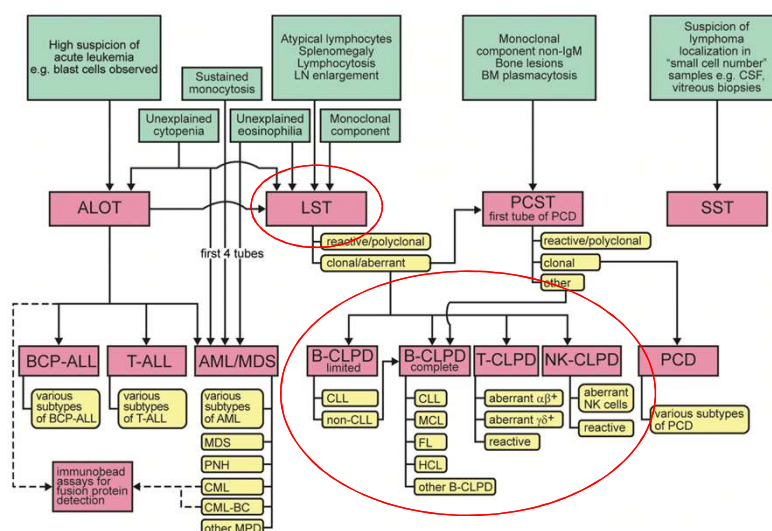



# Papel de la citometría de flujo en el diagnóstico de los SLPC-B

**Samuel Romero Domínguez**  
Servicio de Hematología  
Hospital Universitario y Politécnico La Fe


Valencia, 2 de mayo de 2022

## Panel SLPC-B EuroFlow






# Clasificación SLPC-B




Mature B-cell neoplasms	Pediatric-type follicular lymphoma*
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma	<i>Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement*</i>
Monoclonal B-cell lymphocytosis*	Primary cutaneous follicle center lymphoma
B-cell prolymphocytic leukemia	Mantle cell lymphoma
Splenic marginal zone lymphoma	In situ mantle cell neoplasia*
Hairy cell leukemia	Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
<i>Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>	Germinal center B-cell type*
<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>	Activated B-cell type*
<i>Hairy cell leukemia-variant</i>	T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Lymphoplasmacytic lymphoma	Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)
Waldenström macroglobulinemia	Primary cutaneous DLBCL, leg type
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*	EBV <sup>+</sup> DLBCL, NOS*
μ heavy-chain disease	<i>EBV<sup>+</sup> mucocutaneous ulcer*</i>
γ heavy-chain disease	DLBCL associated with chronic inflammation
α heavy-chain disease	Lymphomatoid granulomatosis
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*	Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Plasma cell myeloma	Intravascular large B-cell lymphoma
Solitary plasmacytoma of bone	ALK <sup>+</sup> large B-cell lymphoma
Extrasosseous plasmacytoma	Plasmablastic lymphoma
Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*	Primary effusion lymphoma
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	<i>HHV8<sup>+</sup> DLBCL, NOS*</i>
Nodal marginal zone lymphoma	Burkitt lymphoma
<i>Pediatric nodal marginal zone lymphoma</i>	<i>Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*</i>
Follicular lymphoma	High-grade B-cell lymphoma, with <i>MYC</i> and <i>BCL2</i> and/or <i>BCL6</i> rearrangements*
In situ follicular neoplasia*	High-grade B-cell lymphoma, NOS*
Duodenal-type follicular lymphoma*	B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma

Swerdlow SH, et al. Blood. 2016



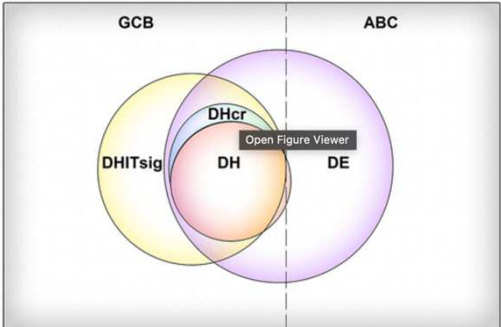
# Clasificación SLPC-B

## Complejidad en la clasificación







### Subtipos del espectro histológico del linfoma difuso de células grandes B

1. Linfoma difuso de células B grandes sin especificar (NOS)	Variantes morfológicas  Subtipos moleculares	I. Centroblastico II. Inmunoblastico  I. Subtipo de células B del centro germinal	III. Anaplásico IV. Otras variantes raras  II. Subtipo de células B activadas
2. Otros linfomas de células B grandes	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Linfoma de células B grandes rico en células T e histiocitos</li> <li>● Linfoma difuso de células B grandes primario del SNC</li> <li>● Linfoma difuso de células B grandes primario cutáneo tipo pielea</li> <li>● Linfoma difuso de células B grandes VEB-positivo sin especificar (NOS)</li> <li>● Linfoma difuso de células B grandes asociado con inflamación crónica</li> <li>● Linfoma primario de cavidades</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Granulomatosis linfomatoide</li> <li>● Linfoma de células B grandes con reordenamiento de <i>IRF4</i></li> <li>● Linfoma de células B grandes primario mediastínico (tímico)</li> <li>● Linfoma de células B grandes intravascular</li> <li>● Linfoma de células B grandes <i>ALK</i> positivo.</li> <li>● Linfoma plasmablastico</li> <li>● Linfoma difuso de células B grandes <i>HHV-8</i> positivo</li> </ul>	
3. Linfoma de células B de alto grado	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Linfoma de células B de alto grado con reordenamiento de <i>MYC</i> y <i>BCL2</i> y/o <i>BCL6</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Linfoma de células B de alto grado, sin especificar (NOS)</li> </ul>	
4. Linfoma de células B inclasificable, con rasgos intermedios entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Hodgkin clásico			



Modificado de Swerdlow SH, et al. Blood. 2016  
Papageorgiu SG, et al. Ther Adv Hematol. 2021

		<h2 style="text-align: center;">Panel SLPC-B EuroFlow</h2>							
	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPy5.5	PECy7	APC	APCH7	
<b>Tubo 1 (LST)</b>	CD4 + CD20	CD45	CD8 + Lambda	CD56 + Kappa	CD5	CD19 + TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38	
<b>Tubo 2 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43	
<b>Tubo 3 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD31	CD305 (LAIR1)	CD11c	CD19	IgMs	CD81	
<b>Tubo 4 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185 (CXCR5)	CD49d	
<b>Tubo 5 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA DR	CD19	CD27	-	

		<h2 style="text-align: center;">Panel SLPC-B EuroFlow</h2>							
	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPy5.5	PECy7	APC	APCH7	
<b>Tubo 1 (LST)</b>	<b>CD4 + CD20</b>	<b>CD45</b>	<b>CD8 + Lambda</b>	<b>CD56 + Kappa</b>	<b>CD5</b>	<b>CD19 + TCR <math>\gamma\delta</math></b>	<b>CD3</b>	<b>CD38</b>	
<b>Tubo 2 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43	
<b>Tubo 3 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD31	CD305 (LAIR1)	CD11c	CD19	IgMs	CD81	
<b>Tubo 4 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185 (CXCR5)	CD49d	
<b>Tubo 5 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA DR	CD19	CD27	-	

## Lymphoid screening tube (LST)

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 1 (LST)</b>	CD4 + CD20	CD45	CD8 + Lambda	CD56 + Kappa	CD5	CD19 + TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38

Marcadores principales identificación:

- CD45: definición compartimentos linfoides maduros y precursores
- CD3: identificación LT, exclusión LB y NK
- CD19 y CD20
  - Identificación LB, exclusión LT y NK
  - Junto con CD45: precursor LB CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>-/lo</sup>, CD45<sup>lo</sup> vs LB maduro CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>hi</sup>, CD45<sup>hi</sup>
- CD56: NK en zona linfocito CD45, sin CD3 ni CD19

*JJM van Dongen, et al. Leukemia. 2012*

## Lymphoid screening tube (LST)

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 1 (LST)</b>	CD4 + CD20	CD45	CD8 + Lambda	CD56 + Kappa	CD5	CD19 + TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38

Marcadores adicionales selección subpoblaciones linfoides:

- LB: kappa y lambda (clonalidad)
- LT: CD4, CD8 y CD56
- NK: CD56 y CD8

Otros marcadores añadidos posteriormente:

- CD38: fenotipo normal vs anormal, precursores LB, células plasmáticas
- TCR  $\gamma\delta$ : subtipos LT
- CD5: fenotipo normal vs anormal

*JJM van Dongen, et al. Leukemia. 2012*

**LaFe** Hospital Universitari i Politècnic **Lymphoid screening tube (LST)** Instituto de Investigación Sanitaria LaFe

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 1 (LST)</b>	CD4 + CD20	CD45	CD8 + Lambda	CD56 + Kappa	CD5	CD19 + TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38

**LB**

- CD19
- CD20
- Kappa
- Lambda
- CD5
- CD38

**LT**

- CD3
- CD4 y CD8
- CD56
- CD5
- TCR  $\gamma\delta$
- CD38

**NK**

- CD56
- CD8
- CD38

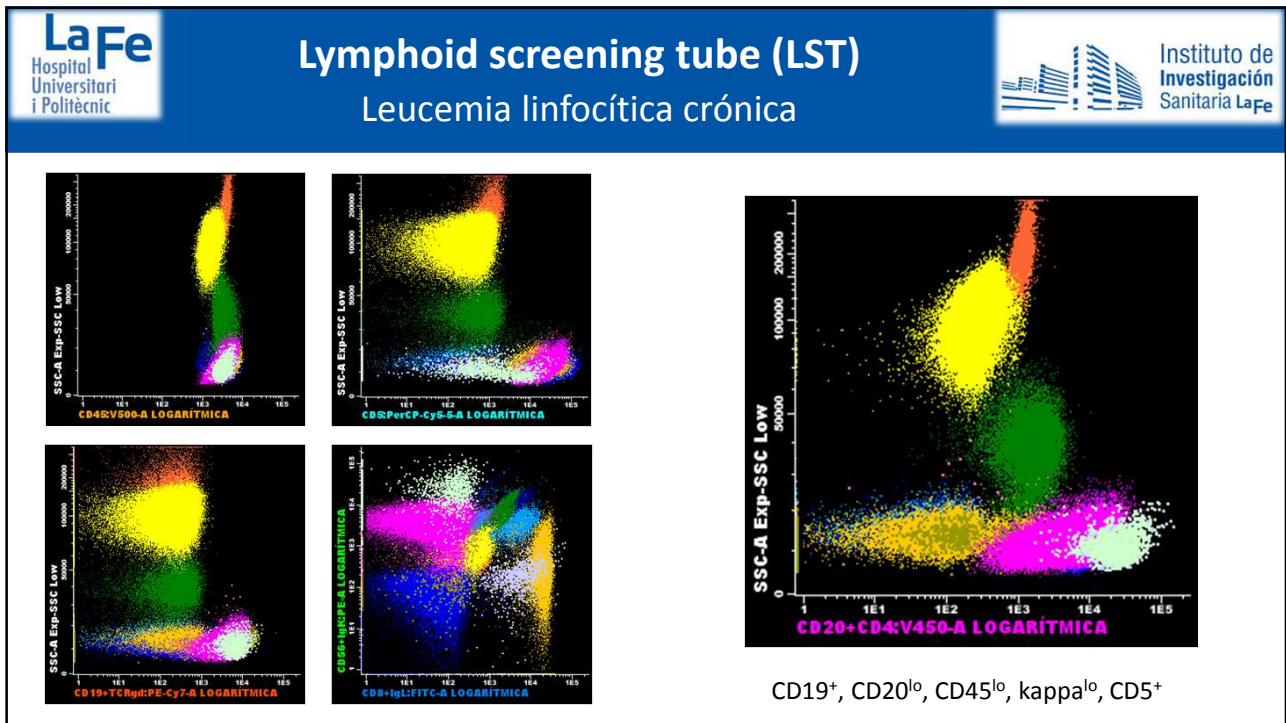
Sensibilidad fenotipos atípicos ( $\geq 0,1\%$ ) = 97,4% →      99,4%      94%      94,1%


*JJM van Dongen, et al. Leukemia. 2012*

**LaFe** Hospital Universitari i Politècnic **Lymphoid screening tube (LST)** Instituto de Investigación Sanitaria LaFe

**Leucemia linfocítica crónica**


	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 1 (LST)</b>	CD4 + CD20	CD45	CD8 + Lambda	CD56 + Kappa	CD5	CD19 + TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38
<b>LLC</b>	CD20 <sup>lo</sup>	CD45 <sup>lo</sup>	lambda <sup>lo</sup>	kappa <sup>lo</sup>	CD5 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>	-	Variable





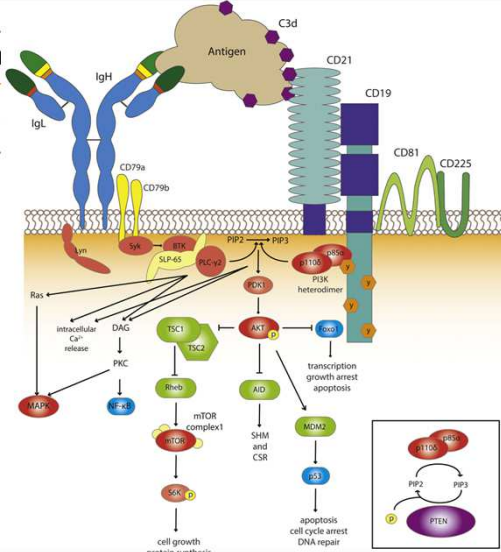
## Lymphoid screening tube (LST)

### Marcadores específicos: CD19




	PacB	PacO	FITC	PE	PerC
<b>Tubo 1 (LST)</b>	CD4 + CD20	CD45	CD8 + Lambda	CD56 + Kappa	C

- Complejo co-receptor BCR junto con CD21, CD81 y CD225
- Función co-estimuladora vía señalización de BCR → amplifica
- Función señalización complemento → respuesta inmune adaptativa
- Marcador universal LB:
  - ↓: LF, LDCGB, tto. Ibrutinib
  - ↑: tricoleucemia




Wentink MWJ, et al. Clin Immunol. 2018





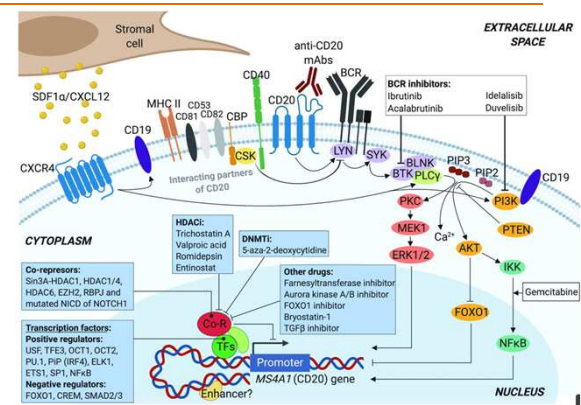
## Lymphoid screening tube (LST)

### Marcadores específicos: CD20




	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 1 (LST)</b>	CD4 + CD20	CD45	CD8 + Lambda	CD56 + Kappa	CD5	CD19 + TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38

- Proteína de superficie LB (y algunos LT)
- Función de unión entre BCR y el microambiente
- Marcador LB maduro:
  - ↓: LLC, tto. anti-CD20
  - ↑: tricoleucemia




Pavlasova G, et al. Haematologica. 2020



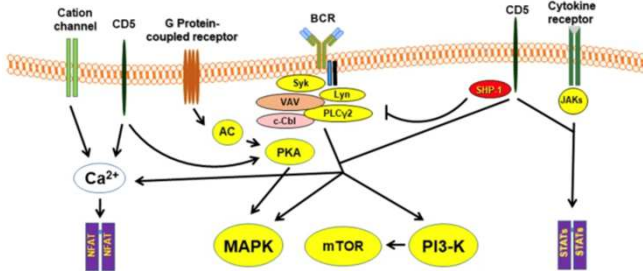
## Lymphoid screening tube (LST)

### Marcadores específicos: CD5




	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 1 (LST)</b>	CD4 + CD20	CD45	CD8 + Lambda	CD56 + Kappa	CD5	CD19 + TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38

- Miembro superfamilia "scavenger receptor cysteine-rich (SRCR)"
- Expresado en el LB naïve en su proceso de salida de médula ósea y migración folículo linfoide
- Respuesta innata rápida humoral
- Expresión:
  - LB naïve
  - Positivo homogéneo: LLC-B, LCM
  - Positivo débil/parcial: trico, LZM, LLP




Taher TE, et al. Cell Mol Immunol. 2020



## Lymphoid screening tube (LST)

### Marcadores específicos: CD38

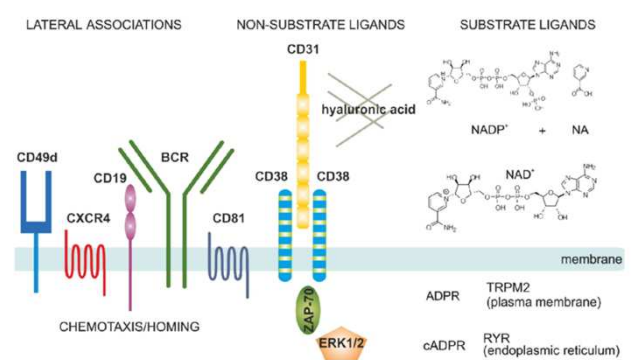



	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPcy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 1 (LST)</b>	CD4 + CD20	CD45	CD8 + Lambda	CD56 + Kappa	CD5	CD19 + TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38

- Enzima en contacto estrecho BCR (CD19, CD81)
- Movilización calcio intracelular
- Interacción matrix extracelular  $\rightarrow$  CD31
- Interacción moléculas que regulan el nicho tumoral  $\rightarrow$  CD49d
- >30%: enfermedad más agresiva, organomegalias, mayor B2, CTG mal pronóstico, peor SLP y SG\*




*Malavasi F, et al. Blood. 2011*  
*\*Damle RN, et al. Blood. 1999*

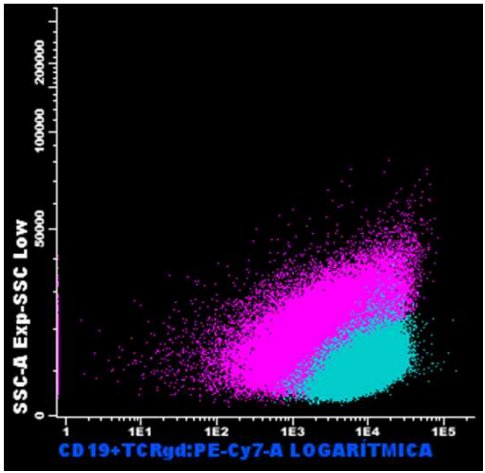


## Lymphoid screening tube (LST)

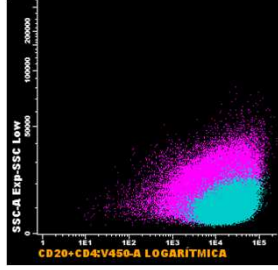
### Linfoma folicular

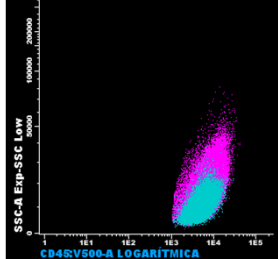


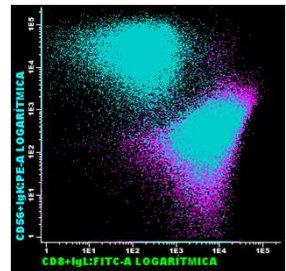
  



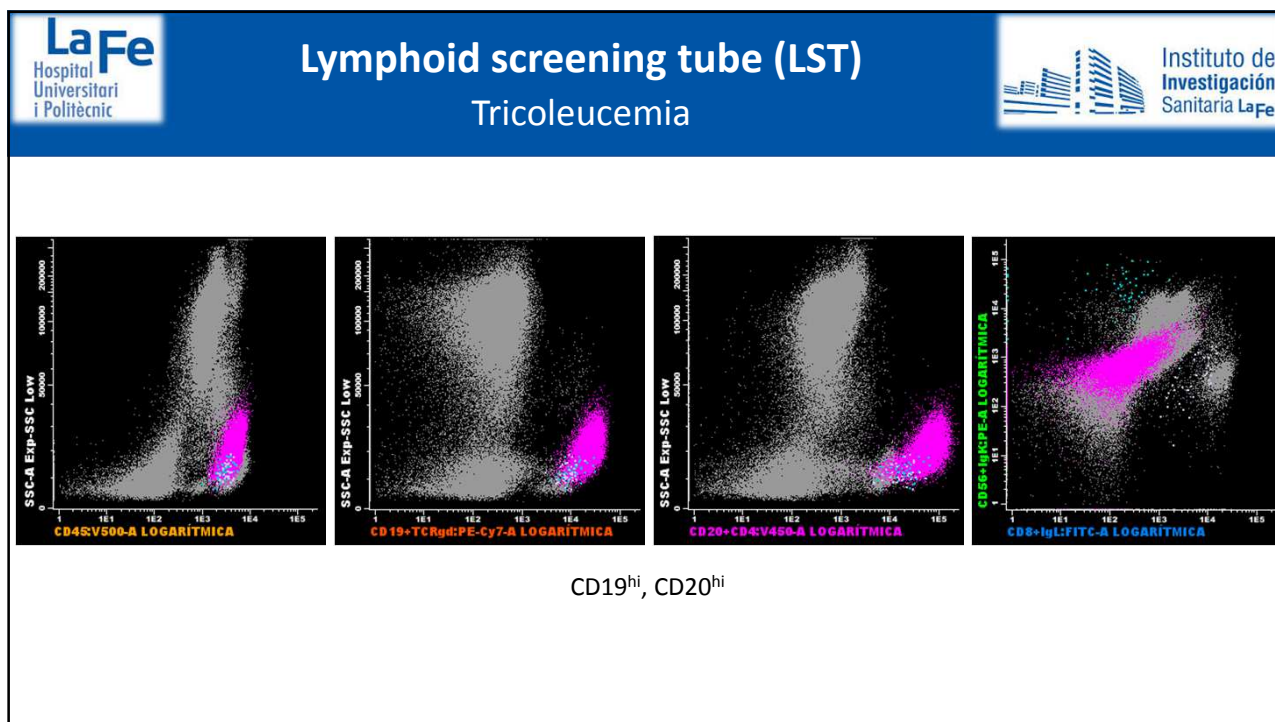
CD19<sup>lo</sup>











**LaFe** Hospital Universitari i Politécnic


**Panel SLPC-B EuroFlow**


Instituto de Investigación Sanitaria LaFe

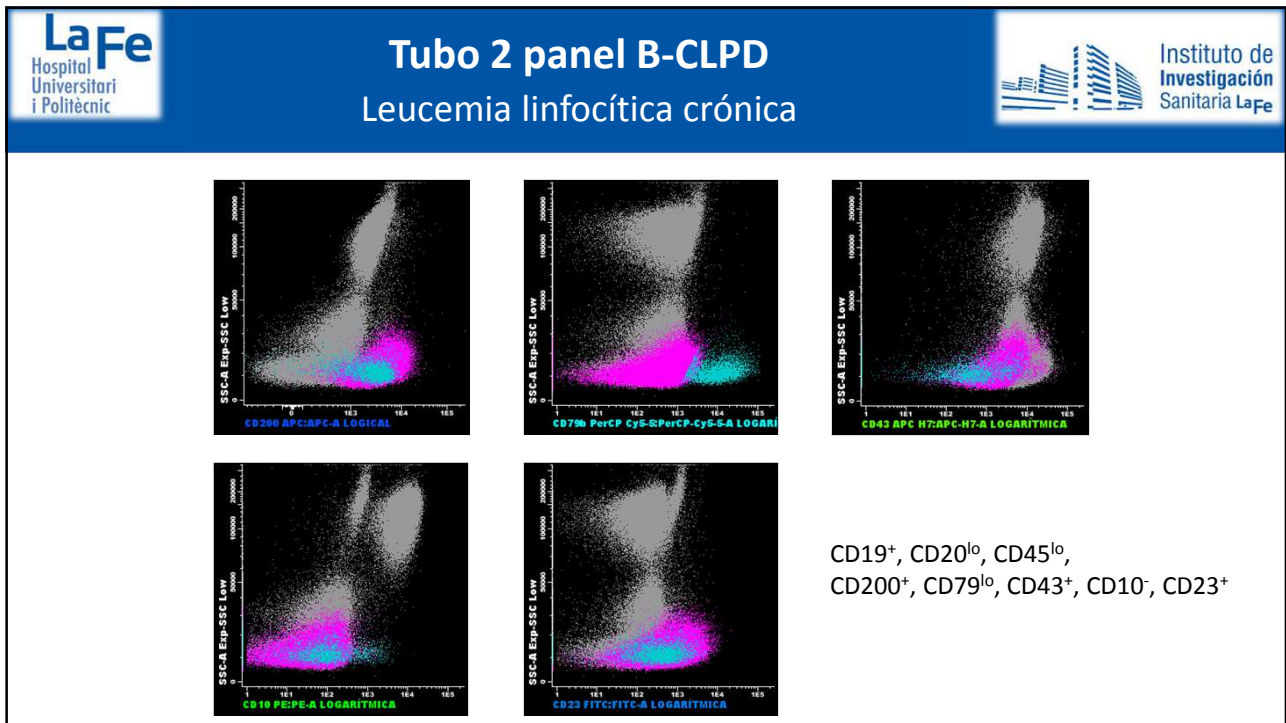
	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
Tubo 1 (LST)	CD4 + CD20	CD45	CD8 + Lambda	CD56 + Kappa	CD5	CD19 + TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38
<b>Tubo 2 (B-CLPD)</b>	<b>CD20</b>	<b>CD45</b>	<b>CD23</b>	<b>CD10</b>	<b>CD79b</b>	<b>CD19</b>	<b>CD200</b>	<b>CD43</b>
Tubo 3 (B-CLPD)	CD20	CD45	CD31	CD305 (LAIR1)	CD11c	CD19	IgMs	CD81
Tubo 4 (B-CLPD)	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185 (CXCR5)	CD49d
Tubo 5 (B-CLPD)	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA DR	CD19	CD27	-


- Marcadores *backbones*: CD19 y CD20 LB, CD45 resto poblaciones
- Marcadores caracterización: marcadores diagnóstico, asociados maduración normal LB y de nicho celular (capacidad de infiltrar MO, ganglios y bazo)

JJM van Dongen, et al. Leukemia. 2012

LaFe Hospital Universitari i Politècnic		Tubo 2 panel B-CLPD							 Instituto de Investigación Sanitaria LaFe	
	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPy5.5	PECy7	APC	APCH7		
<b>Tubo 2</b>	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43		


LaFe Hospital Universitari i Politècnic		Tubo 2 panel B-CLPD							 Instituto de Investigación Sanitaria LaFe	
Leucemia linfocítica crónica										
	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPy5.5	PECy7	APC	APCH7		
<b>Tubo 2</b>	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43		
<b>LLC</b>	Low	Low	+	-	Low	+	+	+		





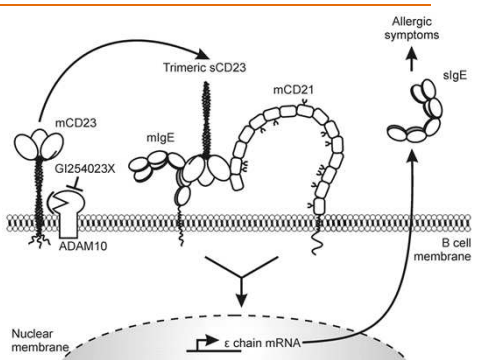
## Tubo 2 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD23



	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 2</b>	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
<b>LLC</b>	Low	Low	+	-	Low	+	+	+

- Receptor de baja afinidad de IgE en el LB
- Proteína de membrana y soluble (ADAMTS10), interacciona con CD21
- Función en la inhibición de la respuesta alérgica al reducir producción IgE
- Expresión:
  - LB activados
  - LLC, LZM



Cooper AM, et al. J Immunol. 2012

## Tubo 2 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD10



	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 2</b>	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
<b>LLC</b>	Low	Low	+	-	Low	+	+	+

- Neprilepsina, CALLA o NEP; proteína de membrana
- Función:
  - LB MO: diferenciación precursor LB (pro-B a pre-B) → reordenamiento de la cadena pesada
  - LB ganglio: en centrofóliculo *swicht* (IgM a IgG o IgA) → reordenamiento genes VDJ
  - Otras células: inactiva aminopéptidos fisiológico
- Expresión:
  - Pre-B y LB; y en fibroblastos asociados al cáncer y otras células
  - Positivo en linfomas de origen centrofolicular (LF, Burkitt, LDCGB GCB, LT)



Mishra D, et al. Mol Biol Int. 2016

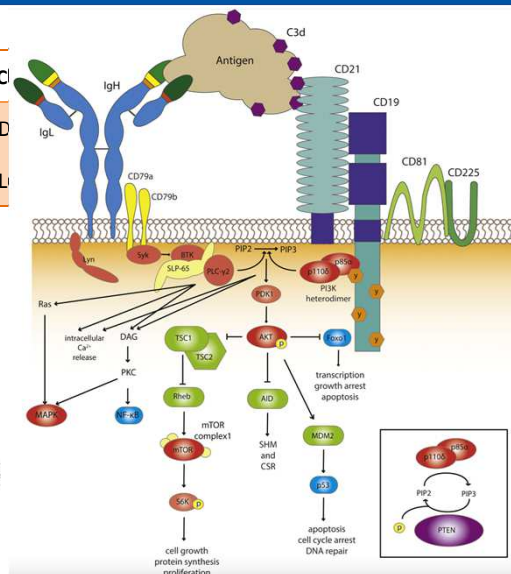
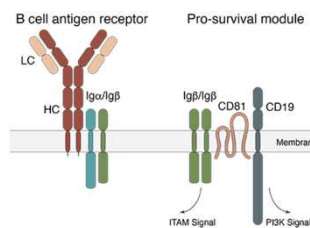
## Tubo 2 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD79b



	PacB	PacO	FITC	PE	PerC
<b>Tubo 2</b>	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b
<b>LLC</b>	Low	Low	+	-	Low

- Forma parte del BCR (Igβ) y del co-complejo CD19
- Función: es el transductor de la señal de BCR o del co-complejo CD19
- Expresión:
  - LB normales y en LNH-B
  - Disminuido en LLC



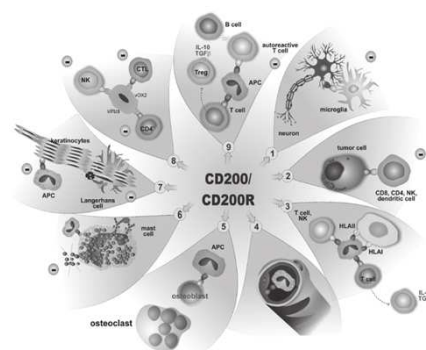
Cooper AM, et al. J Immunol. 2012  
He X, et al. EMBO J. 2018  
Wentink MWJ, et al. Clin Immunol. 2018

## Tubo 2 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD200

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 2</b>	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	<b>CD200</b>	CD43
<b>LLC</b>	Low	Low	+	-	Low	+	+	+

- CD200 y CD200R confirman una vía inmunorreguladora → punto de control inmune (*immune check point*)
- Expresión:
  - Múltiples poblaciones celulares inmunológicas
  - Media en microambiente tumoral de LH, LLC, otros...



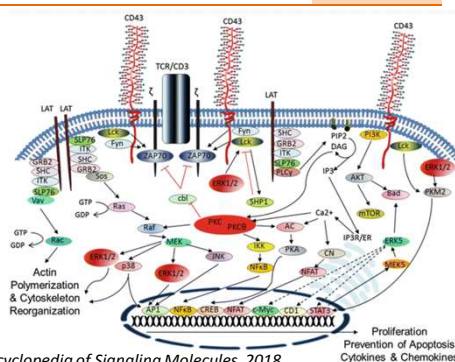
Holmannová D, et al. Acta medica. 2012

## Tubo 2 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD43

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 2</b>	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	<b>CD43</b>
<b>LLC</b>	Low	Low	+	-	Low	+	+	+

- Sialoglicoproteína de transmembrana
- Función: 1) molécula anti-adhesiva que inhibe interacción LT y citoprotectora; 2) transducción de señales
- Expresión:
  - En la mayoría de células hematopoyéticas, excepto LB maduros y hematíes
  - En linfomas se asocia a la expresión de CD5
  - Positivo: LLC, LCM, prolinfocítica
  - Déficit: síndrome de Wiskott-Aldrich




Torres-Huerta A, et al. Encyclopedia of Signaling Molecules. 2018

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 1 (LST)</b>	CD4 + CD20	CD45	CD8 + Lambda	CD56 + Kappa	CD5	CD19 + TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38
<b>Tubo 2 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
<b>Tubo 3 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD31	CD305 (LAIR1)	CD11c	CD19	IgMs	CD81
<b>Tubo 4 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185 (CXCR5)	CD49d
<b>Tubo 5 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA DR	CD19	CD27	-

*JJM van Dongen, et al. Leukemia. 2012*


	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 3</b>	CD20	CD45	CD31	CD305	CD11c	CD19	IgMs	CD81






## Tubo 3 panel B-CLPD

### Leucemia linfocítica crónica




Instituto de  
Investigación  
Sanitaria LaFe

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 3</b>	CD20	CD45	CD31	CD305	CD11c	CD19	IgMs	CD81
<b>LLC</b>	Low	Low	¿?	¿?	-	+	-	Low

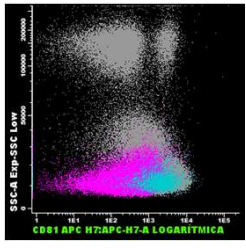


## Tubo 3 panel B-CLPD

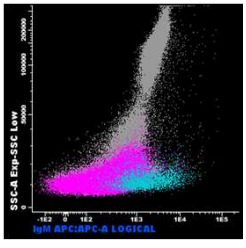
### Leucemia linfocítica crónica



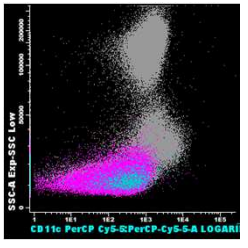
Instituto de  
Investigación  
Sanitaria LaFe



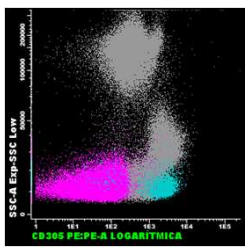
SSC-A Exp-SSC Low  
CD81 APC H7:APC-H7-A LOGARITMICA



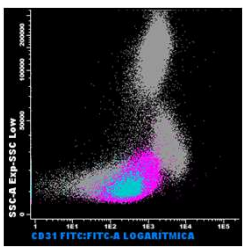
SSC-A Exp-SSC Low  
IgM APC:APC-A LOGICAL



SSC-A Exp-SSC Low  
CD11c PerCP Cy5-SPerCP-Cy5-SA LOGAR




SSC-A Exp-SSC Low  
CD200 PE:PE-A LOGARITMICA




SSC-A Exp-SSC Low  
CD31 FITC:FITC-A LOGARITMICA

CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>lo</sup>, CD45<sup>lo</sup>,  
CD81<sup>low</sup>, IgMs<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD305<sup>¿?</sup>, CD31<sup>¿?</sup>



## Tubo 3 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD31

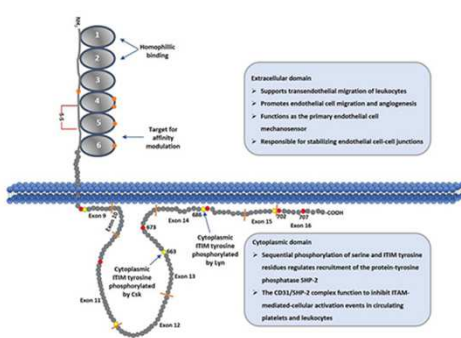



  

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 3</b>	CD20	CD45	CD31	CD305	CD11c	CD19	IgMs	CD81
<b>LLC</b>	Low	Low	¿?	¿?	-	+	-	Low


- PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*)
- Papel importante en el endotelio vascular como molécula de adhesión vascular
- Leucocitos (todos): funciones de adhesión, migración (inflamación) y señalización, hematopoyesis (diferenciación)
- Expresión:
  - Leucocitos (incluido LB), células endoteliales
  - ¿LLC? → progresión y migración → supervivencia célula tumoral





## Tubo 3 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD305

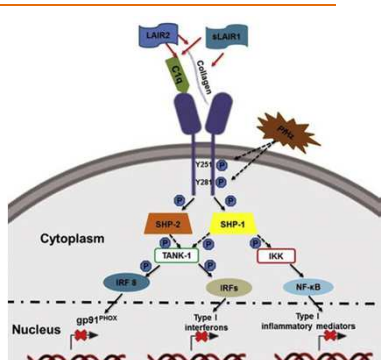


	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 3</b>	CD20	CD45	CD31	CD305	CD11c	CD19	IgMs	CD81
<b>LLC</b>	Low	Low	¿?	¿?	-	+	-	Low

- LAIR1 (*leukocyte-associated immunoglobuline-like receptor-1*), ligando del colágeno matriz extracelular y C1q complemento
- Función: inhibición de la señalización de BCR (anti-proliferativo), punto de control inmune (*immune check-point*) en LT
- Expresión:
  - Células mononucleares, LB en fases iniciales de la diferenciación
  - ¿LLC? → su expresión se asocia a mayor tiempo hasta inicio de tratamiento (se expresa en fases tempranas enfermedad)



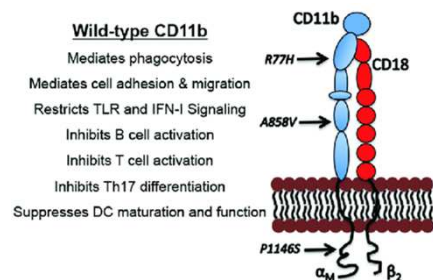
Perbrellini O, et al. Haematologica. 2014; Achieng AO, et al. EBioMedicine. 2019

## Tubo 3 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD11c

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 3</b>	CD20	CD45	CD31	CD305	CD11c	CD19	IgMs	CD81
<b>LLC</b>	Low	Low	¿?	¿?	-	+	-	Low

- Proteína transmembrana tipo integrina que forma complejo con CD18, 4 tipos (a-d). CD11b  $\approx$  CD11c
- Función: une fracción C3 complemento, fibrinógeno y moléculas de adhesión (ICAM-1)  $\rightarrow$  fagocitosis, adhesión y migración
- Expresión:
  - Dendríticas  $\gg$  monocitos-macrófagos  $\gg$  algunos linfos
  - Tricoleucemia incluida variante, LZM



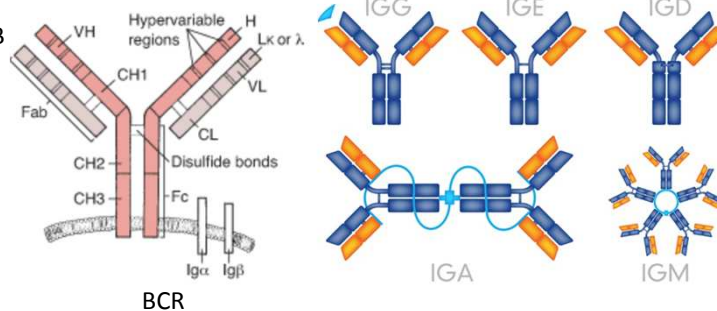
Khan SQ, et al. *Front Med (Laussane)*. 2018;  
 Hoy L, et al. *Blood*. 2020

## Tubo 3 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: IgMs

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 3</b>	CD20	CD45	CD31	CD305	CD11c	CD19	IgMs	CD81
<b>LLC</b>	Low	Low	¿?	¿?	-	+	-	Low

- Cadena pesada de BCR
- Precursor B pre-B II  $\rightarrow$  citoplasma (LLA-B común)
- Precursor B maduro  $\rightarrow$  superficie (LLA-B pre-B), hasta centrofóliculo (*switch*)
- Expresión: linfoma Burkitt, MW/LLP y LCM  $\gg$  LZM

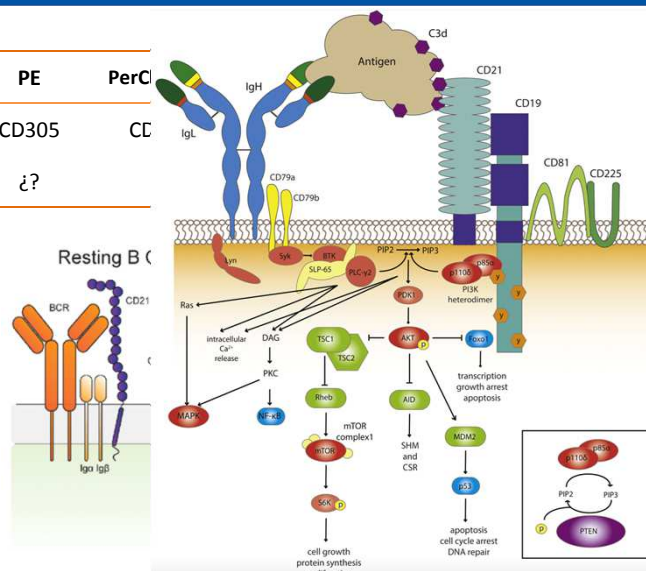


## Tubo 3 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD81

	PacB	PacO	FITC	PE	PerC
<b>Tubo 3</b>	CD20	CD45	CD31	CD305	CD81
<b>LLC</b>	Low	Low	¿?	¿?	¿?

- Tetraspanina, forma parte del co-complejo CD19 junto con CD21
- Función: regula ¿negativamente? CD19
- Se disocia tras la activación LB
- Expresión:
  - Células mesenquimales >>> precursores LB >> LB maduros, monocitos...
  - Infraexpresado en LLC







Susa KJ, et al. *Elife*. 2020

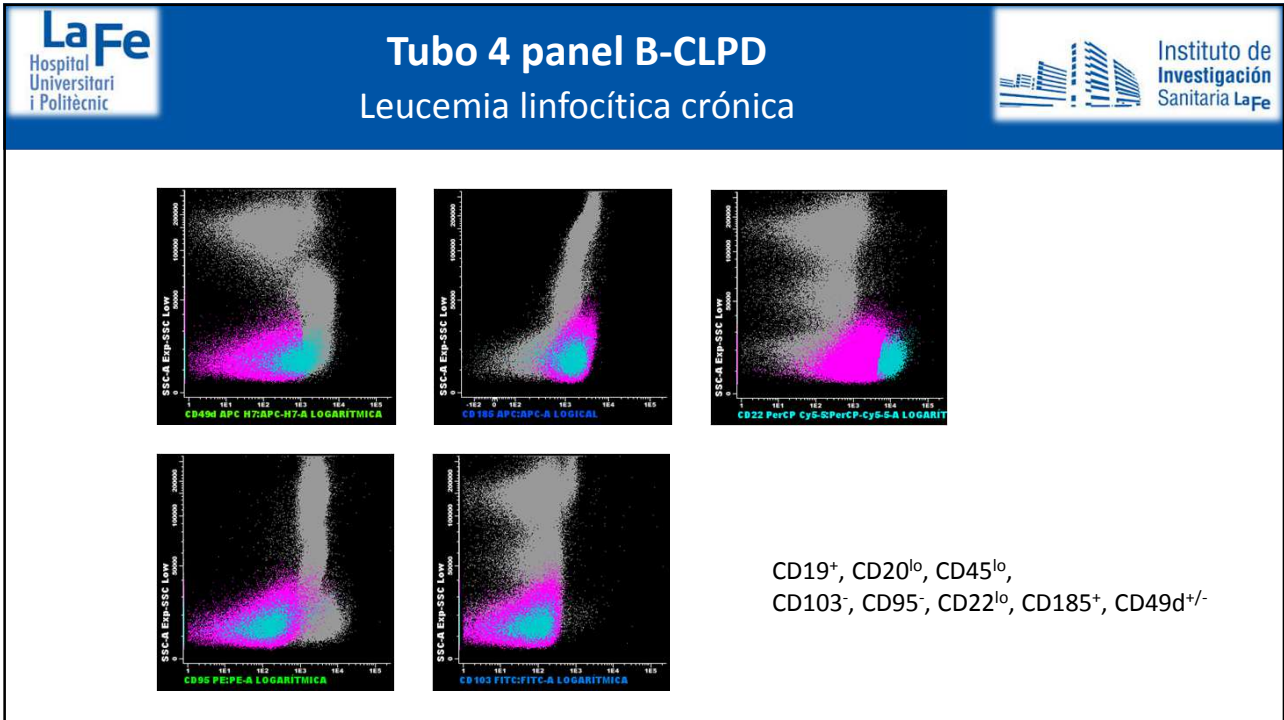
## Panel SLPC-B EuroFlow


	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 1 (LST)</b>	CD4 + CD20	CD45	CD8 + Lambda	CD56 + Kappa	CD5	CD19 + TCR γδ	CD3	CD38
<b>Tubo 2 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
<b>Tubo 3 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD31	CD305 (LAIR1)	CD11c	CD19	IgMs	CD81
<b>Tubo 4 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185 (CXCR5)	CD49d
<b>Tubo 5 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA DR	CD19	CD27	-

JJM van Dongen, et al. *Leukemia*. 2012

		<b>Tubo 4 panel B-CLPD</b>						
	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 4</b>	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185 (CXCR5)	CD49d


		<b>Tubo 4 panel B-CLPD</b>						
	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 4</b>	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185 (CXCR5)	CD49d
<b>LLC</b>	Low	Low	-	-	Low	+	+	+/-





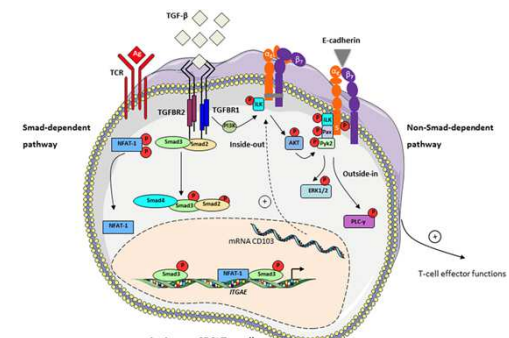
## Tubo 4 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD103




	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPcy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 4</b>	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185 (CXCR5)	CD49d
<b>LLC</b>	Low	Low	-	-	Low	+	+	+/-

- Integrina que se une a la E-cadherina
- Función: retención del LT en el nicho inflamatorio/tumoral y señalización de vías cooperativas con TCR
- Expresión:
  - Subtipos LT, no LB
  - Tricoleucemia (y trico variante)




Corgnac S, et al. Front Immunol. 2018





## Tubo 4 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD95

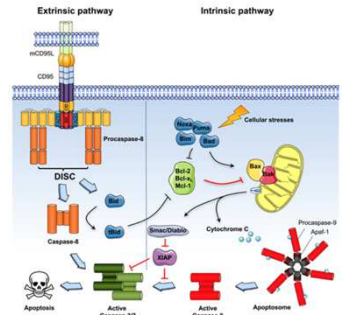



	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 4</b>	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185 (CXCR5)	CD49d
<b>LLC</b>	Low	Low	-	-	Low	+	+	+/-

- CD95 – CD95L → Fas – Fas ligando; miembro del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR)
- Marcador de centrogerminal
- Función: apoptosis celular (caspasas o Bcl), inmuno-regulación
- Expresión:
  - LB centrogerminal, LT
  - LF, LDCGB GCB, LH... Burkitt negativo




Guégan JP, et al. FEBS J. 2018



## Tubo 4 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD22

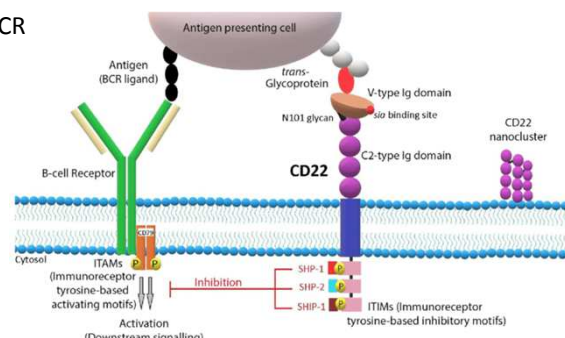


	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 4</b>	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185 (CXCR5)	CD49d
<b>LLC</b>	Low	Low	-	-	Low	+	+	+/-

- Proteína transmembrana tipo SIGLEC, en relación con BCR
- Función: inhibición de la señalización de BCR
- Expresión:
  - Marcador Pan-B
  - Expresión en todos los linfomas
  - Infraexpresión en LLC



Aujla A, et al. Biomark Res. 2019

**LaFe** Hospital Universitari i Politècnic

**Tubo 4 panel B-CLPD**  
Marcadores específicos: CD185 (CXCR5)

Instituto de Investigación Sanitaria LaFe

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 4</b>	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185 (CXCR5)	CD49d
<b>LLC</b>	Low	Low	-	-	Low	+	+	+/-

- Receptor quimiocina, ligando CXCL13
- Función: reclutamiento LB y LT para formar el folículo germinal
- Expresión:
  - LT helper folicular
  - LLC, linfoma de Burkitt

Moser B, et al. *Front Immunol.* 2015;  
Yoshitomi H, et al. *Cell Mol Immunol.* 2020

**LaFe** Hospital Universitari i Politècnic

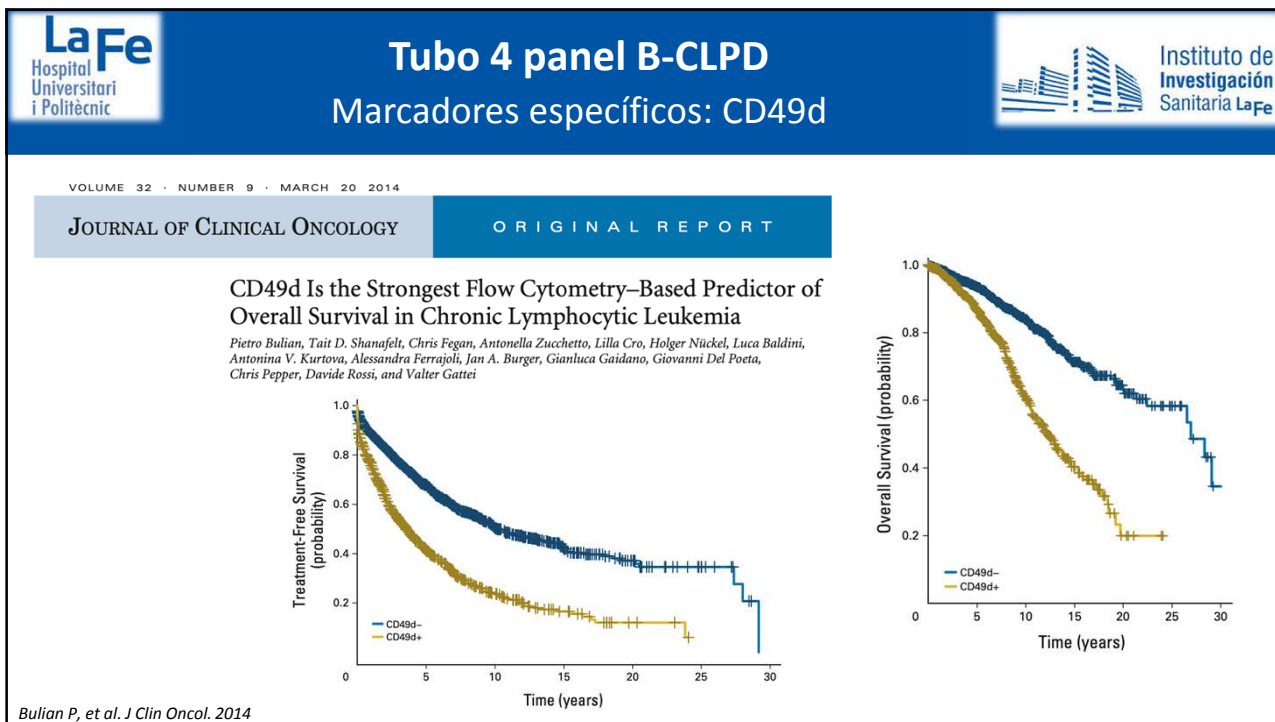
**Tubo 4 panel B-CLPD**  
Marcadores específicos: CD49d


Instituto de Investigación Sanitaria LaFe

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 4</b>	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185 (CXCR5)	CD49d
<b>LLC</b>	Low	Low	-	-	Low	+	+	+/-


- Integrina  $\alpha$ -4, VLA-1 (*very late antigen-1*)
- Función: hematopoyesis
- Principal receptor de interacción con el microambiente tumoral en LLC (VCAM-1, fibronectina, EMILIN-1...)
- Expresión:
  - Células normales?
  - En LLC mal pronóstico
  - Otros linfomas??

Dal Bo M, et al. *Hematology.* 2014





## Panel SLPC-B EuroFlow



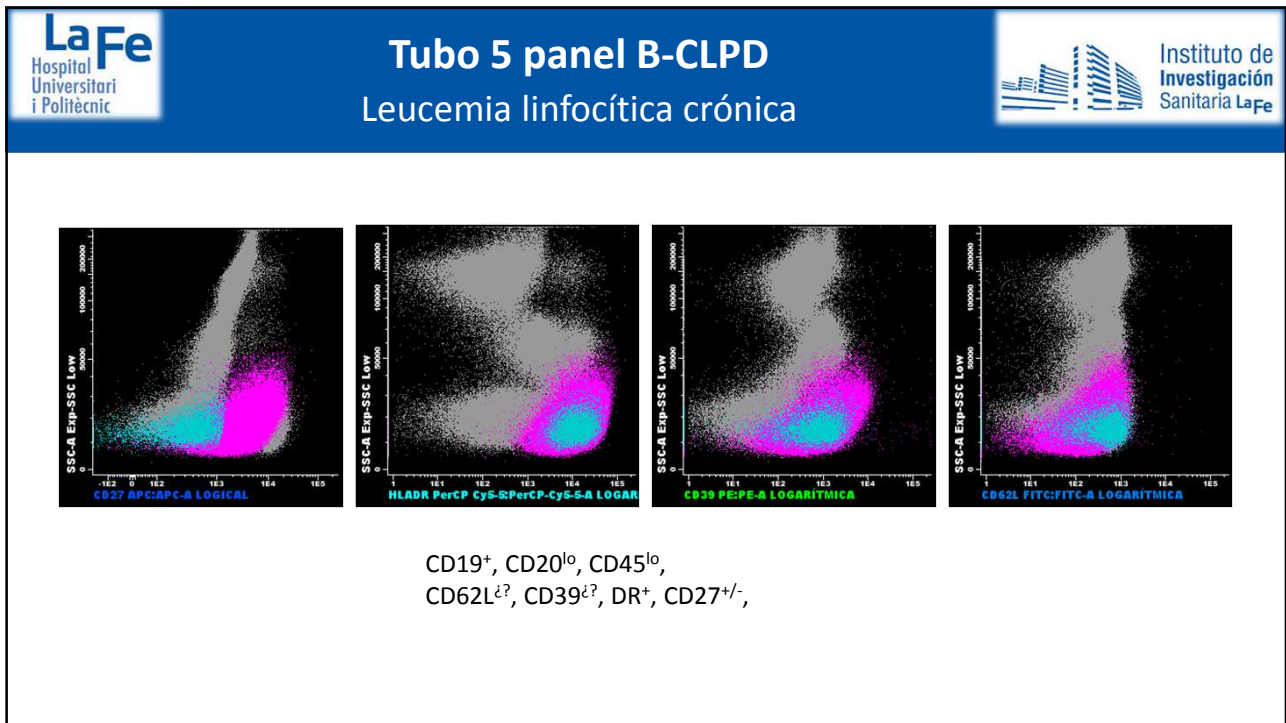
---


	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 1 (LST)</b>	CD4 + CD20	CD45	CD8 + Lambda	CD56 + Kappa	CD5	CD19 + TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38
<b>Tubo 2 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
<b>Tubo 3 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD31	CD305 (LAIR1)	CD11c	CD19	IgMs	CD81
<b>Tubo 4 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185 (CXCR5)	CD49d
<b>Tubo 5 (B-CLPD)</b>	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA DR	CD19	CD27	-

*JJM van Dongen, et al. Leukemia.* 2012

LaFe Hospital Universitari i Politècnic		Tubo 5 panel B-CLPD						Instituto de Investigación Sanitaria LaFe	
	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7	
<b>Tubo 5</b>	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA DR	CD19	CD27	-	


LaFe Hospital Universitari i Politècnic		Tubo 5 panel B-CLPD Leucemia linfocítica crónica						Instituto de Investigación Sanitaria LaFe	
	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7	
<b>Tubo 5</b>	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA DR	CD19	CD27	-	
<b>LLC</b>	Low	Low	¿?	¿?	+	+	+/-	NA	





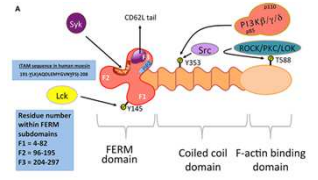
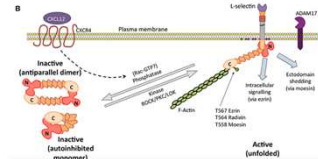
## Tubo 5 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD62L



	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 5</b>	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA DR	CD19	CD27	-
<b>LLC</b>	Low	Low	±?	±?	+	+	+/-	NA

- Proteína transmembrana de adhesión celular; L-selectina
- Función: adhesión y migración transmembrana, necesaria para migrar de la MO a SP, o de SP a ganglio
- Expresión:
  - Mayoría de poblaciones leucocitarias, en células madre
  - Linfomas ±?
  - LLC: a mayor expresión, mayor supervivencia del LB

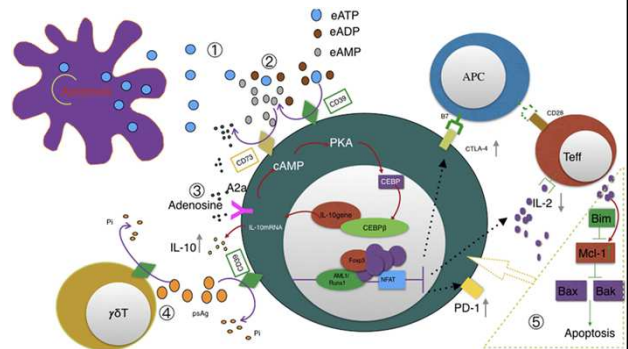
Ivetic A, et al. *Front Immunol.* 2019;  
Soliman MA, et al. *Menoufia Med J.* 2019

## Tubo 5 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD39

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 5</b>	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA DR	CD19	CD27	-
<b>LLC</b>	Low	Low	¿?	¿?	+	+	+/-	NA

- NTPDase, punto de control inmune (*immune checkpoint*), colabora con CD73
- Función: regula la inmunidad mediante la hidrólisis el ATP extracelular en adenosina
- Expresión:
  - Linfocitos (importante en Treg), dendríticas
  - Linfomas ¿?
  - LLC: pronóstico desfavorable?

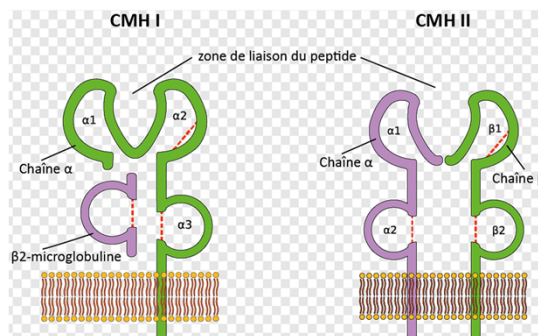


*Zhao A, et al. Front Immunol. 2017*

## Tubo 5 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: HLA-DR

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
<b>Tubo 5</b>	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLA DR	CD19	CD27	-
<b>LLC</b>	Low	Low	¿?	¿?	+	+	+/-	NA



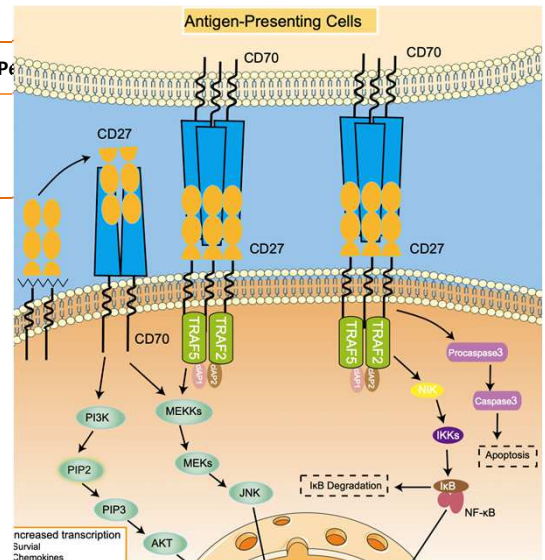


## Tubo 5 panel B-CLPD

### Marcadores específicos: CD27

	PacB	PacO	FITC	PE
<b>Tubo 5</b>	CD20	CD45	CD62L	CD39
<b>LLC</b>	Low	Low	¿?	¿?

- CD27 – CD70 → miembro del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) – ligando
- Función: co-estimulador LT → vía NK-KB y MAP quinasas → proliferación celular
- Expresión:
  - LT naïve y LT memoria, NK, LB memoria
  - Neoplasias LB memoria (post-centro germinal?)



<https://www.creative-diagnostics.com/cd27-cd70-signaling-pathway.html>

## Panel B-CLPD

### Conclusiones

- Marcadores backbones: LB CD19, CD20, CD22 y CD37 → CD19 y CD20 + CD45 para leucocitos
- Marcadores caracterización:
  - Marcadores diagnóstico, asociados maduración normal LB y de nicho celular (capacidad de infiltrar MO, ganglios y bazo)
  - CD11a, CD138, CD63, Bcl-2 cy, CD24 y CD25 no aportan información diagnóstica
  - CD95: objetivo de mejorar la identificación de centrogerminal
  - CD200: objetivo de mejorar el diagnóstico de linfoma de células del manto (+ o -??)
  - Se eliminó CD25: el panel no permite diferenciar entre tricoleucemia y trico variante → añadir CD25 si sospecha diagnóstica
  - Es difícil realizar la diferenciación entre LDCGB, LF, LLP y LZM → se mejora añadiendo CD62L, CD39, HLA-DR y CD27 (pero como??)

JJM van Dongen, et al. Leukemia. 2012

- Marcadores caracterización:
  - Dificultades en la validación:
    - Evaluación estuvo limitada por la escasa información de algunos marcadores en neoplasias linfoides B
    - Solapamiento en la expresión de algunos marcadores para distintas enfermedades
    - Heterogeneidad en la expresión de marcadores
    - Solución: PCA → mejoría en la diferenciación de los linfomas B
    - Sigue siendo difícil diferenciar entre LDCGB con LF, LZM y LLP
  - Con LST y T2 se puede hacer el diagnóstico de LLC con garantías

*JJM van Dongen, et al. Leukemia. 2012*

**¡Muchas gracias  
por vuestra atención!**