



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Descripción clínico patológica y expresión del inmunomarcador SOX11 en pacientes con linfoma del manto

Giovanni Alexander Ruiz Rojas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad De Medicina, Departamento De Medicina Interna

Unidad de Hematología

Bogotá, Colombia

2012

Descripción clínico patológica y expresión del inmunomarcador SOX11 en pacientes con linfoma del manto

Giovanni Alexander Ruiz Rojas, código 05597517

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Especialista en Hematología

Director:

Dr. Leonardo José Enciso Olivera – Especialista en Hematología

Codirector :

Oscar Messa Botero – Especialista en Patología Oncológica INC

Universidad Nacional de Colombia

Facultad De Medicina, Departamento De Medicina Interna

Unidad de Hematología

Bogotá, Colombia

2012

DEDICATORIA

Con todo mi amor, a mis padres, a mis hermanos y a mis dos preciosas sobrinas; quienes incondicionalmente siempre han estado a mi lado, apoyándome en todas mis decisiones y ayudándome en absolutamente todo.

A mi novia Andreina, quien pacientemente me ha esperado y tolerado durante todos estos años.

Giovanni Alexander Ruiz Rojas

Agradecimientos

Al profesor Leonardo José Enciso, especialista en Hematología y profesor de la Universidad Nacional de Colombia, quien día a día nos demuestra que tan elevados niveles de rendimiento académico y laboral, solo se logran con un gran esfuerzo y dedicación.

Al profesor Octavio Martínez Betancur, especialista en Hematología y profesor de la Universidad Nacional de Colombia; cuya capacidad académica e intelectual nunca dejará de impresionarme.

Al profesor Oscar Messa Botero, especialista en Patología Oncológica; quien fervientemente dedica su valioso tiempo a la enseñanza de lo que le apasiona y sin cuya ayuda no hubiese sido posible la realización de éste trabajo.

Al grupo de Patología del Instituto Nacional de Cancerología: Dra. Carmen Lucia Roa, Dra. Sandra Chinchilla, Dr. Alfredo Romero y Dr. Juan Carlos Mejía; quienes de una u otra manera me colaboraron en la realización de éste trabajo.

Al Dr. Antonio Martínez, PhD en hematopatología, del hospital Clínic de Barcelona (España), por su orientación y colaboración desinteresada, en parte del proceso de inmunotinción antiSOX11.

A la Dra. Lizeth Villamizar, epidemióloga del Instituto Nacional de Cancerología y del Hospital San José, por dedicarme muchas horas de su valioso tiempo, para el análisis estadístico de los datos y la revisión del escrito en cada paso.

A mis compañeros de residencia, Natalia y William; por el acompañamiento durante estos dos años de duras jornadas académicas y asistenciales.

Al grupo de histotecnología del Instituto Nacional de Cancerología, en especial a July Pauline Castro, quien amablemente me introdujo al campo de la inmunohistoquímica y nos realizó el proceso de inmunotinción a las muestras seleccionadas.

Al grupo de morfología y citometría de flujo del Instituto Nacional de Cancerología, en especial a la Dra. Mónica Londoño, así como a Bibiana, a Fernanda y a Andrea, por su apoyo irrestricto y desinteresado, por su amistad y por hacer de mi residencia en Hematología una estancia más placentera.

Sin todos ellos, la realización de éste trabajo de investigación no hubiera sido posible.

Resumen

Objetivos: Describir los hallazgos clínico patológicos, la expresión del inmunomarcador SOX11 patrón nuclear y la relación entre éstos, en pacientes con Linfoma de Células del Manto (LCM) diagnosticados en el Instituto Nacional de Cancerología (INC) en el periodo comprendido entre 2008 y 2011.

Diseño: Estudio de tipo observacional descriptivo serie de casos retrospectiva

Materiales y métodos: Sesenta casos de LCM observados en el INC durante un periodo de 4 años, fueron estudiados a partir de sus registros clínicos y de patología. 29 muestras de tejidos ganglionares, 1 de paladar y 1 de carrillo, fueron seleccionadas para la aplicación del inmunomarcador antiSOX11. La información recolectada fue descrita y analizada mediante técnicas estadísticas convencionales y el análisis bivariado mediante la prueba χ^2 o la prueba exacta de Fisher. Se usó el programa estadístico Stata versión 9.0.

Resultados: En los 60 casos identificados y analizados, se encontró una relación hombre a mujer de 1.7:1. La edad promedio al diagnóstico fue de 63.1 años. La mayoría de ellos (85.7%) se diagnosticaron en estadio Ann Arbor avanzado (III o IV) y 89.1% con síntomas B, aunque el estado funcional era bueno (ECOG1) solo en el 66% de los casos. La mayor parte de los casos tenían compromiso extra nodal (93.7%) principalmente dado por infiltración de médula ósea (79%). La variante citomorfológica clásica y el patrón de crecimiento difuso estuvieron presentes en el 82.7% y 73.4%, de los casos analizados, respectivamente. Solo se encontró una relación entre el índice mitótico y el sexo ($p=0.036$, Prueba exacta de Fisher). En cuanto a la expresión del anticuerpo monoclonal anti SOX11 en las 31 muestras de tejidos analizadas, se encontró que el marcador fue no contributivo.

Conclusiones: Las características clínico patológicas de pacientes con LCM observados en el INC, son similares a las mundialmente descritas. La edad avanzada, un pobre estado funcional (ECOG ≥ 2), el sexo masculino y unos elevados índices de proliferación pueden influir en el pronóstico adverso de estos pacientes. La expresión del inmunomarcador antiSOX11 fue considerada como no contributiva en nuestro estudio, debido a diferentes factores o circunstancias que podrían haber alterado esta prueba.

Palabras clave: Linfoma del manto, ciclina D1, Ki-67, SOX11.

Abstract

Objectives: To describe clinicopathological findings, the expression nuclear of SOX11 and the relationship between them, in patients with Mantle Cell Lymphoma (MCL) diagnosed at the National Cancer Institute (NCI) in the period between 2008 and 2011.

Design: Observational descriptive retrospective case series.

Material and methods: Sixty cases of MCL observed in the NCI for a period of 4 years, were studied from their medical records and pathology. 29 lymph node tissue samples, 1 palate tissue and 1 cheek tissue, were selected for the implementation of antiSOX11 immunolabeling. The information collected was described and analyzed by conventional statistical techniques and bivariate analysis using the χ^2 test or Fisher's exact test. We used Stata statistical software version 9.0.

Results: In the 60 cases identified and analyzed, we found a male to female ratio of 1.7:1. The average age at diagnosis was 63.1 years. Most of them (85.7%) were diagnosed in advanced Ann Arbor stage (III or IV) and 89.1% with B symptoms, but was good functional status (ECOG \leq 1) only 66% of cases. Most of the cases had extra nodal involvement (93.7%) mainly as bone marrow infiltration (79%). The classical cytomorphological variant and diffuse growth pattern were present in 82.7% and 73.4% of the cases analyzed, respectively. Only found a relationship between the mitotic index and sex ($p = 0.036$, Fisher's exact test). With regard to the expression of SOX11 monoclonal antibody in the 31 tissue samples analyzed, we found that the marker was non-contributory.

Conclusions: The clinicopathological features of patients with MCL observed in the NCI, are similar to those described worldwide. Advanced age, poor performance status (ECOG \geq 2), male sex and high levels of proliferation may influence the poor prognosis of these patients. The expression of antiSOX11 immunolabeling was seen as non-contributory in our study, due to different factors or circumstances that may have altered this test.

Keywords: mantle cell lymphoma, ciclin D1, Ki-67 index, SOX 11.

Contenido	Página
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
Lista de tablas.....	XII
Lista de figuras.....	XIII
Lista de abreviaturas	XIV
Introducción.....	1
1. Marco teórico.....	3
1.1 Generalidades.....	3
1.2 Linfoma de células del manto	5
1.2.1 Epidemiología.....	5
1.2.2 Histopatología	5
1.2.3 Patogénesis molecular	9
1.2.4 Tratamiento y pronóstico	13
2. Planteamiento del problema.....	17
3. Justificación	19
4. Objetivos.....	21
4.1 Objetivo primario	21

4.2	Objetivos secundarios.....	21
5.	Materiales y metodos	23
5.1	Diseño del estudio.....	23
5.2	Definición de sujetos de estudio	23
5.3	Conducción del estudio.....	23
5.3.1	Sitio de investigación	23
5.3.2	Archivo de datos y sistematización	24
5.4	Descripción de las intervenciones	25
5.5	Criterios de inclusión y exclusión.....	27
5.6	Fuentes de error predecibles	29
5.7	Variables.....	29
5.8	Análisis estadístico.....	31
6.	Consideraciones éticas	33
7.	Propiedad intelectual.....	35
8.	Resultados.....	37
8.1	Características clínicas	37
8.2	Características patológicas.....	39
8.3	Expresión del SOX11	42
9.	Discusión	45
10.	Conclusiones y recomendaciones	49
	Referencias bibliográficas.....	51
	Anexo A. Formulario de recolección de datos	55
	Anexo B . Cronograma general de actividades.....	56
	Anexo C. Presupuesto.....	57

Lista de tablas

Página

Tabla 1. Diagnóstico diferencial de Linfomas de Células B pequeñas: fenotipo y genética.	4
Tabla 2. Variantes citomorfológicas del Linfoma de Células del Manto	6
Tabla 3. Índice Pronóstico simplificado MIPI.	8
Tabla 4. Subgrupos de genes SOX	11
Tabla 5. Principales estudios prospectivos de regímenes de combinación	14
Tabla 6. Definición y operacionalización de variables	29
Tabla 7. Características clínicas de pacientes con LCM diagnosticados durante 2008 – 2011 en el INC	38
Tabla 8. Características patológicas de pacientes con LCM durante 2008 – 2011 en el INC	39

Lista de figuras

Página

Figura 1. Variantes citomorfológicas	7
Figura 2. Modelo de patogénesis molecular y progresión del LCM	10
Figura 3. Imagen por inmunohistoquímica (IHQ) del SOX11	12
Figura 4. Evaluación del índice Ki 67.	27
Figura 5. Flujograma trabajo de investigación en Linfoma del Manto	28
Figura 6. Otros tejidos diagnósticos de pacientes con LCM	40
Figura 7. Compromiso extra nodal y de médula ósea de pacientes con LCM	40
Figura 8. Características citomorfológicas de pacientes con LCM	41
Figura 9. Índices de proliferación de pacientes con LCM	41
Figura 10. Caso 5323. Paciente masculino de 70 años, con LCM	42
Figura 11. Inmunomarcación SOX11.	43

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
Ara C	Arabinosido Citocina (fármaco de quimioterapia)
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutada
BCL2	Célula 2 de linfoma/leucemia linfocítica crónica
BCL6	Célula 6 de linfoma/leucemia linfocítica crónica
CD3	Clúster de diferenciación 3
CD5	Clúster de diferenciación 5
CD10	Clúster de diferenciación 10 o Antígeno de leucemia linfoblástica aguda común (CALLA)
CD19	Clúster de diferenciación 19
CD20	Clúster de diferenciación 20
CD23	Clúster de diferenciación 23
CD43	Clúster de diferenciación 43
CD79a	Clúster de diferenciación 79a
CG	Centrogerminal
CHOP	Poliquimioterapia que incluye: doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y prednisona
COP	Inmunoquimioterapia que incluye: ciclofosfamida, vincristina y prednisona
CCND1	Ciclina D1
Del	Delección
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EU	Estados Unidos
FC	Poliquimioterapia que incluye: fludarabina y ciclofosfamida.
FCM	Poliquimioterapia que incluye: fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrona.
FISH	fluorescence in situ hybridization
HMG	High-mobility group
ICT	Irradiación Corporal Total
Ig	Inmunoglobulina
IGVH	immunoglobulin heavy chain (Cadena pesada de Inmunoglobulinas)
INC	Instituto Nacional de Cancerología
IPI	Índice Pronóstico Internacional
LDH	deshidrogenasa láctica
LCM	Linfoma de Células del Manto
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LLC	Leucemia Linfoide Crónica
LLP	Linfoma Linfocítico Pequeño
LNH	Linfoma No Hodgkin
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MIPI	MCL International Prognostic Index
OMS	Organización Mundial de la Salud
RC	Respuesta Completa
RT	Respuesta Total
REAL	Revised European-American Lymphoma

R-CHOP	Inmunoquimioterapia que incluye: Rituximab, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y prednisona
R-CVP	Inmunoquimioterapia que incluye: Rituximab, ciclofosfamida, vincristina y prednisona
R-DHAP	Inmunoquimioterapia que incluye: Rituximab, Dexametasona, altas dosis de Citarabina y Cisplatino
R-Hyper CVAD	Inmunoquimioterapia que incluye: Rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y dexametasona.
slg	Inmunoglobulina de superficie
SLE	Supervivencia Libre de Evento
SLF	Supervivencia Libre de Falla
SLP	Supervivencia Libre de Progresión
ST	Supervivencia Total
TC	Tomografía Computarizada
TPH	Trasplante de Progenitores Hematopoyeticos.

Introducción

Los Linfomas No Hodgkin (LNH) corresponden al quinto más común cáncer en los Estados Unidos (EU) y representan un 4% de todos los cánceres. La tasa de incidencia anual entre 2000 y 2003 en EU fue de 19.1 casos por 100000 habitantes (1).

El Linfoma de Células del Manto (LCM), corresponde a casi un 5-10% de los LNH, es decir, su tasa aproximada de incidencia anual en EU estaría entre 3000 a 6000 casos. En Colombia no hay datos al respecto.

Para su diagnóstico se requiere no solo de los hallazgos cito morfológicos característicos, sino también de la expresión por inmunohistoquímica de la ciclina D1 o la confirmación citogenética ó por FISH (fluorescence in situ hybridization) de la traslocación t(11; 14) (1 - 7).

Con el advenimiento de nuevos inmunomarcadores y de técnicas por citogenética y biología molecular tipo FISH, se han agregado nuevas herramientas para el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de estos pacientes. Estos nuevos recursos diagnósticos han llevado a una mejor clasificación de estas entidades y nos han permitido abordarlas de una mejor manera (8 – 11).

Sin embargo, en nuestro país no hay informes completos acerca de la presentación clínico patológica de este linfoma, no se han implementado ni aplicado las nuevas técnicas inmunohistoquímicas como el antiSOX11 y además carecemos de estudios propios en los cuales se haya demostrado la real utilidad y aplicabilidad de estas técnicas y su correlación clínica. Esta coyuntura abre un espacio para la investigación clínica con orientación básica como la que se quiere desarrollar con el presente estudio.

El presente trabajo se inicia con una revisión de los tópicos más relevantes en la comprensión del LCM, su historia, marcadores diagnósticos y pronóstico, y algunos aspectos generales del tratamiento.

Se hace especial énfasis en el estudio de las características clínicas generales de los pacientes y de los hallazgos histopatológicos por citomorfología e inmunohistoquímica.

Se espera que los resultados del presente trabajo permitan a nuestra comunidad médica ampliar y mejorar los estándares para el diagnóstico, clasificación y pronóstico de los pacientes con LCM e ir así construyendo nuestras propias definiciones al respecto, para poder más adelante establecer las más adecuadas medidas terapéuticas a nuestros pacientes.

1. Marco teórico

1.1 Generalidades

Los linfomas forman parte del grupo de neoplasias hematológicas originadas en células B, T o NK en sus distintos estadios de diferenciación.

En 1994, una clasificación fue propuesta para identificar tipos específicos de linfomas de origen celular T y B [Revised European-American Lymphoma (REAL)] (2), desarrollándose un esquema diagnóstico de estas neoplasias mediante la identificación de características clínicas, morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) adoptó los principios diagnósticos de esta clasificación REAL, y la clasificación OMS del año 2008 es actualmente utilizada como el esquema para el diagnóstico de todas las neoplasias hematopoyéticas (3).

Dentro de las neoplasias linfoides de células B maduras, reconocidas por la OMS, los Linfomas B de Células Pequeñas, la mayoría de ellos también llamados indolentes o de bajo grado, corresponden a poco menos del 50% de todos los Linfomas No Hodgkin B, e incluyen:

- El Linfoma Folicular que acontece para un 20% de todos los LNH.
- El Linfoma del Manto cuenta para entre un 5 a 10% de todos los LNH.
- El Linfoma Marginal MALT comprende un 7 a 8 % de todos los linfomas de células B.

- El Linfoma de zona Marginal esplénico corresponde a < 2% de todos los LNH.
- El Linfoma de zona Marginal nodal es poco frecuente.
- El Linfoma Linfocítico Pequeño (LLP) de Células B, en su forma “pura”, corresponde a entre un 5 a 10 % de todos los LNH, pero a menos del 10% de las LLC/LLP.
- El Linfoma Linfoplasmocítico es muy raro.

Estos linfomas, aunque morfológicamente similares uno al otro, tienen amplias diferencias en la presentación clínica, fenotipo, características genéticas y resultados (5). Ver tabla 1.

Tabla 1. Diagnóstico diferencial de Linfomas de Células B pequeñas: fenotipo y genética.

Enfermedad \ Marcador	CD19	CD20	CD23	CD10/ BCL6	CD5	CD3	Ciclin D1	Anormalidad cromosómica
LLC-B / LLP- B	+	+	+	-	+	-	-	del(11q) del(13q) del(17p) del(6q) +12
LCM	+	+	-	-	+	-	+	t(11;14)(q13;q32)
Linfoma Zona Marginal	+	+	-	-	-	-	-	t(11;18)(q21;q32) * t(14;18)(q32;q21) * t(1;14)(p22;q32) * +3, +18 * +3 ** del(7q) ***
Linfoma Folicular	+	+	+ -	+	-	-	-	t(14;18)(q32;q21)
Linfoma Linfoplasmocítico	+	+	+ -	-	-	-	-	del(6q21)

LLC-B = Leucemia Linfocítica Crónica B; LLP-B = Linfoma Linfocítico Pequeño de células B; LCM = Linfoma de Células del Manto; * = Linfoma MALT (del inglés Mucosa-Associated Lymphoid Tissue); ** = Linfoma de Zona Marginal Nodal; *** = Linfoma de Zona Marginal Esplénico.

* Adaptado de Paul J Kurtin (5).

1.2 Linfoma de células del manto

El LCM fue originalmente reconocido en 1980 por Tolksdorf y col (4) sobre la base de sus características citomorfológicas, las cuales en algunos aspectos semejan a las de los centrocitos de centros germinales reactivos.

Después de detectarse la translocación t (11; 14) característicamente asociada con este linfoma y basado sobre los demás análisis morfológicos, Banks y col (6), propusieron en 1992 el término “linfoma de células del manto” para esta entidad de linfomas malignos hoy día ampliamente aceptada.

Posteriormente varios grupos establecieron a mediados de la década de los 90', a la ciclina D1 como el inmunomarcador de esta entidad (7).

1.2.1 Epidemiología

El LCM corresponde a entre un 5 a 10 % de todos los LNH, su incidencia se estima entre 3000 a 4000 nuevos casos anuales en EU, predomina en hombres (2:1), con una edad mediana de 60 años, presencia frecuente de linfadenopatía no bultosa generalizada, compromiso extra nodal y estadio Ann Arbor avanzado, la afectación gastrointestinal se ha reportado en el 10-25% de los pacientes, tanto en el momento de la presentación como durante el curso de la enfermedad, en cambio la afectación del sistema nervioso central, que puede ocurrir en el 10-20% de los casos suele ser un evento tardío en la evolución de la neoplasia. Además se describe el compromiso de médula ósea en >50% de los pacientes, un componente leucémico en 20-30% de los casos y un curso clínico indolente o moderadamente agresivo con una mediana de supervivencia de 5 a 7 años (3, 9, 10, 11, 16). No existen datos acerca de la frecuencia ni características del LCM en la población colombiana.

1.2.2 Histopatología

La zona del manto es el área que circunscribe al Centro Germinal (CG) de los folículos linfoides. En esta zona la mayoría de células B permanecen en estado de reposo, y son linfocitos B “pre-CG”.

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS 2008) define al Linfoma de Células del Manto como una neoplasia de células B compuesta de células linfoides mono mórficas de tamaño pequeño a mediano con contorno nuclear irregular y una translocación Ciclina D1. Las células transformadas neoplásicas (centroblastos), parainmunoblastos y centros de proliferación están ausentes. El inmunofenotipo característico es: CD 5 (+), CD10 (-), CD19 (+), CD20 (+), CD22 (+), CD23 (-), CD43 (+), CD79a (+), BCL6 (-), slg (+), Ciclina D1 (+). Todos los casos son BCL 2 (+), con una mayor tendencia a expresar cadenas ligeras lambda y una minoría son CD 5 (-) (3).

Este linfoma comparte características con la LLC-B, lo que sugiere que su origen podría ubicarse en un linfocito B en un estadio madurativo inmediatamente posterior al de la LLC-B, que histológicamente se localizaría en la zona del manto de los órganos linfoides secundarios. Aproximadamente el 25% de los pacientes con LCM presentan genes IGVH mutados, y esto ocurre con mayor frecuencia en los pacientes con enfermedad ganglionar (90% vs. 40%). A diferencia de la LLC-B, la presencia de mutaciones IGVH no se correlaciona con la supervivencia (8).

En el LCM dentro de las variantes cito morfológicas están la clásica, la de células pequeñas, la de zona marginal-like y las variantes agresivas pleomorfica y blastoide. Ver tabla 2 y figura 1

Tabla 2. Variantes citomorfológicas del Linfoma de Células del Manto.

<p><i>Tipo clásica</i> Núcleo indentado de tamaño pequeño a mediano con cromatina moderadamente dispersa. Citoplasma pálido y escaso. Población celular monótona. Ocasionales células neoplásicas grandes infrecuentemente intercaladas.</p>
<p><i>Tipo células pequeñas</i> Núcleo redondo pequeño o ligeramente indentado con cromatina nuclear densa. Imita al linfoma linfocítico/LLC-B, con pérdida de prolinfocitos y parainmunoblastos.</p>
<p><i>Tipo pleomorfo</i> Mezcla de células tumorales con núcleos de diferentes tamaños (medianos-grandes) e imita en alguna forma al linfoma B de células grandes. Cromatina nuclear pálida. Moderada cantidad de citoplasma.</p>
<p><i>Tipo blástico.</i> Formas monomórficas de blastos de pequeño a mediano tamaño con cromatina dispersa fina que imita un linfoma linfoblástico/LLA. Anillo estrecho de citoplasma. Cuerpos apoptóticos frecuentes.</p>

* Adaptado de Tiemann y Col (9)

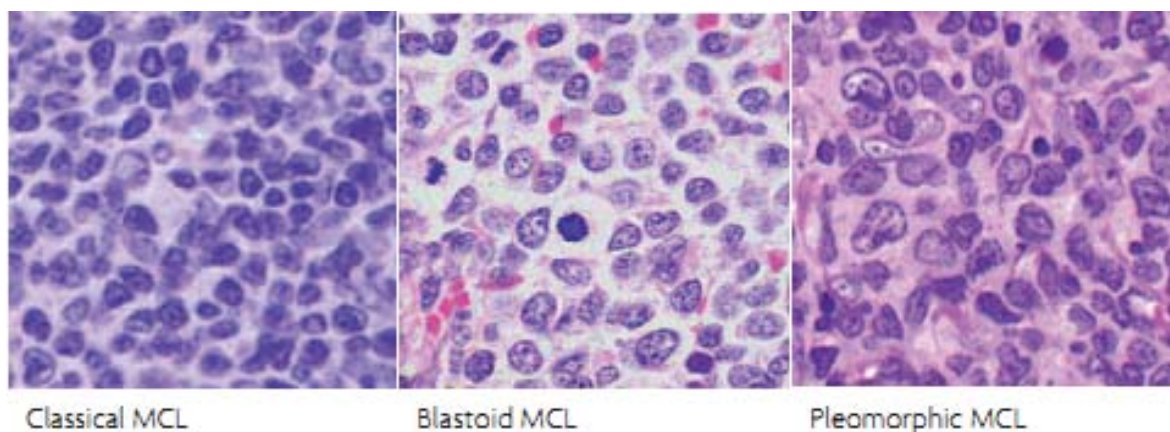


Figura 1. Variantes citomorfológicas (* Adaptado de Jares y col (17)).

Los ganglios linfáticos afectados muestran una arquitectura borrada por una proliferación linfoide atípica, que puede adoptar tres patrones de crecimiento: zona del manto, nodular o difuso.

El termino LCM viene del patrón de crecimiento de este linfoma en los estadios tempranos de la enfermedad, cuando las células tumorales rodean los centros germinales reactivos residuales y reemplazan el manto folicular normal (patrón de zona del manto). Este patrón puede estar asociado con una preservación parcial de la arquitectura nodal y puede ser difícil de distinguir de una hiperplasia folicular o de células del manto. Se ha sugerido que al progresar la enfermedad, el LCM puede mostrar un patrón de crecimiento predominantemente nodular (> 50% de crecimiento nodular) o predominantemente difuso (< 50% de crecimiento nodular) **(9 - 11)**.

En el compromiso de médula ósea el patrón de infiltración puede ser nodular, intersticial, o paratrabecular, siendo en la mayoría de los casos una combinación de estos patrones. Los agregados paratrabeculares aislados son extremadamente raros. En algunos casos se puede ver una infiltración difusa de la médula. El grado de infiltración no parece correlacionar con la variante histológica de LCM identificada en la biopsia de ganglio linfático, el patrón arquitectural o la supervivencia del paciente (11).

La inmunotinción de Ki-67 es útil para valorar la actividad proliferativa de estos linfomas. En general pocas células son positivas para el Ki67 en la variante clásica, mientras que las variantes blastoides muestran un elevado número de células positivas para este marcador (11, 12).

El Índice Ki67 ha sido ampliamente aceptado como un marcador de proliferación celular en la práctica diaria patológica y se ha consolidado como una de las variables independientes pronósticas de supervivencia (12 - 15).

Sin embargo las poblaciones de pacientes de estos estudios han sido clínicamente heterogéneas y el Ki67 ha sido evaluado mediante métodos manuales.

En 2008, Hoster y col (13), reportaron una nueva escala pronostica específica para pacientes con LCM en estadio avanzado que habían recibido tratamientos estandarizados en estudios aleatorizados. Esta escalada denominada MIPI (MCL International Prognostic Index) se basa sobre 4 factores pronósticos independiente: edad, ECOG, LDH y conteo de leucocitos; colocando a los pacientes en 3 grupos de riesgo: bajo, intermedio o alto, de acuerdo a la suma de puntajes dados para cada variable. Ver tabla 3.

Tabla 3 . Índice Pronóstico simplificado MIPI.

Puntos	Edad (años)	ECOG	** LDH	Leucocitos (10 ⁹ /L)
0	<50	0-1	<0.67	<6.700
1	50-59	---	0.67 – 0.99	6.700 – 9.999
2	60-69	2-4	1.000 -1.49	10.000-14.999
3	≥ 70	---	≥ 1.500	≥15.000

Riesgo bajo = 0 a 3 puntos (mediana de supervivencia no lograda); Riesgo intermedio = 4 a 5 puntos (mediana de supervivencia de 51 meses); Riesgo alto = 6 a 11 puntos (mediana de supervivencia de 29 meses): --- = Indica no aplicable; ** LDH está dada de acuerdo a la relación con el límite superior normal.

* Adaptado de Hoster y col (13)

En este reporte de Hoster y col (13), los hallazgos fueron independientes de la elección de la terapia cito reductiva inicial, no siendo afectados tampoco por la inclusión del Rituximab ni por la terapia intensiva con trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos y aunque los datos de proliferación fueron disponibles en solo la mitad de los pacientes, tanto el Ki67 como el índice mitótico mostraron fuerte relevancia pronostica univariada para la supervivencia total con un RR de 1.29 (IC 95% 1.16-1.44, P < .001) para un Ki67 elevado por 10% y 1.27 (IC 95% 1.09-1.48, P < .003) para el número de mitosis elevada por 10/mm². En la regresión bivariable, solo el Ki67 permaneció independientemente significativo. Sin embargo la inclusión del Ki67, no cambio substancialmente el coeficiente de regresión del MIPI (0.9554, P < .001). Refieren además, que la selección de pacientes con Ki67 no fue aleatoria y que éste Ki67 fue

evaluado solamente sobre biopsias de ganglios linfoides, no pudiéndose entonces obtenerse un mayor peso de éste inmunomarcador sobre el pronóstico. Sugieren que la estandarización y reproducibilidad de estos índices de proliferación aun requieren de mejorarse, como prerrequisito esencial para ser usados como marcadores pronósticos moleculares (13).

Un simple estudio evaluó el Ki67 en pacientes tratados con quimioterapia R-CHOP y reporto que un Ki67 alto (mayor >30%) predijo un pobre resultado (14).

En otro estudio encontraron al Ki67 (mayor >35%) como un predictor independiente de SLP y SLE, controlando para genero, compromiso de médula ósea y factores de riesgo IPI, incluyendo LDH (15).

En resumen, dentro de los parámetros pronósticos adversos histopatológicos reportados, se encuentran el patrón de crecimiento difuso, las variantes agresivas pleomorfica y blastica, una alta tasa mitótica (>25 figuras mitóticas x mm²) y un ki67 elevado (>30% de células tumorales positivas para el Ki67 en 10 Campos de Alto Poder (CAP)), independientemente de otros factores pronósticos clínicos, y permaneciendo como marcadores pronósticos importantes en la era del rituximab (9 - 15).

1.2.3 Patogénesis molecular

La expresión de-regulada y ectópica de ciclina D1 debida a la translocación t(11;14)(q13;q32), la cual coloca al gen de la ciclina D1(BCL1/CCND1) bajo el control del “potenciador de las cadenas pesadas de Ig”, es considerada el evento molecular primario en la patogénesis de LCM. La ciclina D1 es un regulador importante de la fase G1-S del ciclo celular.

El LCM es una de las malignidades de células B con el más alto grado de inestabilidad genómica, la cual está relacionada con la disrupción de los mecanismos de reparación del DNA y con la activación de los mecanismos de supervivencia celular. Mutaciones de la proteína p53 típicamente en conjunto con deleciones 17p13 han sido detectadas primariamente en casos de LCM variante blastoide. Las deleciones 11q22-23 afectando el gen ATM son recurrentes en el LCM. La kinasa ATM está involucrada en la respuesta celular al daño del DNA y puede actuar como un gen supresor tumoral (16-18).

En la figura 2 se ilustra el modelo de patogénesis molecular y progresión del LCM (17).

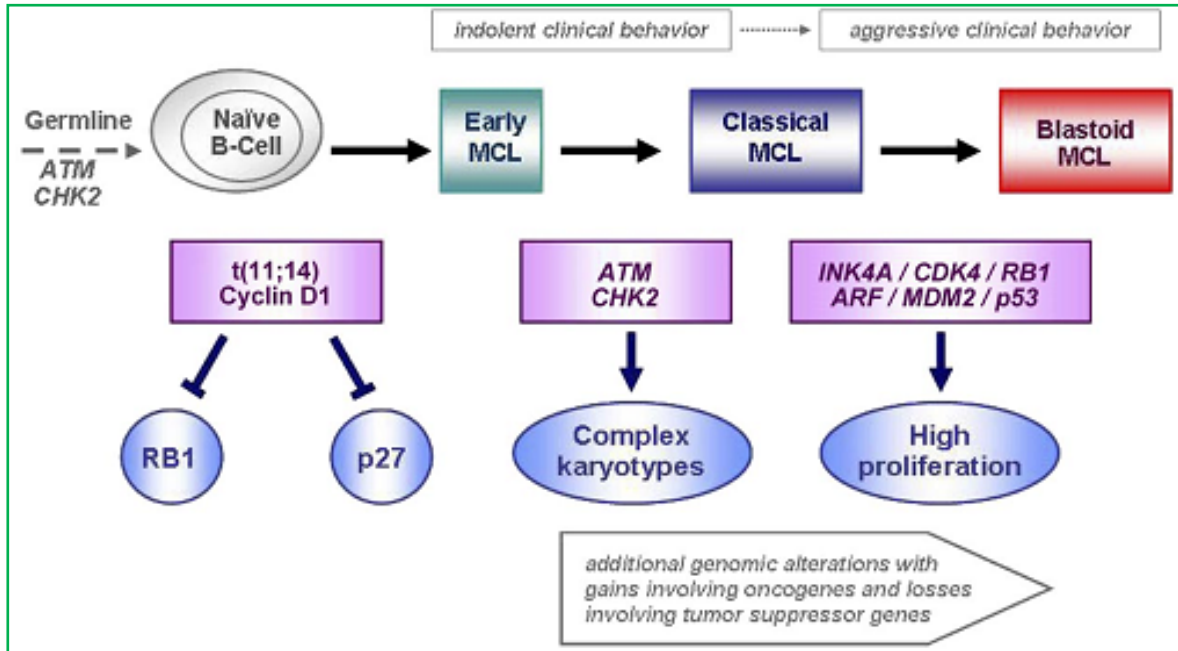


Figura 2. Modelo de patogénesis molecular y progresión del LCM. Mutaciones de la Ataxia-Telangiectasia-Mutada (ATM) o de la Checkpoint kinasa 2 (CHK2) pueden facilitar el desarrollo del linfoma. La t (11; 14) (q13; q32) ocurre en células B inmaduras y resulta en expresión deregulada y ectópica de la Ciclina D1 y temprana expansión de células B tumorales en las áreas de zonas del manto de los folículos linfoides. Esta traslocación supera el efecto supresor del retinoblastoma 1 (RB1) y el inhibidor del ciclo celular p27. Además, otras alteraciones genéticas pueden estar dirigidas a genes del ciclo celular y a vías regulatorias de supervivencia, llevando a más variantes agresivas y proliferativas.

* Adaptado de Jares y col (17).

Por inmunoreactividad la ciclina D1 se detecta siempre en el núcleo de las células, pero la intensidad puede variar de célula a célula y entre distintos casos. La ciclina D1 se detecta también en el núcleo de los histiocitos, en el núcleo de las células endoteliales y en el de las células epiteliales, que se pueden utilizar como control interno (7, 11, 20, 21).

Por medio de las técnicas actuales, la ciclina D1 por inmunohistoquímica se detecta en el 85 a 90% de los casos de LCM. Además del LCM, la ciclina D1 se sobreexpresa también en un subgrupo de LLC, en algunos casos con t (11; 14), en algunas leucemias prolinfocíticas y en el 25% de mielomas múltiples que tienen la translocación t (11; 14) o amplificación del gen. Niveles bajos de ciclina D1 se pueden detectar en tricoleucemias sin reordenamiento de bcl-1. Hasta un 10 a 15% de los LCM pierden la expresión de la ciclina D1 y pueden no ser diagnosticados por inmunohistoquímica, requiriéndose entonces de técnicas citogenéticas y/o por biología molecular tipo FISH (7, 11, 17 – 19).

■ Rol de SOX11 en LCM

En los últimos años se han identificado factores de transcripción asociados a la génesis de diferentes neoplasias. Dentro de éstos, se ha identificado a la familia de genes SOX, la cual corresponde a un grupo de proteínas que contienen un dominio de alta movilidad (**HMG = high-mobility group**) unido al DNA que permite el reclutamiento selectivo de proteínas SOX individuales a genes específicos, con fuerte similaridad al dominio HMG de Sry (proteína determinante del sexo).

Los dominios de SOX HMG se unen a secuencias en la ranura o surco menor del DNA, e inducen un gran cambio conformacional de éste.

Ha sido sugerido que la función de la proteína SOX es parcialmente arquitectural, permitiendo a otros factores de transcripción unirse a la ranura mayor, trayendo elementos regulatorios juntos y facilitando la formación de proteínas complejas.

Aproximadamente 20 genes SOX han sido identificados en humanos y ratones, y son divididos en 9 subgrupos. Ver tabla 4.

Tabla 4. Subgrupos de genes SOX

Subgrupo	Genes SOX
SOXA	SRY
SOXB1	SOX1,SOX2,SOX3
SOXB2	SOX14, SOX21
SOXC	SOX4, SOX11, SOX12
SOXD	SOX5,SOX6,SOX13
SOXE	SOX8,SOX9,SOX10
SOXF	SOX7, SOX17, SOX18
SOXG	SOX15
SOXH	SOX30

* Adaptado de Xu W y Li J-Y (22).

El gen SOX11, mapeado en el cromosoma 2p25.3, pertenece al subgrupo C, el cual tiene 3 miembros: SOX4, SOX 11 y SOX12. Estos 3 genes son co-expresados en progenitores neuronales embrionicos y en células mesenquimales en muchos órganos desarrollados. La proteína humana SOX11 tiene 441 aminoácidos y 46.7 KDa de peso molecular (22).

La incrementada expresión de SOX4 está relacionada con tumores de vejiga, próstata, colón y pulmón y una alta expresión de SOX11 es asociada con gliomas, linfomas de células no B y tumores ováricos epiteliales. Tanto SOX4 como SOX11 han sido demostrados a ser altamente expresados en meduloblastomas (23).

Aunque SOX4 es un factor de transcripción prominente en linfocitos tanto de linaje B como T, y es crucial para linfopoyesis B; SOX11 no tiene una función linfopoyética claramente conocida y no es expresada normalmente en células B.

Recientemente algunos autores han reportado la expresión nuclear de éste factor de transcripción SOX11 en el linfoma de células del manto (LCM) comparado con otros linfomas y tejidos benignos, describiéndose entonces como un posible marcador diagnóstico que es igualmente expresado en LCM ciclina D1 (+) o ciclina D1 (-). Se hipotetiza que su expresión en LCM lleva a regulación aberrante de genes involucrados en la supervivencia o muerte celular, pudiendo tener un rol funcional en el desarrollo y/o supervivencia de células tumorales (24 - 26).

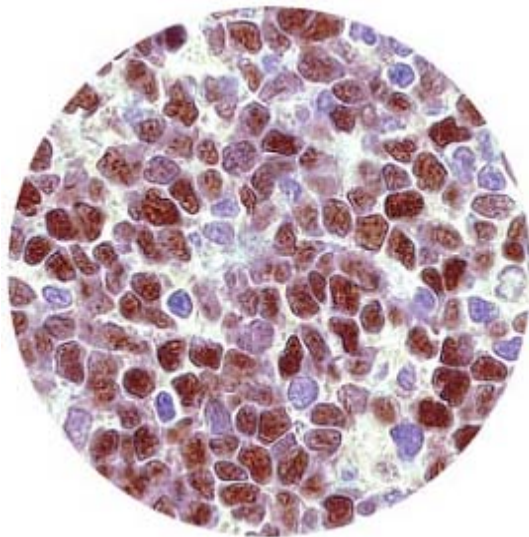


Figura 3. Imagen por inmunohistoquímica (IHQ) del SOX11. Un montaje microarray tisular de señales representativas de éste inmunomarcador.

* Adaptado de Ek S y col (24).

También se ha sugerido que aunque la sobre-expresión del gen SOX11 es altamente asociada con el LCM, ésta es independiente de la t (11; 14) en neoplasias de células B no LCM. Su asociación con la sobreexpresión de ciclina D1 en la leucemia de células peludas, sugiere que puede estar involucrado en la sobreexpresión de la ciclina D1 de esta leucemia (27).

La ausencia de la expresión de SOX 11 ha sido recientemente identificada como una característica del subtipo indolente de LCM. En un artículo publicado por Fernández y col

(28), pacientes con LCM SOX11 (-) tenían una mayor supervivencia total que aquellos SOX11 (+) [Supervivencia Total a 5 años 78% (IC 95%, 56–100) versus 36% (IC 95%, 25–47)]. La pérdida o no expresión de SOX11 en LCM ciclina D1 (+), puede entonces identificar un subconjunto de LCM con una conducta biológica diferente que el LCM convencional SOX11 (+).

En otro artículo publicado por Mozos y col (29) la expresión de la proteína SOX11 fue investigada inmunohistoquímicamente en 12 casos de LCM ciclina D1 (-), en 54 casos de LCM convencional y en 209 neoplasias linfoides adicionales. Los 12 casos de LCM ciclina D1 (-) ocurrieron en hombres ancianos con enfermedad en estadio avanzado y frecuente compromiso extra nodal y de sangre periférica. Hubo pobre respuesta a la terapia y la supervivencia total no fue diferente de la de pacientes ciclina D1 (+). Estos pacientes fueron SOX11 (+). La evolución clínica agresiva de estos linfomas pone entonces de manifiesto la necesidad de tener marcadores confiables para identificar tales malignidades y distinguir éstas de otros linfomas de células B pequeñas ya que un manejo terapéutico diferente puede ser requerido.

Aunque SOX11 puede también ser detectado en algunos linfomas Burkitt, Leucemias/linfomas linfoblasticos B y leucemias prolinfocíticas T, las características morfológicas y fenotípicas diferentes de estas malignidades permiten el fácil reconocimiento de los casos de LCM ciclina D1 (-).

Un reciente estudio ha demostrado el valor de determinar la expresión de SOX11 y ciclinas D, adicionando útil información pronóstica en enfermedades linfoproliferativas B, especialmente en LCM y LLC (30).

El advenimiento de estos inmunomarcadores y de técnicas por biología molecular tipo FISH, han agregado entonces nuevas herramientas para el diagnóstico y pronóstico de pacientes con LCM.

1.2.4 Tratamiento y pronóstico

La supervivencia total de pacientes con LCM avanzado no blastoide casi que se ha doblado durante las últimas tres décadas, debido entre varias causas a avances en los cuidados de soporte, a nuevas herramientas diagnósticas, a una mayor expectativa general de vida, a la aplicación de regímenes conteniendo antraciclinas, al uso de anticuerpos anti CD20 como el rituximab y a terapias intensivas que incluyen el trasplante de progenitores hematopoyéticos (31).

Los regímenes activos en LCM son los mismos que aquellos usados para otros linfomas: basados en agentes alquilantes (COP-CVP), basados en antraciclinas (CHOP), basados en fludarabina y cladribina (FC o FCM), conteniendo Ara-C o platinos y más recientemente basados en bendamustina, bortezomib o lenalidomida; usualmente combinados con Rituximab (16, 19).

La elección de uno u otro régimen de tratamiento depende de las características clínico patológicas de cada paciente y del protocolo institucional o grupo médico tratante. Ver tabla 5.

Tabla 5. Principales estudios prospectivos de regímenes de combinación para LCM en primera línea.

REGIMEN	AUTOR (año)	N	RT %	RC %	SLE/SLP	ST	Ref.
COP/CVP	Meusers y col (1989)	37	84	22	10 meses	65 % (2a)	32
	Teodorovic y col (1995)	35	60	40	20 meses	45 % (2a)	33
	Unterhalt y col (1996)	46	83	18	--	--	34
CHOP	Meusers y col (1989)	26	88	38	7 meses	60 % (2a)	32
	Lenz y col (2005)	60	75	7	19 meses	76 % (2a)	35
	Nickenig y col (2006)	46	87	15	21 meses	85 % (2a)	36
R-CHOP	Howard y col (2002)	40	96	48	17 meses	--	37
	Lenz y col (2005)	62	94	34	20 meses	76 % (2a)	35
CHOP +/- DHAP + TPH autólogo	Lefrère y col (2004)	28	92	84	51 meses (mediana)	81 meses (mediana)	38
R-Hyper-CVAD/ R-MTX-Ara-C	Romaguera y col (2005)	97	97	87	64% (SLF 3 a)	82% (3 a)	39
R-DHAP y TPH autólogo	de Guibert y col (2006)	24	96	92	65% (3 a)	69% (3 a)	40
R-CHOP X 3 + R-DHAP X 3 y TPH autólogo	Delarue y col (2008)	60	95	61	83 meses (Mediana)	75 % (5 a)	41
R-maxi-CHOP + R-HD-Ara-C + R-BEAM y TPH autólogo	Geisler y col (2008)	160	96	54	SLE 56% / SLP 66% (6 a)	70% (6 a)	42

** Abreviaciones : TPH = Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos; N = # de pacientes; RT = Respuesta Total; RC = Respuesta Completa; SLE/SLP = Supervivencia Libre de Evento ó Supervivencia Libre de Progresión; SLF = Supervivencia Libre de Falla; ST = Supervivencia Total; a = años.

* Adaptado de Ghielmini y Zucca (16), y otros (32 - 42).

El Grupo de Linfoma Nórdico (42) incluyó 160 pacientes tratados con R-Maxi-CHOP alternando con altas dosis de Ara C y consolidación con BEAM o BEAC soportado con células madre autólogas purgadas in vivo con Rituximab. En este estudio, con una mediana de observación de 4 años, una SLE a 6 años del 56% fue observada sin pacientes recayendo después de 5 años. Este grupo Nórdico y el intergrupo Europeo de LCM (43) demostraron la importancia de lograr una remisión molecular pos tratamiento, sugiriéndose entonces la medición de la enfermedad mínima residual como un predictor independiente de resultado clínico.

Un reciente estudio del European MCL Network realizado entre Julio de 2004 a mayo de 2010, aleatorizo 497 pacientes en 4 países (Alemania, Francia, Polonia y Bélgica) a R-CHOP (x 6) + TPHa acondicionado con radioquimioterapia (ICT 12 Gy + ciclofosfamida 60mg/kg x 2) vs cursos alternantes de R-CHOP (x 3) y R-DHAP (x 3) + TPHa acondicionado con radioquimioterapia (ICT 10 Gy + altas dosis de Ara-C 1.5 g/m² x 4 y melfalan 140 mg/m²). Después de la inducción, la tasa de respuesta completa fue significativamente mayor en el grupo R-CHOP + R-DHAP (brazo B); experimentando además un mayor tiempo a la falla después de una mediana de seguimiento de 27 meses. Acorde a estos resultados, ellos recomiendan que el régimen de inducción conteniendo altas dosis de Ara-C seguido de TPHa debería ser el Nuevo estándar de cuidado para pacientes con LCM < 65 años (44).

Otras opciones terapéuticas que incluyen al rituximab como terapia de mantenimiento, y nuevos fármacos como el bortezomib, la lenalidomida, el temsirolimus, entre otros, han reportado a ser activos en LCM y están en fase de experimentación, en ensayos clínicos fase II y III.

Aunque la mayor parte de los pacientes se presentan con una enfermedad en estadio avanzado al diagnóstico, otros pocos se presentan con una forma indolente de LCM.

Investigadores del Weill Cornell Medical College en Nueva York (EUA) evaluaron 97 pacientes con LCM; 31 de ellos (32%) fueron asintomáticos, observándose y tratándose con terapia sistémica solo cuando clínicamente necesario (a intervalos mayores de 3 meses). Catorce de ellos permanecieron sin tratamiento por más de 1 año y el perfil de supervivencia total de este grupo fue superior que el del grupo de comparación institucional (n = 66) que fue tratado inmediatamente después del diagnóstico (45).

2. Planteamiento del problema

En Colombia no hay datos acerca de la presentación clínico patológica del LCM, además por el alto costo y nivel de complejidad, no se dispone siempre en los laboratorios de cito patología de nuestro país, de todas las herramientas para el diagnóstico y clasificación de éste tipo de linfomas, lo que conlleva a que en varias ocasiones su diagnóstico sea retrasado y ello incida negativamente en el tratamiento y pronóstico de éstos pacientes. Se requiere entonces que se den a conocer las características de nuestros pacientes con LCM y además, de que se adopten las más prácticas herramientas con el fin de mejorar los estándares de diagnóstico, la clasificación, la estadificación, el pronóstico y el manejo oportuno de ésta patología.

En los últimos años, el factor de transcripción SOX11 ha sido descrito como un marcador diagnóstico que es igualmente expresado en LCM ciclina D1 (+) o ciclina D1 (-) (18, 19, 22, 24- 27). Además, algunos estudios refieren que la pérdida o no expresión de SOX11 en pacientes con LCM ciclina D1 (+), puede identificar un subgrupo con una conducta biológica diferente al LCM convencional SOX11 (+) (28, 29).

Aunque actualmente se encuentra aprobado solo para uso con fines de investigación, podría en un corto tiempo llegar a ser aprobado como un marcador diagnóstico y pronóstico, pudiéndose tal vez implementar como un examen complementario a la ciclina D1 y a las demás técnicas por biología molecular.

Más investigación e información adicional sobre la presentación clínico patológica y características biológicas del LCM, es necesaria para ampliar el armamentario diagnóstico, pronóstico y terapéutico del LCM.

3. Justificación

Con este trabajo queremos describir y relacionar los hallazgos clínico patológicos de la serie más grande de casos de LCM observados o diagnosticados en el Instituto Nacional de Cancerología (INC), principal centro nacional de referencia en hemato-oncología de nuestro país, durante un periodo de cuatro años; además pretendemos describir la expresión por inmunohistoquímica del anticuerpo monoclonal anti SOX11 en las muestras histopatológicas que expresaron la ciclina D1 o la t (11; 14).

Todo este proceso de revisión y descripción de esta serie de casos de LCM, así como la estandarización y aplicación de este nuevo inmunomarcador SOX11, contribuirán al fortalecimiento de la capacidad científica nacional, a la implementación de nuevas técnicas diagnósticas y a la investigación en este campo de la hematología.

4. Objetivos

4.1 Objetivo primario

- Describir la expresión del inmunomarcador SOX11 patrón nuclear en pacientes con LCM diagnosticados en el INC durante el periodo comprendido entre 2008 y 2011.

4.2 Objetivos secundarios

- Describir los hallazgos clínico patológicos de pacientes con LCM diagnosticados en el INC durante el periodo comprendido entre 2008 y 2011.
- Describir la relación entre los hallazgos citomorfológicos e histopatológicos, con los marcadores de proliferación celular y las características clínicas de los pacientes con LCM.
- Describir la relación del inmunomarcador SOX11 patrón nuclear con las demás características clínicas, histopatológicas y citomorfológicas de pacientes con LCM.

5. Materiales y metodos

5.1 Diseño del estudio

Estudio de tipo observacional descriptivo serie de casos retrospectiva.

5.2 Definición de sujetos de estudio

Población: Pacientes diagnosticados con LCM por citomorfología e inmunohistoquímica positiva para ciclina D1 o mediante la t (11; 14), en el periodo comprendido entre 2008 a 2011.

Estos casos se obtuvieron de los registros que se tienen en el departamento de hematopatología, de pacientes diagnosticados con LCM desde enero de 2008, tiempo aproximado en el cual inicio a funcionar la sistematización de datos por medio del software empresarial corporativo SAP en el Instituto Nacional de Cancerología.

5.3 Conducción del estudio

5.3.1 Sitio de investigación

Los sitios para la presente investigación fueron los departamentos de Hematología y de Patología del Instituto Nacional de Cancerología.

5.3.2 Archivo de datos y sistematización

Se realizó una búsqueda y revisión exhaustiva de los informes obtenidos de los pacientes diagnosticados con LCM en los registros de los servicios de hematología clínica y de patología en el período comprendido entre 2008 y 2011.

Se tomó información referente a número de identificación, nombre, edad, sexo, fecha del diagnóstico, estadio Ann Arbor, riesgo MIPI, síntomas B, LDH, compromiso extra nodal, ECOG, tejidos evaluados y hallazgos citomorfológicos e inmunohistoquímicos; así como de la terapia recibida y la fecha de último dato de supervivencia (ver tabla 6 y anexo A).

Esta búsqueda incluyó tanto los registros generales en ambos servicios, como aquellos registros personales de varios de los patólogos que trabajan este tipo de neoplasia. Si alguno de los datos o variables a incluirse en el estudio no estaban anotados o disponibles dentro de la historia clínica, se procedió al cálculo de éstos a partir de reportes o resultados objetivos presentes en la historia clínica. Ejemplo : Si no había un reporte del estadio Ann Arbor del Linfoma, éste se calculo teniendo como base los informes de la tomografía computarizada (TC) del paciente al momento del diagnóstico o en un tiempo cercano a éste; lo mismo se realizó para algunas otras variables en las que fue posible establecerse ello.

En los casos de tejidos no médula ósea en los que no hubiese reporte de alguna de las variantes morfológicas, patrones de crecimiento o marcadores de proliferación celular (Ki67 e índice mitótico), se procedió a revisión de las láminas presentes y/o a nuevo corte e inmunotinción con hematoxilina-Eosina (H-E), ciclina D1 y Ki67, para su lectura.

Aquellas muestras de ganglios linfoides parafinadas y de buena calidad se seleccionaron para la aplicación de la tinción inmunohistoquímica antiSOX11. Se dispuso además, de un instrumento de recolección de datos, los cuales fueron organizados, archivados y custodiados por los miembros del grupo de estudio.

Posteriormente se creó una base inicial de datos de estos pacientes, con el programa Microsoft Office Excel (versión 2007), y luego se seleccionaron y revisaron aquellos casos que tenían disponibles muestras de patología (láminas y biopsias de ganglios, médula ósea y otros tejidos).

5.4 Descripción de las intervenciones

Todo el material fue revisado por un hematopatólogo (OM) usando los criterios recientes de la OMS (2008) (3), incluyendo un panel de anticuerpos de diagnóstico estándar (CD20, Bcl-6, Bcl-2, CD3, CD5, CD10, CD23, ciclina D1, Ki67).

La técnica de inmunohistoquímica antiSOX11 fue solo realizada sobre secciones tisulares de biopsias embebidas en parafina, fijadas en formalina, pues las biopsias de médula ósea y de tejidos fijados en Bouin ó en B-5, se han reportado en algunos estudios a no ser adecuados para este inmunomarcador (24, 26).

Hubo 31 muestras tisulares disponibles y adecuadas para estudios inmunohistoquímicos.

Áreas tumorales representativas fueron seleccionadas a partir de una evaluación inicial hecha sobre secciones teñidas con H-E y secciones tisulares de 3 μ m fueron removidas a partir de cada bloque de parafina correspondiente usando un micrótopo automatizado (*Shandon Finesse ME, Thermo Scientific electron corporation, Inglaterra*) y posteriormente ensambladas en una nueva lámina portaobjetos silanizada (especial para inmunohistoquímica). Luego, las láminas fueron secadas en horno por dos horas, desparafinizadas en xylol, pasadas por alcohol y rehidratadas en agua destilada.

Después de la desparafinación, las secciones fueron colocadas en buffer citrato (pH 9.0) y llevadas a recuperación antigénica mediante el calentamiento de éstas en vapor a 92°C durante 50 minutos; posteriormente la actividad peroxidasa endógena de las secciones desparafinadas fue eliminada por incubación durante 10 minutos en solución peróxido de hidrógeno al 3% y lavadas con PBS (Wash buffer). Las siguientes técnicas o kits manuales que utilizan la 3,3' Diaminobenzidina (DAB) fueron usados como agente colorante:

- La técnica polímero mediante el reactivo peroxidasa conjugado EnVision™ + Dual Link (DAKO) que no tiene el anticuerpo bloqueante de proteínas y que es compatible con anticuerpos primarios de ratón y/o de conejo adecuadamente diluidos.

- La técnica DAB Quanto (Labvision corporation) que utiliza el bloqueante antes del peróxido y antes del anticuerpo primario.

Ambas técnicas permiten omitir el paso por la biotina anti inmunoglobulina y el conjugado estreptavidina-peroxidasa, reduciendo el tiempo de incubación.

En el paso siguiente las laminas fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal primario derivado de conejo antiSOX11 (*Ref: HPA000536; vial x 100 μ l, Lote i41670; SIGMA-ALDRICH, Atlas Antibodies, Suecia*) durante 1 hora.

Finalmente, las láminas fueron contra teñidas con un sulfato de cobre para intensificar la DAB, se lavaron y luego se les aplico la hematoxilina durante 3 minutos, lavándose nuevamente y luego recibiendo agua amoniacal para contrastar y asegurar la hematoxilina. El procedimiento fue realizado a temperatura ambiente.

Este anticuerpo SOX11 fue inicialmente aplicado sobre los controles internos (núcleos de células epiteliales escamosas y citoplasma de células linfoides en tejidos amigdalinos y mucosas) a una dilución de 1:200, sin lograrse la inmunomarcación. Posteriormente se paso a una dilución de 1:100 lográndose después de varios intentos, una fuerte positividad nuclear de estos controles internos. Se selecciono entonces esta dilución para la inmunomarcación de las muestras de ganglios linfoides previamente confirmadas como LCM ciclina D1 (+).

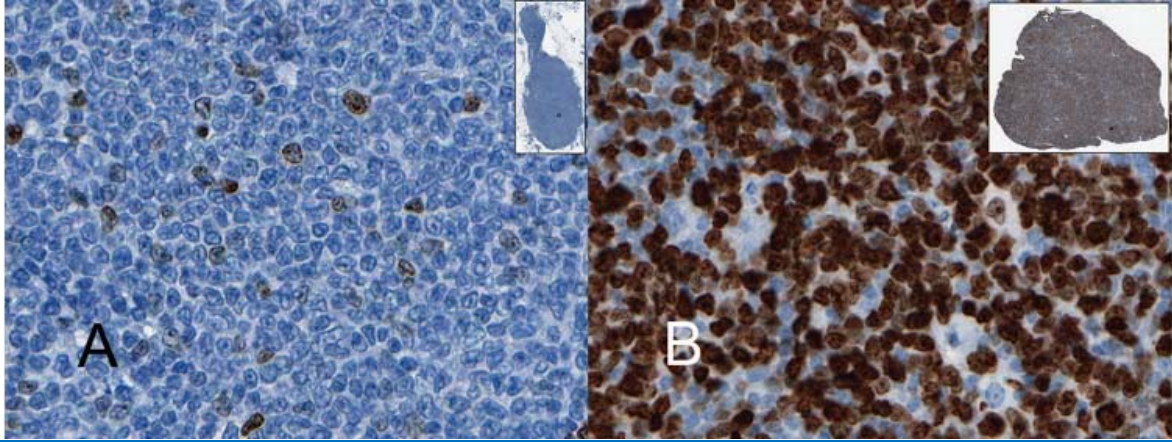
Dentro del proceso de estandarización, primero se hizo "calibración" por diluciones y luego por temperatura.

Para la ciclina D1 se utilizó el anticuerpo anti-CCND1 monoclonal derivado de conejo altamente sensible (*DAKO clona SP 4- Código M3635*) a una dilución de 1:50.

Para el Ki-67 se utilizó el anticuerpo monoclonal derivado de ratón anti Ki-67 (*DAKO clona MIB-1, código M7240*) a una dilución de 1:50.

Para estos inmunomarcadores el patrón de tinción de las células tumorales debía ser nuclear.

El Ki 67 fue evaluado mediante el conteo manual de células positivas por campo de alto poder (promedio de 10 campos). Ver ejemplo figura 4.



* Adaptado de His E y col (15).

Figura 4. Evaluación del índice Ki 67. **(A)** LCM con un índice Ki67 bajo (3%); **(B)** LCM con un índice Ki67 alto (80%).

Para el análisis, un microscopio universal (*Axioplan Carl Zeiss™, Alemania*) equipado con un objetivo 10 X y 40 X fue usado. Las imágenes fueron capturadas y procesadas por un microscopio digital integrado (*Coolscope CS1 de Nikon™, Japón*) que ofrece una observación simultánea de una macro imagen y una micro imagen en cualquiera de los aumentos 5x, 10x, 20x, y 40x.

El cronograma y presupuesto del presente estudio se describe en anexos B y C.

5.5 Criterios de inclusión y exclusión

El criterio de ingreso al estudio fue el tener un reporte clínico e histopatológico con el diagnóstico confirmado de linfoma de células pequeñas tipo LCM que incluye la positividad de la ciclina D1 o de la t (11; 14).

Como criterios de inclusión para la inmunomarcación con el anticuerpo monoclonal anti SOX11 se consideran solo a las muestras de ganglios linfoides.

Se excluyen para la inmunomarcación antiSOX11 a las muestras de médula ósea, pues allí ésta prueba se ha reportado a ser negativa (24, 26); también se excluyen las muestras de otros tejidos no ganglionares y aquellos casos cuyas biopsias embebidas en bloques de parafina no estuviesen disponibles, no fueran representativas o no fuesen adecuadas ni de buena calidad. Ver flujograma figura 5

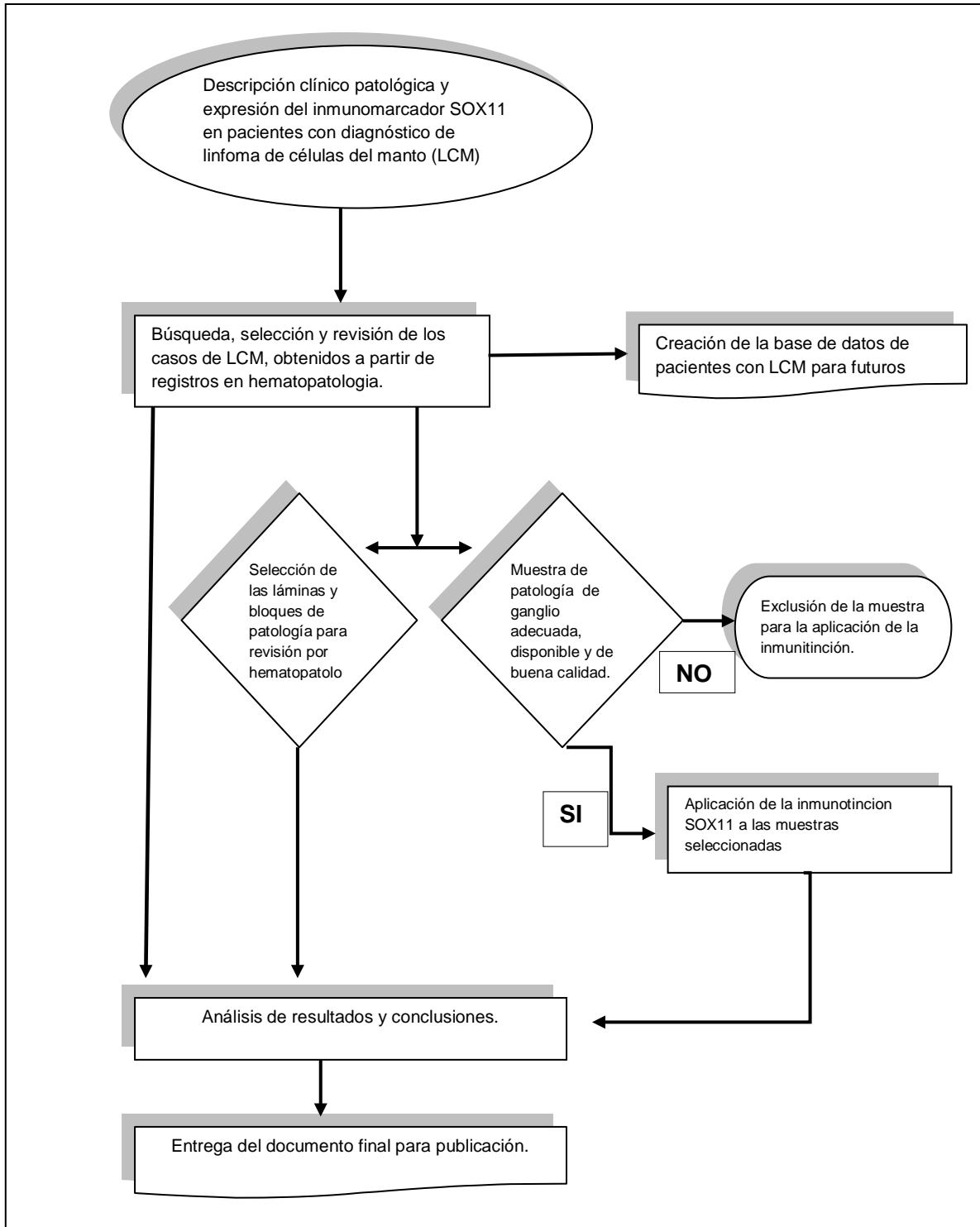


Figura 5. Flujograma trabajo de investigación en Linfoma del Manto.

5.6 Fuentes de error predecibles

Como es conocido, la realización de estudios retrospectivos limita los resultados debido a la carencia de algunos datos por la toma de ciertos registros de historia clínica. Esto condiciona que cierta cantidad de resultados va a carecer de información para ciertas variables clínicas y limitará de igual forma el análisis estadístico y el establecimiento de diferencias. Sin embargo, en este estudio la mayoría de variables histopatológicas están presentes para su análisis.

5.7 Variables

Las variables demográficas consideradas fueron: la edad y el sexo de paciente, el estadio de la enfermedad, la presencia de síntomas B, el valor de la Lactato DesHidrogenasa (LDH), el compromiso extra nodal, el estado funcional evaluado por la escala del ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), la puntuación de riesgo MIPI, el tipo de tejido analizado, la variante morfológica, su patrón de crecimiento, los índices de proliferación : índice mitótico y el Ki 67; la expresión del SOX11, si recibió o no alguna terapia y cuál de ellas, así como las fechas de diagnóstico y último seguimiento o dato de supervivencia; siendo varias de ellas operacionalizadas como variables dicotómicas. Ver tabla 6.

Tabla 6. Definición y operacionalización de variables.

Nombre de la variable	Definición	Clasificación variable	Operacionalización de la variable.
Sexo	Es la identidad que permite el reconocimiento del sexo al cual pertenece un individuo.	Cualitativa nominal	Mujer = (0) Hombre = (1)
Edad	Dato que permite la cuantificación cronológica del tiempo de vida en años del individuo.	Cuantitativa discreta	Años
Estadio de la enfermedad	Estadificación del linfoma por imágenes diagnósticas según la clasificación de Ann Arbor.	Cualitativa nominal	I – II = (0) III – IV = (1) * SD
Riesgo MIPI	Escala de puntuación pronóstica para LCM (MCL Internacional Prognostic Index).	Cualitativa nominal	Bajo = (0) Intermedio = (1) Alto = (2) * SD

Sintomas B	Presencia de pérdida de peso, fiebre y diaforesis.	Cualitativa nominal	No = (0) Si = (1) * SD
LDH	Enzima presente en diversos tejidos y elevada en diferentes patologías, como los linfomas.	Cualitativa nominal	Normal = (0) Elevada = (1) * SD
Compromiso extranodal	Presencia de enfermedad por fuera de los ganglios linfoides.	Cualitativa nominal	No = (0) Si = (1) * SD
ECOG	Estado funcional del paciente al diagnóstico, según la escala de puntuación del ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group).	Cualitativa nominal	Menor o igual a 1 = (0) Mayor o igual a 2 = (1) * SD
Tejido evaluado	Se refiere al (los) tejido (s) evaluados en relación al LCM.	Cualitativa nominal	Ganglio linfático = (1) Médula ósea = (2) Otros tejidos = (3)
Biopsia ganglio	Realización de biopsia ganglionar	Cualitativa nominal	No = (0) Si = (1) * SD
Positividad de biopsia ganglio	Expresión en tejido ganglionar de la ciclina D1 por inmunohistoquímica o de la t (11; 14) por genética o FISH.	Cualitativa nominal	Negativa = (0) Positiva = (1)
Biopsia médula ósea	Realización de biopsia médula ósea.	Cualitativa nominal	No = (0) Si = (1) * SD
Positividad de biopsia médula	Expresión de la ciclina D1 en médula ósea por inmunohistoquímica o de la t (11; 14) por genética o FISH.	Cualitativa nominal	Negativa = (0) Positiva = (1)
Variante morfológica	Tipo de morfología celular del LCM	Cualitativa nominal	Clásica = (0) De células pequeñas o marginal-like = (1) Pleomorfica = 2 Blastica = 3 * SD
Patron de crecimiento	Tipo de morfología de crecimiento tumoral nodal.	Cualitativa nominal	Difuso = 0 Nodular = 1 Manto = 2 * SD
Indice mitotico	Número de mitosis por 10 Campos de Alto Poder (CAP)	Cualitativa nominal	Menor de 25 = (0) Mayor o igual a 25 = (1) * SD
Ki 67	Inmunomarcador utilizado como índice de proliferación celular y	Cualitativa nominal	Menor de 30% = (0) Mayor o igual a 30% = (1)

	reportado en el tejido del caso evaluado.		* SD
Prueba SOX11	Inmunohistoquímica mediante el anticuerpo monoclonal antiSOX11 a realizarse en el tejido ganglionar evaluado.	Cualitativa nominal	Negativo = (0) Positivo = (1) No Valorable = (3) No Realizada = (4)
Terapia recibida	Cualquier tipo de quimioterapia recibida basada en Antracíclicos y Rituximab.	Cualitativa nominal	No = (0) Si = (1) * SD
Regimen quimioterapia	Esquema de quimioterapia recibida por el paciente.	Cualitativa nominal	R-CHOP = (0) R-HCVAD = (1) R-DHAP = (2) R-CVP = (3) Más de una línea = (4) * SD
Trasplante autólogo de Progenitores Hematopoyéticos.	Cualquier terapia intensiva soportada con infusión de células madre autólogas.	Cualitativa nominal	No = (0) Si = (1) * SD

- SD = Sin Datos.

5.8 Análisis estadístico

El presente es un estudio descriptivo de una serie de casos, en donde se aplicó las técnicas estadísticas convencionales como son las frecuencias, los promedios, los porcentajes, las medianas, los valores mínimos y máximos; según el tipo de variable, para la presentación de los resultados. El análisis bivariado se realizó por medio de la prueba χ^2 o la prueba exacta de Fisher, en caso de presentarse casillas menores a cinco, entre el índice mitótico, el índice ki 67, la variante morfológica y el patrón de crecimiento; con el sexo, el estadio, el compromiso extranodal y el ECOG. Se realizó la relación entre los índices de proliferación por medio del estadístico de correlación de Pearson. Se usó el programa estadístico Stata versión 9.0.

6. Consideraciones éticas

En la presente investigación no hay intervención directa en los sujetos del estudio y por tanto no va en contra del bienestar físico de ninguno de los participantes.

La recolección de la información que incluyo la selección de los casos, la revisión de historias clínicas, la creación de una base de datos y el procesamiento y análisis de los resultados, fue realizada por los miembros del grupo de investigación, los cuales a su vez son responsables del control de calidad del dato, así como de su custodia y seguridad.

El compromiso de los investigadores es el de cumplir con las normas de ética científicas en lo referente con la búsqueda y manejo de los datos, así como lo relacionado a resultados y conclusiones, para dar cabal cumplimiento a los objetivos trazados, sin ir en contra de las buenas prácticas clínicas.

El presente estudio no incurre en problemas éticos, ya que las inmunotinciones y el análisis son sobre una serie de casos, es decir es un estudio de tipo observacional y retrospectivo; o sea que según el artículo 11 de la resolución N°008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, es una investigación sin riesgo.

7. Propiedad intelectual

Los aportes y la generación de conocimiento que se obtienen con este trabajo son para beneficio de la comunidad científica nacional y la comunidad en general,

Los documentos que se generen son propiedad de sus autores y de la institución para la cual estos desarrollan su quehacer académico y laboral, que en este caso son la Universidad Nacional de Colombia y el Instituto Nacional de Cancerología. Se espera a futuro, que se a partir de este trabajo, se puedan implementar nuevas herramientas diagnósticas y pronósticas, así como se puedan adaptar y actualizar los procedimientos técnicos mundialmente aceptados, para su utilización en nuestro medio.

8. Resultados

Se identificaron 61 casos por historia clínica o registro en patología de LCM; de éstos, 60 tenían al menos un reporte histopatológico confirmatorio del LCM mediante la positividad de la ciclina D1 y/o de la t (11; 14). El caso excluido había sido diagnosticado y tratado, por hallazgos clínicos y de citomorfología, como un LCM, pero no tenía estudios de inmunohistoquímica para la ciclina D1 ni de genética para la t(11;14), la cual resultó ser negativa al realizarle la inmunomarcación anti ciclina D1 en una muestra obtenida de un bloque de parafina disponible. Se revisó el caso y se concluyó que correspondía a otro linfoma de células pequeñas, posiblemente un linfoma folicular.

8.1 Características clínicas

Las características clínicas se describen en la tabla 7, analizándose por separado dependiendo de si había o no datos disponibles. Se evidencia un mayor predominio de la enfermedad en el sexo masculino, con una relación hombre a mujer de 1.7:1. La edad promedio al diagnóstico fue de 63.1 años, con una desviación estándar [DE] de 10.4 y un rango de entre 36 y 84 años

41 pacientes (84%) se diagnosticaron en estadio Ann Arbor IV, 1 paciente en estadio III y 7 pacientes en estadio II que representan el 2% y 14%, respectivamente. La mayoría de los pacientes se diagnosticaron en estadio Ann Arbor avanzado (III o IV) y concomitantemente presentaban síntomas B; aunque el estado funcional era bueno (ECOG \leq 1) en el 66% de los casos.

Debido a que límites superiores de normalidad difieren inter e intra laboratorios para la LDH, esta información se recolectó pero no se tomó en cuenta para el análisis final. Sin embargo, de los datos obtenidos, dos tercios de los casos tenían la LDH elevada. En la mayoría de pacientes el IPI o MIPI no pudieron ser evaluados debido a datos perdidos.

Solo la cuarta parte de los casos tenían la escala MIPI evaluada y anotada, de éstos, la mitad (53.3%) presentaban un riesgo MIPI alto. Ver tabla 7.

Tabla 7. Características clínicas de pacientes con LCM diagnosticados durante 2008 – 2011 en el Instituto Nacional de Cancerología

Característica clínica (n = datos disponibles)	Porcentaje (n)	Porcentaje de datos disponibles
Sexo (n=60)		
Femenino	36.6 (22)	36.6
Masculino	63.4 (38)	63.4
Edad Promedio 63.1 años [DE=10.4] (n=60)		
Mayor o igual 60	68.3 (41)	68.3
Menor a 60	31.7 (19)	31.7
Estadio Ann Arbor (n=49)		
I – II	11.7 (7)	14.3
III – IV	70 (42)	85.7
SD [11]	18.3 [11]	
Riesgo MIPI (n=15)		
Bajo	5 (3)	20
Intermedio	6.7 (4)	26.7
Alto	13.3 (8)	53.3
SD [45]	75 [45]	
Sintomas B (n=46)		
No	8.3 (5)	10.9
Si	68.3 (41)	89.1
SD [14]	23.3 [14]	
LDH (n=22)		
Normal	11.7 (7)	31.8
Elevada	25 (15)	68.2
SD [38]	63.3 [38]	
Compromiso extra nodal (n=48)		
No	5 (3)	6.3
Si	75 (45)	93.7
SD [12]	20 [12]	
ECOG (n=47)		
≤ 1	51.7 (31)	66
≥ 2	26.7 (16)	34
SD [13]	21.6 [13]	
Quimioterapia (n=46)		
No	5 (3)	6.5
Si	71.7 (43)	93.5
SD [14]	23.3 [14]	
Régimen quimioterapia (n=43)		
R-CHOP	16.3 (7)	16.3
R-HyperCVAD	18.6 (8)	18.6
R-DHAP	7 (3)	7
R-CVP	9.3 (4)	9.3
R-MaxiCHOP	4.6 (2)	4.6
> 1 línea o régimen	44.2 (19)	44.2
Trasplante de progenitores hematopoyéticos (n=46)		
No	71.7 (43)	93.4
Si	5 (3)	6.6
SD [14]	23.3 [14]	
[] = Frecuencia absoluta de pacientes sin datos		

En cuanto al compromiso extra nodal, 48 casos tenían algún reporte al respecto, de los cuales en la mayoría (93.7%) había compromiso extra nodal.

En lo referente a la terapia recibida, 43 pacientes recibieron algún tipo de quimioterapia sistémica, generalmente basada en un agente antracíclico y/o un agente alquilante, combinados con el anticuerpo monoclonal quimérico anti CD 20 (rituximab); aunque ésta terapia fue irregularmente administrada. El 34.9% habían recibido como único régimen el R-CHOP o el HyperCVAD y el 44.2% habían recibido más de una línea o régimen.

Solamente 3 pacientes habían recibido un TPH autólogo al momento del análisis. La mediana de seguimiento de los pacientes fue de 14 meses (rango de 1 a 51 meses).

8.2 Características patológicas

En cuanto a las características patológicas, se evaluó en total el reporte de 33 biopsias ganglionares, 42 biopsias de médula ósea y 17 biopsias de otros tejidos. De los 60 casos, 42 pacientes presentaban estudios de médula ósea; 13 de ellos tenían éste como único reporte de patología diagnóstica. En el 79% de los casos se presentó compromiso infiltrativo de médula ósea. Ver tabla 8.

Tabla 8. Características patológicas de pacientes con LCM diagnosticados durante 2008 – 2011 en el Instituto Nacional de Cancerología

Tejidos evaluados	Frecuencia absoluta
■ Biopsia de ganglio linfático	
Positiva para CCND1 o t(11;14)	33
■ Biopsia de médula ósea	42
Solo BMO	13
BMO y Biopsia de otros tejidos	29
Con compromiso infiltrativo	33
Sin compromiso infiltrativo	9
■ Biopsia de otros tejidos	17

Dentro de los otros tejidos evaluados diferentes a ganglio y médula ósea, seis correspondían a tejido intestinal, tres a tejido gástrico, dos a tejido palatino, dos a tejido de orbita y un caso para tejido de masa retroperitoneal, tejido de glándula lacrimal, tejido pleuro pulmonar y tejido de carrillo. Ver figura 6.

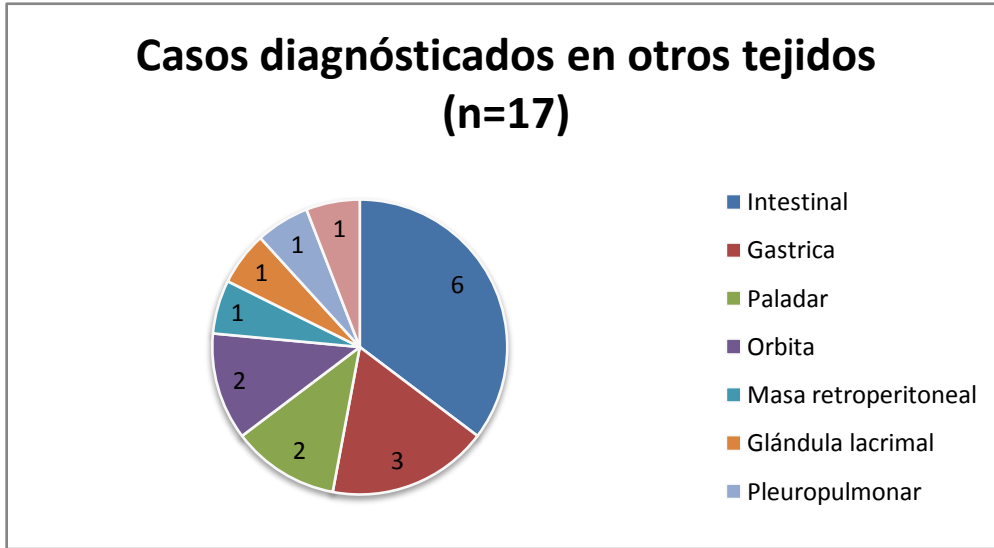


Figura 6. Otros tejidos diagnósticos de pacientes con LCM diagnosticados durante 2008 – 2011 en el Instituto Nacional de Cancerología

De los 48 casos con dato de compromiso extra nodal, el 93% (n=45) eran positivos y en el caso de médula ósea el 79% (n=33) estaban infiltrados. Ver fig7.

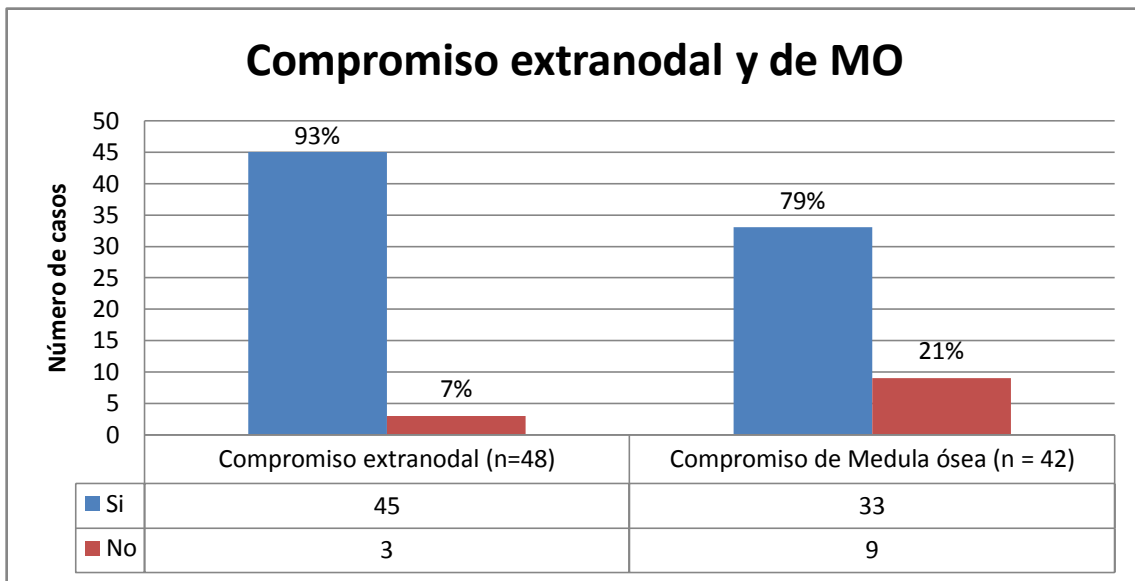


Figura 7. Compromiso extra nodal y de médula ósea de pacientes con LCM diagnosticados durante 2008 – 2011 en el Instituto Nacional de Cancerología

En cuanto a los hallazgos histopatológicos relacionados a la variante citomorfológica, al patrón de crecimiento y a los índices de proliferación, se analizaron éstos en tejidos diferentes a médula ósea, reportándose los datos de más del 95% de los casos disponibles. La variante citomorfológica clásica y el patrón de crecimiento difuso

estuvieron presentes en el 82.7% y 73.4%, de los 46 y 45 casos analizados, respectivamente. Ver figura 8 y 9.

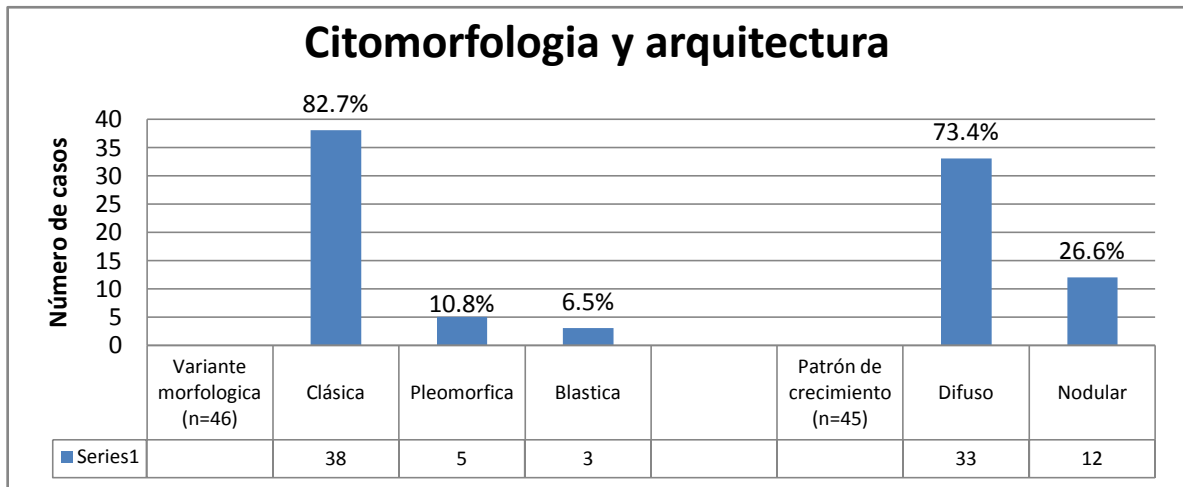


Figura 8. Características citomorfológicas de pacientes con LCM diagnosticados durante 2008 – 2011 en el Instituto Nacional de Cancerología

En lo que se refiere a los índices o marcadores de proliferación, el índice mitótico fue bajo (menor a 25 figuras mitóticas x 10 CAP) en la mayoría de los casos. El índice mitótico fue evaluado en 45 casos, hallándose un rango de entre 2 y 50 figuras mitóticas x 10 CAP, con un promedio de 14.5 y una mediana de 10. El índice Ki 67 fue evaluado en 47 casos, encontrándose un rango de entre el 5% al 60%, con un promedio de 26% y una mediana de 20%. Ver figura 9.

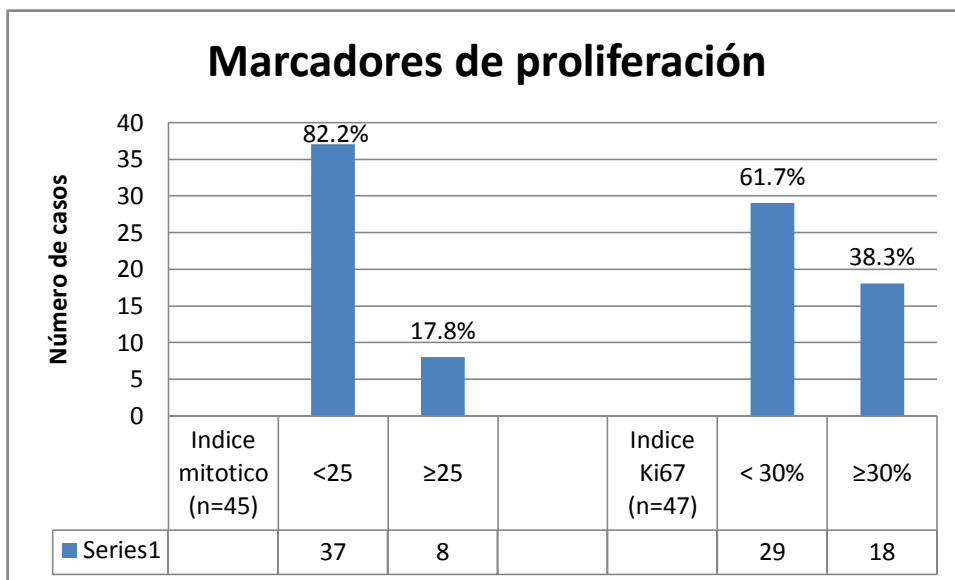


Figura 9. Índices de proliferación de pacientes con LCM diagnosticados durante 2008 – 2011 en el Instituto Nacional de Cancerología

A continuación se ilustra el Índice Ki 67 de uno de los casos evaluados en tejido de amígdala palatina que reporta un valor de 50% para este índice. Ver figura 10.

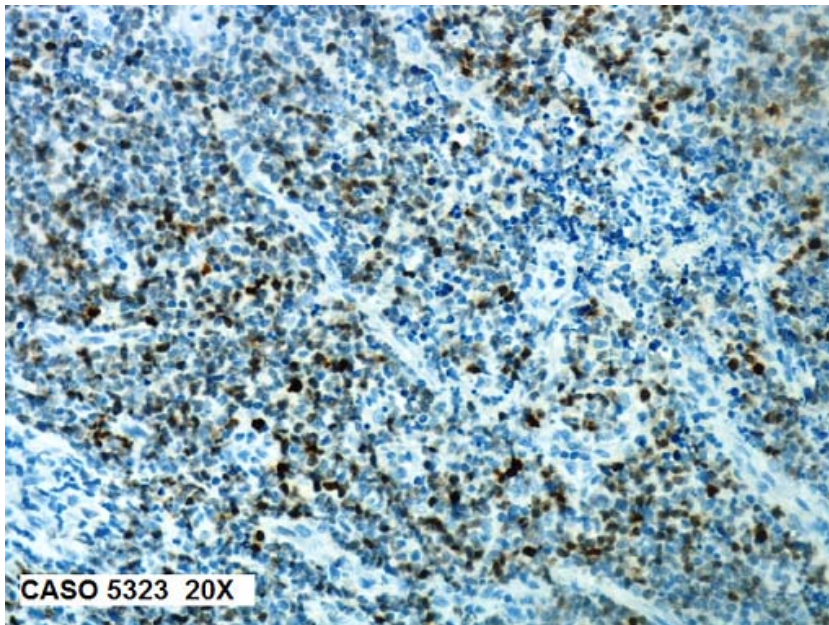


Fig. 10. Caso 5323. Paciente masculino de 70 años, con LCM. Biopsia de tejido de amígdala palatina con un Ki67 del 50%.

Al analizar las características histopatológicas solo se encontró una relación entre el índice mitótico y el sexo ($p=0.036$, Prueba exacta de Fisher). En cuanto a la relación entre los índices de proliferación se encontró una correlación de 0.48 lo que indica que es moderadamente positiva.

8.3 Expresión del SOX11

En cuanto a la expresión del anticuerpo monoclonal antiSOX11 en las 31 muestras de tejidos analizadas (29 tejidos ganglionares, 1 tejido amigdalino palatino y 1 tejido de carrillo infiltrado), se encontró que el marcador fue no contributivo, pues aunque la inmunomarcación estuvo presente en los considerados como controles internos, no la hubo en el núcleo de las células tumorales linfoides.

A continuación presentamos las imágenes de la inmunotinción antiSOX11 en uno de los casos evaluados sobre tejido amigdalino confirmado previamente como LCM. Ver figura 11.

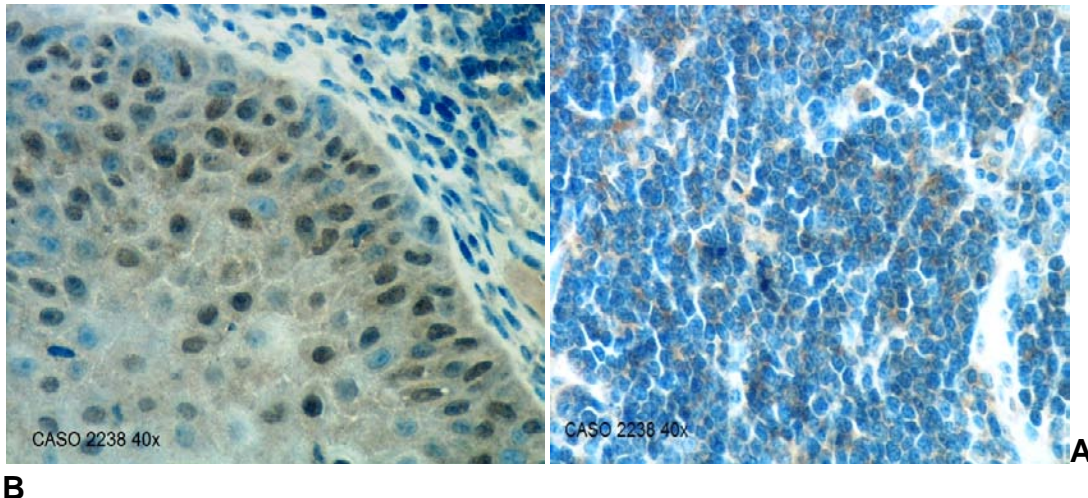


Figura 11. Inmunomarcación SOX11. En la imagen de la figura A, correspondiente a tejido amigdalino de una paciente de 76 años con LCM, se observa la expresión del inmunomarcador antiSOX11 en el núcleo de células epiteliales escamosas y en la imagen de la figura B hay tinción del citoplasma de las células linfoides; sin embargo no hubo marcación nuclear en la población celular linfoide tumoral.

Aunque muchos de los datos de supervivencia fueron perdidos o no disponibles al tiempo de este estudio, pudimos establecer que por lo menos 10 pacientes habían fallecido, distribuyéndose esta mortalidad por igual en ambos sexos, con una edad promedio de 66.6 años y una mediana de 67 años. Ocho de ellos tenían un ECOG mayor o igual a dos y nueve un estadio IVB. El índice Ki67 estaba disponible en ocho de ellos y en seis era mayor o igual a 30%.

9. Discusión

Desde hace poco más de tres décadas se han venido describiendo las características clínicas y patológicas de los pacientes con LCM, a partir de sus rasgos citomorfologicos inicialmente descritos por K. Lennert y G.Tolksdorf (4).

En los últimos años se han incorporado nuevas herramientas para el diagnóstico, clasificación, pronóstico y tratamiento de los Síndromes Linfoproliferativos Crónicos B (SLPC-B) incluido el LCM; en este sentido diferentes grupos incluida la OMS (3), han venido proponiendo una aproximación multiparamétrica, basada en la combinación de técnicas morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y moleculares, para el enfoque y manejo más adecuado de estos procesos.

En nuestro medio una adecuada y completa aproximación para éste y otros linfomas, constituye en ocasiones un problema en el trabajo diagnóstico rutinario, principalmente por la falta de recursos y de personal entrenado para tal fin.

La presente investigación buscó incluir todos los casos de LCM diagnosticados o evaluados en el principal centro hemato-oncológico del país ((INC) durante un periodo de cuatro años. Se lograron identificar y reclasificar 60 pacientes con esta entidad, lo que corresponde muy probablemente al mayor número de casos de LCM evaluados por una sola institución en nuestro país y en un periodo muy corto, aunque no hay datos de otras instituciones nacionales para comparar.

Aquí confirmamos que la enfermedad se presenta más frecuentemente en hombres, con una edad promedio de 63 años, debutando con un estadio Ann Arbor avanzado y muy frecuente compromiso extra nodal (3, 9 -11).

El compromiso de médula ósea presente en el 79% de los casos, fue altamente congruente con el estadio IV y hace de éste examen un método muy útil y necesario para el adecuado abordaje diagnóstico y terapéutico de este tipo de linfomas.

A diferencia de lo más frecuentemente reportado (9, 10, 13, 31, 39), nuestros pacientes se presentaron al diagnóstico con síntomas B en el 89% de los casos y un pobre estado funcional (ECOG mayor o igual a 2) en el 44% de ellos. Lo anterior podría explicarse por la evolución prolongada de la enfermedad en varios de estos pacientes, y el no oportuno diagnóstico al ser referenciados muchos de ellos con demora a nuestra institución; algunos provenían de zonas lejanas o apartadas de nuestro país.

Ratificamos la presencia de la variante citomorfológica clásica y el patrón de crecimiento difuso, como los más frecuentes hallazgos histopatológicos y ello se corresponde con lo actualmente descrito en la literatura (3, 6, 9 - 11).

La única asociación que encontramos entre las variables analizadas con datos disponibles, fue entre el índice mitótico elevado y el sexo masculino ($p=0.036$). A la fecha solamente un estudio ha reportado a éstas 2 variables dentro de un conjunto de factores pronósticos adversos del LCM (46). No hubo mujeres con un índice mitótico elevado, aunque el valor que tomamos como índice mitótico elevado fue de mayor o igual a 25 figuras mitóticas x 10 CAP. Los diversos estudios reportados a la fecha consideran diversos valores (>10 , >20 , >25 , >50) como un índice elevado (9, 13, 46, 47). Se requiere entonces de estandarizarse y validarse el conteo de las figuras mitóticas, para homogeneizar los resultados, además es probable una diferencia inter e intraobservador al respecto.

Pareciera entonces que el LCM presenta un comportamiento menos agresivo en el sexo femenino, aunque no pudimos establecer una relación entre el sexo masculino y el índice mitótico mayor a 25, con ninguna de las variantes citomorfológicas agresivas.

Tampoco encontramos una asociación entre el índice Ki-67 con las variantes citomorfológicas agresivas ni con los patrones de crecimiento. La asociación fue moderada entre el índice Ki-67 y el índice mitótico.

En nuestro estudio no fue realizada la variabilidad inter o intra observador. Sin embargo, ello debería tenerse en cuenta, especialmente en caso de que los índices de proliferación fueran a ser evaluados como parte de una terapia adaptada al riesgo. Es probable que el análisis de imágenes computarizado permita a futuro obviar esta variabilidad (15).

En la época actual, la mediana de supervivencia total de pacientes menor a 65 años con LCM avanzado debería ser mayor a 5 años, si han recibido adecuadamente una terapia intensiva basada en antraciclicos y/o alquilantes combinados con rituximab (11, 16, 19, 31, 39 - 44).

En el presente estudio descriptivo no fue posible establecer las tasas de supervivencia pues hubo un alto número de datos perdidos al respecto, y además la mediana de seguimiento fue demasiado corta como para poder establecerlo. Tampoco es posible de momento establecer una relación entre las diferentes variables y la supervivencia de los pacientes. Sin embargo la mayoría de pacientes fallecidos tenían un ECOG 2, un estadio avanzado IVB y un índice Ki67 \geq 30%, lo cual se ha demostrado son factores de mal pronóstico para esta entidad (12 - 16).

Se requiere entonces de continuar un seguimiento más estricto y de un tratamiento más regular para en algunos años reportar los resultados al respecto.

En este trabajo también intentamos reproducir y estandarizar la inmunomarcación SOX11, pues en los últimos años se ha reportado como un marcador diagnóstico y pronóstico de pacientes con LCM (18, 22 - 30). La más reciente conferencia del grupo de trabajo Europeo en LCM y una revisión, así lo confirman (19, 50).

Acorde a la descripción original por Ek S y col (24), la expresión de la proteína SOX11 debería identificarse como una fuerte tinción nuclear de las células tumorales linfoides; sin embargo ninguno de los casos expresó este patrón. Por el contrario, una tinción citoplasmática puntiforme se observó en varios casos, pero ésta fue considerada inespecífica, ya que previos estudios han demostrado la pérdida de correlación de esta tinción y la expresión del SOX11. Evaluadas las imágenes por el grupo de hematopatología del Hospital Clínic de Barcelona, es posible que esta marcación citoplasmática sea explicada porque el anticuerpo primario haya reaccionado con el SOX4, el cual pertenece al subgrupo SOXC, al igual que el SOX11. A la fecha, el SOX4 es el único gen de la familia SOX que ha sido encontrado a tener un rol importante en el temprano desarrollo de células B y T, siendo crucial para la diferenciación de linfocitos B.

Aunque el SOX11 es homólogo al SOX4, con un 86% de identidad para el dominio de unión al DNA (HMG), su rol en linfopoyesis permanece a ser dilucidado (22, 23, 48, 49).

La demostración de esta proteína del ciclo celular puede ser caprichosa en los tejidos procesados rutinariamente. Dentro de las variables importantes que influyen en ello, están la conservación de la muestra, la adecuada fijación del tejido, la óptima recuperación antigénica, la sensibilidad del sistema de detección, el anticuerpo primario en sí mismo y el procedimiento de inmunotinción.

10. Conclusiones y recomendaciones

Concluimos que:

1. Dentro de los hallazgos histopatológicos del LCM, la variante citomorfologica clásica y el patrón de crecimiento difuso, son en nuestro medio también los más frecuentes. Conocer las otras variantes es necesaria para el diagnóstico histológico y en ocasiones para el pronóstico.
2. Las características clínicas se corresponden con lo mundialmente descrito.
3. Aunque por lo corto del seguimiento y las pérdidas de varios datos, no nos fue posible establecer las tasas de supervivencia, consideramos que la edad avanzada, un pobre estado funcional (ECOG \geq 2), el sexo masculino y unos elevados índices de proliferación pueden influir en el pronóstico adverso de pacientes con LCM.
4. La expresión del inmunomarcador antiSOX11 fue considerada como no contributiva en nuestro estudio, sin embargo son muchos los factores o circunstancias que podrían haber alterado esta prueba, no pudiendo nosotros de momento solo con éste trabajo confirmar ni excluir a éste anticuerpo como uno de los más promisorios marcadores diagnósticos y pronósticos en este tipo de linfomas.
5. Dentro de las posibles soluciones para obtener un mejor resultado o una buena inmunomarcación de un anticuerpo primario tipo anti SOX11 estarían: optimizar y asegurar la adecuada fijación del tejido, buscar otros métodos alternativos y efectivos de recuperación antigénica, variar los tiempos de incubación, elegir el anticuerpo y el sistema de detección inmunohistoquímico más altamente sensible, entre otros.

6. Consideramos fundamental anotar en las historias clínicas la más completa información clínica y de laboratorio, que incluya a todos los marcadores pronósticos clínicos, morfológicos e inmunohistoquímicos, que redundaran en el beneficio de los pacientes. Además creemos que la escala pronóstica de riesgo MIPI, efectivamente deberá incorporar marcadores biológicos que incluyan al índice mitótico, al Ki67 y al SOX11 dentro de sus variables de riesgo independientes (MIPI biológico combinado), una vez estos se estandaricen, se validen y sean fácilmente reproducibles para ser usados como marcadores diagnósticos y pronósticos del LCM; hasta entonces deberán ser aplicados solo para estudios de investigación.

Referencias bibliográficas

1. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov). SEER stat database: mortality—all COD, public-use with state, total U.S. for expanded races/Hispanics (1990–2003), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, released April 2006. Underlying mortality data provided by NCHS (www.cdc.gov/nchs), 2006.
2. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361–1392.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., eds. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth edition. Lyon, France: 2008: 229-232.
4. Tolksdorf, G., Stein, H. and Lennert, K. Morphological and immunological definition of a malignant lymphoma derived from germinal centre cells with cleaved nuclei (centrocytes). *British Journal of Cancer*. 1980; 41: 168–182.
5. Paul J. Kurtin. Indolent Lymphomas of Mature B Lymphocytes. *Hematol Oncol Clin N Am* 23 (2009) 769–790.
6. Banks PM, Chan J, Cleary ML, et al. Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol*. 1992; 16: 637-640.
7. Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K, et al. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinic pathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*. 2000;95: 2253–61.
8. Orchard, J., et al., A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, non nodal disease. *Blood*, 2003. 101(12): 4975- 4981.
9. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol*. 2005; 131(1): 29-38.
10. Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, et al. Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* 1998; 82: 567–575.
11. Balagué O, Colomo L, Campo E. Linfoma de células del manto. *Rev Esp Patol* 2004; Vol 37 (2): 159-172.

12. Katzenberger T, Petzoldt C, Holler S, Mader U, Kalla J, Adam P, et al. The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood* 2006;107 (8):3407.
13. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 2008; 111: 558-565.
14. Determann O, Hoster E, Ott G, Wolfram Bernd H, Loddenkemper C, Leo Hansmann M, et al. Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2008; 111: 2385–2387.
15. His E, Jung S, Lai R, Johnson J, Cook J, Jones D, Devos S, Cheson B, Damon LL and Said J. Ki67 and PIM1 expression predict outcome in mantle cell lymphoma treated with high dose therapy, stem cell transplantation and rituximab: a Cancer and Leukemia Group B 59909 correlative science study. *Leukemia & Lymphoma*, November 2008; 49 (11): 2081–2090.
16. Ghielmini M, Zucca E. How I treat mantle cell lymphoma. *Blood*. 2009;114(8):1469-1476.
17. 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.
18. Pérez-Galán P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*. 2011; 117 (1): 26-38.
19. Dreyling M, Kluin-Nelemans HC, Beà S, Hartmann E, Salaverria I, Hutter G, Perez-Galan P, Roue G, Pott C, Gouill SL, Cortelazzo S, Rule S, Hess G, Zaja F, Vitolo U, Szymczyk M, Walewski J, Ribrag V, Unterhalt M, Hermine O, Hoster E. Update on the molecular pathogenesis and clinical treatment of mantle cell lymphoma: report of the 10th annual conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Leuk Lymphoma*. 2011 Dec; 52(12):2226-36. Epub 2011 Aug 18.
20. de Boer CJ, Schuurin E, Dreef E *et al*. Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Blood* 1995; 86; 2715–2723.
21. Chan J. Immunostaining for cyclin D1 and the diagnosis of mantle cell lymphoma: is there a reliable method? *Expert Opinion. Histopathology* 1999, 34, 266–270.
22. Xu W, Li J-Y. SOX11 expression in mantle cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*. 2010; 51(11): 1962–1967.
23. Penzo-Méndez. Critical roles for SoxC transcription factors in development and cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (2010) 425–428.
24. Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008; 111(2):800- 805.
25. Dictor M, Ek S, Sundberg M, Warenholt J, György Cz, Sernbo S, Gustavsson E, Abu-Alsoud W, Wadström T, and Borrebaeck C. Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 2009; 94 (11) : 1553-1568.
26. Wang X, Asplund C, Porwit A, Flygare J, Smith E, Christensson B and Sander B. The subcellular Sox11 distribution pattern identifies subsets of mantle cell lymphoma: correlation to overall survival. *British Journal of Haematology*, 2008; 143 (2): 248–252.

27. Chen Y, Gao J, Fan G and Peterson L. Nuclear expression of sox11 is highly associated with mantle cell lymphoma but is independent of t(11;14)(q13;q32) in non-mantle cell B-cell neoplasms. *Modern Pathology* (2010) 23, 105–112.
28. Fernandez V, Salamero O, Espinet B, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 2010; 70(4):1408-1418.
29. Mozos A, Royo C, Hartmann E, et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1 -negative subtype. *Haematologica* 2009; 94(11):1555-1562.
30. Cao X, Fan L, Fang C, et al. The expression of SOX11, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3 in B-cell lymphocytic proliferative diseases. *Med Oncol April* 2011 (published on line).
31. Herrmann A, Hoster E, Zwingers T, Brittinger G, Engelhard M, Meusers P, Reiser M, Forstpointner R, Metzner B, Peter N, Wormann B, Trumper L, Pfreundschuh M, Einsele H, Hiddemann W, Unterhalt M, and Dreyling M. Improvement of Overall Survival in Advanced Stage Mantle Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2009 27 (4):511-518.
32. Meusers P, Engelhard M, Bartels H, et al. Multicentre randomized therapeutic trial for advanced centrocytic lymphoma: anthracycline does not improve the prognosis. *Hematol Oncol.* 1989; 7: 365-380.
33. Teodorovic I, Pittaluga S, Kluin-Nelemans JC, et al. Efficacy of four different regimens in 64 mantle-cell lymphoma cases: clinicopathologic comparison with 498 other non-Hodgkin's lymphoma subtypes. *European Organization for the Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group. J Clin Oncol.* 1995;13: 2819-2826.
34. Unterhalt M, Herrmann R, Tiemann M, et al. Prednimustine, mitoxantrone (PmM) vs cyclophosphamide, vincristine, prednisone (COP) for the treatment of advanced low-grade non Hodgkin's lymphoma: German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Leukemia.* 1996; 10:836-843.
35. Lenz G, Dreyling M, Hoster E, et al. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol.* 2005; 23:1984-1992.
36. Nickenig C, Dreyling M, Hoster E, et al. Combined cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and prednisone (CHOP) improves response rates but not survival and has lower hematologic toxicity compared with combined mitoxantrone, chlorambucil, and prednisone (MCP) in follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized trial of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Cancer.* 2006; 107:1014-1022.
37. Howard OM, Gribben JG, Neuberger DS, et al. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression free survival. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 1288-1294.
38. Lefrère F, Delmer A, Levy V, Delarue R, Varet B, Hermine O. Sequential chemotherapy regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: an update of a prospective study. *Haematologica.* 2004;89: 1275-1276.
39. Romaguera JE, Fayad L, Rodriguez MA, et al. High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus

- hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *J Clin Oncol*. 2005; 23:7013-7023.
40. de Guibert S, Jaccard A, Bernard M, Turlure P, Bordessoule D, Lamy T. Rituximab and DHAP followed by intensive therapy with autologous stem-cell transplantation as first-line therapy for mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2006; 91: 425-426.
 41. Delarue R, Haioun C, Ribrag V, et al. RCHOP and RDHAP followed by autologous stem cell transplantation (ASCT) in mantle cell lymphoma (MCL): final results of a phase II study from the GELA. *Blood*. 2008;112:218. Abstract 581.
 42. Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, et al. Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood*. 2008; 112:2687-2693.
 43. Pott C, Hoster E, Böttcher S, et al. Molecular remission after combined immunochemotherapy is of prognostic relevance in patients with MCL: results of the randomized intergroup trials of the European MCL Network. *Blood* 2010;115: 3215 – 3223.
 44. Hermine O, Hoster E, Walewski J, et al. Alternating courses of 3x CHOP and 3x DHAP plus rituximab followed by a high dose ARA-C containing myeloablative regimen and autologous stem cell transplantation (ASCT) is superior to 6 courses CHOP plus rituximab followed by myeloablative radiochemotherapy and ASCT in mantle cell lymphoma: results of the MCL Younger Trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network (MCL net). *Blood* 2010; 116(Suppl. 1): Abstract 110.
 45. Martin P, Chadburn A, Christos P, et al. Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009; 27:1209-1213.
 46. Duggan MJ, Weisenburger DD, Ye YL, Bast MA, Pierson JL, Linder J, Armitage JO. Mantle zone lymphoma. A clinicopathologic study of 22 cases. *Cancer*. 1990; 66: 522-529.
 47. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*. 1997; 89(6):2067-78.
 48. van de Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K, Clevers H. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J* 1993;12: 3847–3854.
 49. Schilham MW, Oosterwegel MA, Moerer P, et al. Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* 1996; 380:711–714.
 50. Sander B. Mantle cell lymphoma: recent insights into pathogenesis, clinical variability, and new diagnostic markers. *Seminars in Diagnostic Pathology* (2011) 28, 245-255

Anexo A. Formulario de recolección de datos

“Descripción clínico patológica y expresión del inmunomarcador SOX11 en pacientes con diagnóstico de linfoma de células del manto”

Caso Número (#): _____ # identificación del caso: _____ Teléfono: _____

Edad al Diagnóstico (años cumplidos): _____

Sexo: Femenino (0) _____ Masculino (1) _____

Diagnóstico: Nuevo (0) _____ Repetido (1) _____

Fecha del Diagnóstico INC: mm/aaaa _____ / _____

Estadio de la enfermedad Ann Arbor: I- II (0) _____ III-IV (1) _____ Sin Datos _____

Riesgo IPI: Bajo (0) _____ Intermedio/bajo (1) _____
 Intermedio/ Alto (2) _____ Alto (3) _____ Sin Datos _____

Riesgo MIPI: Bajo (0) _____ Intermedio (1) _____ Alto (2) _____ Sin Datos _____

Síntomas B: No (0) _____ Sí (1) _____ Sin Datos _____

LDH: Normal (0) _____ u/l Elevada (1) _____ u/l Sin Datos _____

Compromiso extranodal: No (0) _____ Sí (1) _____ Sin Datos _____

ECOG: ≤ 1 (0) _____ ≥ 2 (1) _____ Sin Datos _____

Tejido(s) evaluado(s): Ganglio linfático (1) _____
 Médula Ósea (2) _____
 Otros tejidos (3) _____

Índice mitótico x 10 Campos de Alto Poder (CAP): _____ Sin Datos _____

Positividad Ki67: $<30\%$ (0) _____ $\geq 30\%$ (1) _____ Sin Datos _____

Variante morfológica: Clásica (0) _____ Zona marginal-like o de células pequeñas (1) _____
 Pleomorfica (2) _____ Blastoides (3) _____ Sin Datos _____

Patrón de crecimiento: Difuso (0) _____ Nodular (1) _____ Manto (2) _____ Sin Datos: _____

Prueba SOX11 en tejido nodal: Negativa (0) _____ Positiva (1) _____ No Valorable (3) _____ No Realizada (4) _____

Terapia recibida: No (0) _____ Sí (1) _____ Cuál: _____ Sin datos: _____

Fecha último dato supervivencia: Muerto (0) mm/aaaa _____ / _____
 Vivo (1) mm/aaaa _____ / _____

Nombre de quien recolecta la información: _____

Fecha de recolección de la información : dd/mm/aaaa _____ / _____ / _____

Anexo C. Presupuesto

Presupuesto general de la propuesta por fuentes de financiación

CONCEPTOS PRESUPUESTALES	FUENTES FINANCIACION		TOTAL
	FUNCIONAMIENTO	OTRA FUENTE	
Personal y/o talento humano	\$6'228.872	\$9'506.196	\$15'735.068
Equipos de uso propio	\$1'165.907		\$1'165.907
Servicios técnicos		\$2'000.000	\$2'000.000
Impresos y publicaciones		\$500.000	\$500.000
Materiales e insumos		\$5'439.820	\$5'439.820
Otros gastos de administración (Agua, Luz, telefonía e internet, etc)	\$887.373		\$887.373
TOTAL	\$8'282.152	\$17'446.016	\$25'728.168

Descripción del rubro personal y/o de talento humano

Cargo y rol en el Proyecto	Tipo de vinculación	Dedicación (horas/ sem)	N° semanas	Valor Costo x hora	FUENTES FINANCIACION		TOTAL
					FUNCIONAMIENTO	OTRA FUENTE	
Residente Hematología UN /Investigador principal.	Estudiante Fase I (Sem 1 a 27)	4	27	46599		5032692	5032692
	Fase II(Sem 28 a 39)	8	12	46599		4473504	4473504
Profesional especializado/Investigador secundario.	Planta	5	12	53267	3196020		3196020
Profesional especializado/Investigador Secundario	Planta	5	12	46599	2795940		2795940
Técnico Patología	Planta	8	2	14807	236912		236912
TOTAL					\$6'228.872	\$9'506.196	\$15'735.068

Descripción de servicios técnicos y asesorías

Servicio técnico y/o asesoría	Justificación	Fuente	Total

Asesoría epidemiológica	Análisis de datos	Investigador principal	\$2'000.000
-------------------------	-------------------	------------------------	-------------

Impresos y publicaciones: Descripción de publicaciones

Publicaciones planeadas	Justificación	Fuente	Total
Preparación de artículo científico para revista	Publicación de resultados del estudio	Investigador principal	\$500.000

Materiales e insumos

- Equipos :

Equipos	Justificación	FUENTES FINANCIACION		TOTAL
		FUNCIONAMIENTO	OTRA FUENTE	
COMPUTADORES (propio e institucional)	6 meses	\$876.000	\$0	\$876.000
MICROSCOPIOS Y CAMARAS	- Universal Axioplan Carl Zeiss™ - Digital integrado Coolscope CS1™ de Nikon.	\$289.907	\$0	\$289.907
TOTAL		\$1'165.907	0	\$1'165.907

- Insumos :

Insumo	Justificación	Fuente	Total
Anticuerpo policlonal antiSOX11 producido en conejos y de referencia HPA000536-100ul (Valor por #3 viales)	Requerimiento para las inmunotinciones de las laminas seleccionadas.	Investigador principal	\$5'209.920
Anticuerpo monoclonal anticiclina D1 clona SP 4 (Valor unitario por cada inmunotinción nuevamente realizada o reconfirmada \$20.900 # 6)	Requerimiento para las inmunotinciones de las laminas seleccionadas.	Funcionamiento INC	\$125.400
Anticuerpo monoclonal anti Ki-67 MIB-1 (Valor unitario por cada inmunotinción de novo realizada \$20.900 # 5)	Requerimiento para las inmunotinciones de las laminas seleccionadas.	Funcionamiento INC	\$104.500
Total			\$5'439.820