

Evaluación de la utilidad diagnóstica de la citometría de flujo y la citología para el diagnóstico de compromiso de líquido cefalorraquídeo en linfomas no Hodgkin B en un hospital público chileno

Casandra Jara^{2,a}, Carlos Veas^{2,a}, Carolina Delgado^{1,2}, Claudia Cabezas¹, Mauricio Chandía^{2,3*}.

Assessment of diagnostic utility of cerebrospinal fluid flow cytometry immunophenotyping and cytology in B cell non-Hodgkin lymphoma in a public Chilean hospital

RESUMEN

El compromiso de líquido cefalorraquídeo (LCR) en los linfomas no Hodgkin B es un signo de mal pronóstico y el diagnóstico se realiza mediante técnicas como la citometría de flujo (CMF) y la citología convencional (CC). **Objetivo:** Evaluar la frecuencia de compromiso de LCR en LNH-B por ambas técnicas en un hospital público. **Material y métodos:** Se analizaron 97 muestras de LCR pertenecientes a 70 pacientes, 71% de sexo masculino, con una mediana de edad de 56 años (18-85 años), con diagnóstico de LNH-B y alto riesgo de infiltración de acuerdo a criterio médico. La mayoría fueron pacientes de nuevo diagnóstico (89%), con linfoma difuso de células grandes B (60%), etapa Ann-Arbor III-IV (77%). En 67 muestras (69%) se realizó en forma simultánea CC y CMF. **Resultados:** De las muestras analizadas por CMF, un 99% fueron valorables, mientras que por CC sólo un 67% ($p < 0,05$). Globalmente, un 25% de las muestras, mostraron infiltración por CMF, mientras que por CC un 18% ($p < 0,0001$). Cuarenta y cuatro muestras fueron valorables y analizadas por CC y CMF, encontrándose similar frecuencia de casos positivos (27%), 2/3 de los cuales fueron por solo una de las 2 técnicas. Por CC y/o CMF se encontró infiltración en 28% de Linfoma difuso de células grandes B. **Conclusiones:** Se detectó una mayor proporción de casos de infiltración por CMF que por CC. La CC en muestras valorables es complementaria a la CMF.

Palabras clave: Citometría de Flujo; Líquido Cefalorraquídeo; Linfoma no Hodgkin

¹Departamento de Especialidades, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
²Unidad de Anatomía Patológica, Hospital Guillermo Grant Benavente. Concepción, Chile.
³Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
^aBioquímico, MSc.

*Correspondencia: Mauricio Chandía Cabas / mchcabas@gmail.com
Laboratorio de Citometría de Flujo
Hospital Guillermo Grant Benavente,
San Martín 1436, Concepción, Chile.

Financiamiento:
Proyecto VRID (215.085.035-10),
Universidad de Concepción.

Recibido: 29 de enero de 2023.
Aceptado: 11 de julio de 2024.

ABSTRACT

*Cerebrospinal fluid (CSF) involvement in B cell non-Hodgkin lymphomas is a poor prognostic sign and diagnosis is made using techniques such as flow cytometry (FCM) and conventional cytology (CC). **Aim:** To evaluate the frequency of CSF involvement in B-NHL by both techniques in a public hospital. **Material and methods:** 97 CSF samples were analyzed in tubes with cell preservative belonging to 70 patients, 71% male, median age 56 years (18-85 years), with a diagnosis of B-NHL and risk of infiltration according to medical criteria. Most were patients from new diagnosis (89%), diffuse large B cell lymphoma (60%), and Ann-Arbor stage III-IV (77%). In 67 samples (69%), CC and CMF were performed simultaneously. **Results:** Of the samples analyzed by CMF, 99% were valuable, while by CC, only 67% ($p < 0,05$). Globally, 25% of the samples showed infiltration by CMF, while 18% by CC ($p < 0,0001$). Forty-four valuable samples were evaluable and analyzed by CC and CMF, finding a similar frequency of positive cases (27%), with two-thirds positive only by CC or CMF. Positive samples in diffuse large B cell lymphoma were 28% by CC and/or CMF. **Conclusions:** A higher proportion of infiltration cases were detected by CMF than by CC. In valuable cases, CC complements CMF.*

Keywords: Cerebrospinal fluid; Flow cytometry; Non Hodgkin Lymphoma.

El compromiso del líquido cefalorraquídeo (LCR) en linfomas no Hodgkin B (LNH-B) es más frecuente como proceso de diseminación secundaria en variedades agresivas y es un marcador de mal pronóstico, especialmente en las recaídas¹. Se produce al diagnóstico o durante la evolución de la enfermedad y tiene presentación clínica variable, pudiendo diagnosticarse también en pacientes asintomáticos^{2,3}. Esto lo diferencia de lo que ocurre en invasión meníngea por tumores sólidos, en los cuales hay una mayor proporción de casos que acontecen en pacientes con enfermedad avanzada y síntomas atribuibles al compromiso neurológico, especialmente con compromiso radicular o espinal^{4,5}.

El diagnóstico de esta complicación se realiza en forma dirigida en pacientes que poseen factores de riesgo conocidos o que presentan síntomas neurológicos, mediante imágenes como

la resonancia nuclear magnética junto al análisis de LCR o humor vítreo mediante técnicas como la citología convencional (CC) y la citometría de flujo (CMF)⁶. La biopsia no siempre es posible de realizar, debido a que menudo representa un riesgo por localización de las lesiones y el riesgo asociado a la intervención quirúrgica⁷. La CC posee menor complejidad técnica, puede complementarse con inmuno-histoquímica y tiene menor coste, sin embargo, es menos sensible que la CMF y reporta con mayor frecuencia muestras acelulares o no valorables. La CMF favorece la adquisición de una mayor cantidad de eventos y permite el análisis simultáneo de una mayor cantidad de parámetros, lo que aumenta su sensibilidad⁸.

En este trabajo nos propusimos revisar la contribución de ambas técnicas en el diagnóstico de diseminación meníngea de pacientes con linfoma No Hodgkin B.

Material y Métodos

Se obtuvo de la base de datos del laboratorio de citometría de flujo del Hospital "Dr. Guillermo Grant Benavente" (HGGB) información de 97 muestras de LCR pertenecientes a 70 pacientes, 71% de los cuales fueron de sexo masculino, con mediana de edad 56 años (18-85 años) en el periodo comprendido entre enero de 2014 a diciembre de 2018. Las muestras fueron obtenidas mediante punción lumbar en tubos acondicionados con EDTA y estabilizante celular (Transfix®). El inmunofenotipo por citometría de flujo se realizó con panel de 8 colores, siguiendo el protocolo publicado por el consorcio EuroFlow⁹. En todos los casos se incluyó CD14 (APC o APC-H7) para identificación de monocitos, CD3 (APC o APC-H7) para la identificación de linfocitos T, CD19 (PE-Cy7) para la identificación de linfocitos B y cadenas ligeras Kappa (PE) y Lambda (FITC) para evaluación de clonalidad linfoide B. Se consideró como población a la agrupación definida de al menos 5 eventos con fenotipo similar. En 67 muestras (69%) se realizó en forma simultánea citología convencional. La adquisición se realizó en citómetro FACSCantoll® mediante software DIVA (BD Biosciences, San José, California). El análisis de citometría se realizó mediante software Infinicyt® (Cytognos, Salamanca, España). El estudio contó con la aprobación del comité de ética del Servicio de Salud Concepción.

Análisis estadístico

Los datos categóricos fueron presentados como mediana, n y porcentajes y los datos numéricos como mediana y rango. Se utilizó la prueba de χ^2 para analizar diferencias entre variables categóricas y *t* de Student y U de Mann-Whitney para variables numéricas. El análisis estadístico se realizó con software estadístico SPSS, considerando significativa una $p < 0,05$.

Resultados

Las muestras fueron principalmente procedentes de pacientes de nuevo diagnóstico (89%) y en etapa Ann Arbor III-IV (77%). Los principales tipos histológicos fueron linfoma difuso de células grandes B (60%), linfoma folicular (9%) y linfoma del manto (17%). El criterio para la indicación de la punción lumbar y toma de la muestra de LCR fue la ubicación del tumor primario contigua al sistema nervioso central (ej: peridural, anillo de Waldeyer) (38%), compromiso extranodal o de médula ósea (29%), histología (linfoma de Burkitt o linfoma del manto) (23%) y síntomas sugerentes de compromiso de sistema nervioso central (10%) (Figura 1).

De las muestras analizadas por CMF, un 99% fueron valorables, mientras que por CC un 67% ($p < 0,05$) (Tabla 1). La infiltración por células linfoides B clonales se observó globalmente en 25% de las muestras por CMF y 18% por CC ($p < 0,0001$) (Figuras 2 y 3).

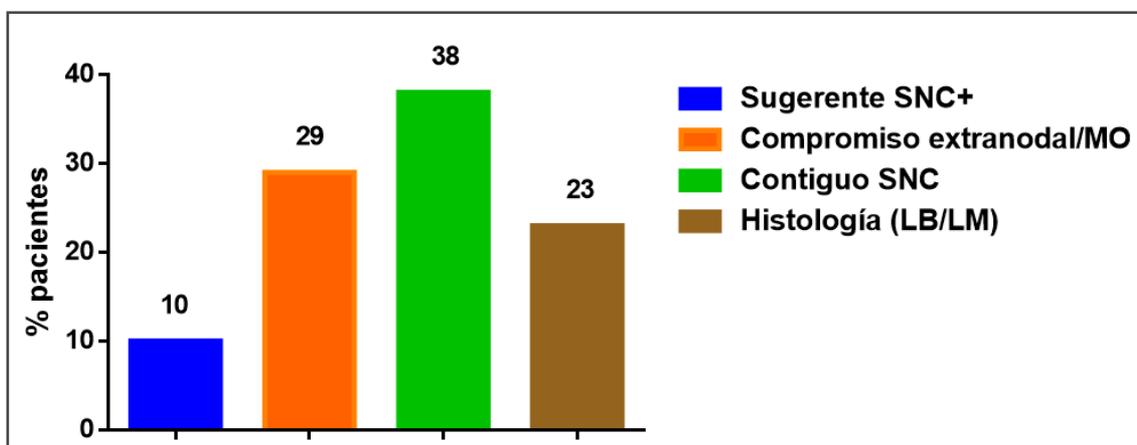


Figura 1: Indicaciones para obtención de muestra mediante punción lumbar en pacientes con linfoma No Hodgkin (n= 97).

Del total de muestras analizadas por CMF y CC (n= 67), se obtuvo 44 muestras valorables. Si se consideran sólo estas muestras, la CMF y la CC presentan similar sensibilidad ($p= NS$), sin embargo, se pierde un 25% de los resultados. En 8 casos de CC+ no se detectó células clonales por CMF y en similar número de casos hubo

detección de células clonales sólo por CMF (Tabla 2).

Las muestras que fueron positivas por ambas técnicas tuvieron en promedio 2,4% de infiltración. En la población de pacientes con linfoma difuso de células grandes B se observó infiltración por una o ambas técnicas en 28% de los casos.

Tabla 1. Proporción de muestras valorables y no valorables por citometría de flujo (CMF) y citología convencional (CC) (n= 67).

	CMF n (%)	CC n (%)	p
Muestras valorables	66 (99)	45 (67)	NS
Muestras no valorables	1 (1)	22 (33)	<0,05

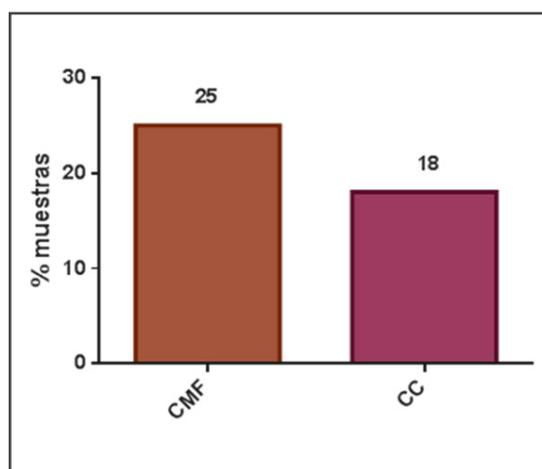


Figura 2: Frecuencia global de muestras de LCR positivas para infiltración por linfocitos B clonales mediante citometría de flujo (CMF) o citología convencional (CC).

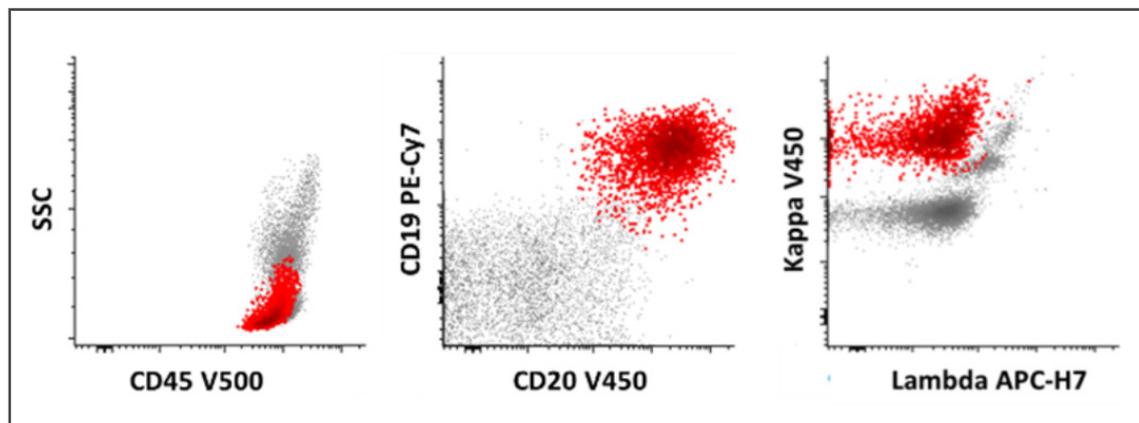


Figura 3: Histograma dot plot bivalente de LCR positivo para infiltración por células clonales B con restricción de expresión de cadena ligera Kappa (en rojo) en paciente con compromiso secundario por Linfoma No Hodgkin B.

Tabla 2. Frecuencia de hallazgos positivos para infiltración entre muestras valorables analizadas por citometría de flujo (CMF) y citología convencional (CC) (n= 44).

	CMF+	CMF-	
CC+	4	8	12/44 (27%)
CC-	8	24	32/44 (72%)
	12/44 (27%)	32/44 (72%)	

Discusión

El presente estudio demuestra que para el diagnóstico de compromiso de LNH-B en LCR, la CMF y la CC son técnicas útiles para la práctica clínica. La detección de células tumorales en el LCR puede ser complejo debido a la escasez de células de la muestra, presentándose recuentos celulares normales en cerca de la mitad de los casos. Otros factores confundidores son la contaminación de la muestra con sangre periférica, la mala viabilidad del LCR y el escaso volumen de la muestra obtenida¹⁰.

La frecuencia de infiltración de LCR en LNH-B descrita en la literatura es dependiente de la técnica utilizada. La CMF detecta un rango de 0.01%-99% de células neoplásicas y diversos autores describen una frecuencia de infiltración por esta técnica de 22-73%, en estudios que incluyen en su mayoría pacientes de nuevo diagnóstico^{2,3,8}. Por su parte, la CC diagnóstica infiltración con un punto de corte a partir de 5-20% y por ende tiene menor sensibilidad, describiéndose frecuencias de infiltración de 2-32%, que equivale a aproximadamente un tercio de los diagnósticos realizados por CMF^{2,11}. En nuestro estudio, las frecuencias de infiltración globales fueron de 25% por CMF y 18% por CC, similares a las descritas en la literatura. La mayor sensibilidad descrita para la CMF en nuestro caso no se comprobó al analizar sólo las muestras valorables, lo que unido al hecho de que hubo muestras positivas diagnosticadas sólo por CC, refuerza el valor diagnóstico de esta técnica realizada como complemento a la CMF. El compromiso de SNC es más frecuente en

linfomas agresivos, principalmente linfoma difuso de células grandes, describiéndose frecuencias de infiltración aproximada de 20-30%, similares a las descritas en nuestra serie^{2,3,8}.

Los pacientes que son asintomáticos para compromiso del SNC, se presentan en su mayoría como negativos para infiltración por CC y positivos por CMF, tienen bajos recuentos celulares y bajos porcentajes de células tumorales en LCR. La CMF es útil para la detección temprana de células tumorales en LCR antes de la aparición de síntomas clínicos¹¹. Al respecto, autores como Sancho et al han demostrado el valor pronóstico de esta condición, describiendo una mayor frecuencia de recaída del SNC y una menor supervivencia a largo plazo en pacientes con compromiso del LCR por CMF con o sin CC+ luego de una mediana de seguimiento de 20 meses¹². En nuestra serie la mayoría de los casos carecieron de manifestaciones clínicas al momento del diagnóstico.

En los últimos años, nuevas herramientas diagnósticas como los niveles de CD19 soluble en LCR y la búsqueda de DNA libre circulante de células tumorales de linfoma en LCR y plasma, se vislumbran como herramientas diagnósticas más sensibles que la CMF para el diagnóstico precoz de la invasión leptomeníngea de LNH-B^{7,13}.

Entre las limitaciones de nuestro reporte se encuentran el carácter retrospectivo y unicéntrico del estudio lo que puede no reflejar la realidad de todos los hospitales públicos del país. Por otro lado, las indicaciones de toma de muestra fueron a criterio del médico tratante y no necesariamente de acuerdo a lo propuesto por algunos

consensos, como el IPI del SNC, que refuerza el mayor riesgo de diseminación de LCR asociado al compromiso extranodal de algunos sitios como riñón y glándulas suprarrenales¹⁴.

Conclusiones

En el estudio de la invasión del LCR por linfomas no Hodgkin B, técnicas diagnósticas como la CMF y la CC permiten un diagnóstico oportuno, aún en pacientes asintomáticos. A pesar de que la CMF tiene mayor sensibilidad que la CC, se recomienda el empleo de ambas técnicas en forma simultánea.

Agradecimientos

Se agradece apoyo recibido desde Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción.

Referencias

1. Yamamoto W, Tomita N, Watanabe R, Hattori Y, Kakajina Y, Hyo R, et al. Central nervous system involvement in diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 2010; 85(1): 6-10. doi:10.1111/j.1600-0609.2010.01438.x
2. Quijano S, López A, Sancho JM, Panizo C, Debén G, Castilla C, et al. Identification of Leptomeningeal Disease in Aggressive B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: Improved Sensitivity of Flow Cytometry. *J Clin Oncol.* Published online February 17, 2009. doi:10.1200/JCO.2008.17.7089
3. Hegde U, Filie A, Little RF, Janik J, Grant N, Steinberg S, et al. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: The role of flow cytometry versus cytology. *Blood.* 2005; 105(2): 496-502. doi:10.1182/blood-2004-05-1982
4. Kaplan JG, DeSouza TG, Farkash A, Shafran B, Pack D, Rehman F, et al. Leptomeningeal metastases: Comparison of clinical features and laboratory data of solid tumors, lymphomas and leukemias. *J Neurooncol.* 1990; 9(3): 225-229. doi:10.1007/BF02341153
5. van Oostenbrugge RJ, Twijnstra A. Presenting features and value of diagnostic procedures in leptomeningeal metastases. *Neurology.* 1999; 53(2): 382-385. doi:10.1212/wnl.53.2.382
6. Nam AS, Giorgadze T, Tam W, Chadburn A. Assessment of the Utility of Cytology and Flow Cytometry of Cerebrospinal Fluid Samples in Clinical Practice. *Acta Cytol.* 2018; 62(2): 130-136. doi:10.1159/000487070
7. Bobillo S, Crespo M, Escudero L, Mayor R, Raheja P, Carpio C, et al. Cell free circulating tumor DNA in cerebrospinal fluid detects and monitors central nervous system involvement of B-cell lymphomas. *Haematologica.* 2020; 106(2): 513-521. doi:10.3324/haematol.2019.241208
8. Ahluwalia MS, Wallace PK, Peereboom DM. Flow cytometry as a diagnostic tool in lymphomatous or leukemic meningitis. *Cancer.* 2012; 118(7): 1747-1753. doi:10.1002/cncr.26335
9. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden V, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012; 26(9): 1908-1975. doi:10.1038/leu.2012.120
10. Bromberg JEC, Breems DA, Kraan J, Bikker G, van der Holt P, Sillevs Smitt P, et al. CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies. *Neurology.* 2007; 68(20): 1674-1679. doi:10.1212/01.wnl.0000261909.28915.83
11. Wilson WH, Bromberg JEC, Stetler-Stevenson M, Steinberg S, Martin-Martin L, Muñiz C, et al. Detection and outcome of occult leptomeningeal disease in diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Haematologica.* 2014; 99(7): 1228-1235. doi:10.3324/haematol.2013.101741
12. Sancho JM, Orfao A, Quijano S, García O, Panizo C, Pérez-Ceballos E, et al. Clinical significance of occult cerebrospinal fluid involvement assessed by flow cytometry in non-Hodgkin's lymphoma patients at high risk of central nervous system disease in the rituximab era. *Eur J Haematol.* 2010; 85(4): 321-328. doi:10.1111/j.1600-0609.2010.01478.x
13. Muñiz C, Martín-Martín L, López A, Sánchez-González B, Salar A, Almeida J, et al. Contribution of cerebrospinal fluid sCD19 levels to the detection of CNS lymphoma and its impact on disease outcome. *Blood.* 2014; 123(12): 1864-1869. doi:10.1182/blood-2013-11-537993
14. Schmitz N, Zeynalova S, Nickelsen M, Kansara R, Villa D, Sehn L, et al. CNS International Prognostic Index: A Risk Model for CNS Relapse in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With R-CHOP. *J Clin Oncol.* Published online July 5, 2016. doi:10.1200/JCO.2015.65.6520