluorescente in situ, “FISH” (“Fluorescence in-situ hybridization”).

“FISH” permite visualizar secuencias de los cromosomas haciéndolas hibridar (por complementariedad de bases del ADN) con sondas (secuencias cortas de nucleótidos en una sola hebra) que emiten fluorescencia, permitiendo la rápida determinación de aneuploidías [cómo el síndrome de Patau (13), síndrome de Edwards (18), síndrome de Down (21), síndrome de Turner (X), síndrome de Klinefelter (Y), etc.], microdeleciones, duplicaciones, inversiones y la elaboración de la cartografía genética (marcador genético de un cromosoma). “FISH” puede realizarse a los cromosomas en metafase o en interfase (64).

En este estudio en cortes completos de parafina se utilizó sondas comerciales de doble color de fluorescencia “break-apart”(“BA”). Ver Figura 3.3 y 3.4.

Para detectar el reordenamiento de *CCDN1* (o *BCL1*): IZASA LSI *BCL1* Dual Color “BA”.

Para detectar el reordenamiento de *BCL2*: IZASA LSI *BCL2/18q21* Dual Color “BA”, 05N51-020.

La hibridación in situ en tejido se realizó por métodos convencionales (140) tras desparafinar secciones de tejido de 3 micras de grosor. Se utilizó como guía fotos 10x de los ganglios con NFIS con indicación de los folículos *BCL2+* y de los ganglios con NCMIS con la

respectiva señalización para facilitar la interpretación de “FISH”. El punto de corte para la lectura cuando se emplea sonda “BA” es del 8-10% (131) en células en tejido, criterio que no se aplica en este estudio por la naturaleza misma de la lesión.

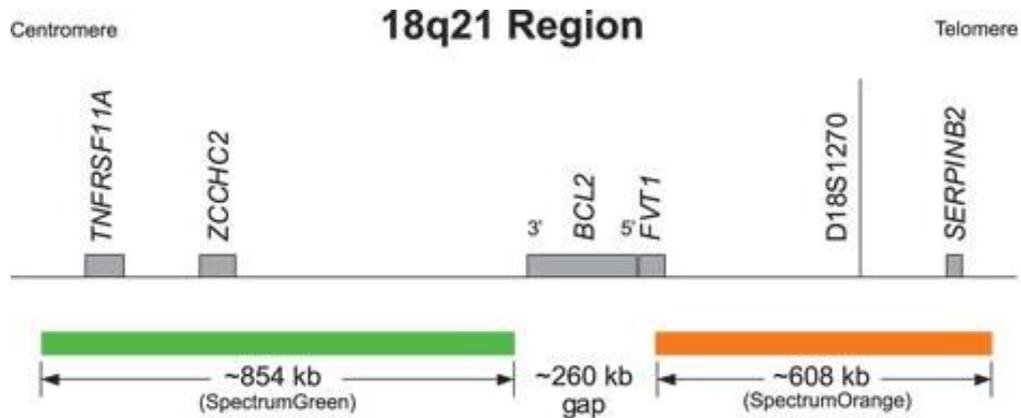


Figura 3.3 (Referencia (141)): Sonda “Break Apart” para el gen *BCL2*

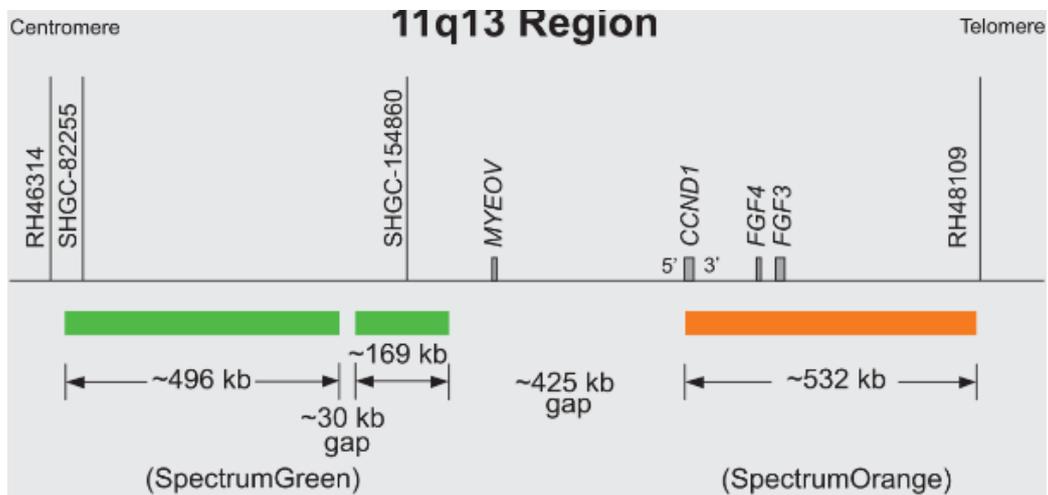


Figura 3.4 (Referencia (141)). Sonda “Break Apart” para el gen *BCL1* o *CCND1*.

La hibridación de una sonda tipo “BA” con un núcleo de células normales en interfase produce dos pares de señales naranja y verde superpuestas o casi superpuestas que se visualizan fusionadas de color amarillo (patrón 2f). El patrón de señal en células que tienen el punto de

ruptura cromosómico dentro del intervalo (gap) ubicado entre el blanco de dos sondas dirigidas a secuencias de un mismo cromosoma (por ejemplo, del cromosoma 18) es: 1 naranja, 1 verde y 1 amarillo de fusión (1n1v1f). Ver Figura 3.5 (141).

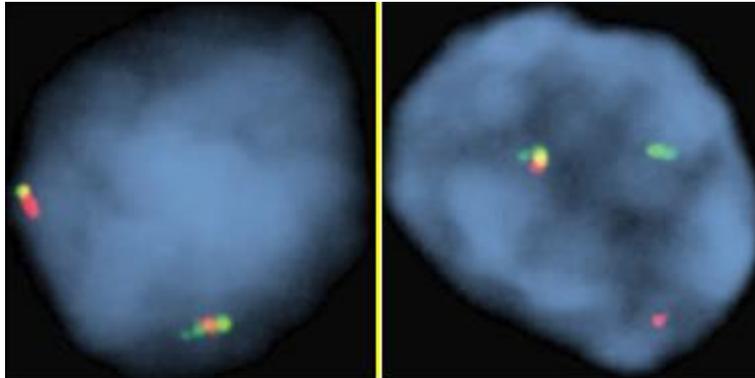


Figura 3.5 Izquierda: patrón de señal 2f. Derecha: patrón de señal 1n1v1f. Sonda de tipo “Break Apart” (referencia (141)).

3.4. Métodos estadísticos

Como método estadístico se emplearían las siguientes medidas de frecuencia (142):

3.4.1. Medida de la frecuencia de NFIS/NCMIS

La *prevalencia* (**P**) cuantifica la proporción de individuos de una población que presenta una enfermedad o evento en un momento o periodo de tiempo determinado.

En la prevalencia de la NFIS y de la NCMIS el denominador será el número de pacientes que constituyen la *Muestra* o cohorte (341 pacientes) y el numerador será el número de casos NFIS/o NCMIS detectados. Como cualquier proporción, será dada en términos de porcentaje y el periodo de observación para poder ser interpretada es de 3 años, entre 1998 a 2000. Su cálculo se estima mediante la expresión:

$P = \text{N}^\circ \text{ de casos con NFIS} / \text{Muestra de 341 pacientes (durante el periodo 1998-2000)}$ expresado en %

$P = \text{N}^\circ \text{ de casos con NCMIS} / \text{Muestra de 341 pacientes (durante el periodo 1998-2000)}$ expresado en %

Como *incidencia anual* se expresará la frecuencia del evento expresada por 100 habitantes y por año.

3.4.2. Otras medidas de frecuencia utilizadas

Para el análisis de otros datos se han utilizado:

3.4.2.1. Medidas de localización o tendencia central

1) Media aritmética

Es una medida de centralización y se calcula sumando los valores numéricos de todas las observaciones y dividiendo el total por el número de observaciones, ejemplo la media de GL por paciente.

3.4.2.2. Medidas de dispersión o variabilidad

1) Rango o Recorrido

Diferencia entre el valor máximo y el mínimo observado en una serie, ejemplo rango de edad.

2) Razón

Cociente en el que el numerador no está incluido en el denominador, es decir, cociente entre dos entidades que poseen caracteres distintos,

ejemplo relación de hombres/mujeres; pacientes con carcinoma de colon/pacientes con carcinoma de mama.

3) Mediana

Es el valor que ocupa el lugar central de todos los datos cuando éstos están ordenados de menor a mayor, si son número impar la mediana es la puntuación central de la misma y si es número par la mediana es la media entre las dos puntuaciones centrales. La mediana es independiente de las amplitudes de los intervalos. Ejemplo la mediana del tiempo de seguimiento, la mediana de edad.

4) Proporción

Cociente en que el numerador está incluido en el denominador. Se utiliza como la estimación de la probabilidad de un evento. Sus valores oscilan de 0 a 1 o de 0% a 100%. Es adimensional. Ejemplo proporción $GL\ BCL2+/N^{\circ}\ GL$ y proporción de $FS\ BCL2+/N^{\circ}\ FS$ (o carga folicular).

4. RESULTADOS

Para exponer los resultados han sido agrupados en: (4.1) casos con neoplasia folicular in situ (NFIS) o neoplasia de células del manto in situ (NCMIS) aislada e incidental y (4.2) casos con NFIS o NCMIS no aislada diagnosticada en el contexto de sospecha clínica de proceso linfoproliferativo.

4.1. Casos con NFIS y NCMIS aislada e incidental

En total se expone 18 casos de NFIS/NCMIS aislada e incidental. Fueron detectados en un total de 346 pacientes, ninguno con proceso linfoproliferativo previo o sincrónico. La edad en los 2 casos de NCMIS fue 46 y 68 años y la mediana de edad de 16 casos de NFIS incidental y aislada fue de 66 años. Después de una mediana de seguimiento de las NFIS y NCMIS de 54 meses (rango 7-192 meses) ninguna desarrolló linfoma manifiesto. Siete pacientes murieron por progresión de su carcinoma.

Los resultados lo expondremos como (4.1.1.) casos procedentes del cribado sistemático y retrospectivo de piezas de linfadenectomía y (4.1.2.) casos procedentes de la consulta. Ver Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Características clínicas de casos de neoplasia folicular in situ (NFIS) y de neoplasia de células del manto in situ (NCMIS)

Caso	Diagnóstico (dx)	Edad/sexo	Localización de NFIS/ NCMIS	Neoplasias asociadas y tiempo de dx (meses)	Localización de linfoma/s asociado/s	Seguimiento (meses)	Estadio	Estado en último seguimiento	[1]/ [2]
Casos con NFIS o NCMIS aislada e incidental									
1	NFIS	71/M	GL mesentérico	(0) Ac colorrectal (76) Ac Prostático		171		Vivo;NEL	[1]
2	NFIS	75/M	GL mesentérico	(0) Ac colorrectal (35) Ac Rectal		44		Exitus*	[1]
3	NFIS	63/F	GL mesentérico	(0) Ac colorrectal		91		Exitus*	[1]
4	NFIS	74/M	GL mesentérico	(0) Ac colorrectal		18		Exitus*	[1]
5	NFIS	63/F	GL mesentérico	(0) Ac colorrectal		187		Vivo;NEL	[1]
6	NFIS	76/M	GL mesentérico	(0) Ac colorrectal (-43) Ca cél Basales previo (20) Ac Prostático		42		Exitus*	[1]
7	NFIS	58/F	GL axilar	(0) Ca Mama Iz		177		Vivo;NEL	[1]
8	NFIS	53/F	GL axilar	(0) Ca Mama D		182		Vivo;NEL	[1]
9	NFIS	59/F	GL axilar	(0) Ca Mama Iz (76) Metástasis Ca mama D (97) Metástasis a piel Ca mama		159		Vivo;NEL	[1]
10	NFIS	56/F	GL axilar	(0) Ca Mama (74) Ca cél Basales (124) Ac Endometriode		172		Vivo;NEL	[1]
11	NFIS	84/F	GL axilar	(0) Ca mama D (-47) Ac colon previo (3) Metástasis a piel Ca mama		7		Exitus*	[1]
12	NFIS	46/M	GL mesentérico	"GIST" gástrico		25			[2]@
13	NFIS	55/F	GL mesentérico	EII		12		Vivo,NEL	[2]@
14	NFIS	85/F	GL axilar D	Ca Mama		64		Vivo,NEL	[2]@
15	NFIS	68/M	GL axilar D	Ca glotis		9		Exitus*	[2]@
16	NFIS	78/M	GL inguinal	Ca Sigma		10		Vivo,NEL	[2]@
17	NCMIS	68/M	GL mesentérico	(0) Ac colorrectal (-22) Ac Rectal previo		16		Exitus*	[1]
18	NCMIS	46/F	GL axilar	(0) Ca mama Iz		192		Vivo;NEL	[1]
Casos con NFIS/NCMIS no aislada:									
NFIS/NCMIS diagnosticadas en el contexto de estudio por sospecha clínica de trastorno linfoproliferativo									
19	NCMIS	76/F	GL cervical D	(0) LF y NCMIS Ca cél escamoso previo	GL cervical D Mejilla D	9		Vivo,RC	[2]
20	NFIS	77/M	GL cervical Iz	(0) LH y NFIS (-24) LF previo (3) LF secundario (48) Mieloma Múltiple	GL Cervical Iz Partes blandas Mucosa nasofaríngea Médula ósea	47	IV	Vivo,EE	[2]
21	NFIS	54/F	GL axilar	(0) LF	GL inguinal Iz/RTP	8	IIIA	Vivo,EE	[2]@
22	NFIS	40/F	GL cervical	(0) LF	Masa Submaxilar	72	III	Vivo,RC	[2]@
23	NFIS	40/F	GL axilar	(2) LF y LH	GL retroperitoneal	120	IV	Vivo,RC	[2]@
24	NFIS	65/M	GL mesentérico	(15) LF	GL Axilar	32	IV	Vivo,RC	[2]@
25	NFIS	60/F	GL inguinal D	(3) LBDCG	GL abdominal	3		Vivo	[2]@
26	NFIS	51/F	GL inguinal	(0) LZMG	GL inguinal	18	IV	Vivo,RC	[2]
27	NFIS	73/F	GL axilar D	(0) LLC/LLCP y NFIS (-69) LLC previa	GL axilar D	2	IV	Exitus,NEL	[2]
28	NFIS	49/F	GL inguinal	(0) LH	GL inguinal	12	IIIB	Vivo,EE	[2]@
29	NFIS	42/M	Bazo	(0) LZME	Bazo (recaída 55m)	125	IV	Vivo,NEL	[2]@
30	NFIS	74/M	Bazo	(0) LZME	Bazo	9	IV	Vivo,RC	[2]@

M,masculino; F,femenino; GL,ganglio linfático; RTP,retroperitoneo; D,derecho; Iz,izquierdo; Ac,adenocarcinoma; Ca,carcinoma; LF,linfoma folicular; "GIST", tumor del estroma gastrointestinal; EII, enfermedad inflamatoria intestinal; LH, linfoma Hodgkin; LBDCG, linfoma B difuso de célula B grande; LZMG, linfoma de la zona marginal ganglionar; LLC, leucemia linfocítica crónica; LLCP, linfoma linfocítico de células pequeñas; LZME, linfoma de la zona marginal esplénica; NEL,no evidencia de linfoma;RC,respuesta completa; EE, enfermedad estable; *,Exitus no relacionado a linfoma; [1], cohorte de 341 pacientes; [2], consulta de hematopatología; @ previamente publicado.

4.1.1. Casos de NFIS y NCMIS aislada e incidental en el cribado sistemático y retrospectivo de piezas de linfadenectomía

4.1.1.1. Características de la muestra o cohorte

Se analizaron muestras de ganglios linfáticos (GL) de 341 pacientes, que tenían una mediana de 66 años de edad, rango 29-91 años, diagnosticados de adenocarcinoma colorrectal y de mama en un periodo de 3 años (1998-2000). Ninguno de los pacientes tenía diagnóstico previo o concurrente de proceso linfoproliferativo. Ver tabla 4.2.

Tabla 4.2. Cohorte retrospectiva: N° de pacientes, edad y

N° de ganglios linfáticos (GL) según procedencia y sexo

	N° pacientes	Rango de edad	N°GL (i)	N°GL PQ	N°GL T
Cohorte Ca colon					
a. Hombres	112	43-91	357	430	443
b. Mujeres	89	37-86	268	296	305
	201	\bar{X} 70	625	726	748
Valor de razón a/b	1,26		1,33		
Cohorte Ca mama					
Hombres	2	55-73	6	6	6
Mujeres	138	29-85	315	353	353
	140	\bar{X} 58,5	321	359	359
Cohorte Ca colon y mama					
c. Hombres	114	\bar{X} 70	363	436	449
d. Mujeres	227	\bar{X} 64	583	649	658
	341	\bar{X} 66	946	1085	1107
Valor de razón d/c	2		1,6		

(i) : número de GL iniciales; PQ: pieza quirúrgica; T: total; Ca: carcinoma; \bar{X} :mediana.

Entre 201 pacientes con adenocarcinoma colorrectal, 89 son mujeres y 112 hombres. Entre 140 pacientes con carcinoma de mama 138 son mujeres y 2 hombres. En total se analizó linfadenectomías de 227 mujeres (658 GL) y 114 hombres (449 GL). La relación de GL mesentéricos seleccionados inicialmente fue de 1,33 δ :1 en una relación de hombre/mujer 1,26 δ :1.

En esta cohorte retrospectiva se detectaron 13 casos de lesiones in situ (NFIS/NCMIS). Siete casos en pacientes con carcinoma de colon y 6 con carcinoma de mama; 8 en mujeres, 5 en hombres.

4.1.1.2. Características de los casos de neoplasia folicular in situ (NFIS) aislada e incidental

1) Variable de frecuencia

La NFIS fue detectado en el 3.23% (11/341 casos) de los pacientes. Dos casos entre 85 pacientes en el año 1998, 4 entre 137 pacientes en el año 1999, 5 entre 119 pacientes en el año 2000. Ver Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Frecuencia de NFIS y NCMIS según el sexo y por año en muestra retrospectiva de 341 pacientes

	Muestra		NFIS			NCMIS		
	M	H	M(%)	H(%)	(a)	M (%)	H (%)	(a)
1998	61	24	1 (1,6)	1 (4,2)	2/85 (2,4)	-	-	
1999	95	42	4 (4,2)	-	4/137 (2,9)	1 (1,05)	1 (2,38)	1,46
2000	71	48	2 (2,8)	3 (6,3)	5/119 (4,2)	-	-	
Prevalencia 1998-2000			3,23%			0,59%		

NFIS, neoplasia folicular in situ; NCMIS, neoplasia de células del manto in situ; M, mujer; H, hombre; (a) anual.

2) Variable edad y sexo

Los casos de NFIS presentan una mediana de 63 años de edad (rango 53-84 años). Ver Tabla 4.4.

Tabla 4.4 Características de los casos en la cohorte de 341 pacientes (1998-2000): tipo de lesión precursora por sexo y procedencia; edad.

	NFIS		NCMIS	
	Mujeres	Varones	Mujeres	Varones
Casos (carcinoma colon)	2	4	0	1
Casos (carcinoma mama)	5	0	1	0
Total de casos	11		2	
Edad	\bar{X} 59	\bar{X} 74,5	46	68
Mediana de edad	63			

Mediana (\bar{X}) edad de mujeres: 58,5

Mediana edad de varones: 74

Mediana edad t. casos: 63

De los 11 casos de NFIS, 7 son detectados en mujeres y 4 en varones (1,75:1) siendo en la cohorte de 341 pacientes la razón mujer/hombre de 2:1 (Figura 4.1).

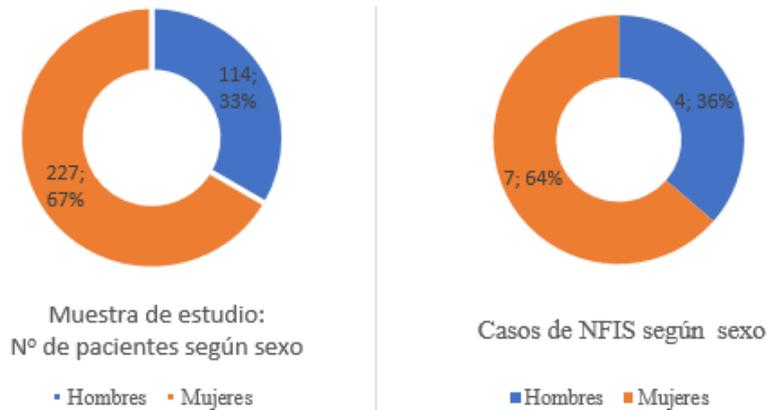


Figura 4.1 Correlación entre casos de NFIS según sexo y, el número de pacientes según sexo en la muestra de estudio.

Los GL en mujeres también fueron más numerosos en el cribado (razón de N° GL 1,61:1 mujer/hombre) y en ellas se detectó en números absolutos más GL BCL2+, siendo la relación observada de GL BCL2+ 1,43:1 mujer/hombre. Ver Tabla 4.5.

Tabla 4.5 Razón hombre/mujer: por N° de casos de NFIS, por N° de ganglios linfáticos BCL2+ y comparación con la Muestra.

	Total	Hombres	Mujeres	Razón
a. Cohorte de Ca de colon (N° pacientes)	201	112	89	1,26 ♂ :1
b. Casos de NFIS	6	4	2	2 ♂ :1
c. Cohorte de Ca mama (N° pacientes)	140	2	138	
d Casos de NFIS	5	0	5	
Cohorte de Ca colon y mama (N° pacientes)	341	114	227	2 ♀ :1
Casos de NFIS	11	4	7	1,75 ♀ :1
Porcentaje	3,23	3,51	3,08	
Razón	1,44:1 a/c		1,55:1 c/a	
Razón	1,2:1 b/d		2,5:1 d/b	
N° GL mesentéricos (i)	625	357	268	1,33 ♂ :1
N° GL(i) BCL2+	11	7	4	1,75 ♂ :1
N° GL(i) total	946	363	583	1,61 ♀ :1
N° GL(i) BCL2+	17	7	10	1,43 ♀ :1

NFIS, neoplasia folicular in situ; GL, ganglio linfático; (i), inicial.

3) Variable según procedencia de la linfadenectomía

Seis casos de NFIS se detectó entre los 201 pacientes diagnosticados con carcinoma de colon (razón número de pacientes 1,44:1 colon/mama). Mientras que 5 casos entre 140 pacientes con carcinoma de mama (razón número de casos 1,2:1 colon/mama), constituyendo el 45% de los casos, (Tabla 4.5).

Se detectó la NFIS en el 1,80% (17/946) de los GL revisados inicialmente, el 1,76% en GL de colon y el 1,87% en GL de mama. Ver Figura 4.2 y Tabla 4.6.

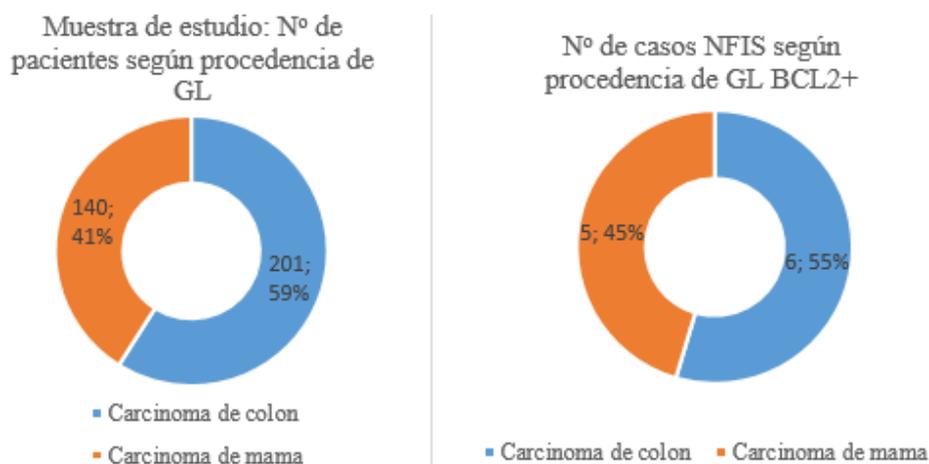


Figura 4.2 Correlación entre casos de NFIS según procedencia de GL BCL2+ y el número de pacientes según procedencia de GL en la muestra de estudio.

Tabla 4.6 Ganglios linfáticos BCL2+ en linfadenectomías por carcinoma de colon y mama: porcentaje y razón

Procedencia de los GL	N° GL	N° GL BCL2+	Porcentaje
N° GL iniciales	946(i)	17	1,80
a.Ca colon	625(i)	11	1,76
b.Ca mama	321(i)	6	1,87
Razón GL a/b	1.95	1,83	
N° GL PQ	1085(a)	27	2,49
c.Ca colon	726(a)	15	2,07
d.Ca mama	359(a)	12	3,34
Razón GL c/d	2.02	1.25	

GL, ganglio linfático; Ca, carcinoma; (i), inicial; (a), ampliación.

4) Características histológicas e inmunohistoquímicas de los casos de NFIS

En seis casos la NFIS fue encontrado en un sólo GL (6/78) y en 5 casos estuvo presente en un rango de 2-7 GL por linfadenectomía. La proporción de GL BCL2+ por linfadenectomía fluctuó entre 3,33 al 100%. Ninguno de los 9 GL adicionales del caso 3 procedente de una linfadenectomía posterior (8 años después) fue BCL2+. El tamaño más

frecuente de GL BCL2+ fue el de 0,6 cm, rango entre 0,3 a 1,4 cm. Ver tabla 4.7.

Tabla 4.7. Tamaño de ganglios linfáticos. Número de FS BCL2+/ Ciclina D1+ por GL y caso. No cristales con GL BCL2+/ Ciclina D1+ en muestreo inicial

Caso	Tamaño c/GL por caso (cm)	FS BCL2+/ FS ciclina D1+ por GL y caso	FS BCL2+/ FS ciclina D1+ total por caso	No cristales iniciales con GL tinción+
1	0.6	2	2	1 de 2
2	0.6	4	4	1
3	0.4	2	2	1 de 2
4	0.5/ 0.7/ 0.8/ 1	1,6,8,16	31	1 de 2
5	0.4/ 0.6/ 0.6/ 0.7/ 0.8	1,2,2,6,11	22	2 de 2
6	0.5/ 0.5/ 0.6	1,1,3	5	1
7	0.3/ 0.4/ 0.6/ 0.8/ 1/ 1/ 1.4	2,3,4,7,8,10,11	45	1
8	0.8	1	1	1
9	1	2	2	1
10	0.5/ 1.1	1,2	3	2 de 2
11	0.7	1	1	1
17 *	0.6/ 0.7/ 0.9	46,92,105	243	2 de 2
18 *	1.4	12	12	1

FS: folículo secundario; (*), casos de NCMIS (tinción ciclina D1).

La carga de folículos secundarios (FS) afectados (# de FS BCL2+/# de FS del GL) por linfadenectomía fluctuó entre el 9 al 100%. La mediana de FS BCL2+ por GL fue dos, en los casos donde se detectaron más de 3 GL BCL2+ hubo hasta más de 5 FS BCL2+ por GL (caso 4,5,7). Aunque se detectó el mayor número absoluto de FS BCL2+ en el conjunto de pacientes mujeres, la mediana de FS BCL2+ fue mayor en hombres. Todos los casos BCL2E17+ fueron BCL2+ también.

La distribución por casos de acuerdo a la graduación de infiltración propuesto por Cong *et al* (21) fue: 7 casos con 1A, 1 caso con 1B y 3 casos con 3B (caso 4,5,7), es decir en el 73% (8/11) de los casos la NFIS no afecta a más de 5 centros germinales (CG). Y excepto uno (caso 9), todos tenían teñido más del 50% de los linfocitos del CG. Ver Tabla 4.8.

Tabla 4.8 Cuantificación histológica e inmunohistoquímica de BCL2 y CCND1 y resultados de “FISH”

Caso	Diagnóstico	% GL (+)/ GL PQ	% FS (+)/ FS GL(+)	IHQ BCL2 ^(a)	“FISH” BCL2 “BA”/ CCND1 “BA” ^(b)
cohorta de 341 pacientes:					
1	NFIS	6%	22%	1A	NEG
2	NFIS	33%	36%	1A	POS
3	NFIS	3%	40%	1A	NEG
4	NFIS	7%	50%	3B	NEG
5	NFIS	38%	59%	3B	NEG
6	NFIS	30%	11%	1A	NEG
7	NFIS	100%	88%	3B	NEG
8	NFIS	8%	100%	1B	NEG
9	NFIS	8%	25%	1A	NEG
10	NFIS	11%	18%	1A	NEG
11	NFIS	33%	9%	1A	POS
17	NCMIS	100%	100%	---	NEG ^(b)
18	NCMIS	100%	100%	---	NEG ^(b)
consulta de hematopatología:					
19	NCMIS				-
12	NFIS		>50%	3B	POS
13	NFIS		<20%	2A	NEG
14	NFIS		<20%	1A	POS
15	NFIS		<20%	2A	POS
16	NFIS		20–50%	2	POS
20	NFIS	100%	55%	1B	POS
21	NFIS		20–50%	3	NEG
22	NFIS		<20%	2A	NEG
23	NFIS		<20%	3A	NEG
24	NFIS		>50%	3B	AMPLIF
25	NFIS		<20%	3A	POS
26	NFIS	100%	13%	3A	POS
27	NFIS	100%	59%	3B	POS
28	NFIS		>50%	3B	POS
29	NFIS		20–50%	3	POS
30	NFIS		>50%	3B	POS

“FISH”, “fluorescent in-situ hybridization”; GL, ganglio linfático; PQ, pieza quirúrgica; FS, folículo secundario; IHQ, inmunohistoquímica; “BA”, “break apart”; NFIS, neoplasia folicular in situ; NCMIS, neoplasia de células del manto in situ; NEG, negativo; POS, positivo; AMPLIF, amplificado sin translocación; (a), infiltración de FS acorde a propuesta de Cong *et al* (21); (b), sonda empleada para caso 17 y 18.

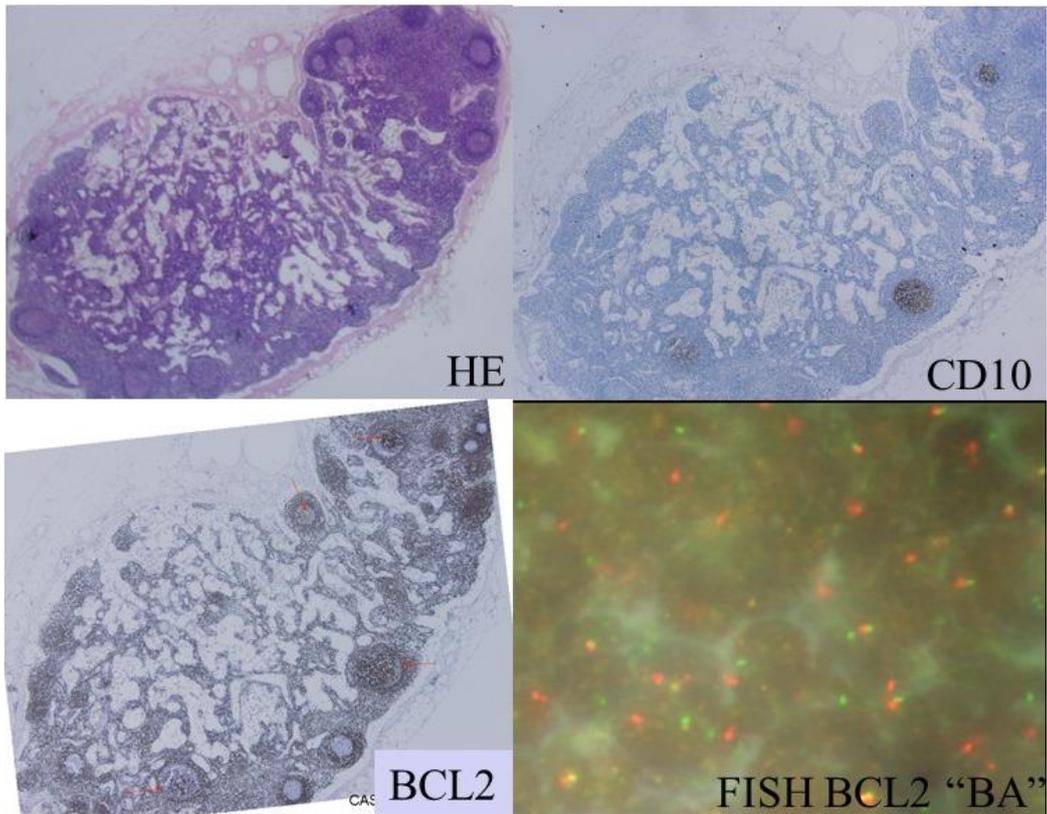


Figura 4.3 NFIS aislada e incidental (caso 2). En un ganglio linfático con una arquitectura preservada y centros germinales reactivos son observados folículos secundarios demostrando co-expresión de BCL2+ y CD10+ intenso. Se observa translocación BCL2 mediante "FISH", sonda "break apart" ("BA").

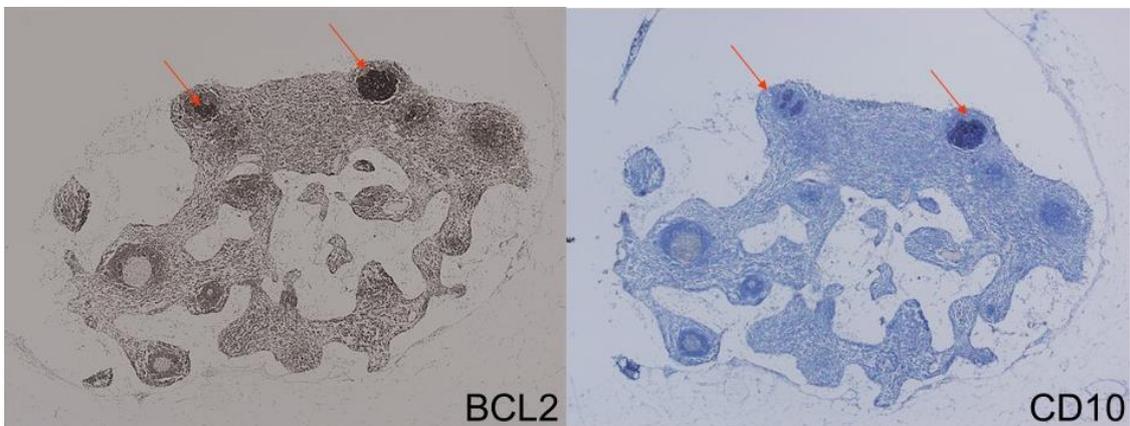


Figura 4.4 NFIS aislada e incidental (caso 3). En un ganglio linfático es observado co-expresión de BCL2+, CD10+ intenso en 2 centros germinales.

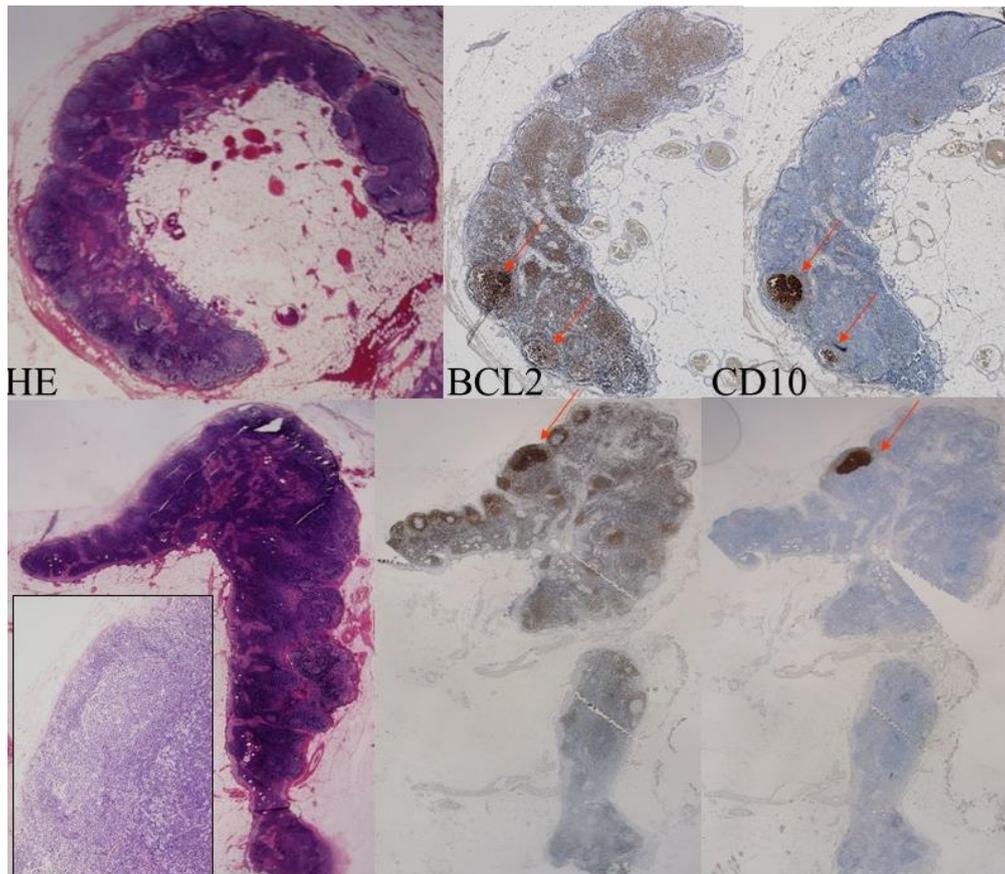


Figura 4.5 NFIS aislada e incidental (caso 10). En 2 ganglios linfáticos con centros germinales reactivos se observan tres folículos demostrando expresión de BCL2+ y CD10 intenso.

5) Seguimiento de los casos de NFIS:

Todos los pacientes fueron seguidos con protocolos convencionales acorde a la clínica, con bioquímica hematológica, TAC, TAC craneal, TAC de columna lumbo-sacra, ecografía abdominal, mamografía anual de cribado, radiografía de tórax, citología vaginal, marcadores tumorales como CEA, CA 15,30, PSA.

A ninguno se le diagnosticó linfoma folicular (LF) en una mediana de seguimiento de 159 meses (rango 7-187 meses).

4.1.1.3. Características de los casos de neoplasia de células del manto in situ (NCMIS) aislada e incidental

1) Variable de frecuencia

Dos casos (17 y 18) de NCMIS fueron identificados en la cohorte de 341 pacientes (0.59%). Los 2 en el año 1999 (2/137). Ver Tabla 4.3.

2) Variable edad y sexo

Un caso de NCMIS se detectó en un varón de 68 años de edad y el otro en una mujer de 46 años de edad.

3) Variable según procedencia de la linfadenectomía

Un caso fue diagnosticado en linfadenectomía de paciente con carcinoma de colon y el otro caso en una paciente con carcinoma de mama.

4) Características histológicas e inmunohistoquímico de los casos de NCMIS

Fue diagnosticada la NCMIS en el 0,42% (4/959) de los GL analizados, 946 GL iniciales más 13 de una linfadenectomía previa. La presencia de células CCDN1+ se observó en el área más interna de la zona del manto y en todos los GL analizados (Tabla 4.8). Interesantemente todos los FS identificados en cada GL presentaban la lesión, en contraste con los casos de NFIS. El tamaño de los GL CCDN1+ estuvo entre 0,6 y 1,4 cm.

Ninguno de los 13 GL adicionales del caso 17 procedente de una linfadenectomía previa (2 años antes) fue CCDN1+.

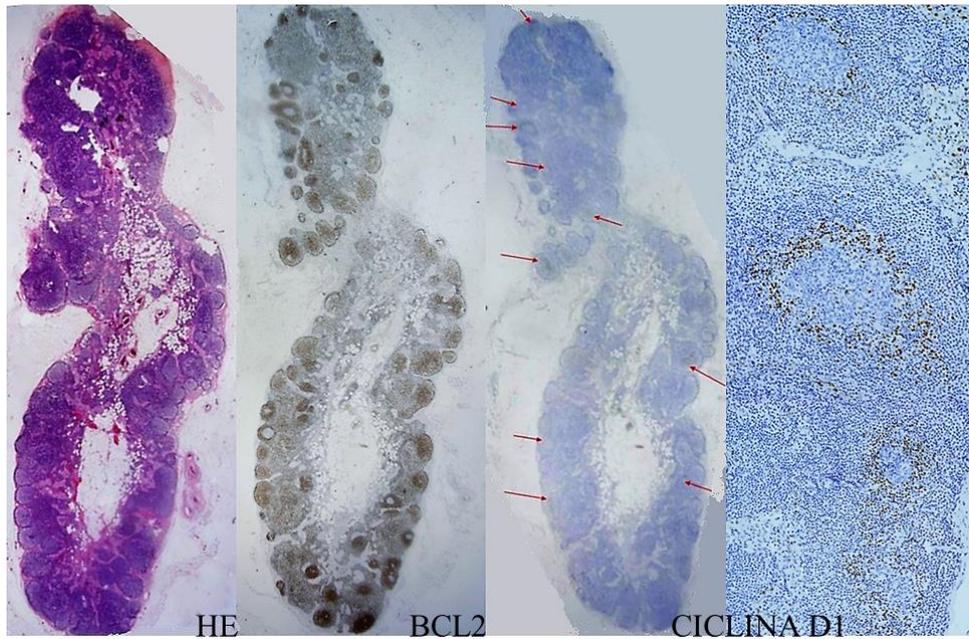


Figura 4.6 Neoplasia de células del manto in situ aislada e incidental (caso18). Las células ciclina D1 positivas se observan en una localización restringida a la capa más interna de la zona de manto de los folículos del ganglio linfático.

5) Seguimiento de los casos de NCMIS

Ninguno de los dos casos demostró linfoma de células del manto (LCM) en el tiempo de seguimiento (16 y 192 meses). Un paciente murió a consecuencia de su adenocarcinoma de recto estadio IV y la paciente con carcinoma de mama continuaba viva durante el tiempo de seguimiento.

Así, en esta serie las NCMIS incidentales son más infrecuente que las NFIS incidentales, pero los hallazgos tienen una significancia clínica similar, ninguno evolucionó a linfoma en pacientes sin sospecha clínica de proceso linfoproliferativo.

4.1.1.4. Neoplasias no linfoides previas o posteriores en los casos de NFIS y NCMIS aislada e incidental

Entre los 13 casos (NFIS y NCMIS), cinco pacientes no presentaron neoplasia no linfóide previa o posterior al diagnóstico de carcinoma del cual proceden los GL analizados en este estudio. Los restantes pacientes presentaron a posteriori: carcinoma de células basales y adenocarcinoma

endometrioides (caso 10), adenocarcinoma prostático (caso 1 y 6) y adenocarcinoma rectal (caso 2). Un paciente con adenocarcinoma de mama desarrolló metástasis en la mama contralateral a los 6 años y en piel a los 7 años (caso 9), una segunda paciente con carcinoma de mama desarrolló metástasis en la piel en menos de un año (caso 11). Y también hubo pacientes con diagnóstico previo de otras neoplasias: carcinoma de células basales (caso 6), adenocarcinoma de recto (caso 11).

En el caso 17 (NCMIS) el adenocarcinoma colorrectal es una recidiva del adenocarcinoma de recto diagnosticado 22 meses antes.

4.1.1.5. Resultados de “FISH”

En la cohorte de 341 pacientes procedente del cribaje retrospectivo el análisis “FISH” demostró positividad para la translocación BCL2 en dos de los 11 casos (caso 2,11). Ninguna de las dos muestras con NCMIS fue positiva para la translocación de CCDN1 (ver Tabla 4.8).

4.1.2. Casos de NFIS aislada e incidental procedentes de la consulta

A cinco casos adicionales de NFIS aislada se les realizó seguimiento, fueron publicados en el 2010 en conjunto a casos asociados con linfomas (16). Estas 5 NFIS fueron identificadas (casos 12-16) en pacientes estudiados por “GIST” gástrico, enfermedad gastrointestinal inflamatoria, carcinoma de mama, carcinoma glótico y carcinoma colorrectal, en 3 hombres y 2 mujeres con mediana de edad de 68 (promedio 66, rango entre 46-85 años). Un paciente falleció a los 9 meses de diagnóstico del carcinoma de glotis. Las características se observan en Tabla 4.1.

Tres casos fueron detectados en GL infradiafragmáticos y 2 casos en GL axilares. El 60% (3/5) de los casos son graduación 2 (6 -10 CG BCL2+) de Cong (21). Los exámenes de laboratorio e imagen fueron

revisados según disponibilidad, los casos 12,14,15,16 fueron “FISH” BCL2+ (Tabla 4.8).

4.2. Casos con NFIS/NCMIS en pacientes con sospecha clínica de proceso linfoproliferativo

En la serie de casos procedentes de la consulta de hematopatología se identificó 1 caso (19) de NCMIS y 11 casos de NFIS (casos 20-30) encontrados en GL o muestras de bazo procedentes de pacientes con sospecha clínica de proceso linfoproliferativo. La mediana del tiempo de seguimiento fue de 15 meses (rango 2–125 meses). Ver Tabla 4.1

Entre estos 12 casos de lesiones precursoras NFIS/ NCMIS, diez no tienen procesos linfoproliferativos previos y dentro de ese grupo el 58,3% (7/12) fue un hallazgo sincrónico al diagnóstico de un proceso linfoproliferativo manifiesto. El proceso linfoproliferativo más frecuente con el que se detectó la NFIS/o NCMIS, de modo previo, sincrónico o subsecuente fue el LF (6/12).

4.2.1. Casos con NFIS no aislada

Los 11 casos de NFIS se trata de 7 mujeres y 4 hombres con una mediana de edad de 54 años (rango 40-77 años). La mediana del tiempo de seguimiento fue de 18 meses (rango 2–125 meses). Ocho de estos casos han sido previamente publicados (16).

Tabla 4.9 Características de casos de NFIS/NCMIS no aislada en la consulta de hematopatología: por sexo y edad.

	NFIS		NCMIS	
	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
	4	1	1	0
	3	3	0	0
Total de casos		11		1
Edad	\bar{X} 51	\bar{X} 69,5	76	0
\bar{X} de edad		54		

Mediana (\bar{X}) de edad de mujeres: 52,5.

Mediana de edad total de casos: 57.

El 55% (6/11) de este grupo presentó LF (5 casos) o linfoma B difuso de célula grande (LBDCG, 1 caso). Sólo un paciente (caso 20) tenía un diagnóstico previo de LF (24 meses antes de la NFIS). Dos casos fueron asociados con LF concurrente (caso 21 y 22) en un GL diferente. En uno (caso 23) se diagnosticó LF a los dos meses después del diagnóstico de NFIS y en otro a los 15 meses (caso 24), ambos en localizaciones ganglionares diferentes. Un paciente desarrolló LBDCG 3 meses después del diagnóstico de NFIS (caso 25).

El 64% (7/11) demostró otros tipos diferentes de linfomas no LF no LBDCG, tipo linfoma Hodgkin (caso 28, y el 20 y 23 que presentaron LF también); linfoma de la zona marginal ganglionar (caso 26); linfoma linfocítico de células pequeñas ganglionar concurrente a la NFIS y con leucemia linfocítica crónica diagnosticada 69 meses antes (caso 27); mieloma múltiple (MM) y linfoma de la zona marginal esplénica (LZME). La asociación única con linfomas B de tipo LF/LBDCG fue en 4 casos (casos 21,22,24,25).

El MM (caso 20) fue diagnosticado en un paciente con LF previo, que a los 2 años presenta NFIS de modo sincrónico a LH clásico y después de 3 meses LF secundario, con el diagnóstico de desórdenes linfoproliferativos concurrentes múltiples (“multiple concurrent lymphoproliferative disorders, MCLD”) a los 48 meses.

De las NFIS asociadas a LZME (caso 29 y 30), ninguna presentó mutación del gen EZH2 y sólo una presentó alteraciones de pérdida en cromosoma 1,10 y 16 y ganancia en cromosoma 1 y 11 con análisis de HGC en un estudio conjunto realizado con Alemania (69).

El 55% (6/11) de las NFIS fue un hallazgo sincrónico (casos 21,22,26,28-30) al diagnóstico de un proceso linfoproliferativo manifiesto sin presentación previa de cualquier proceso linfoproliferativo.

En los 3 casos no publicados de NFIS (c: 20,26-27), la graduación acorde a Cong fue 1B, 3A y 3B con una carga folicular del 13 al 59%. En tal caso el 82% (9/11) de las NFIS asociadas con linfoma en esta serie son graduación 3 (>10 FS BCL2+) incluido el caso 24 que desarrolló LF (3B) (16). “FISH” fue positivo en los casos 20,26-27, así como en los casos 25,28-30 previamente publicados (16,69).

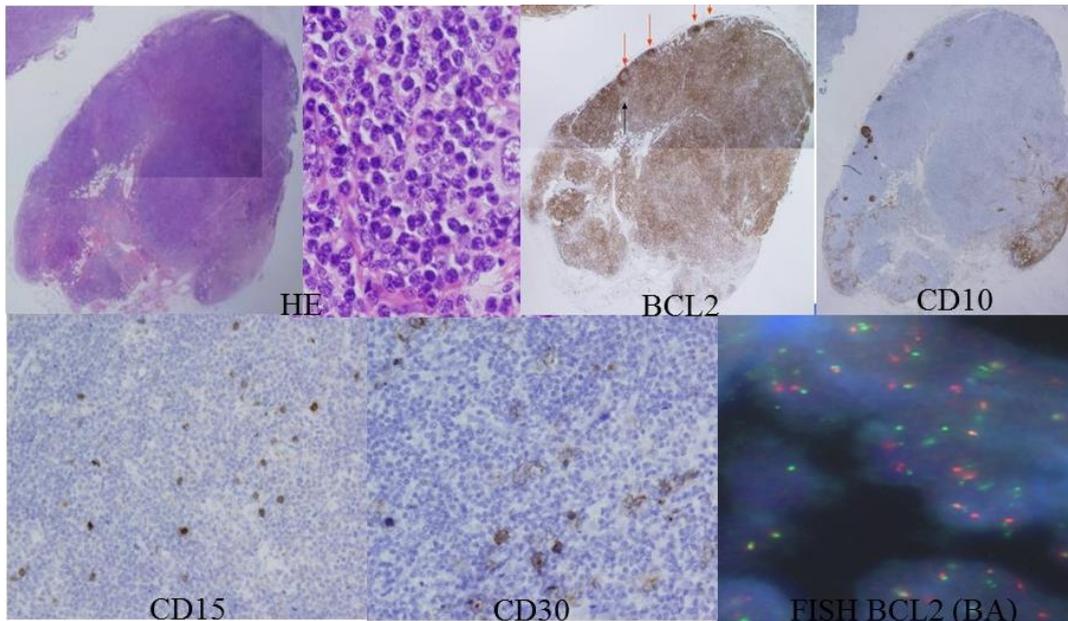


Figura 4.7 Neoplasia folicular in situ y linfoma de Hodgkin clásico concurrente (caso 20). BCL2 intenso en CG y células de Reed Sternberg CD15+ y CD30+.

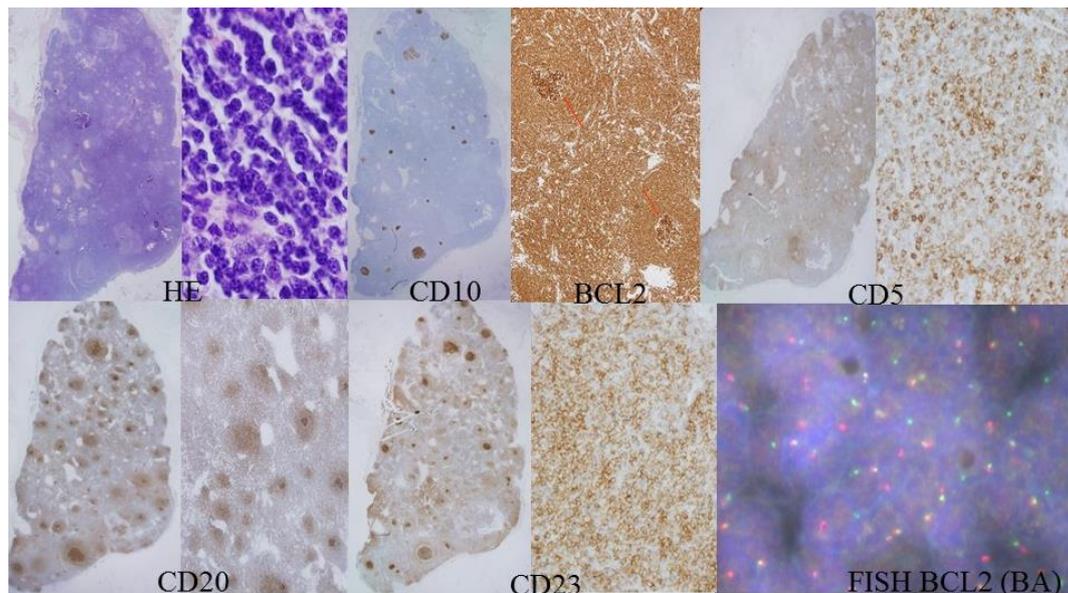


Figura 4.8 Neoplasia folicular in situ y leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico de células pequeñas ganglionar concurrente (caso 27). Se observa BCL2 intenso en centros germinales. Las células neoplásicas del linfoma expresan CD20, CD5 y CD23.

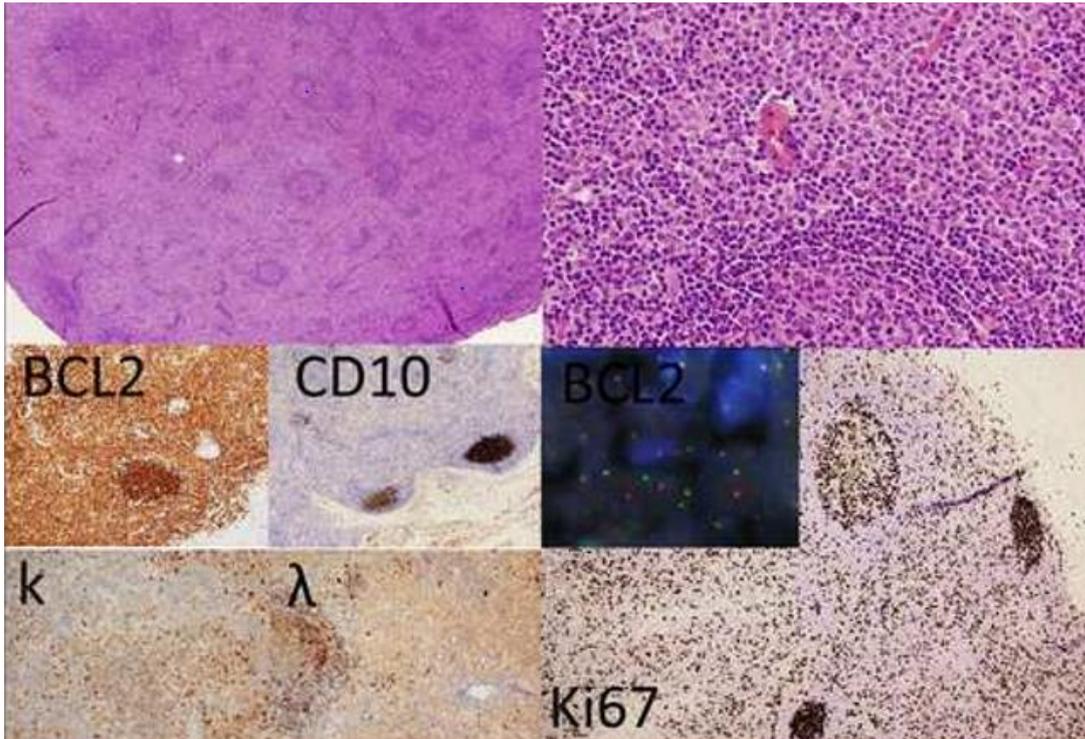


Figura 4.9 Neoplasia folicular in situ y linfoma de la zona marginal ganglionar concurrente (caso 26): BCL2+ y CD10 intenso en centro germinal del ganglio linfático con baja expresión de Ki67 y translocación BCL2 visible mediante “FISH”. La hematoxilina demuestra una población de células B monocitoides extrafoliculares y células B con restricción de cadena Kappa.

4.2.2. Casos con NCMIS no aislada

La NCMIS (caso 19) fue un hallazgo en un GL laterocervical, sincrónico al diagnóstico de LF en una mujer de 76 años de edad con carcinoma de células escamoso previo en la mejilla derecha. Todos los folículos fueron además positivos para ciclina D1. El paciente estuvo en remisión completa después de un seguimiento de 9 meses. Ver Figura 4.10.

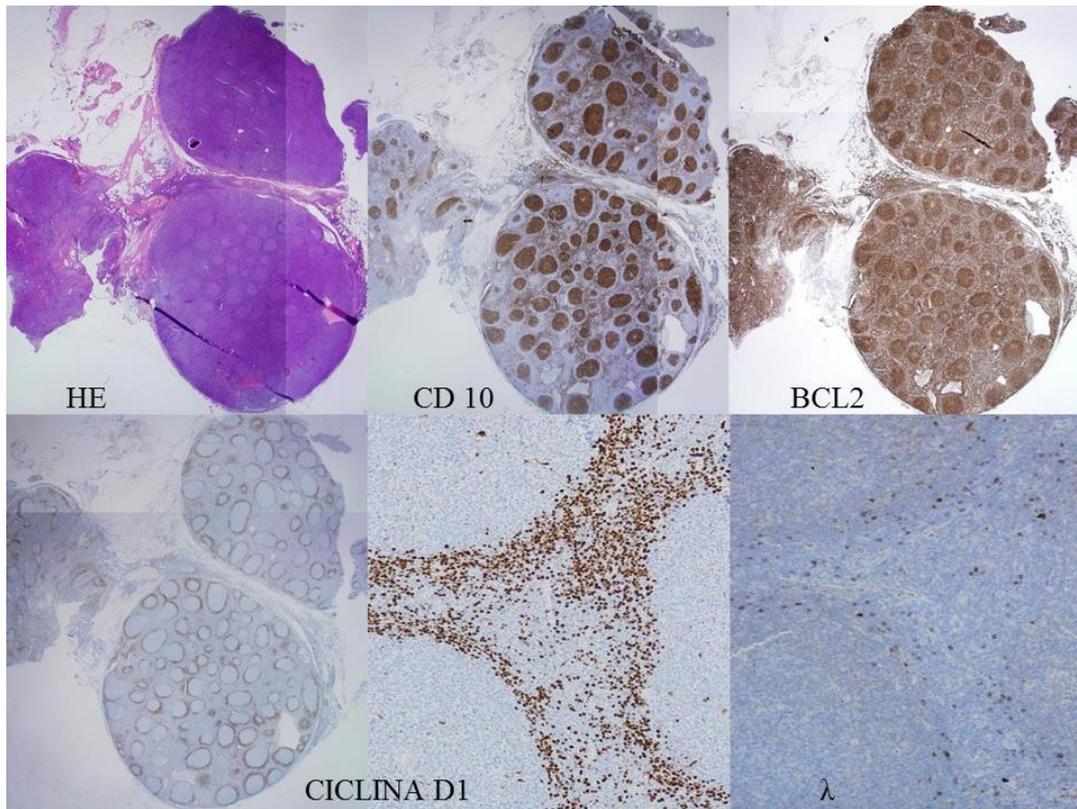


Figura 4.10 NCMIS y linfoma folicular concurrente (caso 19). Se observa sobreexpresión de CD10 y BCL2 en los centros germinales y compartimiento extrafolicular. Con células positivas para ciclina D1 y lambda, en una localización restringida a la zona interna del manto del folículo secundario.

5. DISCUSIÓN

5.1. Incidencia de NFIS y NCMIS “incidental” en un cribado sistemático y retrospectivo de piezas de linfadenectomía

Los casos de neoplasia folicular in situ (NFIS) y neoplasia de células del manto in situ (NCMIS) aislada, del cribado retrospectivo (1998-2000), tienen una mediana de edad similar que los pacientes de linfoma folicular (LF) y linfoma de células del manto (LCM) respectivamente.

Sin embargo y a pesar de la posible subestimación, la incidencia obtenida de la NFIS durante el periodo de estudio es mayor (aproximadamente 3 caso/100 personas/año) que la del LF manifiesto (2,6/100 mil personas/año) (2), el segundo más común (30%) entre los linfoma no Hodgkin (120, 143). Y la NFIS es menos frecuente en relación a la detección de células B BCL2+ en sangre periférica (66-80%) (110- 112) o en ganglios linfáticos (14%) mediante “RT-PCR” (108) en pacientes con enfermedades no malignas.

La NCMIS es tan poco frecuente que solo se detectó en el 0,59% de la muestra, en uno de los 3 años. La incidencia estimativa de < 0.2 casos /100 personas/año se correlaciona con el bajo porcentaje de células B t(11;14)+ circulantes en individuos sanos, descrito entre el 1% al 7% (126,127) y el menor número de casos de LCM, 3 al 10% aprox. entre los linfomas no-Hodgkin (1).

Es concebible que la NFIS quizás represente la manifestación tisular de las células B BCL2+ encontradas en la sangre periférica (119) por la observación de ambos componentes [cél. B t(14;18) circulante y NFIS en ganglios linfáticos] con células clonalmente idénticas (119) en un mismo paciente, mediante estudio de monoclonalidad de *IgH*, detección de la translocación por “FISH” y secuenciación de la fusión detectada.

Actualmente se está considerando que las células de la NFIS son células B memoria post centro germinal (CG) expresando baja afinidad de IgM y con acumulación de alta hipermutación somática (103) sin los suficientes eventos genéticos para desarrollar un linfoma (69, 77).

Se observa una frecuencia de forma piramidal, donde las células B t(14;18) circulante son la base y el LF manifiesto sería el vértice, la complejidad oncogénica aumenta hacia el vértice comprometiendo la evolución de células B t(14;18) a linfoma, pero la mayoría de las células B t(14;18) no adquieren tal complejidad. De ahí que la frecuencia del LF sea mucho menor que la frecuencia detectada de células B t(14;18) en personas sanas. Ver Figura 5.1.

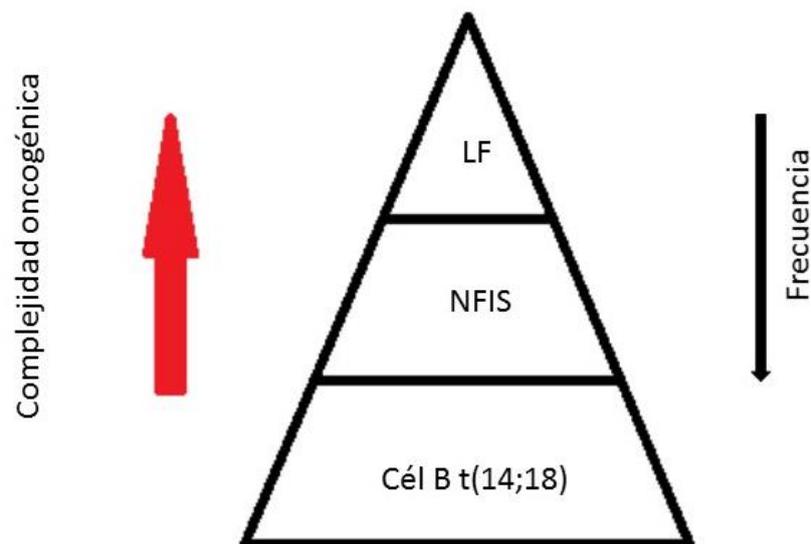


Figura 5.1 Incidencia de células B t(14;18), NFIS, LF versus complejidad oncogénica

Los resultados de frecuencia de la NFIS y de la NCMIS de este estudio no pueden ser extrapolados a la población en general. Aunque al seleccionar los pacientes el objetivo era representar una población “sana” (sin linfoma) la *muestra* tiene un rango de edad entre 29-91 años (mediana de 66 años) acorde con la edad de distribución del carcinoma de colon, carcinoma de mama, LF y LCM. Es posible que la frecuencia de NFIS o NCMIS sea aún menor en niños y adultos más jóvenes.

Las edades menores de presentación (53,56,58,59,63,63 años) de NFIS en la muestra de 341 pacientes, corresponden al género femenino (6 de 7) bien proceda la linfadenectomía de piezas quirúrgicas por cáncer de mama o de colon, mientras que las edades más tardías (71,74,75,76 años) en las que se detectó NFIS corresponden a los varones. En un estudio en linfadenectomías consecutivas de 3 meses, los 3 casos detectados de NFIS fueron hombres de 42, 69 y 71 años de edad siendo el rango de edad de esa cohorte de 18-91 años (14).

La edad de los casos procedentes del cribado retrospectivo (42 y 68 años en NCMIS, mediana de 63 años en NFIS,) y de los procedentes de la consulta de Hematopatología, sea NFIS en el contexto de sospecha o *no* de proceso linfoproliferativo (54 y 68 años respectivamente) o del único caso de NCMIS no aislada (76 años) está en concordancia con la mayor frecuencia de la t(14;18) (109) y t(11;14) (126) a esas edades.

En ninguno de esos grupos la edad de un paciente con NFIS o NCMIS fue menor a 40 años. En las diferentes descripciones de NFIS o NCMIS aislada o en serie son pocos los casos con menos de 40 años de edad (2, 13, 58). Pareciera que al igual que la detección de la t(14;18) y t(11;14) aumenta con la edad (109) también la posibilidad de hallazgo de NFIS o NCMIS.

A diferencia de dos estudios previos en 1292 ganglios linfáticos (GL) (19) y otro en 100 GL con hiperplasia folicular reactiva (15) donde ningún caso de NCMIS fue encontrado, en este estudio se ha identificado

dos casos en la muestra de 341 pacientes, ambos del año 1999. Según la literatura revisada, este sería el primer estudio que identifica casos de NCMIS en un cribado sistemático de linfadenectomías. En ambos casos todos los folículos tenían células CCND1+ en la zona del manto, aunque fueran escasas; en una serie de 17 casos (15) no todos los folículos contenían estas células.

De todos modos, el número de casos de NFIS incluso de NCMIS puede ser mayor al encontrado en la cohorte de 341 pacientes debido al muestreo limitado de la población general, porque las muestras procedían de un evento quirúrgico oncológico.

5.2. Riesgo de progresión a LF y LCM manifiesto en la Muestra retrospectiva

En la muestra retrospectiva ningún paciente de los 11 identificados con NFIS presentó linfoma en el tiempo de seguimiento, de 7 a 187 meses. Similar nulo riesgo de progresión en los dos pacientes con NCMIS en un tiempo de seguimiento de 16-192 meses.

Otros estudios han informado no obstante tasas variables de transformación de NFIS a linfoma folicular establecido entre el 4% (2) y el 6% (13). Estos datos sugieren que existe un riesgo muy bajo de progresión de la NFIS a linfoma B folicular. Sin embargo, debido a la demostración formal de que la NFIS precede al LF establecido (13, 81), su hallazgo requiere un examen clínico exhaustivo y un manejo clínico conservador con seguimiento a corto-medio plazo (15, 143, 144).

Tabla 5.1 Series de neoplasia folicular in situ (NFIS): casos aislados e incidentales y casos asociados a linfoma folicular y otros linfomas

	Blood 2011 (2)	Haematologica 2013 (13)	*American Journal 2015 (145)	Total	%
Número de casos NFIS	34	31	16	81	
LF previo o síncrono	6/34 (18%)	7/31 (23%)	4/16 (25%)	17/81	21
LF subsecuente	1/28	0/24	1/12	2/64	3
Neo linfoide no LF previa, concurrente o subsecuente	5/34 (15%)	12/31(39%)	8/16(50%)	25	31
Sin evidencia de neo linfoide previa, concurrente o subsecuente	20/34 63%	14/31(45%)	5/16(31%)	39/81	48

Para la casilla linfoma folicular subsecuente, se han considerado los pacientes que no tuvieron LF previo o síncrono al hallazgo de NFIS y desarrollaron LF durante el periodo de seguimiento. (*), actualización de la serie publicada por Montes-Moreno, *et al* (2010) (16).

En relación con el riesgo de transformación de la NCMIS, en la serie publicada por Carvajal (15) uno de los 10 casos con NCMIS aislada progresó a LCM, a los 4 años de seguimiento (87).

¿Qué condiciona que la NFIS tengo un bajo riesgo de progresión a linfoma?. La NFIS carece de alteraciones genéticas secundarias sí presentes en el LF manifiesto y que son esenciales para el progreso en la ruta oncogénica (69,77). En la serie de Schmidt *et al* (69) se evidenció que a pesar de presentar las NFIS (2/9 casos) mutación somática común al LF en el gen EZH2 Tyr641 (que bloquea la diferenciación de las células B, induce la hiperplasia del CG y acelera la linfomagénesis en cooperación con BCL2) y otras alteraciones oncogénicas: no son suficientes para la progresión.

Las lesiones de las NFIS tienen un ratio de alteraciones en el número de copias significativamente inferior que los casos de infiltración parcial por linfoma folicular (LFP) y los casos de LF establecido. La NFIS y el

LFP tienen bajo nivel de metilación de ADN de genes recurrentemente metilados de novo en los linfomas, como en el LF (69).

Hallazgos equivalentes se han publicado por Mamessier *et al* (77) donde, a pesar que la técnica de hibridación genómica comparada (HGC) también reveló una gran complejidad genética en la NFIS, unos pocos de esos genes alterados son actores principales para la evolución a linfoma y carece de los que enfilan a células B t(14;18) en la ruta de malignización (Figura 1.7).

En el LFP, a pesar que la distorsión arquitectural está presente y el diagnóstico de linfoma es más evidente histológicamente, los estudios de alteraciones en el número de copias evidencian que se trata de una lesión con complejidad genética intermedia entre la NFIS y el LF manifiesto (69, 77) .

Usualmente al diagnóstico de LFP los pacientes presentan estadio clínico limitado (146) con bajo grado de progresión a LF establecido y frecuentemente con intervalo libre de enfermedad muy prolongado con terapia limitada(2). Una pequeña serie de LFP (asintomáticos y con baja masa tumoral) tratados con rituximab o radioterapia, ninguno progresó a LFm después de 7 años de seguimiento (2).

Es decir que tanto por características genéticas y no solo funcionales que se han evidenciado, la NFIS es una entidad con bajo riesgo de progresión a LF incluso menor que el descrito en casos de LFP, del 5% y 53% respectivamente (2, 77), lo cual tiene importancia en la práctica clínica.

5.3. Asociación de NFIS y NCMIS con linfomas

5.3.1. NFIS y linfomas asociados

La asociación de NFIS con otros procesos linfoproliferativos distintos del LF, considerando las tres series con un número significativo de casos procedentes de consultas, supone en torno al 30% (2, 13, 145) (Tabla 5.1). Sin embargo, la experiencia cotidiana en el diagnóstico de linfomas, utilizando paneles de inmunohistoquímica que incluyan BCL2, sugiere que esta asociación tiene una prevalencia mucho menor en cohortes no seleccionadas de casos diagnosticados de proceso linfoproliferativo.

Después del LF, pareciera el linfoma B difuso de célula grande, LBDCG (6 casos) ser el linfoma más frecuente asociado a NFIS en las 3 series y considerando casos aislados, seguido del linfoma de Hodgkin (LH). Asociación que no va en relación a que la translocación t(14;18) fuese más frecuente en esos linfomas, más bien en el LBDCG se detecta en un 20 a 30 % (1, 39) y en el LH en un 15% (73). Ocasionalmente se ha demostrado la asociación de NFIS con linfomas de fenotipo T (13).

En la serie procedente de la consulta de hematopatología se observó la asociación de LF y LH en un mismo paciente de modo sincrónico o subsecuente, como ha sucedido en el caso 20, donde inicialmente se diagnosticó un LF y 24 meses después LH sincrónico con NFIS. En el caso 23, 2 meses después de la detección de la NFIS se diagnosticó LF de modo sincrónico con LH.

El principal tipo de linfoma no Hodgkin asociado o coexistente con el LH es el LF. La presencia de la translocación t(14;18) en los LH ha sido demostrada en casos con (71, 73) o sin historia previa de LF (71). En el caso 28, sin antecedentes previos ni concurrentes de LF, se diagnosticó LH de modo sincrónico con NFIS (Tabla 4.1).

Se ha publicado un estudio de secuenciación de genes en un caso de LF con LH subsecuente en un mismo paciente, donde se observó el mismo reordenamiento monoclonal del gen de la inmunoglobulina (*Ig*) en ambos linfomas (147).

Aunque la región variable de los genes de la *IgH* de las células de Reed-Sternberg y del LF fueron mutadas diferentemente, ambos compartían seis mutaciones somáticas (147). Análogas observaciones en otros estudios (148, 149), que permite considerar que las células neoplásicas del LF y del LH podrían derivar de un precursor común de células B, lo cual podría ser cierto también para los casos 20,23 y para otros similares. Así la relación clonal entre distintos linfomas asociados pareciera ser común antes que excepción (149).

En cuanto al linfoma de la zona marginal ganglionar, LZMG (caso 26) y la leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico de células pequeñas, LLC/LLCP (caso 27) también han sido publicados como linfomas asociados a NFIS por otros autores (2,13), no así el mieloma múltiple (MM) y el linfoma de la zona marginal esplénico (LZME) (16).

La serie de NFIS no aislada procedente de la consulta de hematopatología podrían también contribuir a la hipótesis de que algunos tipos de linfomas pueden tener un origen común en células B del CG (63). Pero que las lesiones moleculares secundarias que adquieran las llevará por diferentes rutas de evolución neoplásica con la consiguiente diferencia en su presentación fenotípica y clínica (71, 150), lo cual explica también la similitud de varias secuencias entre diferentes tipos de linfomas en un mismo paciente (71, 73, 74, 149) o en relación a la NFIS (55, 59).

En tal caso la secuenciación de los 11 casos de NFIS asociados a linfomas y su comparación entre linfomas de un mismo paciente y linfoma versus NFIS podría ser objeto de otro estudio.

Existe la propuesta que la NFIS esté presente o sea más frecuente

en pacientes que además de la translocación *BCL2/IgH* han tenido procesos que han requerido mayor tráfico de células linfocíticas a través del CG de los folículos.

Ese tráfico más frecuente, expone a mayor número de errores o mutaciones a las células linfoides, por el mecanismo de mutación somática mediado por AID (103). Adicionalmente, la estimulación crónica a través de bajas dosis de antígenos bien podría ser causante de un sutil mantenimiento y o expansión de las células BCL2+ a través del tiempo y a lo largo del envejecimiento del organismo (115).

La NFIS podría ser entonces en sus portadores un signo de una mayor exposición de los GL a factores desequilibrantes celulares (incluido los oncogénicos) que el resto de la población con células B BCL2+, sin que ser portador signifique tendencia incrementada a linfomas para lo cual se requeriría eventos oncogénicos mayores (en potencia/ y/o número), epigenómicos y del microambiente que logren inclinar la balanza hacia el lado tumoral (69, 120).

5.3.2. NCMIS y linfomas asociados

El único caso (19) de NCMIS en consulta de hematopatología fue en un GL laterocervical, como hallazgo sincrónico al diagnóstico de LF en un paciente con antecedente de carcinoma de células escamosas.

En los casos de NCMIS con seguimiento disponible la mayoría de los pacientes no fueron tratados por los procesos linfoides concurrentes y hasta 2 años después del diagnóstico continuaban vivos (151). Otros han muerto por causas no relacionadas a enfermedad linfoproliferativa (15, 53, 74). La paciente con NCMIS asociado a LF inició tratamiento con RCHOP, estaba viva y con respuesta completa al tratamiento hasta los 9 meses de seguimiento.

Hay estudios que por su naturaleza revelan posibles causas moleculares del hallazgo sincrónico o subsecuente de LF con NCMIS. Por ejemplo, Lecluse identificó en los mismos sujetos sanos las traslocaciones t(14;18) y la t(11;14) (126), lo cual explicaría el caso 19 y similares de otras publicaciones donde la NCMIS está asociado a LF con incluso el componente in situ del LF en la misma muestra (53); o NCMIS asociada a NFIS (13), o LF asociado a LCM (75, 151) y con el componente in situ de ambos (56) relacionados clonalmente (74). También se ha detectado pacientes con LCM y translocación t(14;18).

De todos modos, en caso de certeza de NFIS o NCMIS y no evidencia de linfoma manifiesto, aunque su riesgo de progresión a LF o LCM es muy bajo, tanto si es un solo foco como múltiples, recomiendan varios autores un manejo conservador con seguimiento rutinario por un periodo limitado de tiempo (15, 143, 144). La instauración de tratamiento se reserva para cuando hay linfoma sincrónico manifiesto.

6. CONCLUSIONES

El contexto clínico determina la relevancia del hallazgo de la neoplasia folicular in situ y de la neoplasia de células del manto in situ.

Se encontró que la neoplasia folicular in situ aislada e incidental representa ~3% en un muestreo de ganglios linfáticos en 341 pacientes durante un periodo de 3 años. La neoplasia de células de manto in situ (NCMIS) aislada e incidental es aún menos frecuente con una prevalencia de 0,59% durante el mismo periodo de tiempo. El diagnóstico de NFIS y NCMIS ha sido un hallazgo casual ya que los ganglios linfáticos han sido biopsiados por procesos reactivos o por otras patologías.

El riesgo de transformación de NFIS y NCMIS a linfoma folicular y linfoma de células del manto respectivamente fue nulo en la muestra retrospectiva de 341 pacientes, sin historial de linfoma previo o concurrente. Por lo cual no sería recomendable hacer una búsqueda intencionada mediante inmunohistoquímica de estas lesiones precursoras en piezas de linfadenectomía obtenidas en pacientes sin sospecha clínica de proceso linfoproliferativo.

Sin embargo, en los pacientes donde la neoplasia folicular in situ o neoplasia de células de manto in situ se diagnostican en el contexto de una sospecha clínica de proceso linfoproliferativo este hallazgo es más frecuente de lo esperado, sugiere un trastorno de base que facilita la emergencia de poblaciones clonales en células B y debe llevar a un estudio clínico riguroso.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Swerdlow S, Campo E, Harris N, et al. In WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
2. Jegalian A, Eberle F, Pack S, et al. Follicular lymphoma in situ: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma. *Blood*. 2011; 118:2976-2984.
3. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. 2011; 105:1684–1692.
4. Freedman A. “Follicular lymphoma: 2011 update on diagnosis and management”. *American Journal of Hematology*. 2011; 86(9):768–775.
5. Swerdlow S, Campo E, Pileri S, et al. The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390.
6. Morton L, Wang S, Devesa S, Hartge P, Weisenburger D, Linet M. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992–2001. *Blood*. 2006; 107:265–276.
7. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*. 2004;104(5):1258–1265.
8. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;111(2):558-65.
9. García-Noblejas A, Cannata Ortiz M, R AS. Actualización del tratamiento del linfoma de células del Manto. Cuadernos de Hematología II del Servicio de Hematología Hospital Universitario de la Princesa Madrid. 2012: 1-16.

10. Fend F, Cabecadas J, Gaulard P, et al. Early lesions in lymphoid neoplasia: Conclusions based on the Workshop of the XV. Meeting of the European Association of Hematopathology and the Society of Hematopathology, in Uppsala, Sweden. *J Hematop.* 2012;5:1-44.
11. Ganapathi K, Pittaluga S, Odejide O, Freedman A, Jaffe E. Early lymphoid lesions: conceptual, diagnostic and clinical challenges. *Haematologica.* 2014;99(9):1421–1432.
12. Campo E, Swerdlow S, Harris N, Pileri S, Stein H, Jaffe E. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 2011;117(19): 5019-5032.
13. Pillai R, Surti U, Swerdlow S. Follicular lymphoma-like B cells of uncertain significance (in situ follicular lymphoma) may infrequently progress, but precedes follicular lymphoma, is associated with other overt lymphomas and mimics follicular lymphoma in flow cytometric studies. *Haematologica.* 2013;98:1571-1580.
14. Henopp T, Quintanilla-Martínez L, Fend F, et al. Prevalence of follicular lymphoma in situ in consecutively analysed reactive lymph nodes. *Histopathology.* 2011; 59:139-142.
15. Carvajal-Cuenca A, Sua L, Silva N, et al. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica.* 2012; 97(2):270-278.
16. Montes-Moreno S, Castro Y, Rodriguez-Pinilla S, et al. Intrafollicular neoplasia/in situ follicular lymphoma: review of a series of 13 cases. *Histopathology.* 2010; 56:658-662.
17. Howard M, Dufresne S, Swerdlow S, Cook J. Follicular lymphoma of the spleen: multiparameter analysis of 16 cases. *Am J Clin Pathol.* 2009;131(5):656-62.
18. Li J, Zhang W, Tang Y, Li G, Dong D. In situ follicular lymphoma with progressive transformation of the germinal centers confirmed by laser capture microdissection, IGH gene rearrangement analysis, and fluorescence in situ hybridization for t(14; 18). *Hum Pathol.* 2012;43(1):138-43.
19. Adam P, Schiefer A, Prill S, Henopp T, Quintanilla-Martinez L, Bosmuller H, et al. Incidence of preclinical manifestations of mantle cell lymphoma and mantle cell lymphoma in situ in reactive lymphoid tissues. *Mod Pathol.* 2012;25(12):1629-36.

20. Sloan C, Xiong Q, Crivaro A. Multifocal mantle cell lymphoma in situ in the setting of a composite lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2015;143:274-282; quiz 307.
21. Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, et al. In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood.* 2002(99):3376-3382.
22. Nodit L, Bahler D, Jacobs S, Locker J, Swerdlow S. Indolent mantle cell lymphoma with nodal involvement and mutated immunoglobulin heavy chain genes. *Hum Pathol.* 2003; 34(10):1030-4.
23. Richard P, Vassallo J, Valmary S, Missouri R, Delsol G, Brousset P. "In situ-like" mantle cell lymphoma: a report of two cases. *J Clin Pathol.* 2006; 59(9):995-6.
24. Krajewski S, et al. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1993 (53): 4701-4714.
25. deJong D, et al. Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res.* 1994(54): 256-260.
26. Grimm K, Barry T, O'Malley D, Weiss L. Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms. In Orazi A, Foucar K, Knowles D. *Knowles' Neoplastic hematopathology.* Wilkins, Lippincott Williams &. 3rd ed.; 2013. p. 1–1304.
27. Schraders M, de Jong D, Kluin P, Groenen P, van Krieken H. Lack of Bcl-2 expression in follicular lymphoma may be caused by mutations in the BCL2 gene or by absence of the t(14;18) translocation. *J. Pathol.* 2005;205: 329-35.
28. Tsujimoto Y, Croce C. Analysis of the structure, transcripts and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986;83: 5214-5218.
29. Sinicrope F, et al. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 1995;55: 237-241.
30. Chu P, et al. Immunophenotyping of Hematopoietic neoplasms. *Sem diag pathol.* 2000;17(3): 236- 256.

31. Waarnker R, Isaacson P. Immunohistochemical Analysis of Lymphoid tissue. In Neoplastic hematopathology. Knowles D. Lippincott W.W. Philadelphia.; 2001;4:227-253.
32. Lai R, et al. Frequency of bcl-2 expression in non Hodgkin´s lymphomas. A study of 778 cases with comparison of marginal zone lymphoma and monocytoid B cell hyperplasia. Mod Pathol. 1998;11:864-869.
33. Sinicrope F, et al. Prognostic Value of bcl-2 Oncoprotein Expression in Stage II Colon Carcinoma. Clinical Cancer Research. 1995 (1): 1103-1110).
34. Williams M, Cook R. Bcl-2 family proteins in Breast development and cancer: Could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance? Oncotarget. 2015,6(6): 3519-3530.
35. Silvestrini R, et al. The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. J. Natl. Cancer Inst. 1994;86: 499-504.
36. Joensuu , et al. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. Am. J. Pathol. 1994;145: 1191-1198.
37. Gasparini , et al. Expression of bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node-positive breast cancer. Clin. Cancer Res. 1995,1: 189-198.
38. Gualco G, Ardao G. Valor de la inmunohistoquímica en la determinación del inmunofenotipo en las neoplasias sólidas hematopoyéticas. Arch. Med. Int. 2001, 23(4):195-205.
39. Aster J, Longtine J. Detection of BCL2 rearrangements in follicular lymphoma. Am J Pathol. 2002;160(3):759-763.
40. Bonzheim I, Salaverria I, Haake A, Gastl G, Adam P, Siebert R, et al. A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma. Blood. 2011;118(12):3442-4.
41. Adam P, et al. The BCL2 E17 and SP66 antibodies discriminate 2 immunophenotypically and genetically distinct subgroups of conventionally BCL2-“negative” grade 1/2 Follicular lymphomas. Hum Pathol. 2013;44(9):1817-26.

42. Arber D, Weiss L. CD10: A review. *Appl Immunohistochem*. 1997; 5: 125-140.
43. Bacchi C, Bacchi M. Immunohematopathology markers in paraffin sections. *J Histotechnol*. 1999;22:195 – 205.
44. Donnellan R, Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *Clin Pathol:Mol Pathol*. 1998;51:1–7.
45. Alkan S, Schnitzer B, Thompson J. Cyclin D1 protein expression in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol*. 1995;6: 567-570.
46. Frizzera G, Wu D, Inghirami G. The usefulness of immunophenotypic and genotypic studies in the diagnosis and classification of hematopoietic and lymphoid neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 1999; 111(Suppl1): S13-39.
47. Chan J. Immunostaining for cyclin D1 and the diagnosis of mantle cell lymphoma: is there a reliable method? *Histopathology*. 1999; 34: 266-270.
48. Kussick S, Kalnoski M, Brazier R, Wood B. Prominent clonal B-cell populations identified by flow cytometry in histologically reactive lymphoid proliferations. *Am J Clin Pathol*. 2004;121(4):464-72.
49. Landgren O, Albitar M, Ma W, Abbasi F, Hayes R, Ghia P, et al. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2009; 360(7):659-67.
50. Rawstron A, Yuille M, Fuller J, Cullen M, Kennedy B, Richards S, et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood*. 2002; 100(7):2289-90.
51. Ghia P, Caligaris-Cappio F. Monoclonal Bcell lymphocytosis: right track or red herring? *Blood*. 2012;119(19):4358-62.
52. Sotomayor E, Shah I, Sanger W, Mark H. In situ follicular lymphoma with a 14;18 translocation diagnosed by a multimodal approach. *Exp Mol Pathol*. 2007;83(2):254-258.
53. Rouillet M, Martinez D, L M, Fowler M, McPhail E, Judkins A, et al. Coexisting follicular and mantle cell lymphoma with each having an in situ component: a novel, curious, and complex consultation case of coincidental, composite, colonizing lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2010; 133(4):584-91.

54. Montes-Moreno S, Climent F, Gonzalez de Villambrosia S, et al. CD 30-positive transformed follicular lymphoma: two case reports and literature review. *Histopathology*. 2015;67(6):918-22.
55. Carbone A, Della Libera D, Zannier L, et al. In situ follicular lymphoma associated with overt B- or T-cell lymphomas in the same lymph node. *Am J Hematol*. 2011;86(12):E66–70.
56. Carbone A, Gloghini A. Coexisting Follicular and Mantle cell lymphoma with each having an in situ component. *Am J Clin Pathol*. 2011;136:480-483.
57. Sakhadeo U, Mane A, Shet T. In situ follicular neoplasia/ lymphoma: three illustrative cases exemplifying unique disease presentations. *Indian J Pathol Microbiol*. 2012; 55(2): 218–221.
58. Kurian R, Balamurugan T, Ping B, et al. Follicular lymphoma in situ in intra-abdominal lymphadenectomies-a study of five cases: revisiting the entity. *Adv Mod Oncol Res*. 2015; 1(1): 62–67.
59. Mamessier E, Drevet C, Broussais-Guillaumot F, et al. Contiguous follicular lymphoma and follicular lymphoma in situ harboring N-glycosylated sites. *Haematologica*. 2015;100(4):e155–e157.
60. Carbone A, Tibiletti M, Zannier L, Selva A, Sulfaro S, A G. A unique case of extranodal DLBCL sharing genetic abnormalities with a synchronous ileal lymphoma exhibiting immunoarchitectural features of in situ follicular lymphoma. *American Journal of hematology*. 2012;87(12):134-5.
61. McCormack M, Lade S. Diffuse large B-cell lymphoma with concurrent follicular lymphoma in situ: Two Cases. *Pathology*. 2013, 45(1):76-77.
62. Park H, Noh S, Kwak J, et al. In situ follicular lymphoma developed after Hodgkin lymphoma. *Korean J Pathol*. 2011; 45(S1): S53–S57.
63. Lee J, Hoehn D, Schechter J, Murty V, Mansukhani M, Alobeid B, et al. Lymphoid follicle colonization by Bcl-2(bright+)CD10(+) B-cells (“follicular lymphoma in situ”) at nodal and extranodal sites can be a manifestation of follicular homing of lymphoma. *Hum. Pathol*. 2013. 44:1328–1340.
64. Dabbs D. *Diagnostic Immunohistochemistry. Theranostic and genomic applications*. 3rd ed. Philadelphia: Saunderv Elsevier; 2010.

65. Arnold A, Cossman J, Bakhshi A, Jaffe E, Waldmann T, Korsmeyer S. Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med.* 1983; 309:1593-9.
66. Campo E, et al. Implicaciones prácticas de la biología molecular en el diagnóstico, clasificación y seguimiento clínico de los linfomas y síndromes linfoproliferativos crónicos. XLV Reunión Nacional de la AEHH y XIX Congreso Nacional de la SETH Simposios. 2003: 119-126.
67. Van Krieken J, Langerak A, San Miguel J, Parreira A, Smith J, Morgan G, et al. Clonality analysis for antigen receptor genes: Preliminary results from the biomed-2 concerted action PL 96- 3936. *Hum Pathol.* 2003;34:359-361.
68. Evans P, Pott C, Groenen P, 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(2):207–214.
69. Schmidt J, Salaverria I, Haake A, et al. Increasing genomic and epigenomic complexity in the clonal evolution from in situ to manifest t(14; 18)-positive follicular lymphoma. *Leukemia.* 2014;28:1103-1112.
70. Carbone A, Gloghini A, Volpe R, et al. Follicular lymphoma of compartmentalized small cleaved center cells and mantle zone lymphocytes. Evidence for a common derivation. *Am J Clin Pathol.* 1992; 98; 437–448.
71. Yoshida M, Ichikawa A, Miyoshi H, Takeuchi M, Kimura Y, Nino D, et al. High frequency of t(14; 18) in Hodgkin's lymphoma associated with follicular lymphoma. *Pathol.* 2012;62(8):518-24.
72. Marafioti T, Hummel M, Foss H, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, et al. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements. but defective immunoglobulin transcription. *Blood.* 2000;95(4):1443-50.
73. Nakamura N, Ohshima K, Abe M, Osamura Y. Demonstration of chimeric DNA of bcl-2 and immunoglobulin heavy chain in follicular lymphoma and subsequent Hodgkin lymphoma from the same patient. *J Clin Exp Hematop.* 2007;47(1):9-13.
74. Tsang P, Pan L, Cesarman E, Tepler J, Knowles D. A distinctive composite lymphoma consisting of clonally related mantle cell lymphoma and follicle center cell lymphoma. *Hum Pathol.* 1999;30(8):988-92.

75. Wang S, Tzankov A, Young K, et al. Clonally related composite Follicular lymphoma and Mantle cell lymphoma with clinicopathologic features and biological implications. *Human Pathology*. 2013;44: 2658–2667.
76. Eberle F, et al. Immunoguided Laser Assisted Microdissection Techniques for DNA Methylation Analysis of Archival Tissue Specimens. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2010; 12 (4): 394-401.
77. Mamessier E, et al. Early lesion of follicular lymphoma: a genetic perspective. *Haematologica*. 2014; 99(3): 481-488.
78. Cañas R, Torre F. ¿Cómo funciona? la captura por microdissección láser, desvelando los secretos de una célula. *Primavera*. 2015;8(154):61-63.
79. Pruneri G, Mazzarol G, Manzotti M, Viale G. Monoclonal proliferation of germinal center cells (incipient follicular lymphoma) in an axillary lymph node of a melanoma patient. *Hum Pathol*. 2001;32(12):1410-1413.
80. Alsabeh R, Abdelhalim F, Kwok B, al e. In-situ follicular lymphoma involving about 2% of the total lymphoid cells. In XVth meeting of the European Association for Haematopathology; 2010, September 25–30; Uppsala, Sweden (Abs LW103).
81. Morita K, Nakamine H, Nakai T, Takano M, Takeda M, Enomoto Y, et al. A retrospective study of patients with follicular lymphoma (FL): identification of in situ FL or FL-like B cells of uncertain significance in lymph nodes resected at the time of previous surgery for carcinomas. *J Clin Pathol*. 2015;68:541–546.
82. Owens S, Hartman D. Follicular lymphoma in situ. In XVth meeting of the European Association for Haematopathology; 2010, September 25–30; Uppsala, Sweden (Abs LW68).
83. Carbone A, Tibiletti M, Canzonieri V, et al. In situ follicular lymphoma associated with non-lymphoid malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2012;53:603–8.
84. Kwok B, Rawson R, Alsabeh R, et al. Lung adenocarcinoma with contiguous in-situ follicular lymphoma involving Lung adenocarcinoma with contiguous in-situ follicular lymphoma involving less than 5% of the total lymphoid cells. In XVth meeting of the European Association for Haematopathology; 2010, september 25–30; Uppsala, Sweden (Abs LW38).

85. Bertoni F, Roggero E, Luscieti P, Pedrinis E, Cavalli F, Zucca E. Clonality assessment in blood of patients with mantle cell lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*. 1999;32:375–379.
86. Kurtin P. Mantle Cell Lymphoma. In Hsi E. *Hematopathology section 2, ch 7*. 2nd ed. Cleveland, Ohio: Elsevier Saunders; 2012.
87. Aqel N, Barker F, Patel K, et al. In-situ mantle cell lymphoma—a report of two cases. *Histopathology*. 2008;52:256-260.
88. Bassarova A, Tierens A, Lauritzsen G, FA, Delabie J. Mantle cell lymphoma with partial involvement of the mantle zone: an early infiltration pattern of mantle cell lymphoma? *Virchows Arch*. 2008;453(4):407-11.
89. Rodig S, Healey B, Pinkus G, Kuo F, Dal C, Kutok J. Mantle cell lymphoma arising within primary nodal marginal zone lymphoma: a unique presentation of two uncommon B-cell lymphoproliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;171(1): 44-51.
90. Espinet B, Sole F, Pedro C, Garcia M, Bellosillo B, Salido M, et al. Clonal proliferation of cyclin D1-positive mantle lymphocytes in an asymptomatic patient: an early stage event in the development or an indolent form of a mantle cell lymphoma? *Hum Pathol*. 2005; 36(11):1232-7.
91. Hsu P, Yang T, S SF. Mantle cell lymphoma with in situ or mantle zone growth pattern: a study of five cases and review of literature. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2014;7(3):1042–1050.
92. Bretherick K, et al. Elevated circulating t(14;18) translocation levels prior to diagnosis of follicular lymphoma. *Blood*. 2010 ; 116 (26): 6146-6147.
93. Roulland S, et al. Translocation t(14;18): A predictive blood biomarker for follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(13):1347–1355.
94. Leonard D. *Molecular Pathology in clinical practice* New York, USA; Springer; 2007;1(32):349-364.
95. Akasaka T, Akasaka H, Yonetani N, Ohno H, Yamabe H, Fukuhara S, et al. Refinement of the BCL2/immunoglobulin heavy chain fusion gene in t(14;18)(q32;q21) by polymerase chain reaction amplification for long targets. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998, 21:17–29.

96. Wang Y, Addya K, Edwards R, Rennert H, Dodson L, Leonard D, et al. Novel bcl-2 breakpoints in patients with follicular lymphoma. *Diagn Mol Pathol*. 1998, 7:85–89.
97. Buchonnet G, Lenain P, Ruminy P, Lepretre S, Stamatoullas A, Parmentier F, et al. Characterisation of BCL2-JH rearrangements in follicular lymphoma: PCR detection of 3_BCL2 breakpoints and evidence of a new cluster. *Leukemia*. 2000, 14:1563–1569.
98. Willis T, Jadayel D, Coignet L, Abdul-Rauf M, Treleaven J, Catovsky D, et al. Rapid molecular cloning of rearrangements of the IGHJ locus using long-distance inverse polymerase chain reaction. *Blood*. 1997; 90:2456–2464.
99. Tsujimoto Y, Bashir M, Givol I, Cossman J, Jaffe E, Croce C. DNA rearrangements in human follicular lymphoma can involve the 5' or the 3' region of the bcl-2 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987, 84:1329–1331.
100. Vaandrager J, Schuurin E, Philippo K, Kluin P. V(D)J recombinase-mediated transposition of the BCL2 gene to the IGH locus in follicular lymphoma. *Blood*. 2000, 96(5):1947–1952.
101. Pezzella F, Tse A, Cordell J, Pulford K, Gatter K, Mason D. Expression of the bcl-2 Oncogene Protein Is Not Specific for the 14; 18 Chromosomal Translocation. *American journal of Pathology*. 1990,137(2): 225-232.
102. Belaud-Rotureau M, Parrens M, Dubus P, et al. A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas. *Mod Pathol*. 2002;15:517–525.
103. Kluin P. Origin and migration of follicular lymphoma cells. *Haematologica*. 2013;98(9):1331–1333.
104. Limpens J, de Jong D, van Krieken J, Price C, Young B, van Ommen G, et al. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene*. 1991, 6:2271–2276.
105. Aster J, Kobayashi Y, Shiota M, Mori S, Sklar J. Detection of the t(14;18) at similar frequencies in hyperplastic lymphoid tissues from American and Japanese patients. *Am J Pathol*. 1992, 141:291–299.
106. Ohshima K, Kikuchi M, Kobari S, Masuda Y, Eguchi F, Kimura N. Amplified bcl-2/JH rearrangements in reactive lymphadenopathy. *Virchows Arch B Cell Pathol*. 1993, 63:197–198.

107. Estalilla O, Medeiros L, Manning JJ, Luthra R. 5'-3' exonuclease-based real-time PCR assays for detecting the t(14;18)(q32;21): a survey of 162 malignant lymphomas and reactive specimens. *Mod Pathol.* 2000, 13:661–666.
108. Tellier J, Menard C, Roulland S, et al. Human t(14;18)positive germinal center B cells: a new step in follicular lymphoma pathogenesis? *Blood.* 2014;123:3462-3465.
109. Liu Y, Hernandez A, Shibata D, Cortopassi G. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1994; 91; 8910–8914.
110. Roulland S, Sungalee J, Morgado E, Mamessier E, Gregoire E, Monvoisin C, et al. Iterative germinal center re-entries of memory B-cells with translocation(14;18) and early steps of follicular Lymphoma progression. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).* 2012;120:150.
111. Schuler F, Dolken L, Hirt C, Kiefer T, Berg T, Fusch G, et al. Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. *Int J.* 2009;124(4):958-63.
112. Janz S, Potter M, Rabkin C. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003; 36: 211–223.
113. Hirt C, Weitmann K, Schuler F, et al. Circulating t(14;18)-positive cells in healthy individuals: association with age and sex but not with smoking. *Leuk Lymphoma.* 2013; 54:2678–2684.
114. Bell D, Liu Y, Cortopassi G. Occurrence of bcl-2 oncogene translocation with increased frequency in the peripheral blood of heavy smokers. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(3):223-224.
115. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Heutte N, Nadel B, Gauduchon P. Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals. *Leukemia.* 2006;20(1):158-162.
116. Korsmeyer S. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood.* 1992; 80: 879-886.
117. Lotem J, Sachs L. Regulation by bcl-2, c-myc, and p53 of susceptibility to induction of apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation-competent and defective myeloid leukemic cells. *Cell Growth & Differ.* 1993;3: 41-47.

118. Wang Y, Szekely L, Okan I, Klein G, Wiman R. Wild-type p53-triggered apoptosis is inhibited by bcl-2 in a v-myc-induced T-cell lymphoma cell line. *Oncogene*. 1993; 8: 3427-3431.
119. Cheung M, Bailey D, Pennell N, Imrie K, Berinstein N, Amato D, et al. In situ localization of follicular lymphoma: evidence for subclinical systemic disease with detection of an identical BCL-2/IGH fusion gene in blood and lymph node. *Leukemia*. 2009; 23(6):1176-9.
120. Kridel R, Sehn L, Gascoyne R. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3424–3431.
121. Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7: 750–762.
122. Jones D. Follicular Lymphoma and Mantle Cell Lymphoma, Ch 16. In Jones D, editor. *Neoplastic Hematopathology Experimental and Clinical Approches*. New York, NY: Humana Press; 2010: 279-301.
123. Suzuki R, Takemura K, Tsutsumi M. Detection of cyclin D1 overexpression by realtime reverse-transcriptase-mediated quantitative polymerase chain reaction for the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am. J. Pathol*. 2001,159(2): 425-429.
124. Hui P, Howe J, Crouch J, et al. Real-time quantitative RT-PCR of cyclin D1 mRNA in mantle cell lymphoma: comparison with FISH and immunohistochemistry. *Leuk Lymphoma*. 2003;44:1385–1394.
125. Ferreira-Gonzales A. Establishing a molecular diagnostics laboratory. In *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Philadelphia: WB Saunders: Henry JB; 2001:1333–1339.
126. Lecluse Y, Lebailly P, Roulland S, et al. t(11;14)-positive clones can persist over a long period of time in the peripheral blood of healthy individuals. *Leukemia*. 2009;23:1190-1193.
127. Hirt C, Schüller F, Dölken L, Schmidt C, Dölken G. Low prevalence of circulating t(11;14)(q13;q32)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals as detected by real-time quantitative PCR. *Blood*. 2004; 104: 904–905.

128. Krijgsman O, et al. Dissecting the gray zone between follicular lymphoma and marginal zone lymphoma using morphological and genetic features. *Haematologica*. 2013;98(12):1921-9.
129. Bala R, Warnke R, Natkunam Y. Expanding the Morphologic Spectrum of Follicular Lymphoma In Situ: 13 Examples Including In Situ Grade 3 and BCL2-Negative Cases. *Modern Pathology (USCAP Annual meeting abstract)*. 2012;25(S2):324A.
130. Shinawi M, Cheung S. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discovery Today*. 2008;13:760-769.
131. Batlle A. Estudio citogenético-FISH. In *Recomendaciones del club de linfomas de la SEAP- Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España*. SEAP. 2015; 79-183.
132. Schmatz A, Streubel B, Kretschmer-Chott E, et al. Primary follicular lymphoma of the duodenum is a distinct mucosal/submucosal variant of follicular lymphoma: a retrospective study of 63 cases. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1445-1451.
133. Takata K, Okada H, Ohmiya N, et al. Primary gastrointestinal follicular lymphoma involving the duodenal second portion is a distinct entity: a multicenter, retrospective analysis in Japan. *Cancer Science*. 2011;102(8):1532–1536.
134. Roulland S, Faroudi M, Mamessier E, Sungalee S, Salles G, Nadel B. Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. *Adv Immunol*. 2011;111:1–46.
135. Bende R, et al. Primary follicular lymphoma of the small intestine: alpha4beta7 expression and immunoglobulin configuration suggest an origin from local antigen-experienced B cells. *Am J Pathol*. 2003;162(1):105-13.
136. Sepúlveda J. Importancia de la biología celular y tisular y técnicas de estudio de células y tejidos. In *Texto Atlas de Histología, Biología celular y tisular*. Mexico, DF: McGraw-Hill; 2012(1):3-16.
137. Young B, Heat J. Sistema inmunitario. In *Wheater's Histología funcional*. 4th ed. Madrid: Harcourt; 2000. p. 193-221.
138. DAKO. FLEX Ready-to-Use Atlas of Stains. [Online].; 2012 (4): 1-120. Available from: http://www.agilent.com/cs/library/catalogs/public/00230_atlas_of_stains.pdf.

139. Abcam. Anti-Bcl-2 antibody [E17] ab32124. [Online]. Available from: <http://www.abcam.com/bcl-2-antibody-e17-ab32124.html>.
140. Izasa, S.A. División de inmunología. Protocolo de hibridación in situ en fluorescencia. Aportado por el Servicio de Hematopatología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
141. Laboratories Abbott. Vysis LSI IGH/BCL2 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe. [Online].; 2016. Available from: <https://www.abbottmolecular.com/products/vysis-lsi-igh-bcl2-dual-color-dual-fusion-translocation-probe.html>.
142. Fernández P. Tratado de Epidemiología Clínica. Unidad de epidemiología Clínica, Departamento de Medicina y Psiquiatría Universidad de Alicante Madrid: DuPont Pharma, S.A.; 2001.
143. Mamessier E, Broussais-Guillaumot F, Chetaille B, Bouabdallah R, Xerri L, Jaffe E, et al. Nature and importance of follicular lymphoma precursors. *Haematologica*. 2014; 99(5):802-810.
144. Carbone A, Santoro A. How I treat: diagnosing and managing "in situ" lymphoma. *Blood*. 2011;117(15):3954-60.
145. Bermudez GM, González S, Martínez-López A, Batlle A, Revert-Arce J, Cereceda L, et al. Incidental and isolated Follicular Lymphoma in situ and Mantle Cell Lymphoma in situ lack clinical significance. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(7):943-9.
146. Adam P, Katzenberger T, Eifert M, Ott M, Rosenwald A, Muller-Hermelink H, et al. Presence of preserved reactive germinal centers in follicular lymphoma is a strong histopathologic indicator of limited disease stage. *Am J Surg Pathol*. 2005; 29:1661–1664.
147. Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, Foss H, Huhn D, Stein H. Classical Hodgkin's disease and follicular lymphoma originating from the same germinal center B cell. *J. Clin. Oncol*. 1999,17:3804–3809.
148. Bräuninger A, Hansmann M, Strickler J, et al. Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med*. 1999;340:1239–1247.
149. Kuppers R, Sousa A, Baur A, Strickler J, Rajewsky K, Hansmann M. Common germinal-center B-cell origin of the malignant cells in two composite lymphomas,

involving classical Hodgkin's disease and either follicular lymphoma or B-CLL. *Mol Med*. 2001;7(5): 285–292.

150. Staudt L. The Molecular and Cellular Origins of Hodgkin's Disease. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000,191 (2): 207–212.
151. Taverna J, Nair A, Yun S, et al. A rare presentation of in situ mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: a case report and review of the literature. *Case Rep Hematol*. 2014;2014:1-7; ID 145129.

8. ANEXO: PUBLICACIÓN ORIGINAL

Título: Incidental and isolated Follicular Lymphoma in situ and Mantle Cell Lymphoma in situ lack clinical significance.

Autores: Bermúdez Pinargote Glenda, González Sonia, Martínez-López Azahara, Batlle Ana, Revert-Arce José, Cereceda Laura, Ortega César, Piris Miguel Ángel, Montes-Moreno Santiago.

Revista: American Journal of Surgical Pathology.
2016;40(7):943-9. DOI:10.1097/PAS.0000000000000628

https://journals.lww.com/ajsp/Abstract/2016/07000/Incidental_and_Isolated_Follicular_Lymphoma_In.9.aspx

Factor de impacto de American Journal of Surgical Pathology:4592

Material suplementario en formato digital anexo