



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES EN NIÑOS.
ANÁLISIS MORFOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
QUE PRESENTA:
LETICIA BORNSTEIN QUEVEDO

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN:
PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

TUTOR DE TESIS:
DR. EDUARDO LÓPEZ CORELLA



MEXICO, D.F.


JUNIO, 2003

LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES EN NIÑOS.

ANÁLISIS MORFOLOGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO



Dr. Pedro Sánchez Márquez
Director de Enseñanza



Dr. Luis Heshiki Nakandakari
Jefe del Departamento de Pre y Posgrado



Dr. Eduardo López Corella
Tutor del trabajo de fin de curso
Profesor titular del curso

RESUMEN

Antecedentes. La clasificación actual de LACG y la correlación del inmunofenotipo T o B con la expresión de ALK son controversiales. Aunque los LACG representan el 15% de linfomas en niños, las características morfológicas e inmunohistoquímicas no están bien caracterizadas.

Material y métodos. Se evaluaron todos los casos de linfomas de células grandes registrados en el archivo de patología quirúrgica entre 1980 y 2002. Se seleccionaron los casos con morfología anaplásica y se realizó inmunohistoquímica para identificar los LACG ALK+.

Resultados. Se evaluaron 15 casos, 7 fueron ALK-negativos (3 linfoma de Hodgkin y 4 linfomas difusos de células grandes con inmunofenotipo B). Se identificaron 8 pacientes con linfoma anaplásico de células grandes con inmunofenotipo T/nulo en 5 niños y 3 niñas (mediana 8 a). El 100 y 87% de casos fueron positivos con CD30 y AEM, respectivamente. El 25% mostró positividad exclusivamente citoplasmática para ALK. En 6/8 el inmunofenotipo fue T y en dos casos fue nulo.

Conclusiones. Los LACG ALK positivos son frecuentes (53%) entre el grupo de linfomas de células grandes con morfología anaplásica. La mayoría muestran co-expresión de CD30, AEM y marcadores genéricos de células T. La utilización de ALK es de utilidad para identificar un subgrupo de linfomas de células grandes.

ABSTRACT

Background. The current classification of anaplastic large cell lymphoma (ALCL) and the correlation of T or B cell lineage with ALK expression are controversial. Although ALCL represents 15% of pediatric lymphomas the morphologic and immunohistochemical features are not well characterized.

Methods. All large cell lymphomas with anaplastic features accessioned in the surgical pathology files between 1980 and 2002 were studied. Immunophenotyping was performed to identify the ALK+ ALCL.

Results. Fifteen cases were evaluated, 7 were ALK-negative (3 Hodgkin lymphomas, and 4 diffuse large B-cell lymphomas). Eight ALK+, CD30+ ALCL with T/null cell immunophenotype were identified in 5 boys and 3 girls (median 8 years). Immunostaining with CD30 and EMA was observed in 100 and 87% of cases, respectively. Twenty five percent of ALCLs had ALK staining restricted to the cytoplasm. Six cases showed T-cell phenotype while only two were considered null-type.

Conclusions. ALK positive ALCLs are frequent (53%) among large cell lymphomas with anaplastic features. Most of them express CD30, EMA and generic T-cell markers. The use of ALK protein helps to recognize a subgroup of large cell lymphomas

INTRODUCCIÓN

En niños, los linfomas constituyen el 11% de las neoplasias¹. Aproximadamente el 50% de estos son linfomas no Hodgkin (LNH), un grupo heterogéneo de neoplasias de alto grado que muestran progresión rápida². Histológicamente, se dividen en tres grupos: linfoma difuso de células pequeñas no hendidas (Linfoma de Burkitt y tipo-Burkitt), linfoma linfoblástico y linfoma difuso de células grandes. El linfoma anaplásico de células grandes (LACG) se encuentra clasificado dentro del tercer grupo y representa del 10 a 15% de LNH en niños³⁻⁴.

El reconocimiento del linfoma anaplásico de células grandes (LACG) como entidad clinicopatológica comenzó en 1982 con la utilización del anticuerpo Ki-1 en líneas celulares de enfermedad de Hodgkin (EH), en células malignas de EH en muestras de tejido y en algunos linfocitos pequeños localizados en la zona paracortical de ganglios linfáticos normales^{5,6} (Cuadro 1). Posteriormente el antígeno Ki-1 fue asignado al grupo CD30 y se demostró que era un antígeno de activación que podía ser expresado por células B, células T e incluso en histiocitos activados⁶.

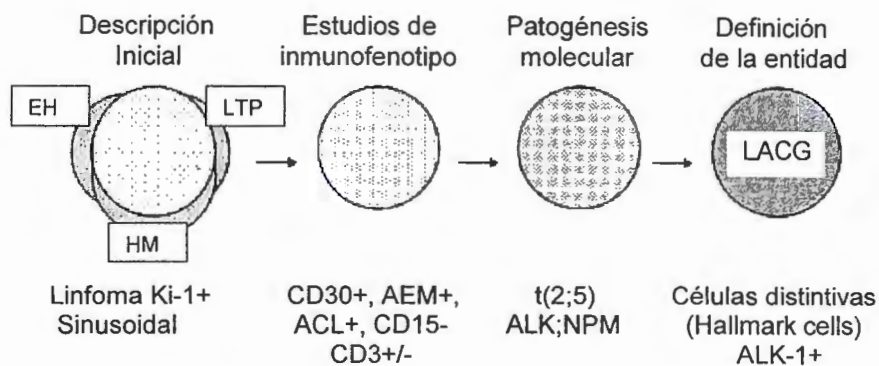
En 1985 Stein y cols⁷ informaron un grupo de 45 linfomas de células grandes con características morfológicas similares y expresión de CD30. En esta serie, el LACG fue descrito como una neoplasia linfoide caracterizada por infiltración ganglionar sinusoidal o paracortical de células grandes anaplásicas con expresión del antígeno CD30 (Ki-1). Sin embargo, también se identificó reactividad para

Cuadro 1. Evolución histórica de linfoma anaplásico de células grandes.

1982	Anticuerpo Ki-1 contra líneas celulares de EH y células de Reed Sternberg
1985	Ki-1 fue positivo en 45 LCG con morfología de "Histiocitosis maligna" e invasión sinusoidal
1986	Ki-1 fue asignado al grupo CD 30 e identificado en linfocitos T y B activados
1988	LACG fue incluido en la clasificación de Kiel
1989	t(2;5) se encontró en LACG
1994	La t(2;5) fue clonada y los genes ALK/NPM identificados
1995	Desarrollo de anticuerpos policlonales y
1997	Monoclonales para identificar ALK en tejido desparafinado

CD30 en EH, papulosis linfomatoide, linfomas T periféricos y algunos linfomas B de células grandes⁶ (Figura 1). Posteriormente, se identificó la translocación t(2;5)(p23q35), inicialmente asociada con histiocitosis maligna, en casos de LACG⁸, y se clonaron anticuerpos policlonales y monoclonales, específicamente ALK-1, que identifica la proteína quimérica producida por esa translocación.

Figura 1. Representación esquemática de la evolución del LACG desde la descripción inicial hasta la definición de la entidad actual.



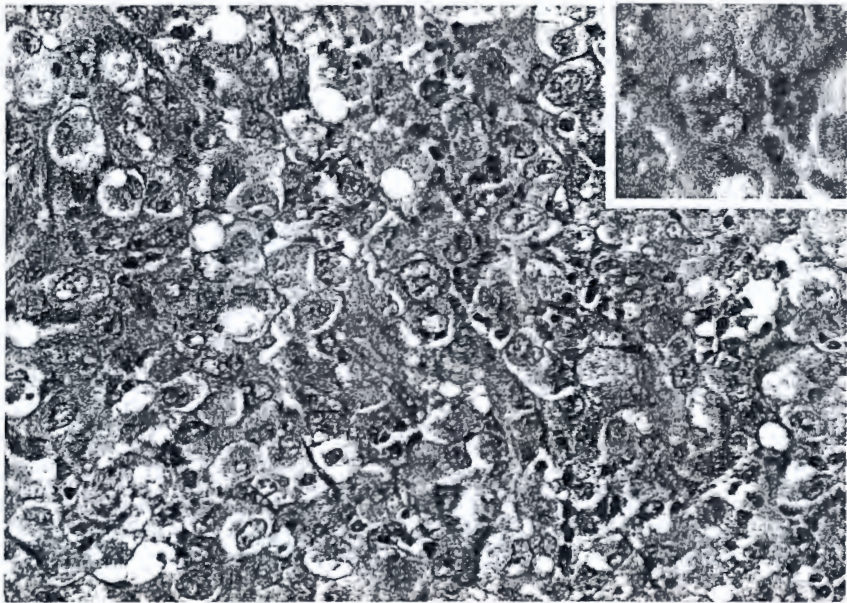
EH - Enfermedad de Hodgkin; HM - Histiocitosis maligna; LTP - Linfoma T periférico; LACG - Linfoma anaplásico de células grandes; AEM - Antígeno epitelial de membrana; ACL - Antígeno común leucocitario.

Esta neoplasia fue incluida en la clasificación de Kiel modificada⁹, como un linfoma anaplásico de células grandes con inmunofenotipo T o B. Aunque la existencia de casos esporádicos de LACG con inmunofenotipo B es controversial, en la clasificación REAL (*Revised European-American Lymphoma classification*)¹⁰ y la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹¹, el término LACG se refiere a una neoplasia linfoide formada por células anaplásicas que expresan el antígeno CD30 y presentan inmunofenotipo T o nulo.

En su forma clásica, el LACG está constituido por células neoplásicas grandes, con abundante citoplasma anfófilo, núcleo lobulado y numerosos nucleolos. Estas

células se denominan células distintivas (hallmark cells)¹², debido a que representan una característica distintiva de la neoplasia (Figura 2).

Figura 2. Características histológicas del LACG. Las células neoplásicas son grandes, cohesivas con abundante citoplasma anfófilo y bordes citoplásmicos bien definidos. Recuadro. Las células distintivas (Hallmark cells) tienen núcleos lobulados con nucleolos pequeños y una zona de Golgi prominente.



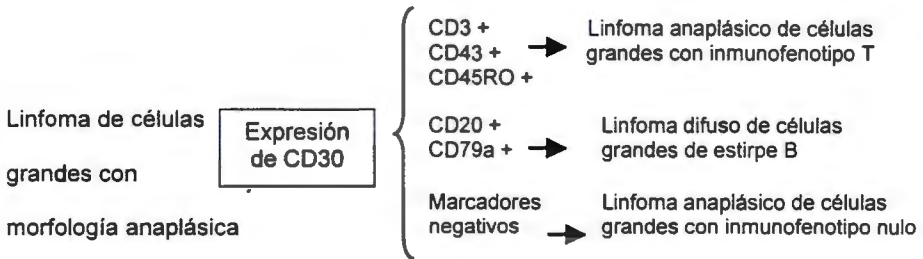
También se pueden identificar algunas con pseudoinclusiones citoplasmáticas (células en rosca) y otras relativamente monomórficas con núcleos redondos u

ovalados. La presencia de cambios estromales como fibrosis capsular e infiltrado inflamatorio son comunes. Las variantes morfológicas reconocidas de linfoma anaplásico de células grandes son: a) clásico, constituye >75% de los casos; b) linfohistiocítico¹³ y c) células pequeñas¹⁴. Todas ellas tienen como dato unificador la presencia de células distintivas.

Utilizando inmunohistoquímica se ha observado que todos los casos de LACG muestran expresión de CD30 y la mayoría (90-97%) expresión de antígeno epitelial de membrana (AEM)¹². El análisis de marcadores convencionales ha permitido identificar dos inmunofenotipos, LACG con inmunofenotipo T, el más común y neoplasias con inmunofenotipo nulo. La frecuencia del tipo nulo depende del número de marcadores de células T utilizados. Los marcadores frecuentemente utilizados son: CD3, CD43 y CD45RO. Aunque en un bajo porcentaje de casos se puede identificar expresión de otros marcadores como CD4, CD8 y moléculas citotóxicas (perforina, granzima B y TIA-1)^{8, 11}.

Los linfomas de células grandes con morfología anaplásica que expresan antígenos de células B son relativamente raros⁷. Para identificarlos se utilizan CD20 y CD79a; sin embargo, éstos no se distinguen como una entidad independiente y se consideran una variante morfológica e inmunofenotípica de linfomas difusos de células grandes de estirpe B (LDCGB)^{10, 15} (Cuadro 2).

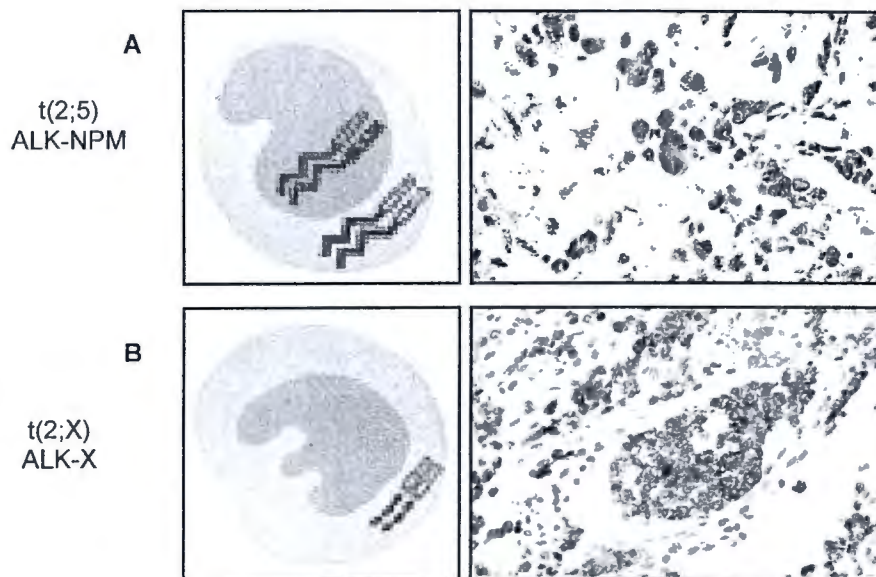
Cuadro 2. Diagnóstico de linfoma anaplásico de células grandes con base en la morfología e inmunofenotipo.



La translocación cromosómica t(2;5) constituida por la fusión de los genes ALK (cinasa de linfoma anaplásico) y NPM (nucleofosmina)¹⁶, se ha asociado al LACG⁸.¹⁷ El producto de esta translocación es la proteína quimérica ALK-NPM (p80), que consiste de la unión del extremo N terminal de NPM con el dominio citoplasmático del receptor de tirosina cinasa ALK¹⁸. Esta proteína se puede identificar por medio de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo ALK-1.

Recientemente, se ha informado que aproximadamente de 15 a 20% de LACG son negativos para la translocación t(2;5), detectada por medio de hibridación in situ. Se ha propuesto que en estos casos el gen ALK se une a un gen diferente a NPM y produce variantes X-ALK^{12, 19, 20}. La traducción morfológica de estas variantes es la reactividad exclusivamente citoplasmática utilizando el anticuerpo ALK-1 (Figura 3).

Figura 3. Patrones de distribución celular de proteínas NPM-ALK y variantes X-ALK en linfomas anaplásicos de células grandes. A. Representación esquemática de distribución nuclear y citoplasmática de proteína NPM-ALK (izquierda); reactividad nuclear y citoplasmática con ALK-1 (derecha). B. Esquema de localización citoplasmática de proteína X-ALK (izquierda); positividad citoplasmática de proteína ALK (derecha).



En varios estudios se ha demostrado la presencia de la translocación $t(2;5)$ y/o su producto proteico en casos de LACG. La frecuencia de expresión es aproximadamente de 60 a 80%^{21,22}. Benharroch¹² y cols estudiaron un grupo de 123 pacientes con LACG ALK+; aunque demuestran que la combinación de características morfológicas, inmunofenotipo y expresión de ALK definen un

subgrupo de LACG frecuente en pacientes jóvenes (edad promedio 21 años), en este trabajo, no se analizan las características clínicas y el impacto pronóstico de este hallazgo. Falini y cols¹⁹, estudiaron 96 pacientes con LACG, de los cuales 60% fueron ALK+. Sus resultados mostraron que los LACG ALK+, en contraste con los ALK-, fueron mas frecuentes en niños y pacientes jóvenes (promedio 22±10 años) con enfermedad avanzada (estadio III/IV), síntomas sistémicos e infiltración extraganglionar¹⁹. También, se observó mejor supervivencia global, 76 vs 15% (p=0.007) en pacientes con linfomas ALK+²⁰.

Debido a estas diferencias, se ha propuesto que los linfomas ALK+ representan una enfermedad diferente a los LACG ALK-, la cual esta caracterizada por una alteración genética determinada.

En niños existen pocos estudios que correlacionan la expresión de CD30 con la morfología y/o la translocación t(2;5)^{21,22}. t(2;5)(p23;q35). Hutchinson²³ y cols identificaron expresión de ALK-1 en 19/20 linfomas CD30+; al comparar estos casos con otros linfomas de células grandes, no se observaron diferencias en cuanto a supervivencia libre de enfermedad a 2 años. Sherman²⁴ y cols describieron 17 pacientes con LACG y expresión de ALK. Estos casos mostraron inmunofenotipo T y expresión de CD30 y EMA. En otro estudio²⁹, todos los casos (n=28) fueron positivos para CD30 y ALK1 y mostraron inmunofenotipo T/nulo. La supervivencia fue de 94% con seguimiento promedio de 43 meses.

Estos datos apoyan la propuesta de considerar a los LACG ALK+ como una entidad clinicopatológica, sin embargo, la información con respecto al significado clínico de esta entidad en población pediátrica es limitada.

JUSTIFICACIÓN

La caracterización precisa de esta subvariedad de linfomas permitirá aumentar las casuísticas y así contribuir a su definición clinicopatológica con las implicaciones de estudio genético, etiológico, de diagnóstico y tratamiento.

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar las características morfológicas e inmunohistoquímicas de linfomas anaplásicos de células grandes en niños.

Objetivos Secundarios

1. Identificar la frecuencia relativa de ALK en el grupo de linfoma anaplásico de células grandes en niños.
2. Identificar las variantes morfológicas y el inmunofenotipo de linfomas anaplásicos de células grandes en niños.
3. Comparar la expresión de ALK con inmunofenotipo.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Retrolectivo, observacional, transversal y descriptivo

DEFINICIONES OPERACIONALES

Linfoma anaplásico de células grandes ALK-positivo: Linfoma no Hodgkin con inmunofenotipo T/nulo formado por células grandes, de citoplasma abundante y núcleo pleomórfico que expresan CD30 y ALK1.

NPM/ALK: Proteína de 80kd que resulta de la translocación t(2;5).

ALK1: Anticuerpo monoclonal que identifica el dominio citoplasmático de la proteína ALK.

Inmunohistoquímica: técnica de biología molecular que utiliza la reacción antígeno:anticuerpo para detección de productos proteicos.

PACIENTES ELEGIBLES

Todos los casos con diagnóstico de linfoma de células grandes registrados en el archivo de patología quirúrgica del Instituto Nacional de Pediatría entre 1980 y 2002.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes en los que se corrobore el diagnóstico de linfoma anaplásico de células grandes. (véase definiciones operacionales)
2. Pacientes con linfoma anaplásico de células grandes que cuenten con laminillas y bloques de parafina disponibles.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Pacientes con linfoma anaplásico de células grandes en los que el material sea inadecuado para inmunohistoquímica.

UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El Instituto Nacional de Pediatría es un hospital de tercer nivel de atención médica que cuenta con hospitalización y consulta externa de pediatría y diferentes subespecialidades. El Departamento de Oncología es un centro de referencia de enfermedades hematológicas y oncológicas que cuenta con métodos de detección, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de pacientes. El Departamento de Patología cuenta con una sección de Patología Molecular y la infraestructura suficiente para realizar métodos de detección molecular de proteínas y material genético mediante inmunohistoquímica e hibridación in situ. Al mes en promedio se reciben 20 ganglios linfáticos. El 70% corresponden a lesiones reactivas o enfermedades benignas y el 30% a linfomas.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Del archivo de patología quirúrgica se obtuvieron todos los casos con diagnóstico de linfoma de células grandes entre 1980 y 2002. Todos los casos, teñidos con hematoxilina y eosina, fueron evaluados y se seleccionaron los que mostraron morfología anaplásica. Se realizó inmunohistoquímica a este subgrupo de linfomas de células grandes con morfología anaplásica para identificar los casos que correspondan a LACG.

INMUNOHISTOQUIMICA

Se realizaron cortes a 2 μ del tejido seleccionado y se montaron en laminillas previamente tratadas con una solución de silano al 2.5%. Se realizó la técnica de inmunohistoquímica con el complejo biotina-estreptavidina/peroxidasa mediante el sistema de detección LSAB+ (Labelled streptavid-Biotin, Dako Corporation, Carpintería Calif. USA). Para el desenmascaramiento de epitopes se utilizó citrato de sodio al 0.1M pH 6.2 y EDTA 0.1 M pH 9, durante 5 minutos en la olla de presión/ horno de microondas y se enfriaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente las muestras fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 0.3% en medio acuoso e incubadas con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS por cinco minutos, los anticuerpos CD43, proteína ALK-1 (policlonal), CD45RO (UCHL-1), CD15 (C3D-1), CD79 α (JCB 117), CD30 (Ber-H2), CD3 (policlonal), AEM (E29), EBV LMP-1 (CS1-4) y CD20 (L26) (todos de la marca Dako Corporation, Carpintería Calif. USA) fueron incubados por 45 minutos a

temperatura ambiente. El anticuerpo secundario biotinilado y el complejo estreptavidina/peróxidasa se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Para la visualización de la reacción se utilizó como sustrato 3,3'-deaminobencidina-H₂O₂ y se monitoreo al microscopio. Se deshidrataron las laminillas con lavados en alcohol etílico al 50%, 60%, 70%, 96%, alcohol absoluto y xilol.

EVALUACIÓN

En los cortes histológicos se estableció el tipo de linfoma anaplásico de células grandes, la presencia de cambios estromales (fibrosis capsular, infiltrado inflamatorio) e infiltración sinusoidal.

En la evaluación de inmunohistoquímica se consideró estirpe T si CD3 y/o CD45RO fueron positivos en >5% de células neoplásicas. Se consideró tipo nulo si ninguno de ellos fue positivo y estirpe B si CD20 y/o CD79a fueron positivos en las células neoplásicas. Los casos en los que CD30 y CD15 fueron positivos y los demás marcadores negativos fueron diagnosticados como Linfoma de Hodgkin.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables categóricas fueron evaluadas con prueba exacta de Fisher o χ^2 . Se consideró estadísticamente significativo a valores de $p < 0.05$ a dos vías.

RESULTADOS

Se identificaron 15 linfomas de células grandes con morfología anaplásica, tres casos fueron positivos con CD30 y CD15 y correspondieron a linfoma de Hodgkin y 4 mostraron inmunoreactividad para CD20 y CD79a por lo que se diagnosticaron como linfomas difusos de células grandes con inmunofenotipo B. En el estudio se incluyeron 8 pacientes con linfoma anaplásico de células grandes con inmunofenotipo T/null (Cuadro 3) en 5 niños y 3 niñas con una mediana de edad de 8 años. La localización más frecuente fue en ganglios linfáticos periféricos y un caso mostró infiltración a piel.

Cuadro 3. Linfomas de células grandes con morfología anaplásica.

No. caso	Inmunofenotipo								Fenotipo	Diagnóstico
	CD30	AEM	ALK	CD3	CD45R0	CD20	CD79a	CD15		
1	+	+	+	+	+	-	-	-	T	LACG
2	-	-	-	-	-	+	+	-	B	LDCG
3	+	+	+	-	+	-	-	-	T	LACG
4	+	+	+	-	+	-	-	-	T	LACG
5	+	-	-	-	-	-	-	-		LH
6	+	+	+	+	+	-	-	-	T	LACG
7	+	-	-	-	-	-	-	+		LH
8	+	-	-	-	-	-	-	+		LH
9	+	-	-	-	+	+	+	-	B	LDCG
10	+	-	+	-	+	-	-	-	N	LACG
11	+	+	-	-	+	+	+	-	B	LDCG
12	+	+	+	-	+	-	-	-	T	LACG
13	+	-	-	-	+	+	+	-	B	LDCG
14	+	+	+	-	-	-	-	-	N	LACG
15	+	+	+	-	+	-	-	-	T	LACG

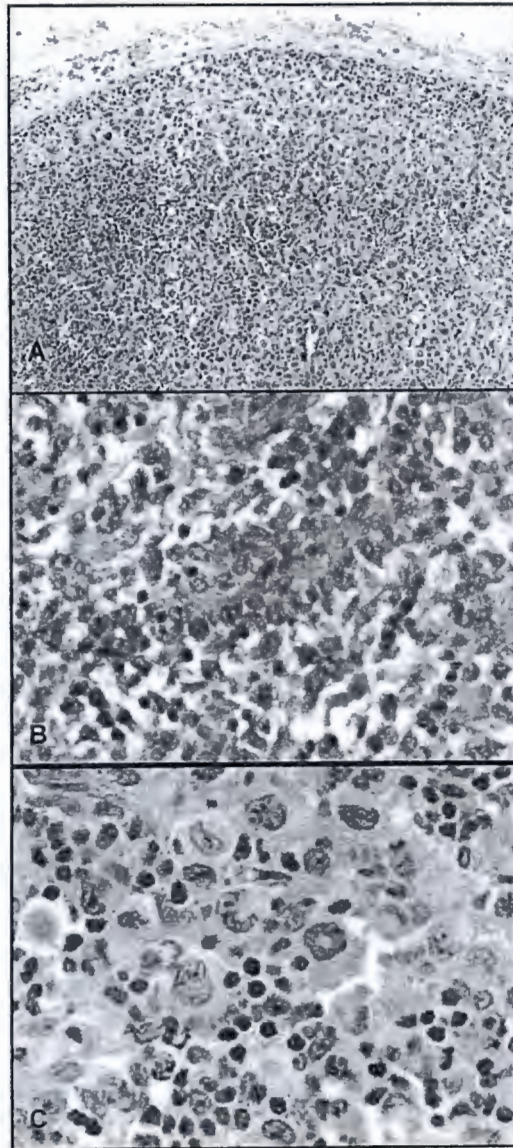
LH - Linfoma de Hodgkin; LDCG - Linfoma difuso de células grandes B.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

De acuerdo a la clasificación de la OMS, todos los casos correspondieron a la variante común de LACG. La arquitectura ganglionar estaba obliterada en todos los casos, sin embargo, en algunas áreas se identificaron sinusoides con extensa infiltración por células neoplásicas (Figura 4A). En 3 casos, aparte de los ganglios linfáticos con infiltración masiva por la neoplasia, se identificaron pequeños ganglios en los cuales la arquitectura ganglionar estaba conservada, pero presentaron numerosas células neoplásicas en sinusoides. En un caso se observó un patrón de infiltración perivascular (Figura 4B). En 2/8 casos se identificó infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario en el estroma neoplásico, así como histiocitos. Se observó necrosis en 2/8 casos con histiocitos y polimorfonucleares en las áreas vecinas.

Las características citológicas fueron variables.. En algunos casos, las células neoplásicas fueron de mediano tamaño y polimorfas, mientras que en otros se observaron células grandes tipo inmunoblasto. Sin embargo, en todos los casos se identificó una población de células grandes, con núcleo excéntrico, lobulado (en herradura) y nucleolos pequeños (Figura 4C). Estas células mostraron citoplasma amfófilo y zona eosinófila paranuclear que probablemente corresponde a una zona de Golgi prominente.

Figura 4. Características morfológicas de LACG. A. Infiltración sinusoidal y subcapsular por células linfoides malignas. B. Patrón de infiltración perivascular. C. Variante común de LACG con células distintivas (Hallmark cells) y en 'rosca'.



INMUNOHISTOQUÍMICA

Los resultados de inmunohistoquímica se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Resumen de resultado de inmunohistoquímica en linfomas anaplásicos de células grandes.

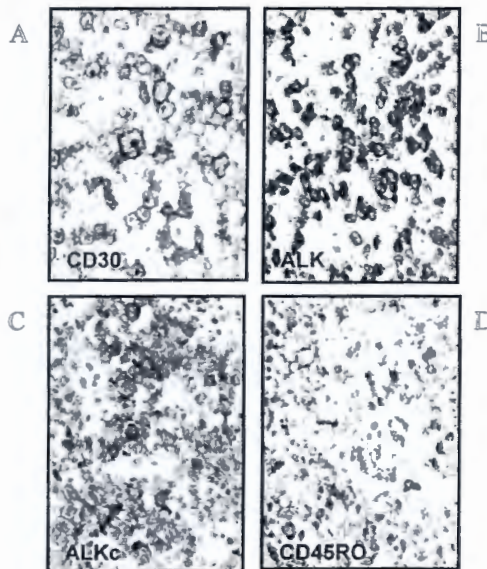
Anticuerpo	No Casos	%
CD30	8	100
ALK	8	100
AEM	7	87
CD3	2	25
CD45 RO	5	62
CD 43	6	75
CD20	0	0
CD79a	0	0
CD15	0	0
LMP-1	0	0

En todos los casos, > 95% de las células mostraron positividad intensa para CD30, la reactividad fue de membrana y en el área de Golgi (Figura 5A). En siete casos se identificó positividad para AEM, el patrón de expresión fue similar a CD30; sin embargo, la proporción de células neoplásicas positivas fue menor.

Por definición, todos los casos fueron positivos para proteína ALK. El 75% (6/8) de casos mostraron positividad nuclear y citoplasmática (Figura 5B). En 2 de 8 casos (25%) la reactividad del anticuerpo ALK-1 fue solo citoplasmática (Figura 5C). No se identificó positividad exclusivamente nuclear.

En 6/8 casos el inmunofenotipo fue T, con positividad para CD3, CD45RO o ambos (Figura 5D). En el 25% de LACG estos marcadores fueron negativos, por lo que se clasificaron como tipo nulo. Ningún caso de LACG ALK+ mostró inmunofenotipo B. No se identificó evidencia de infección por virus de Epstein Barr (VEB) utilizando el anticuerpo LMP-1.

Figura 5. Inmunohistoquímica en LACG.



DISCUSIÓN

En esta serie se identificaron 8 (53%) linfomas anaplásicos de células grandes ALK+ de 15 neoplasias con características anaplásicas. Todos los casos correspondieron a la variante común; no se identificaron otras variantes morfológicas previamente descritas^{13, 14}. Aunque los LACG ALK-positivos mostraron diversos patrones morfológicos; en ningún caso el número de histiocitos o neutrófilos fue suficientes para categorizar los casos como LACG linfocítico o rico en neutrófilos. En otras series, se ha reportado una frecuencia de 65¹² a 100%²⁵ de casos que muestran la variante común; la segunda variante histológica frecuente es el LACG linfocítico (11.3%)¹². Probablemente, por reducido número de casos en nuestra serie no fue posible identificar variantes poco frecuentes.

Al igual que en otras series^{12, 24, 25}, el 100 y 87% de los casos mostraron positividad para CD30 y AEM respectivamente, lo que confirma el valor diagnóstico de estos marcadores en LACG²⁶. El AEM es una sialomucina epitelial codificada por el gen MUC1 en el cromosoma 1q21-24²⁷, al igual que la molécula CD30/Ki-1 (codificada en 1p36). Es probable que la t(2:5) estimule la expresión de estas moléculas en las células neoplásicas.

La proteína ALK no se expresa normalmente en células linfoides. El anticuerpo monoclonal ALK1 reconoce un epítipo resistente a formol en la proteína química ALK-NPM y en la proteína humana ALK normal²⁸. En este trabajo, todos los casos

fueron positivos para ALK; con respecto al patrón de tinción, el 25% (2/8) de los casos mostraron positividad exclusivamente citoplasmática. Esta observación se ha informado previamente con una frecuencia de 15¹⁹ a 20%^{12, 20, 24}. Una posible explicación es que las células neoplásicas presentan alteraciones genéticas diferentes a t(2;5), en las cuales el gen ALK en el cromosomas 2 se une a un gen diferente a NPM. Es posible que la proteína resultante active ALK cinasa pero no contenga ningún dominio que dirija la proteína al núcleo; por lo que la traducción inmunohistoquímica, es la reactividad restringida al citoplasma.

Como en la clasificación de LACG de la OMS¹¹, la mayoría de los casos de LACG ALK-positivos en esta serie, mostraron inmunofenotipo T y en ningún caso se observó evidencia de inmunofenotipo B. Por medio de estudios moleculares⁶, se ha mostrado que generalmente los LACG son de origen T. Sin embargo, las células neoplásicas exhiben fenotipo aberrante con pérdida de varios marcadores asociados a células T. El CD3 y CD45RO, que son los marcadores de células T más utilizados, son negativos en más del 50% de LACG; CD43 es generalmente positivo, sin embargo, su sensibilidad y especificidad como marcado de linaje es baja^{6, 11}. Cuando se realiza la evaluación de LACG por medio de inmunohistoquímica, ocasionalmente, las células neoplásicas no expresan marcadores T y son clasificadas como tipo nulo. Sin embargo, se ha informado que al analizar este subgrupo con estudios moleculares, muestra rearreglo de receptores de células T.

Con respecto al diagnóstico diferencial se debe considerar el LDCGB anaplásico. Se caracteriza por células grandes, ovaladas o poligonales con núcleos pleomórficos semejantes a células de Reed-Sternberg. Estas células muestran infiltración sinusoidal, patrón de crecimiento sólido e inmunofenotipo B con reactividad para CD20 y CD79a¹⁵. También, puede haber sobreposición morfológica entre LACG y LH. Ocasionalmente, el LACG con infiltración ganglionar parcial puede mostrar patrón nodular y estar asociado con fibrosis. Por otro lado, se ha observado que el LH puede presentar mantos sólidos de variantes de células de Reed-Sternberg que semejan LACG. Sin embargo, utilizando marcadores de células T, ALK, AEM y CD15 es posible hacer la distinción entre las dos categorías¹¹. Por último, se debe considerar la histiocitosis / sarcoma de células de Langerhans. Se trata de neoplasias con infiltración sinusoidal por células grandes, de núcleos indentados y/o lobulados con hendiduras nucleares y citoplasma abundante. Estas células muestran expresión de CD1a y proteína S-100 y son negativas para marcadores genéricos de células T, así como, CD30, AEM y ALK¹³.

Los resultados de esta serie están de acuerdo con informes previos que indican que los LACG ALK positivos representan una entidad clinicopatológica que se presenta en pacientes jóvenes y co-expresa marcadores de células T, AEM y CD30. Se necesitan estudios con seguimiento a largo plazo para determinar el pronóstico en este tipo de linfoma.

CONCLUSIONES

Los LACG ALK positivos se detectaron en 53% de linfomas de células grandes con morfología anaplásica y, en la mayoría de los casos mostraron positividad nuclear y citoplasmática con el anticuerpo ALK1, así como, co-expresión de CD30, AEM y marcadores genéricos de células T. La identificación, por medio de inmunohistoquímica, de expresión de ALK tiene importantes implicaciones diagnósticas para el estudio de linfomas de células grandes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Grovas A, Fremgen A, Rauch A, Ruyman FB, Hutchinson CL, Winchester DP, Menck HR. The national cancer database report on patterns of childhood cancer in the United States. *Cancer* 1997; 80: 2321-2332.
2. Mora J, Filippa DA, Thaler HT, Polyak T, Cranor ML, Wollner N. Large cell non-Hodgkin lymphoma of childhood. *Cancer* 2000; 88: 186-197.
3. Murphy SB: Pediatric lymphomas: recent advances and commentary on Ki-1 positive anaplastic large cell lymphoma of childhood. *Ann Oncol* 1994; 5: S1.
4. Wright D, Mc Keever P, Carter R. Childhood non-Hodgkin lymphomas in the United Kingdom: Findings from de UK children's cancer study. *J Clin Pathol* 1997; 50: 128-135.
5. Schwab U, Stein H, Lemke H, Kirchner H, Schaadt M. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature* 1982; 299: 65-67.
6. Jaffe ES. Anaplastic large cell lymphoma: The shifting sands of diagnostic hematopathology. *Mod Pathol* 2001; 14: 219-228.
7. Stein H, Mason DY, Gardes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H, Schwarting R, Lennert K. The expression of Hodgkin's disease associated Ki-1 antigen in reactive and

- neoplastic lymphoid tissues: evidence that Stenberg-Reed cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985; 66: 848-858.
8. Rimokh R, Magaud JP, Berger F, Samarnt J, Coiffer B, Germain D, Mason DY. A translocation involving the specific breakpoint (q35) on chromosome 5 is characteristic of anaplastic large cell lymphoma ("Ki-1 lymphoma"). *Br J Hematol* 1989; 71: 31-40.
 9. Stansfeld A, Diebold J, Kapanci Y, Kelenyi G, Lennert K, Mioduszeska O, Noel H, Rilke F, Sundstrom C, Van Unnik J, Wright D. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* 1988; 1; 292-301.
 10. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks P, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Issacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri SA, Ralfkier E, Warnke RA. A Revised European American classification of lymphoid neoplasms: A proposal for the International Lymphoid Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-1370.
 11. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. *Pathology and Genetics. Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues.* World Health Organization of Tumours. IARC Press, Lyon. 2001.
 12. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, Amin C, Brugières L, Terrier-Lacombe MJ, Haralambieva E, Pulford K, Pileri S, Morris SW, Mason DY, Delsol G. ALK-positive Lymphoma: A single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood* 1998; 91: 2076-2084.

13. Pireli S, Falini B, Delsol G, Stein H, Baglioni P, Poggi S. Lymphohistiocytic T-cell lymphoma (anaplastic large cell lymphoma CD30+/Ki1+) with a high content of reactive histiocytes. *Histopathol* 1990; 16: 383-391.
14. Kinney M, Collins m, Greer J, Whitlock J, Sioutos N, Kadin M. A small-cell-predominant variant of primary Ki-1 (CD30) + T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 859-868.
15. Haralambieva E, Pulford KA, Lamant L, Pileri S, Roncador G, Gatter KC, Delsol G, Mason DY. Anaplastic large-cell lymphomas of B-cell phenotype are anaplastic lymphoma kinase (ALK) negative and belong to the spectrum of diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Hematol* 2000; 109: 584-591.
16. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of the kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; 263: 1281-1290.
17. Bitter MA, Franklin WA, Larson RA, McKeithan TW, Rubin CM, Le Beau MM, Stephens JK, Vardiman JW. Morphology in Ki-1 (CD30) positive non-Hodgkin's lymphoma is correlated with clinical features and a unique chromosomal abnormality, t(2;5)(p23;q35) *Am J Surg Pathol* 1990; 14: 305.
18. Shiota M, Nakamura S, Ichinohasama R, Abe M, Akagi T, Takashita M, Mori N, Fujimoto J. Anaplastic large cell lymphoma expressing the novel chimeric protein p80^{NPM/ALK}. A distinct clinicopathologic entity. *Blood* 1995; 86: 1954.
19. Falini B, Bigerna B, Fizzotti M, Pulford K, Pileri S, Delsol G, Carbone A, Paulli M, Magrini U, et al. ALK expression defines a distinct group of T/Null lymphomas ("ALK Lymphomas") with a wide morphological spectrum. *Am J Pathol* 1998; 153: 875-886.

20. Falini B, Pileri S, Zinzani PL, Carbone A, Zagonel V, Wolf-Peeters C, Verhoef G, Menestrina F, et al. ALK+ Lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood* 1999; 93: 2697-2706.
21. Sanddlund J, Pui C, Roberts W. Clinicopathologic features and treatment outcome of children with large-cell lymphoma and the t(2;5)(p23;q35). *Blood* 1994; 84: 2467-2471.
22. Gordon B, Weisenburger D, Warkentin P, et al. Peripheral T-cell lymphoma in childhood and adolescence. *Cancer* 1993; 71: 257-263.
23. Hutchinson RE, Banki K, Shuster J, Barrett D, Dieck C, Bernard CW, Murphy B, Link P, Laver J, Schwenn M, Mathew P, Morris SW. Use of the anti-ALK antibody in the characterization of anaplastic large cell lymphoma of childhood. *Ann Oncol* 1997; 8: S37-S42.
24. Sherman CG, Zielenska M, Lorenzana AN, Pulford K, Mason DY, Hutchinson RE, Thorner PS. Morphological and phenotypic features in pediatric large cell lymphoma and their correlation with ALK expression and the t(2;5)(p23;q35). *Pediatr Develop Pathol* 2001; 4: 129-137.
25. Nakamura Sh, Shiota M, Nakagawa A, Yatabe Y, Kijima M, Motoori T, Suzuki R, Kagami Y. Anaplastic large cell lymphoma: A distinct molecular pathology entity. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 1420-1432.
26. Delsol G, Al Saati T, Gatter KC, Gerdes J, Schwiarling R, Caveriviere P, Rigal-Huguet F, Robert A, Stein H, Mason DY. Coexpression of epithelial membrane antigen (EMA), Hi-1 and interleukin-2 receptor by anaplastic large cell lymphoma. Diagnostic value in so-called malignant histiocytosis. *Am J Pathol* 1988; 130: 39-45.

27. ilkens J, Ligtenberg MJL, Vos HL, Litvinov SV. Cell membrane associated mucins and their adhesion-modulating properties. *Trend Biochem Sci* 1992; 17: 359.
28. Pulford K, Lammant I, Morris S. Detection of anaplastic large cell lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)- ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood* 1997; 89: 1394-1404.
29. Bornstein-Quevedo L, Lehmann L, Vargas SO, Kosakewich HPW, Perez-Atayde AR. ALK+ Anaplastic large cell lymphoma in children. A clinicopathologic analysis. *Mod Pathol* 2003; 16: 1P.