



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL CENTRAL "DR. IGNACIO MORONES PRIETO"

TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA ESPECIALIDAD DE ANATOMÍA
PATOLÓGICA

**ASOCIACIÓN ENTRE LA INMUNOEXPRESIÓN DE CD68 Y CD163
Y LA ETAPA CLÍNICA DE PACIENTES CON LINFOMA DE
HODGKIN CLÁSICO**

DRA. NORA PATRICIA ORTEGA SÁNCHEZ

ASESOR
DR. CUAUHTÉMOC OROS OVALLE

ASESOR METODOLÓGICO
M. C JUAN FRANCISCO HERNÁNDEZ SIERRA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIDAD EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

TÍTULO DE TESIS
ASOCIACIÓN ENTRE LA INMUNOEXPRESIÓN DE CD68 Y CD163 Y LA ETAPA
CLINICA DE PACIENTES CON LINFOMA DE HODGKIN CLASICO

PRESENTA
NORA PATRICIA ORTEGA SÁNCHEZ

Firmas

Asesor Dr. Cuauhtémoc Oros Ovalle	
Co – asesor (Asesor metodológico) M.C Juan francisco Hernández Sierra	
Sinodales	
Dra. Mary Carmen Gutiérrez Gil	
Dra. Olga Johnson Ponce	
Dr. David Martínez Galla	
M.C. Ma. del Pilar Fonseca Leal Jefe de Investigación y Posgrado Clínico de la Facultad de Medicina	M. en C. Nadia Judith Gómez Hernández Coordinador de la Especialidad en Anatomía Patológica

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El Linfoma de Hodgkin es una neoplasia maligna originada en el sistema linfático y como una proliferación clonal de células B y tiene una diseminación ganglionar por contigüidad. La mayoría de las formas de linfoma de Hodgkin son altamente curables. Estudiando el microambiente tumoral se ha descubierto que tiene un rol importante en la progresión de las neoplasias malignas, dentro de este microambiente se encuentran los macrófagos asociados a tumores que han sido cruciales tanto para la defensa del organismo en la progresión de la neoplasia como para el origen, proliferación, metástasis y supervivencia de las células tumorales. Se ha asociado que, a la mayor expresión de estos macrófagos, se tiene un estadio clínico y respuesta terapéutica pobre.

OBJETIVO: Asociar la inmunoexpresión entre CD68 y CD163 por etapa clínica en pacientes con linfoma de Hodgkin clásico. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se analizaron casos con diagnóstico de Linfoma de Hodgkin clásico, a los cuales se les realizó estudio de inmunohistoquímica de CD68 y CD163 en un período de 8 años. Además, se registró edad, variante histológica y etapa clínica.

RESULTADOS: Se incluyeron 33 pacientes, la edad promedio fue de 34.78 años (DE 22.1 años). La inmunoexpresión de los anticuerpos son divididos por estadio clínico en temprano (I y II) y avanzado (III y IV), y de acuerdo a la expresión de ambos anticuerpos, casos positivos para CD68 y CD163 en estadio temprano son 8(24.4%) en estadio avanzado 14 casos (42.4%) ($p=0.31$); los casos positivos a CD68 y negativos para CD163 ($p=0.37$); casos negativos para CD68 y positivos para CD163, 3 casos (9.09%) en estadios tempranos, y 4 casos (12.1%) en estadios avanzados ($p=0.97$). De manera global la expresión positiva global por anticuerpo que son positivos a CD68 10(30.3%) en estadio temprano y 15 (45.4%) en estadio avanzado ($p=0.61$); los casos positivos a CD163 son 11 (33.3%) en estadio temprano y 18 casos (54.5%) es estadios avanzados ($p=0.15$). **CONCLUSIONES:** En este estudio no hay una significancia estadística para la asociación de los anticuerpos CD68 y CD163 con el estadio clínico del paciente.



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Tesis para obtener el Diploma de la Especialidad en Anatomía Patológica



DEDICATORIAS

A mi familia por su cariño en estos años lejos de ellos.

A mi madre, por su amor y apoyo incondicional, en los mejores y peores momentos. Gracias.



AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros de residencia y ahora amigos y colegas.

A mis maestros: Dr. Cuauhtémoc Oros, Dra. Nadia Gómez, Dra. Claudia Peña, Dr. David Martínez y Dra. Olga Johnson, por sus enseñanzas y paciencia para lograr el objetivo de convertirme en especialista, el tiempo y las experiencias compartidas.

A la Dra. Mary Carmen Gutiérrez Gil por su toda su paciencia, regaños y enseñanzas, el tiempo compartido es el mejor de los regalos, no alcanzan palabras para agradecer y dar reconocimiento a su perseverancia y labor en inculcarme valores de excelencia profesional y personal.

ÍNDICE

RESUMEN	I
DEDICATORIAS	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ANTECEDENTES.	1
JUSTIFICACIÓN.	16
HIPÓTESIS.	17
OBJETIVOS.	18
SUJETOS Y MÉTODOS.	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	21
ÉTICA.....	22
RESULTADOS.	23
DISCUSIÓN.	34
LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.	37
CONCLUSIONES.....	38
BIBLIOGRAFÍA.	40
ANEXOS.	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características clínicas del LH de acuerdo a variedad histológica.....	3
Cuadro 2. Revisión de Cotswold de la clasificación de Ann Arbor.....	4
Cuadro 3. Diferencia de la definición de los grupos de riesgo entre EORTC y GHSG.....	5
Cuadro 4. Cuadro de variables.....	19
Cuadro 5. Distribución de anticuerpos, según Estadio Ann Arbor.....	27
Cuadro 6. Inmunoexpresión positiva y negativa a CD68 y CD163 en estadios cénicos temprano y avanzado	29
Cuadro 7. Características clínicas de la población estudiada.....	31
Cuadro 8. Características de estudios incluidos	33

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Total de casos por edad.....	22
Gráfica 2. Porcentaje de casos por sexo	22
Gráfica 3. Total de casos por variante histológica	23
Gráfica 4. Total de casos por estadio temprano y avanzado.....	23
Gráfica 5. Total de casos por estadio clínico de Ann Arbor.....	24
Gráfico 6. Total de casos por estadio clínico de Ann Arbor y su subclasificación....	24
Gráfico 7. Total de casos por terapéutica recibida.....	25
Gráfico 8. Total de expresión positiva a los anticuerpos CD68 y CD163.....	25
Gráfico 9. Distribución de anticuerpos, según estadio de Ann Arbor.....	27
Gráfico 10. Total de casos positivos y negativos a CD68 por estadio clínico.....	28
Gráfico 11. Total de casos positivos y negativos a CD163 por estadio clínico.....	28
Gráfico 12. Porcentaje de la expresión positiva del anticuerpo de acuerdo al estadio clínico.....	29
Gráfico 13. Total de casos positivos a CD68 de acuerdo a variedad histológica...	30
Gráfico 14. Total de casos positivos a CD163 de acuerdo a variedad histológica.	31

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

LH: Linfoma Hodgkin

RS: Reed-Sternberg

CH: Célula de Hodgkin

LHPLN: Linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular

LHC: Linfoma de Hodgkin clásico

ES: Esclerosis nodular

DL: Depleción linfocítica

CM: Celularidad mixta

RL: Rico en linfocitos

MAT: Macrófagos asociados a tumores

M1: Macrófago tipo 1

M2: Macrófago tipo 2

ANTECEDENTES.

El Linfoma de Hodgkin (LH) es una neoplasia maligna originada en el sistema linfático, por lo tanto es una proliferación clonal de células B y tiene una diseminación ganglionar por contigüidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica el linfoma de Hodgkin en dos entidades:

- Linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular (LHPLN)
- Linfoma de Hodgkin clásico (LHC)

Dentro de los linfomas y de la epidemiología de manera general, el LHPLN es poco frecuente, se diagnóstica en el 10% de los linfomas y el 90% restante corresponde a LHC. Estas dos entidades se pueden definir como neoplasias compuestas de células grandes mononucleares a multinucleadas rodeadas por una mezcla variable de células inflamatorias no neoplásicas. Muestran diferencias en su epidemiología, manifestaciones clínicas, histología, inmunofenotipo y perfil genético. En este trabajo nos enfocaremos en el análisis y características del linfoma de Hodgkin clásico, sus variedades y en la hipótesis propuesta que se expondrá más adelante.

1. HISTORIA

Se conocen descripciones de enfermedades linfoproliferativas que datan desde 1666, por Malpighi en hallazgos post mortem(1), sin embargo, se toma el inicio de la descripción de esta patología en el años de 1832, cuando Sir Thomas Hodgkin presenta ante la Sociedad Médico Quirúrgica Inglesa, su artículo titulado como “Apariencias mórbidas de las glándulas absorbentes y el bazo”(2); estudio anatomo patológico (sin descripción histológica) de siete casos con crecimiento en ganglios linfáticos y del bazo. Independientemente, en 1865, Sir Samuel Wilks publica un artículo con título de “Enfermedad Lardácea” en donde describe 45 casos, cuatro de ellos corresponden a los descritos originalmente por Hodgkin, además de dar una descripción más detallada tanto clínica y anatómica, y él la

describe como la “Enfermedad de Hodgkin” (2). Fue hasta el año de 1892 por Carl Sternberg en Viena, y posteriormente en 1902 por Dorothy Reed cuando han descrito a detalle las características de las células gigantes que hoy llevan el epónimo de Reed-Sternberg (RS), sin embargo, ninguno de los dos consideró la patología como una neoplasia maligna, Carl Sternberg la interpreto como una reacción tuberculosa y Reed como un proceso inflamatorio reactivo (3).

La primera clasificación útil fue propuesta por Jackson y Parker en 1944. Dividió al LH en tres tipos: paragranuloma, granuloma y sarcoma, pero esta clasificación no fue clínicamente útil en el resultado de la enfermedad (4). En 1965, en Rye, Nueva York, hasta ese momento los subtipos conocidos hasta ese momento se simplificaron y condensaron en los cuatro subgrupos que actualmente conocemos. Posteriormente, la clasificación de Lukes y Butler/Rye permaneció sin cambios hasta que fue sustituida en 1994 por la clasificación Revisada del Linfoma Europeo Americano (R.E.A.L.) que sirvió de base para la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (W.H.O.) en 2001, 2008 y posteriormente con la última actualización en 2017, se conservó lo propuesto, dividiendo la patología en dos tipos: linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular y linfoma de Hodgkin clásico.

2. EPIDEMIOLOGÍA

Las cifras para la población adulta según el Globocan (5), el linfoma de Hodgkin ocupa el lugar número 20 de neoplasias de mayor frecuencia con una incidencia total de 1.7 por 100,000 habitantes, de ambos sexos. Con una incidencia estimada de un total de 2 388 casos nuevos cada año, en donde se observa mayor predominio del sexo masculino con 1 483 casos y de 905 casos en mujeres. La incidencia de linfoma de Hodgkin tiene una distribución bimodal en los países desarrollados como Estados Unidos de Norteamérica. Según reporta la *American Cancer Society* en el año 2018, hay un estimado de 8 500 casos nuevos, teniendo mayor incidencia en el sexo masculino (4840 casos) contra el femenino (3660 casos) (5).

Hay que mencionar que el linfoma de Hodgkin tiene una incidencia dependiente con la edad, con un pico en adultos jóvenes (entre 15 a 35 años) y otro en ancianos (mayores a 60 años de edad) (6). Las presentaciones inusuales como la enfermedad limitada a bazo o sitios extraganglionares, han sido reportados en ancianos (4). En el cuadro 1 se resumen las características clínicas generales. En el estado de San Luis Potosí no se han encontrado estadísticas oficiales sobre la incidencia del linfoma de Hodgkin.

Cuadro 1. Resumen de las características clínicas según la variedad histológica

	ESCLEROSIS NODULAR	CELULARIDAD MIXTA	RICO EN LINFOCITOS	DEPLECIÓN LINFOCÍTICA
Frecuencia	40-70%	20-25%	5%	Menos del 1%
Proporción hombre: mujer	1:1	2:1	2:1	4:1
Edad media	15 a 34 años	38 años	30-50 años	57 años
Localización de presentación	Ganglios linfáticos cervicales o tumor en mediastino en el 80% de los casos.	Ganglios linfáticos cervicales y supraclaviculares bazo	Ganglios periféricos	Ganglios retroperitoneales y abdominales, bazo, médula ósea
Estadio clínico al diagnóstico	Estadio I - II	Estadio III -IV	Estadio I - II	Estadio III- IV
Síntomas B	Menos del 40%	Frecuente	Raro	común

3. FISIOPATOLOGÍA

Las células del entorno en el linfoma de Hodgkin son atraídas por linfoquinas, diversas interleucinas, factor de necrosis tumoral alfa y factor de crecimiento transformador beta (7). Estas linfoquinas son las responsables de los síntomas clínicos y del cuadro histológico; la producción de IL-1 e IL-6 se correlacionan con los síntomas B, y la producción de IL-5 con la eosinofilia tisular y sanguínea (7). Se ha concluido que las células neoplásicas del LH corresponden a linfocitos B con características moleculares propias de células centrolímbicas, pero incapaces de producir inmunoglobulinas funcionales. Estas células no son eliminadas mediante apoptosis en el centro germinal, como sucedería en condiciones fisiológicas con este tipo de linfocitos B defectuosos (7).

4. ESTADIO CLINICO

En 1971, se adoptó una clasificación de estadificación clínica por etapas para usarlo como método para resumir la extensión de la neoplasia, conocida como el sistema de estadificación de Ann Arbor, que posteriormente se modificó en una reunión en Cotswold, Inglaterra. Esta clasificación se explica en el cuadro 2 y se esquematiza en la figura 1.

Cuadro 2. Revisión de Cotswold de la clasificación de Ann Arbor

Estadio	Definición
I	Involucro de una región de ganglios linfáticos de estructura linfoide.
II	Involucro de dos o más regiones de ganglios linfáticos en el mismo lado del diafragma; el número de sitios anatómicos debe indicarse con un sufijo (por ejemplo, II3).
III	Involucro de las regiones o estructuras de los ganglios linfáticos a ambos lados del diafragma.
III ₁	Con o sin ganglios esplénicos, hiliares, celíacos o porta.
III ₂	Con ganglios paraaórticos, ilíacos o mesentéricos.
IV	Involucro de sitios extranodales más allá de los designados.

Además de la clasificación anteriormente mencionada en la tabla, a su clasificación se le agregan los siguientes sufijos:

- **A:** Sin síntomas.
- **B:** Con presencia de síntomas B.
- **X:** Enfermedad voluminosa (ensanchamiento de mediastino en T5-T6; o máximo de masa ganglionar mayor a 10cm).
- **E:** Afección de un solo sitio extraganglionar o contiguo al sitio ganglionar conocido de la enfermedad.

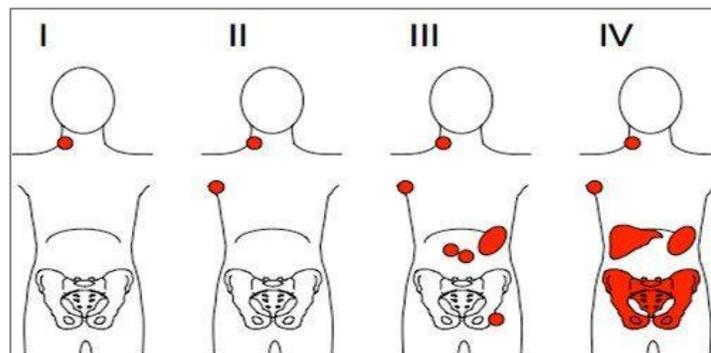


Fig 1. Esquema del estadio clínico por Ann Arbor

El estadio clínico preciso es extremadamente importante ya que la historia natural de la enfermedad sugiere que surge en un solo sitio y luego se propaga desde ese sitio en un patrón ordenado y más o menos predecible desde un sitio linfoides a sitios linfoides contiguos y desde sitios linfoides a sitios no linfoides contiguos (7) Esta estadificación requiere una evaluación cuidadosa del paciente, que incluye una historia clínica completa, un examen físico detallado y estudios de imagenología (radiografía y tomografía axial computarizada) y de laboratorio.

5. FACTORES PRONÓSTICOS

Clínicamente, los pacientes con linfoma de Hodgkin y de acuerdo a la Organización Europea de Investigación y Tratamiento del Cáncer (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*, EORTC) y el Grupo de Estudio Alemán del Linfoma de Hodgkin (*German Hodgkin Study Group*, GHSG) se dividen en tres grupos pronósticos, la definición de este grupo pronóstico va a establecer la elección del tratamiento (8), ver cuadro 3.

Cuadro 3. Diferencias de definición de los grupos de riesgo entre EORTC y GHSG

Grupo de Riesgo	EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer)	GHSG (German Hodgkin Study Group)
Temprano favorable	Estadio clínico I-II sin factores de riesgo (enfermedad supradiaphragmática)	Estadio clínico I-II sin factores de riesgo
Temprano desfavorable	Estadio clínico I-II con más de un factor de riesgo (enfermedad supradiaphragmática)	<ul style="list-style-type: none"> • Estadio clínico I • Estadio clínico IIA con más de un factor de riesgo • Estadio clínico IIB con factores de riesgo C/D pero no A/B.
Avanzado	Estadio clínico III-IV	<ul style="list-style-type: none"> • Estadio clínico IIB con factores de riesgo A/B • Estadio clínico III-IV
Factores de riesgo	<ul style="list-style-type: none"> a) Tumor mediastinal grande b) Edad mayor a 50 años c) VSG elevado (≥ 50mm/h sin síntomas B, o ≥ 30mm/h con síntomas B) d) Afección a más de 4 áreas ganglionares. 	<ul style="list-style-type: none"> a) Tumor mediastinal grande b) Enfermedad extraganglionar c) VSG elevado (≥ 50mm/h sin síntomas B, o ≥ 30mm/h con síntomas B) d) Afección a más de 3 áreas ganglionares.

En 1998 fue introducida la Escala de Pronóstico Internacional (*International Prognostic Score*, IPS) para pacientes con linfoma de Hodgkin avanzado; esta

escala está compuesta por siete factores adversos con un efecto pronóstico independiente (8):

- Albumina sérica menor a 4g/ml
- Hemoglobina menor a 10.5 g/ml
- Sexo masculino
- Edad mayor a 45 años
- Estadio clínico IV (de acuerdo a la clasificación de Ann-Arbor)
- Leucocitosis (mayor a $15 \times 10^9/L$)
- Linfocitopenia (menor a $0.6 \times 10^9/L$)

Sumando el total del número de estos factores se puede obtener un índice, el IPS, de 0 a 7, con descenso del 8% en la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad por cada uno de los factores presentes. El IPS también influye de manera similar sobre la supervivencia global (9).

6. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

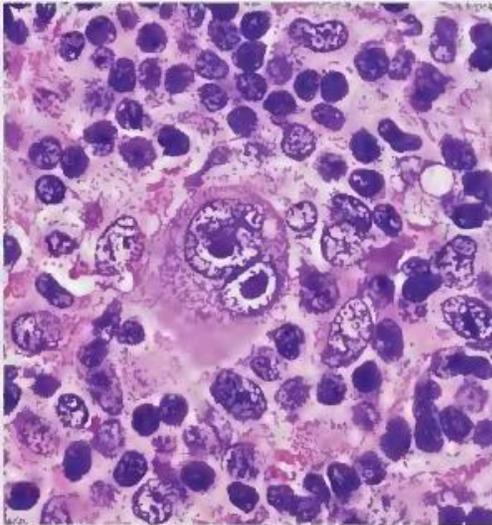


Fig 2. Célula Reed-Sternberg clásica, binucleada con nucleolo prominente y eosinófilo, semejando a ojos de búho. OMS 2017.

Para establecer el diagnóstico de linfoma de Hodgkin es necesaria la sospecha clínica y la confirmación histopatológica por medio de las características morfológicas de esta patología. Una de las características más sobresalientes observadas en el corte histológico es la célula de Reed- Sternberg. En la forma clásica es una célula grande, que mide entre 20-50 μm , incluso hasta más de 100 μm , con presencia de dos o más núcleos, de forma lobuladas. El patrón nuclear es usualmente vesiculoso con grumos gruesos

de cromatina dispersa (10). Esta binucleación da la apariencia de “ojos de búho”, como se observa en la figura 2. Estas células pueden ser escasas o numerosas según las características de la variedad histológica. Existen variantes morfológicas de las células de Reed-Sternberg; las variantes **mononucleares**, la cual solo tiene un núcleo con un gran nucléolo a modo de inclusión; las **células lacunares** tienen

núcleos más delicados con citoplasma pálido abundante y con artificios por retracción, lo que les otorga esa imagen característica; las células **momificadas (apoptósicas)** son células RS que sufren una forma de muerte celular en la cual la célula pierde volumen y se torna picnótica (11). Otras variantes son las **linfohistiocíticas** (o células L&H) con núcleos polilobulados con nucléolos poco prominentes y citoplasma muy amplio y por último las **pleomórficas**, estas últimas son características del linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular (NLPHL). Se muestran algunas variantes ya descritas anteriormente en la figura 3.

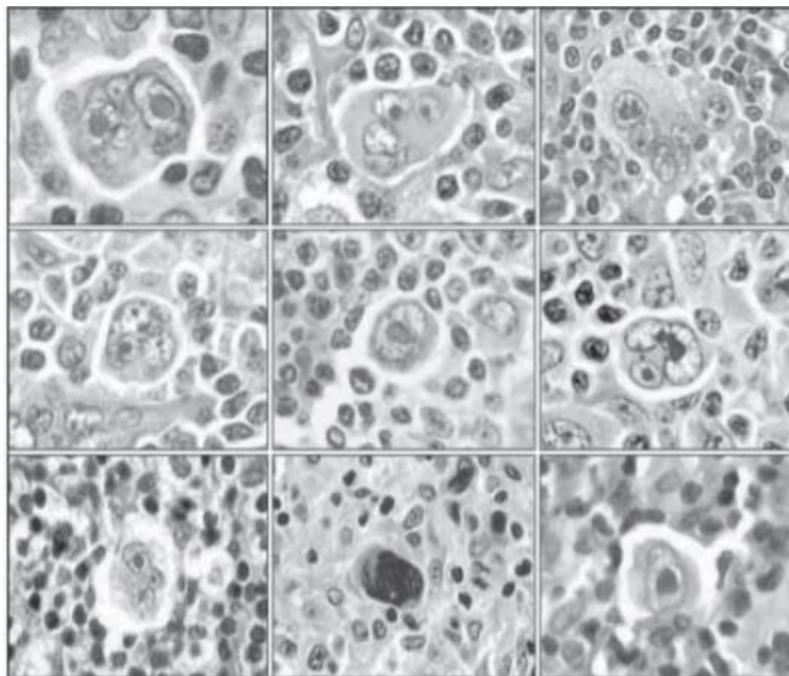


Fig 3. Variedad citológica de las células de Reed-Sternberg. Lara-Torres C, Ortiz Hidalgo C. Patol Rev Latinoam 2009;47(1):35-45.

6.1. VARIEDADES HISTOLÓGICAS

Los subtipos histológicos, son basados en la arquitectura tisular y las características del infiltrado reactivo. Son cuatro subtipos, de los cuales la variante esclerosis nodular y celularidad mixta son los más comunes, y la variante rico en linfocitos y depleción linfocítica son más infrecuentes.

6.1.1. ESCLEROSIS NODULAR

A la microscopia hay nódulos celulares rodeados por bandas de colágena concéntrica y birrefringentes, estos nódulos frecuentemente muestran la presencia

de células lacunares y momificadas; pueden contener áreas de necrosis francas y formación de abscesos (13). Se acompaña frecuentemente de un fondo

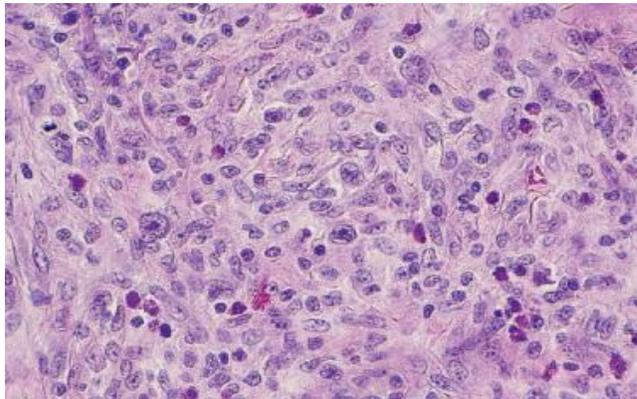


Fig 4. Foto micrografía HyE, 40x. Muestra infiltrado inflamatorio, incluyendo eosinófilos y células de Reed-Sternberg.

inflamatorio con población mixta linfocitos, neutrófilos y eosinófilos, es fácil identificar células plasmáticas y macrófagos (ver figura 4). En esta variedad histológica, si hay un predominio de alguna característica morfológica, se puede referir como variante sincicial, sarcomatoide o

sarcomatoso. El subtipo sincicial del linfoma de Hodgkin clásico, se caracteriza por presentar agregados confluentes de células lacunares, y una arquitectura cohesiva que puede recordar a un linfoma no Hodgkin (14). De acuerdo con el Sistema Nacional Británico de Investigación en Linfomas (*British National Lymphoma Investigation System, BNLS*), separa esta variedad en dos grados, la cual evalúa el número de células de Reed-Sternberg, grado de anaplasia de dichas células y el grado de fibrosis (14):

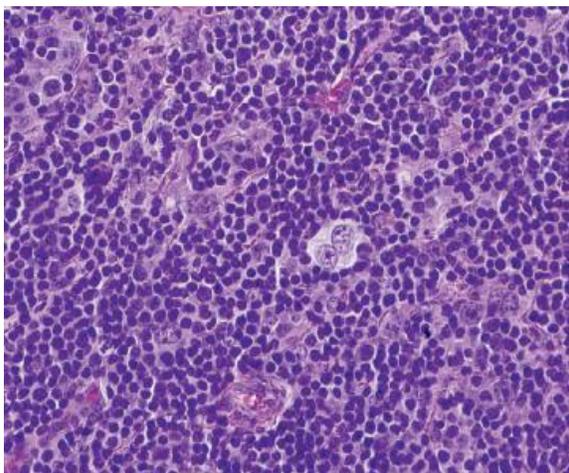


Fig 5. Fotomicrografía de LHC celularidad mixta, HyE 10x, muestra célula Reed-Sternberg típica con un fondo mixto de linfocitos pequeños e histiocitos.

- Grado 1: Escasas células de Reed-Sternberg, en un infiltrado inflamatorio mixto, o rico en linfocitos.
- Grado 2: Agregados de células de Reed-Sternberg o pleomorfismo citológico en más del 25% de los nódulos.

6.1.2. CELULARIDAD MIXTA

Es el segundo subtipo histológico más frecuente, en cuanto a pronóstico es

una patología agresiva. Las células Reed-Sternberg clásicas están dispersas. El fondo consiste en una población heterogénea de linfocitos pequeños, eosinófilos,

células plasmáticas e histiocitos. Algunos linfocitos pueden mostrar pleomorfismo nuclear (14) ver figura 5.

6.1.3. RICO EN LINFOCITOS

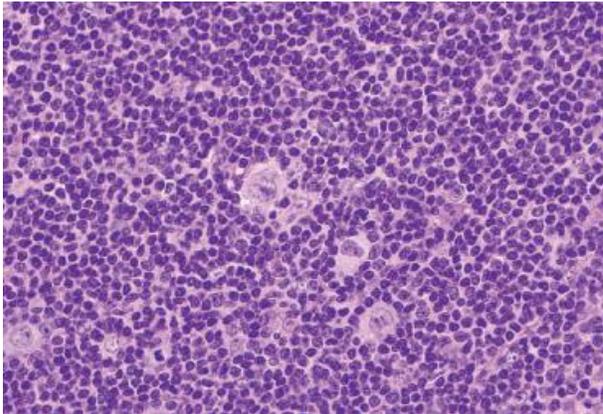


Fig 6. Fotomicrografía de LHC rico en linfocitos, HyE 10x, muestra variantes de células Reed-Sternberg con un fondo de linfocitos pequeños.

Se caracteriza por la presencia de escasas células de Reed-Sternberg en un fondo de predominio linfocítico reactivo (15) como se puede observar en la figura 6. De acuerdo al Grupo de Trabajo Europeo, se describen dos patrones de crecimiento: patrón nodular, que muestra una arquitectura nodular, estos nódulos están compuestos por linfocitos de la

zona marginal diseminados, se encuentran a menudo centros germinales excéntricos que son pequeños y compactos, y se acompaña en ocasiones de escasos histiocitos en comparación con la cantidad existente de linfocitos. La característica más llamativa es la escasez e incluso la ausencia de células plasmáticas, eosinófilos y neutrófilos (16). Por otra parte, la variante difusa muestra un patrón de crecimiento interfolicular o difuso con células clásicas Reed-Sternberg en un ambiente de linfocitos pequeños en ausencia de células plasmáticas, eosinófilos y neutrófilos, como la variante nodular.

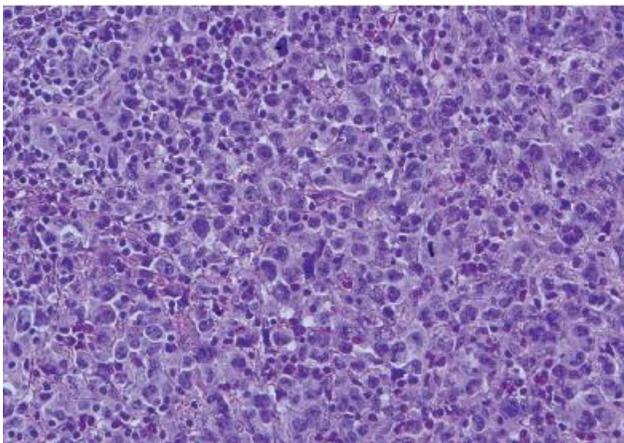


Fig 7. Fotomicrografía de LHC variante depleción linfocítica, HyE 10x, se muestra un infiltrado neoplásico constituido por un predominio de células de RS con una mezcla de escasos linfocitos y eosinófilos.

6.1.4. DEPLECIÓN LINFOCÍTICA

Es el subtipo histológico menos común. Histológicamente muestra un infiltrado difuso e hipocelular, con células Reed-Sternberg diseminadas en un fondo de población celular heterogénea, ver

figura 7; la presencia de bandas de colágena organizadas debe diferenciarse de la variedad esclerosis nodular. El tipo reticular, es caracterizado por sábanas de células atípicas, incluyendo, células Reed-Sternberg monstruosas y células anaplásicas (16).

7. INMUNOHISTOQUÍMICA

Mediante estudios de inmunohistoquímica se ha demostrado el origen linfoide B de las células de Reed-Sternberg, además de expresar marcadores, tanto de línea linfoide B (CD19, CD20, CD22) (17), como de línea linfoide T (CD43, CD2, CD4, CD8) (18), de línea monocítica (CD68, alfa-1-antitripsina, lisozima) (19), o de células presentadoras de antígeno como las células dendríticas (antígenos HLA de clase II, CD21) (20,21). El panel de inmunohistoquímica más frecuentemente utilizado para el diagnóstico del Linfoma de Hodgkin Clásico es CD15+, CD30+, PAX5+, MUM-1+y VEB+/- y negatividad para CD45, OCT2 y BOB 1; en ocasiones positiva a CD20 y CD79a; o cual dependerá del tipo de Célula de R-S y del entorno celular.

El anticuerpo **CD30** es una glicoproteína transmembrana tipo I compuesto por 595 aminoácidos, de 120/105kDa de peso molecular, y miembro de la familia de factor de necrosis tumoral (22). Es expresado en el 85 al 96%, su positividad consiste en su inmunorreacción en la membrana y en la zona del aparato de Golgi, con lo que se conoce como patrón *dot like* o acentuación en el área perinuclear (23). El anticuerpo **CD15** reconoce un glucolípido (lacto-N-fucopentosa III ceramida) conocido como hapteno X, coexistente en algunas otras células como los granulocitos, monocitos, macrófagos tisulares y en células epiteliales (24). Tiene reacción en la membrana celular, citoplasma y en forma de punto paranuclear que correspondiente a la zona del aparato de Golgi (24), encontrándose en el 75 al 85% de los casos, pero en ausencia de su expresión no excluye el diagnóstico.

Las células de Reed-Sternberg pueden expresar **CD20**, pero este es débil y en pocas células, se considera que en un 31% las células de Reed-Sternberg son positivas a este anticuerpo (25). **PAX-5** se considera positivo en el 80-98% de los casos (25), por lo que confirma la naturaleza de las células de Reed-Sternberg,

como células B. Su expresión es nuclear, débil; si la expresión es uniforme intensa o negativa debe considerarse la posibilidad de otros diagnósticos diferenciales como un linfoma difuso de células grandes B, linfoma de células grandes anaplásico, linfomas de estirpe T o linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular. Es característico que las células de Reed- Sternberg sean negativas al factor de transcripción **OCT-2**, lo que lo distingue principalmente del linfoma de predominio linfocítico nodular, también puede expresarse **EMA** en sólo el 5% de los casos, pero es débil y focal. La **fascina** es intensamente positiva en las células de Reed-Sternberg.

8. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS CD68 Y CD163

En este trabajo se propone el uso de los anticuerpos CD68 y CD163 para la evaluación del comportamiento de la neoplasia; el anticuerpo **CD68** pertenece a la familia marcadores de lisosomas y endosomas, son conocidos no sólo por reconocer macrófagos sino también otro tipo de células que se pueden encontrar en el microambiente tumoral como son células mieloides, fibroblastos, células de Langerhans y células T (26). Con un patrón granular concentrado cerca del núcleo, puede encontrarse débil en proyecciones citoplasmáticas y con una gran tendencia a la tinción del fondo. El anticuerpo **CD163** es un anticuerpo que es más específico de macrófagos, se ha reportado que tienden a presentar una inmunorreacción con macrófagos M2 activados. En diversos estudios realizados por Luigi Panico *et al.*, Jonathan A. Harris *et al.*, Jonathan L. Klein *et al.*, que han reportado a CD163 y se ha podido relacionar con información adicional como predictivo de estadios más avanzados de la enfermedad, la presencia de síntomas B, enfermedad voluminosa o un alto IPS (27).

9. ROL EN EL MICROAMBIENTE

La supervivencia de las células de Reed-Sternberg y de Hodgkin depende de su microambiente, estas atraen células T, células B, neutrófilos, células plasmáticas, eosinófilos y mastocitos secretando quimiocinas como CCL5, CCL17 y CCL22 atraen células T cooperadoras 2 y T reguladoras. Otras quimiocinas atraen a

eosinófilos y mastocitos, y la IL-8 atrae a neutrófilos. Estas quimiocinas también pueden tener efectos directos sobre las células de Hodgkin y Reed-Sternberg. Además, las células de Hodgkin y Reed-Sternberg producen varios factores inmunosupresores como IL-10, factor de crecimiento transformante β , galectina 1 y prostaglandina E2, las células RS y CH también expresan el ligando de la proteína de muerte celular programada 1 (PD1) que se une e inhibe la función citotóxica de las células T (28).

10. MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMORES Y SU BIOLOGÍA

Los macrófagos son células del sistema hemafagocítico mononuclear, derivados de los mastocitos circulantes en sangre, están dotados de capacidades de autorrenovación con gran plasticidad, capaces de desempeñar una amplia gama de funciones, entre las ya conocidas de fagocitosis de células y microorganismos, eliminación de células senescentes, detritus y cuerpos extraños; como reguladores de la hematopoyesis, presentadoras de antígenos para una respuesta inmunitaria específica; secreta productos biológicamente activos, tiene actividad antitumoral, ya sea citotóxica o citotáctica. Los tumores asociados al microambiente son conocidos por tener un rol vital al desarrollo y progresión de diferentes tumores malignos. Como parte de este microambiente, se encuentran los macrófagos asociados a tumores (MAT) que son cruciales para el origen, proliferación, metástasis y la supervivencia de las células tumorales (29). La presencia de numerosos macrófagos asociados a tumores en el linfoma de Hodgkin se ha correlaciona con la presencia de síntomas B y la poca respuesta al tratamiento. Se diferencian en dos distintos tipos funcionales: el macrófago **M1** (clásicamente activado) y el **M2** (alternativamente activado). De forma general, los macrófagos asociados a tumores presentan un fenotipo M2 y muestran principalmente acciones oncogénicas; facilitando la supervivencia, proliferación y la diseminación de células malignas, por lo cual, un alto número de estos macrófagos suele relacionarse con un mal pronóstico (30).

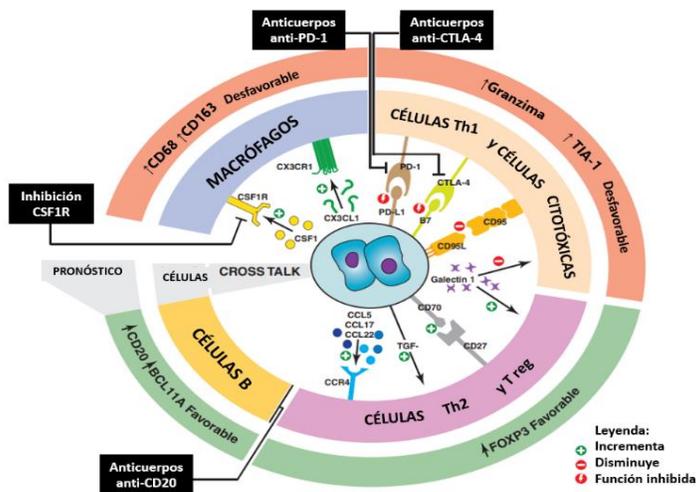


Fig 8. Biología y su significado clínico de los macrófagos asociados a tumores en el linfoma de Hodgkin. El esquema muestra la interacción de las células de RS y su microambiente.

La migración de los macrófagos es influenciada por un amplio número de citocinas y quimiocinas secretadas tanto por las células tumorales, fibroblastos estromales, células endoteliales y por los mismos macrófagos en un bucle autocrino: CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL12, CSF1 (*colony stimulating factor 1*, factor 1 estimulante de colonia) y VEGF (*vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento endotelio vascular) (31). Estos dos tipos funcionales de macrófagos son activados de manera distinta conforme al estímulo recibido; por lo tanto, cada macrófago polarizado expresa un perfil diferente de citocinas, enzimas y marcadores de superficie. Los macrófagos **M1** son macrófagos de tipo supresivo y son estimulados por patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns, PAMPS*), interleucina 12 (IL-12) e interferón gamma (IFN-γ) y se caracterizan por la expresión de factores proinflamatorios como IL-1β, IL-6, IL-12, IL-8, IL-23, y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species, ROS*) y de nitrógeno (*reactive nitrogen species, NOS*), además de niveles elevados del complejo principal de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex, MCH*) clase I y II, así también como de la quimiocina CXCL10 (32). De esta manera, los macrófagos tipo M1 participan en respuestas microbicidas y en la inmunidad antitumoral. Mientras que los macrófagos tipo **M2** promueven el crecimiento y la resistencia a los fármacos de las células tumorales. A través de la promoción de la angiogénesis, metástasis e inmunosupresión. Además de promover la progresión tumoral y la metástasis (32) y son estimulados por IL-4, IL-13, IL-21 e IL-33, complejos autoinmunitarios, activina A y glucocorticoides y por ende expresan IL-

factor 1, factor 1 estimulante de colonia) y VEGF (*vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento endotelio vascular) (31). Estos dos tipos funcionales de macrófagos son activados de manera distinta conforme al estímulo recibido; por lo tanto, cada macrófago polarizado expresa un perfil diferente de citocinas, enzimas y marcadores de superficie. Los macrófagos **M1** son macrófagos de tipo supresivo y son estimulados por patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns, PAMPS*), interleucina 12 (IL-12) e interferón gamma (IFN-γ) y se caracterizan por la expresión de factores proinflamatorios como IL-1β, IL-6, IL-12, IL-8, IL-23, y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species, ROS*) y de nitrógeno (*reactive nitrogen species, NOS*), además de niveles elevados del complejo principal de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex, MCH*) clase I y II, así también como de la quimiocina CXCL10 (32). De esta manera, los macrófagos tipo M1 participan en respuestas microbicidas y en la inmunidad antitumoral. Mientras que los macrófagos tipo **M2** promueven el crecimiento y la resistencia a los fármacos de las células tumorales. A través de la promoción de la angiogénesis, metástasis e inmunosupresión. Además de promover la progresión tumoral y la metástasis (32) y son estimulados por IL-4, IL-13, IL-21 e IL-33, complejos autoinmunitarios, activina A y glucocorticoides y por ende expresan IL-

4, IL-5, IL-10, e IL-13, arginasa 1, antagonista del receptor de IL-1 (*interleucin receptor antagonist*, IL-1Ra), molécula CD-163 (*receptor scavenger*), CD-206 (*macrophage mannose receptor C type 1*), y ligando CC 22 (CCL22) que están involucrados en la inmunidad humoral y en la cicatrización de heridas (33), ver figura 8.

El microambiente tumoral ha sido descrito extensamente por medio de la descripción morfológica, citometría de flujo y las técnicas de inmunohistoquímica, para estudiar la composición y disposición de las células no malignas. En este además de las células malignas, se encuentran otros tipos celulares residentes y células de linaje hematopoyético infiltradas como los macrófagos, neutrófilos, linfocitos y mastocitos. Todas estas células producen un ambiente único de interacción entre los leucocitos del hospedero y las células tumorales (34).

El tratamiento actual del linfoma de Hodgkin clásico, no es curativo en al menos el 20% de los pacientes con esta patología y una proporción similar de pacientes son sobre tratados. Es un reto identificar cuáles serán los pacientes que no tendrán una respuesta favorable al tratamiento estandarizado que consta de al menos cuatro ciclos de quimioterapia y si es indicado, radioterapia. El trasplante de células madre se reserva para los pacientes en quienes ha fallado el tratamiento primario (35) por lo que las decisiones iniciales y la estratificación del grupo de riesgo son basadas en variables clínicas que ayudan a distinguir los casos que tienen un alto riesgo de falla al tratamiento. Por estas razones es necesario el estudio de biomarcadores predictivos al momento del diagnóstico (36). Steidl *et al* utilizaron con el anticuerpo anti-CD68 en biopsias de 166 pacientes con neoplasia de macrófagos asociados a tumores, y se encontró una sobreexpresión del anticuerpo en los pacientes con falla en el tratamiento. El aumento de células CD68 se asoció significativamente con una reducción de la supervivencia libre de progresión y después de la quimioterapia con doxorubicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina (con o sin radioterapia) (37).



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Tesis para obtener el Diploma de la Especialidad en Anatomía Patológica



JUSTIFICACIÓN.

Diversos estudios del microambiente tumoral han reportado sobre los macrófagos asociados a tumores, en diferentes neoplasias y en cómo afecta el comportamiento de la neoplasia y su pronóstico.

El linfoma de Hodgkin tiene una incidencia relativamente baja, sin embargo, se ha visto que puede tener un comportamiento agresivo, contribuyendo a una baja supervivencia, resistencia al tratamiento o recaídas tempranas. Para examinar si el pronóstico adverso de los pacientes con linfoma de Hodgkin este estudio puede predecir en función a la aparición de macrófagos tipo M2, que son expresados con el anticuerpo CD163, mientras que la evaluación de los macrófagos tipo M1, se realizará con el anticuerpo CD68.

En México no existe un estudio que evalúe la inmunexpresión de CD68 y CD163 en el linfoma de Hodgkin clásico, la determinación de estos anticuerpos permitirá determinar su relación y utilidad para el pronóstico de la patología y por lo tanto la evidencia del microambiente tumoral por la presencia de macrófagos asociados a tumores tipo M1 y M2.



HIPÓTESIS.

¿Cuál es la asociación entre la inmunoexpresión del anticuerpo CD68 y CD163 en el linfoma de Hodgkin clásico de acuerdo a su etapa clínica?

OBJETIVOS.

Objetivo general:

- Determinar si existe asociación entre la inmunexpresión positiva de los anticuerpos CD68 y CD163 y la etapa clínica en el linfoma de Hodgkin clásico.

Objetivos específicos:

- Describir las características epidemiológicas de los pacientes con diagnóstico de linfoma de Hodgkin clásico del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” (edad, género, estadio clínico).
- Determinar la inmunoreacción de CD68 y su relación con la etapa clínica en linfoma de Hodgkin clásico.
- Determinar la inmunoreacción positiva de CD163 y su relación con la etapa clínica en linfoma de Hodgkin clásico.
- Determinar el OR de ambos marcadores asociados a etapa III y IV según la clasificación de Ann Arbor.

SUJETOS Y MÉTODOS.

Se seleccionó a través de los diarios disponibles, los números de quirúrgicos que contaran con diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico de linfoma de Hodgkin. Se obtuvo del archivo las laminillas y de ellas se seleccionó el bloque de parafina para realizar los cortes, se hizo un corte de 5 μ por cada caso y se colocaron en laminillas silanizadas debidamente identificadas, en total 33, y de los cuales, se realizaron dos anticuerpos (CD68 y CD163), por lo que se obtuvieron 66 laminillas para realizar el estudio de inmunohistoquímica. Los cortes se incubaron con el anticuerpo CD68(KP-1) mouse monoclonal y CD163(10D6) mouse monoclonal, (Ver anexo 2 y 3). La inmunorreacción se valoró de acuerdo a la experiencia del revisor; en el citoplasma y/o membrana de los macrófagos, considerando el resultado como negativo aun cuando la inmunoexpresión positiva sea menor al 30% de las células y como positivo cuando tengan una inmunoexpresión mayor del 30% del total de los macrófagos con una intensidad de moderada a intensa.

DISEÑO DEL ESTUDIO:

Transversal, analítico, retrospectivo.

LUGAR DE REALIZACIÓN: Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, en San Luis Potosí, San Luis Potosí.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

- Inclusión:
 - Diagnóstico histopatológico de linfoma de Hodgkin.
 - Diagnóstico confirmatorio por marcadores de inmunohistoquímica de linfoma de Hodgkin clásico en cualquier de sus variedades histológicas.
 - Espécimen tisular de ganglio linfático en el que sea valorable para el diagnóstico.
 - Disponibilidad de bloques de parafina en el archivo.

- Disponibilidad de expediente clínico con etapificación clínica según la clasificación de Ann Arbor.
- Exclusión:
 - Especímenes de biopsias que no corresponda a ganglio linfático.

VARIABLES EN EL ESTUDIO

- Variables Dependientes: Estadio clínico según clasificación de Ann Arbor.
- Variable Independiente:
 - Porcentaje de inmunexpresión positiva sobre el espécimen histopatológico de CD68
 - Porcentaje de inmunexpresión positiva sobre el espécimen histopatológico de CD163
- Variables de confusión/sociodemográficas: variable histológica, edad y sexo del paciente.

Cuadro 4. Cuadro de variables.

Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
<i>Etapa clínica</i>	Estadio clínico inicial según clasificación de Ann Arbor	1=estadio 1 y 2 2=estadio 3 y 4	N/A	Nominal dicotómica
<i>Inmunexpresión positiva a CD68</i>	Porcentaje de inmunexpresión positiva sobre el espécimen histopatológico	1=Positivo 2=Negativo	≥ 30% ≤30%	Nominal Dicotómico
<i>Inmunexpresión positiva a CD163</i>	Porcentaje de inmunexpresión positiva sobre el espécimen histopatológico	1=Positivo 2=Negativo	≥ 30% ≤30%	Nominal Dicotómico
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Edad	Años cumplidos al diagnóstico	1-80	Años	Continua
Sexo	Sexo biológico del paciente	Masculino Femenino	M F	Nominal dicotómica

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se calcularon medidas de tendencia central y dispersión de acuerdo a la variable de estudio, para la evaluación de la asociación se utilizó χ^2 o prueba exacta de Fisher de acuerdo al número de espera en casilla. El OR se calculó por β^e .

CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

3 grados de libertad x 10 o 20 = 30 -60 pacientes

Variable de respuesta dicotómica (regresión logística)

3 grados de libertad x 10 o 20 = 30 -60 pacientes / 1.6 (frecuencia) = 18.7 a 37.5 pacientes

Pacientes: 19 a 38 pacientes

Globocan incidencia de 1.6 por 100 000 habitantes

http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-able?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=904&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1#collapse-group-0-1



ÉTICA.

Investigación sin riesgo. En el presente estudio, no fue necesario hacer partícipe a los pacientes de manera directa, ya que estuvo basado en los informes histopatológicos y los bloques de parafina disponibles en el archivo. La manera de identificación de cada caso, fue sólo con el número de quirúrgico asignado, y los datos de cada uno de ellos se manejaron con estricta confidencialidad. Por lo tanto, no fue necesario obtener el consentimiento informado. Posterior a revisar la declaración de Helsinki, la ley general de salud y la Norma Oficial Mexicana del expediente clínico, se concluyó que no existe riesgo alguno para los pacientes.

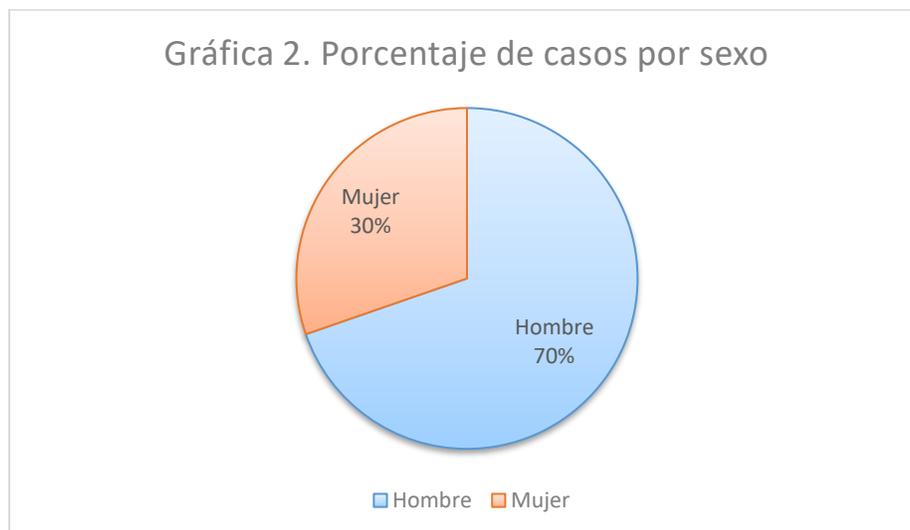
Cuenta con autorización del comité de ética e investigación No. 101-19 y registro: CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427 (ver anexos 4 y 5).

RESULTADOS.

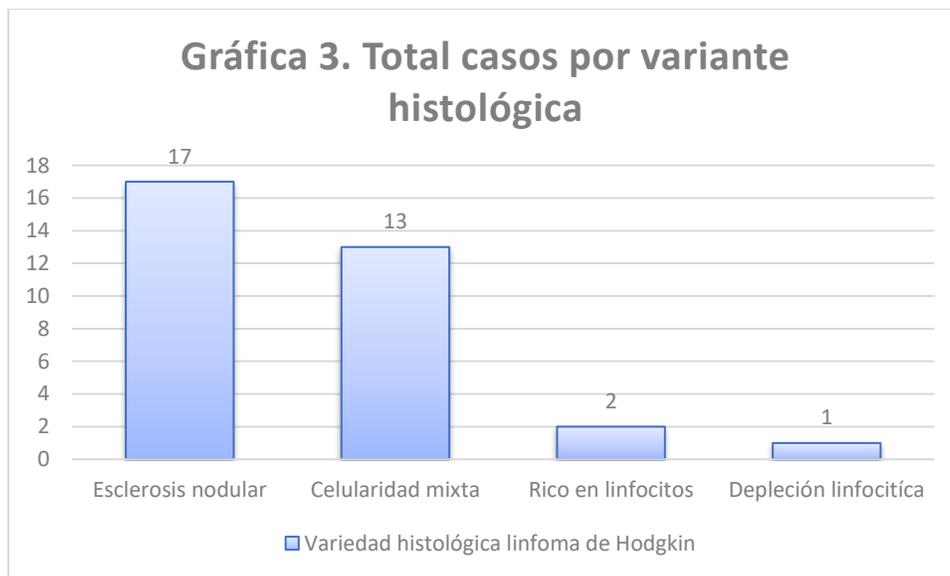
En un período de 9 años (enero de 2013 a enero del 2021), se recolectaron en el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” un total de 33 casos con diagnóstico histológico compatible con linfoma de Hodgkin, de los cuales 10 casos fueron mujeres, con un rango de edad de 20 años a 77 años; 23 casos fueron hombres con un rango de edad de 4 años a 80 años de edad. La edad promedio fue de 34.7 años (DE 22.1 años). En la gráfica 1 se muestra el total de casos de la población por edad.



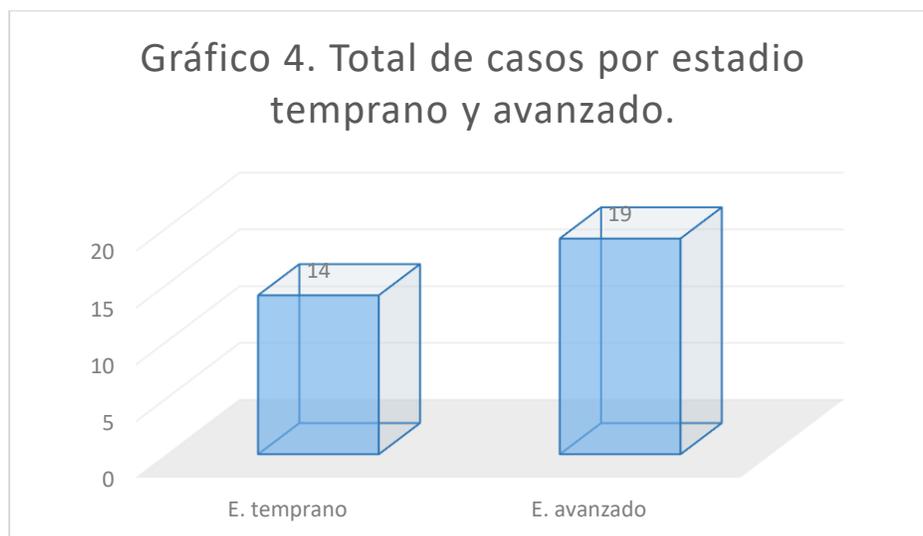
En la gráfica 2 se muestra el porcentaje de la población de acuerdo al sexo, el 70% (23 casos) corresponden al sexo masculino y 30% (10 casos) en el femenino, por lo que hay una mayor incidencia en el sexo masculino.



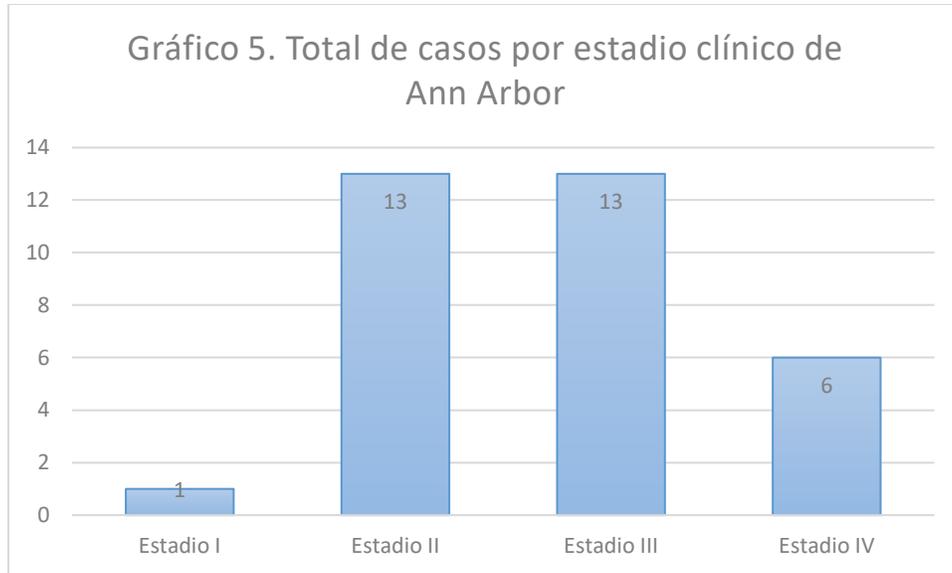
De acuerdo a sus características histológicas y su morfología, la variante histológica más frecuente fue esclerosis nodular con un total de 17 casos, lo cual representó el 51.5% de la población, seguido de la variedad celularidad mixta con un 39.3% (13 casos); las variantes menos comunes encontradas en este estudio fueron: rico en linfocitos, siendo solo el 6% con dos casos reportados y la variante de depleción linfocítica con un caso que representó solo el 3%.



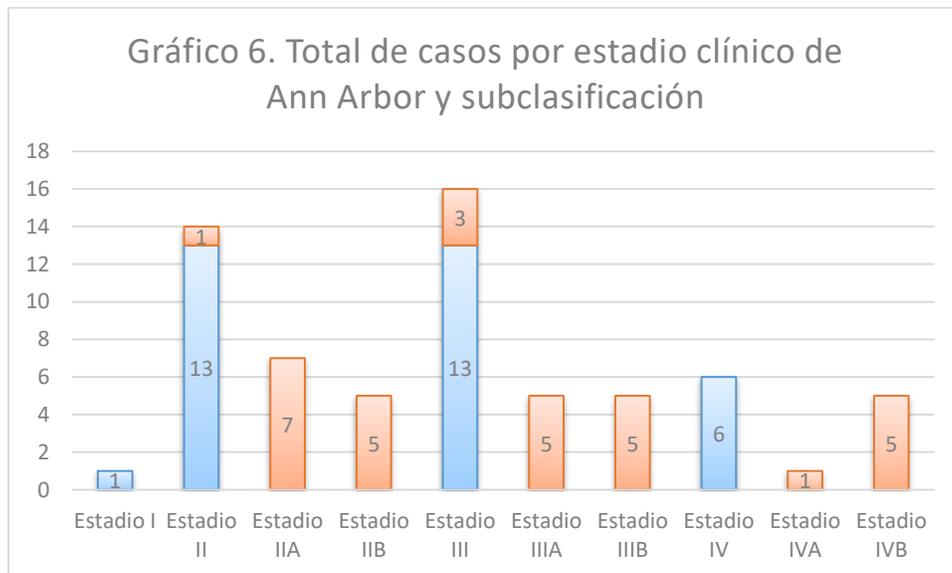
En la gráfica 4 se muestra la cantidad total de pacientes, divididos por el estadio clínico, con 14 casos (42.2%) que están clasificados como estadio temprano, y 19 casos (57.5%) como estadio clínico avanzado.



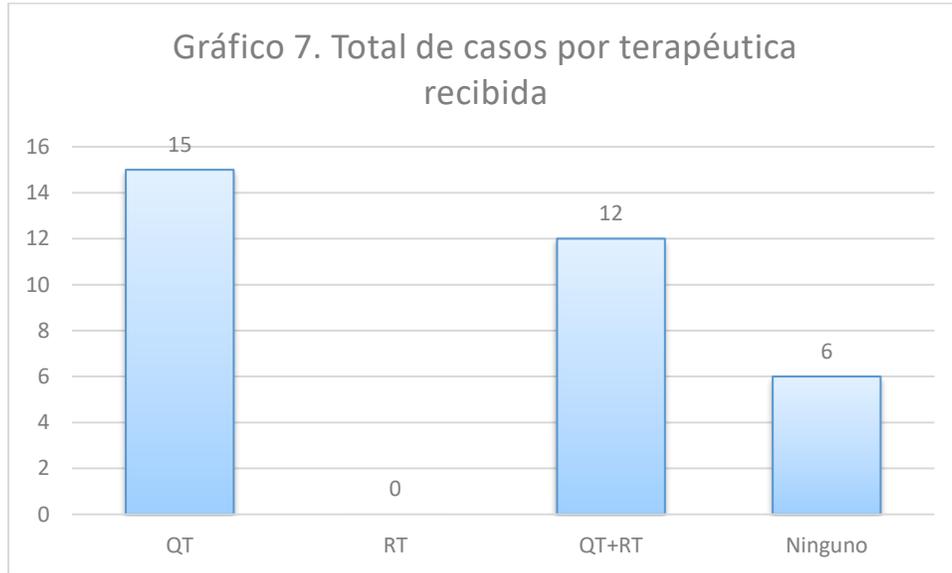
Del total de casos divididos en estadio temprano y avanzado, se desglosan de la siguiente de acuerdo al estadio clínico al momento del diagnóstico, y por la clasificación de Ann Arbor, la gran mayoría de los pacientes se encontraban en un estadio II y III, con un total de 13 pacientes para cada grupo (39.3%), seis en el estadio clínico IV (18.1%) y solo un paciente perteneciente al estadio clínico I que corresponde solamente al 3%.



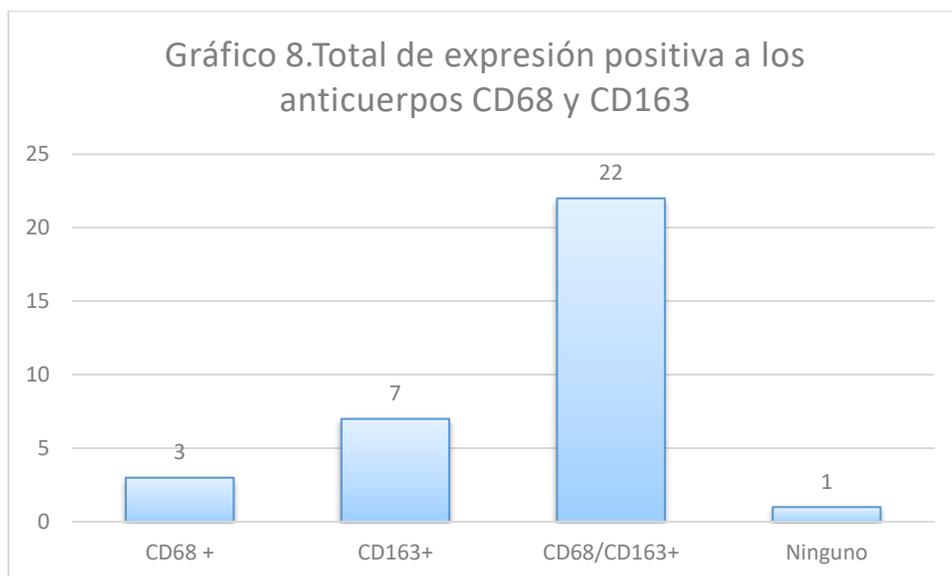
En el gráfico 6, se muestra la misma clasificación por estadio de Ann Arbor con subclasificación de acuerdo a la sintomatología asociada.



En la gráfica 7, ilustra el total de casos según el tratamiento recibido, 15 (45.5%) pacientes solo han recibido quimioterapia, ningún paciente recibió radioterapia por si sola, 12 pacientes (36.3%) tuvieron un esquema combinado de quimioterapia con radioterapia, 6 pacientes (18.1%) no recibieron ningún tratamiento.



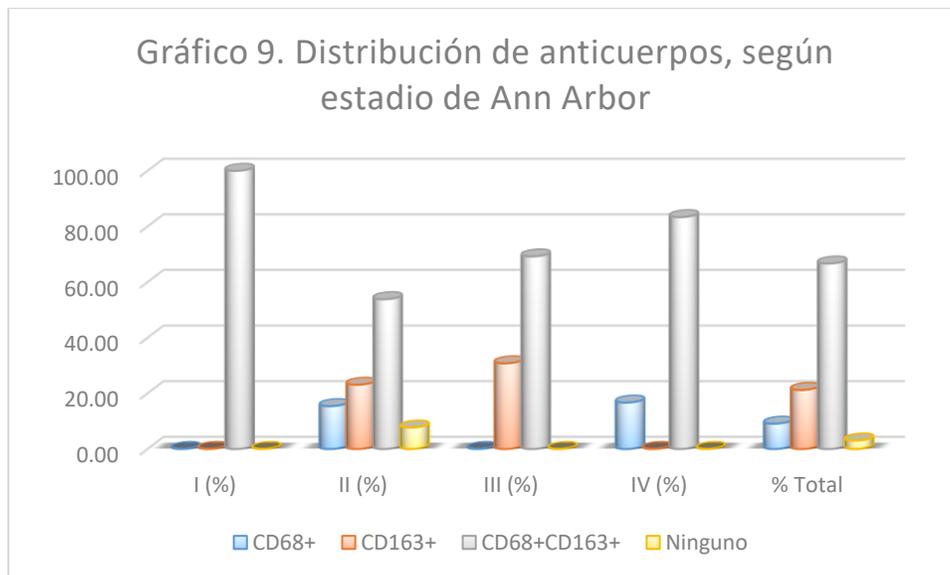
En la gráfica 8, muestra los casos que sólo son positivos para el anticuerpo de CD68 con un total de 3 casos (9.09%), los casos exclusivos positivos al anticuerpo CD163 son 7 (21.2%); 22 casos (66.6%) que han sido positivos para ambos anticuerpos y solo un caso (3.03%) no presentó ninguna expresión ambos anticuerpos.



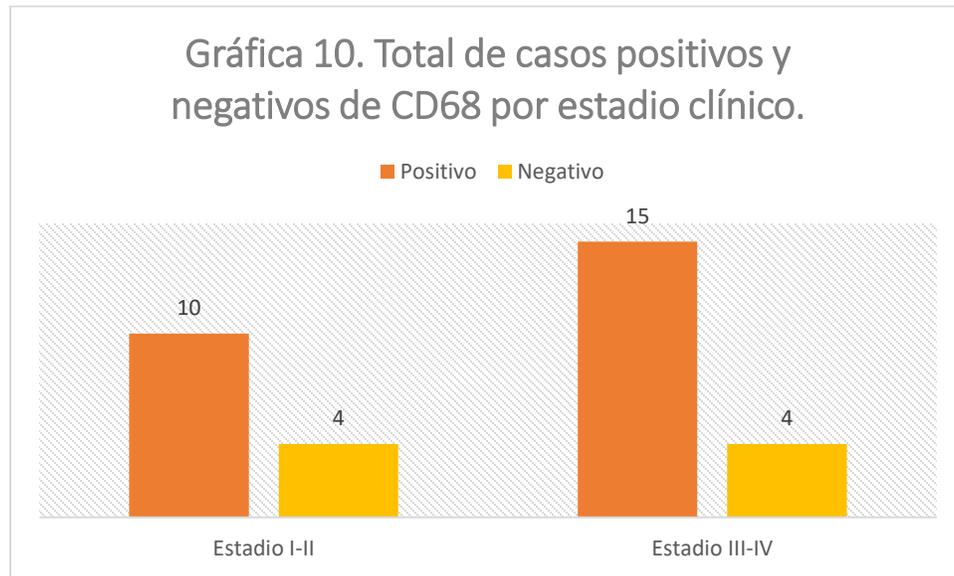
Cuadro 5. Distribución de anticuerpos, según Estadio Ann Arbor

Estadio Ann Arbor	I	(%)	II	(%)	III	(%)	IV	(%)	Total	%
CD68+ / CD163-	0	(0.00)	2	(15.38)	0	(0.00)	1	(16.67)	3	(9.09)
CD163+ / CD68-	0	(0.00)	3	(23.08)	4	(30.77)	0	(0.00)	7	(21.21)
CD68+ / CD163+	1	(100)	7	(53.85)	9	(69.23)	5	(83.33)	22	(66.67)
Ninguno	0	(0.00)	1	(7.69)	0	(0.00)	0	(0.00)	1	(3.03)
Total	1	(3.03)	13	(39.39)	13	(39.39)	6	(18.18)	33	(100)

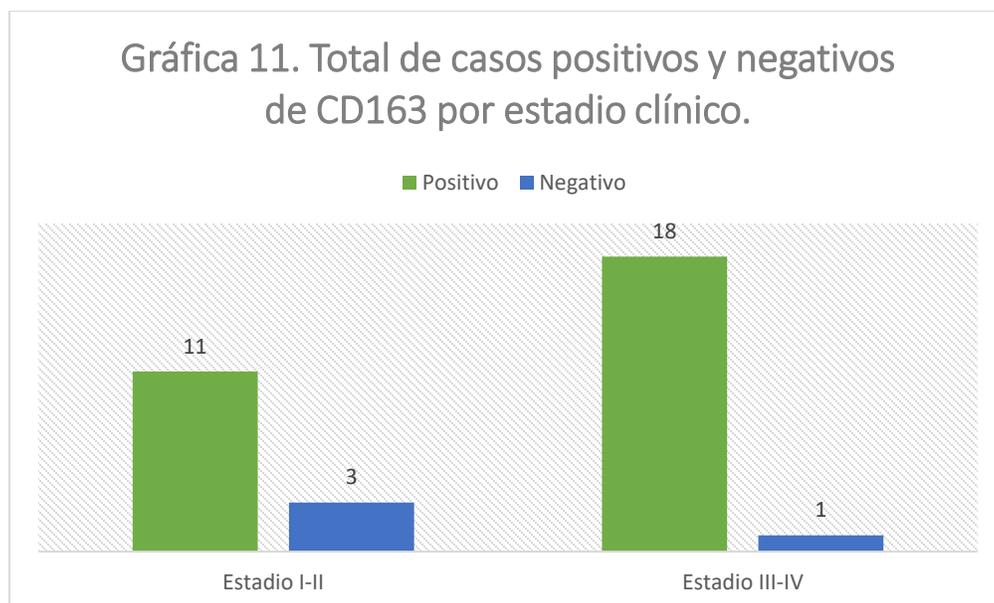
En la gráfica 9, se ilustra la distribución de anticuerpo según el estadio de Ann Arbor (cuadro 5) mientras que en el estadio I, solo hay un caso positivo a los anticuerpos CD68 y CD163; en el estadio II muestra los 13 casos que corresponden a 2 casos positivos a CD68, 3 casos solo positivos a CD163, 7 casos que son positivos a CD68 y CD163 y sólo un caso que no es positivo a ningún anticuerpo. En el estadio III son en total 13 casos de los cuales; 4 son positivos a CD163 y 9 son positivos a CD68 y CD163. Por último, en el estadio IV con un total de 6 casos, solo es un caso positivo a CD68 y 5 casos positivos a CD68 y CD163.



En la gráfica 10 se observa el total de casos positivos y negativos para el anticuerpo CD68, divididos por el estadio clínico; en los estadios tempranos (I-II) hay 10 casos positivos y 4 negativos, mientras que en los estadios clínicos avanzados se encuentran 15 casos positivos para el anti-CD68 y 4 negativos.



En la gráfica 11; se interpretó la inmunohistoquímica para el anticuerpo CD163, en los estadios clínicos I y II, se obtuvo que el 33.3% de los pacientes (11 casos) han sido positivos para el anticuerpo y 9.09% fue negativo; mientras que en los estadios avanzados el 54.54% (18 casos) han sido positivos y solo el 3% (1 caso) ha sido negativo.

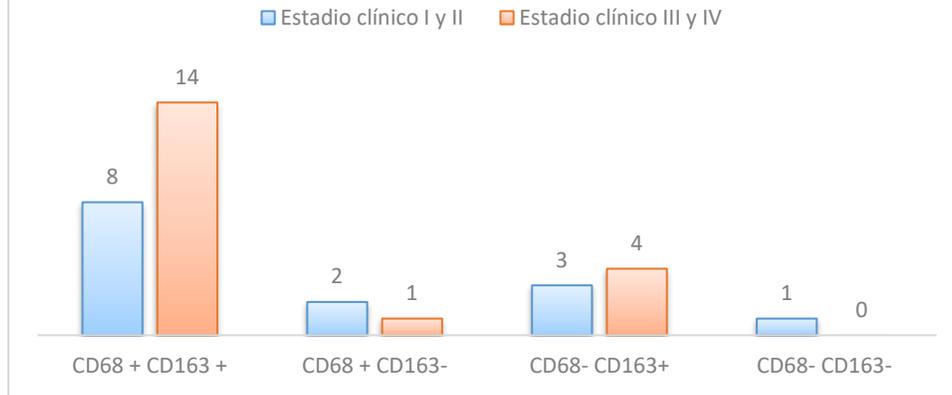


Cuadro 6. Inmunoexpresión positiva y negativa a CD68 y CD163 en estadios clínicos temprano y avanzado.

Variables	Grupo completo (N)%	Estadio clínico I y II (N)%	Estadio clínico III y IV (N)%	p
CD68 positivo CD163 positivo	22 (66.6%)	8 (24.24%)	14 (42.42%)	0.31
CD68 positivo CD163 negativo	3 (9.09%)	2 (6.06%)	1 (3.03%)	0.37
CD68 negativo CD163 positivo	7 (21.21%)	3 (9.09%)	4 (12.12%)	0.97
CD68 negativo CD163 negativo	1 (3.03%)	1 (3.03%)	0	0.23

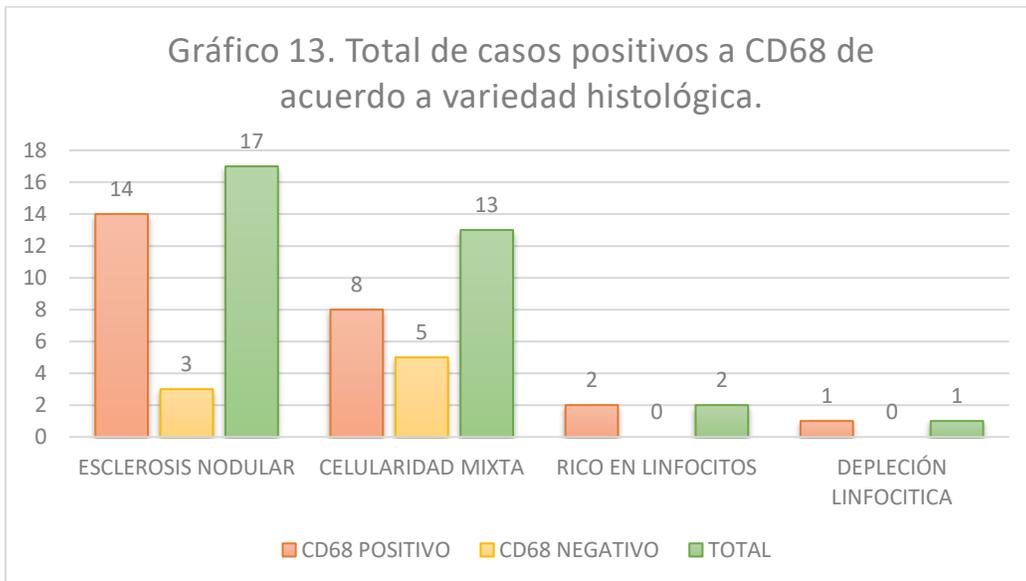
En el gráfico 12 se ilustran los resultados obtenidos y de acuerdo al cuadro 6, la inmunoexpresión positiva y negativa para ambos anticuerpos, CD68 y CD163, divididos por estadio clínico en temprano (I y II) y estadio avanzado (III y IV) obteniéndose los siguientes resultados: para los estadios tempranos la expresión de CD68 positivo y CD163 positivo son 8 casos (24.4%) y estadios avanzados con 14 casos (42.4%) ($p=0.31$); los casos positivos a CD68 y negativos para CD163 son 3 en total, en estadio temprano son 2 casos (6.06%) y en estadio avanzado un caso (3.03%) ($p=0.37$); casos negativos para CD68 y positivos para CD163, con un total de 7 casos de los cuales 3 casos (9.09%) se encuentran en estadios tempranos, y 4 casos (12.1%) son estadios avanzados ($p=0.97$); finalmente para los casos que han expresado ser negativos para ambos anticuerpos, es solamente un caso que se encuentra en estadio temprano (3.03%) ($p=0.23$).

Gráfico 12. Inmunoexpresión positiva y negativa a CD68 y CD163 en estadios clínicos temprano y avanzado.

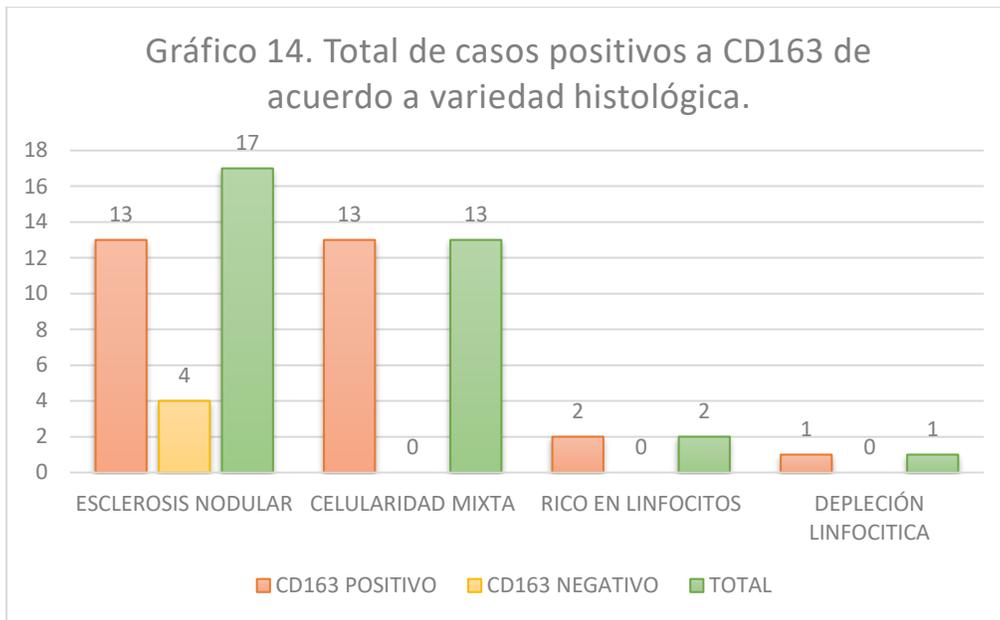


En el gráfico 13, se ilustra el total de casos positivos para la inmunorreacción positiva a CD68, de acuerdo a la variedad histológica. Se observa que de un total de 17 casos que corresponden a la variedad de esclerosis nodular, solo 14 (82.3%) son positivos y 3 (17.6%) negativos; celularidad mixta, con un total de 13 casos, sólo 8 (61.5%) son positivos y 5 negativos (38.4%); la variedad rica en linfocitos son sólo 2 casos (100%) que son positivos al anticuerpo y, por último, depleción linfocítica solo es un caso y es positivo (100%).

Gráfico 13. Total de casos positivos a CD68 de acuerdo a variedad histológica.



En la gráfica 14, se ilustra lo anterior nuevamente, el total de casos positivos a CD163 de acuerdo a la variedad histológica, esclerosis nodular, en total son 17 casos, los cuales 13 (76.4%) son positivos y 4 casos (23.5%) son negativos, celularidad mixta con un total de 13 casos los cuales todos fueron positivos (100%); rico en linfocitos son dos casos y son positivos al anticuerpo (100%); y depleción linfocítica solo un caso y es positivo (100%).



Cuadro 7. Características clínicas de la población estudiada.

Pacientes n=33 (%)

$\chi^2_9 = 6.572$
 $P = 0.68$
 $C_{Cramer} = 0.258$

<i>Características al diagnóstico</i>	Número de pacientes (%)
<i>Edad media</i>	34.7 años (DE 22.1 años).
<i>Hombres</i>	23 (69.6)
<i>Mujeres</i>	10 (30.3)

<i>Subtipo histológico</i>	
<i>Esclerosis Nodular</i>	17 (51.5)
<i>Celularidad Mixta</i>	13 (39.3)
<i>Depleción linfocítica</i>	1 (3.03)
<i>Rico en linfocitos</i>	2 (6.06)
<i>Estadios Ann Arbor</i>	
<i>I</i>	1 (3.03)
<i>II</i>	13 (39.3)
<i>III</i>	13 (39.3)
<i>IV</i>	6 (18.1)
<i>Estadio clínico</i>	
<i>Temprano</i>	14 (42.2)
<i>Avanzado</i>	19 (57.7)
<i>Tratamiento</i>	
<i>Solo quimioterapia</i>	15 (45.4)
<i>Solo radioterapia</i>	0
<i>Qt+Rt</i>	12 (36.3)
<i>Ninguna</i>	6 (18.1)
<i>Estado actual</i>	
<i>Recaída</i>	5 (15.1)
<i>Defunción</i>	11 (33.3)
<i>Vigilancia</i>	10 (30.3)
<i>Cuidados paliativos</i>	1 (3.03)
<i>Tratamiento</i>	6 (18.1)
<i>Expresión a anticuerpos</i>	
<i>Solo positivo a CD68</i>	3 (9.09)
<i>Solo positivo a CD163</i>	7 (21.1)
<i>Positivo a CD68 y CD163</i>	22 (66.6)
<i>Ninguno</i>	1 (3.03)

Cuadro 8. Características de estudios incluidos.

Autor/ año	Número de casos estudiados	Anticuerpos (clona)	Puntos de corte	Número de revisores	Correlación de resultados
Panico et al 2015 (31)	121	CD68 (KP1)	30 per 0.023 mm ²	3	CD68 adverso
Zaki et al 2011 (32)	82	CD68 (KP1) CD163 (10D6)	CD68 mediana CD163 mediana	2	Adverso para CD163 y CD163/CD68, no significativo para CD68
Steidl et al. 2010, (36)	166	CD68 (KP1)	5%, 25%	3	CD68 adverso
Casulo et al 2013 (38)	81	CD68 (KP1)	30%	3	CD68 adverso
Klein et al 2014 (39)	88	CD68 (KP1) CD163 (10D6)	5%, 25% (CD68 y CD163)	5	CD68 no significativo, CD163 adverso
Azambuja et al 2012 (40)	265	CD68 (KP1) CD163 (10D6)	5%, 25% (CD68 y CD163)	4	CD68 y CD163 no significativo
Harris et al 2012 (41)	44	CD68 (KP1) CD163 (MRQ26)	5%, 5-25%, mayor a 25% (CD68 y CD163)	2	No asociado con resultados clínicos
Yoon et al 2012 (42)	144	CD68 (KP1) CD163 (10D6)	20% CD68 y CD163	2	CD68 adverso CD163 adverso

DISCUSIÓN.

El linfoma de Hodgkin clásico es una neoplasia con un gran espectro de clasificación de acuerdo a sus hallazgos histopatológicos, en términos generales, aunque conlleva una sintomatología en común, existen excepciones. La patología se considera que es altamente curable si cumple con los criterios clínicos, sin embargo, hay casos en los que, aunque se consideren sus características tanto clínicas como histopatológicas de carácter más benevolente, muestra una evolución mucho más agresiva de lo esperado, por lo que es sumamente importante detectar a este tipo de pacientes para determinar cuáles son las medidas a tomar para el bienestar del paciente.

En nuestro estudio se observó que ambos anticuerpos (CD68 y CD163) se expresaron en la gran mayoría de los casos, en los estadios tempranos (I/II) con 8 casos (24.2%) y estadios avanzados (III/IV) con 14 casos (42.4%) ($p=0.31$); los casos positivos a CD68 y negativos para CD163 son 2 (6.06%) en estadio temprano y 1 caso para estadio avanzado (3.03%) ($p=0.37$); anticuerpo CD68 negativo y CD163 positivo en estadio temprano son 3 (9.09%) y 4 casos en estadios avanzados (12.1%) ($p=0.97$); para finalizar, se encontró un caso (3.03%) que es negativo para CD68 y CD163 ($p=0.23$).

Lo anterior concuerda solo con algunos artículos como de *Klein et al.* Donde no hay significancia estadística para el anticuerpo CD68, pero si hay una asociación adversa con el CD163, como se mencionó anteriormente hay una tendencia hacia los estadios avanzados con este anticuerpo, sin ser significativo. Al contrario de los autores *Panico et al*, *Zaki et al.* y *Yoon et al.* en este estudio no se encontró asociación de la expresión de los anticuerpos con el pronóstico adverso del paciente. A diferencia de *Steidl et al.* y *Casulo et al.* que sólo realizaron CD68 en sus respectivos estudios y con un pronóstico adverso, no concuerda con este estudio. Nuestros resultados concuerdan con el estudio realizado por *Azambuja et al.* quienes tampoco encuentran significancia estadística con ninguno de los anticuerpos realizados, a pesar de contar con una población de estudio más

grande y diferentes puntos de corte para la evaluación de la expresión de la inmunohistoquímica.

Al realizar el análisis de ambos anticuerpos en diferentes métodos no ayuda en diferenciar a los macrófagos tipo 1 y tipo 2. En cuanto a la positividad del anticuerpo CD68 se expresa en todos los estadios, siendo mayor en los avanzados, por lo tanto, los anticuerpos tipo M1 no se expresan en mayor cantidad con acciones antitumorales como se mencionó en el marco teórico de esta investigación. En cuanto a la expresión del anticuerpo de CD163 encontramos de manera global tiene una mayor expresión en los estadios avanzados, pero de acuerdo al análisis por estadio de Ann Arbor, la mayor cantidad de casos positivos exclusivamente a este anticuerpo son los estadios II y III. De acuerdo a la hipótesis planteada, los macrófagos tipo M2 se expresan mediante el anticuerpo M2, traduciendo esto es un curso más agresivo de la patología.

Ninguno de los anticuerpos es estadísticamente significativo para que se asocie al pronóstico de la patología, dentro de las características de la población estudiada, contamos con una amplia variedad de acuerdo a la inmunoexpresión expresada; dentro de los parámetros para clasificarlo como un caso positivo, el punto de corte es que sea igual o mayor al 30%, después de esta clasificación, hay una mayor expresión en cantidad o intensidad expresada, la cual no fue considerada al realizar este estudio.

Otro de los hallazgos del estudio al correlacionar la positividad del anticuerpo anti-CD163 con la variante histológica, podemos observar que hay una relación con la expresión positiva y las variantes más agresivas de acuerdo a *Medeiros et al.* como lo son: celularidad mixta y depleción linfocítica; aunque son pocos casos, es de interés en estudios futuros determinar la relación entre ambas variables. El anticuerpo de CD68 tiene una expresión constante en las variedades de esclerosis nodular y celularidad mixta, sin embargo, no se expresa en todos los casos, en cambio la variedad histológica de rico en linfocitos y depleción linfocítica no hay una inmunoexpresión positiva.



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Tesis para obtener el Diploma de la Especialidad en Anatomía Patológica



LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.

Entre las limitaciones de este estudio se encuentran el tamaño de la muestra, aunque en nuestros cálculos realizados según las variables analizadas, la población seleccionada se encuentra en el margen adecuado para que este estudio sea significativo, no es fiable, ya que son pocos casos. De acuerdo a los estudios revisados muestran una mayor cantidad de casos; sería importante realizar el estudio en una población más grande para valorar la asociación ya descrita en este estudio.

Cabe señalar que la población estudiada, mayoritariamente los estadios clínicos al momento del diagnóstico, son etapas avanzadas, por lo que puede influir en la inmunoexpresión de los anticuerpos y sobre la evolución del paciente, ante una nueva investigación se podrían seleccionar los casos de linfoma en estadios tempranos y realizar los anticuerpos estudiados para evaluación de los resultados. Otra limitante encontrada fue el amplio rango de las edades de los pacientes, ya que tenemos casos pediátricos y adultos, esto nos puede dar una idea en general del comportamiento de la neoplasia, sería importante considerar futuros proyectos relacionados a solo un tipo de población más específica en cuanto a grupos etarios. Además, se ha encontrado un gran número de casos positivos a los anticuerpos y siendo compleja su interpretación para la clasificación, se recomienda el uso de puntos de corte ya utilizados por otros autores y hacer una correlación con la intensidad y cuantificación de los porcentajes considerados positivos y negativos. Por otra parte, se propone a dos o más patólogos como revisores de la interpretación del material de estudio obtenido.

CONCLUSIONES.

En nuestro estudio el anticuerpo CD163 proporciona una apariencia más uniforme y tinción específica de los macrófagos tisulares en comparación con el anticuerpo CD68, produciendo una menor tinción del fondo tisular, en gran parte se debe a que el CD68 no es específico para los macrófagos, ya que además se expresa en linfocitos T y elementos de la serie mieloide. Se evaluó el porcentaje de inmunorreacción de macrófagos en relación con el total de la celularidad; este método proporcionó una interpretación relativamente uniforme de CD163. El punto de corte para la positividad de los macrófagos difirió entre los diversos investigadores analizados, el límite más comúnmente utilizado fue del 20% al 25%, y fue elegido por algunos grupos de estudio en base a informes anteriores.

A pesar de esto, en este estudio encontramos que entre la etapa clínicas tempranas y avanzadas hay una tendencia en los estadios III y IV en la expresión de ambos anticuerpos, pero no hay una significancia estadística, no hay preferencia en la inmunoexpresión de CD68 y CD163 en el linfoma de Hodgkin clásico y por lo que no hay una asociación entre la inmunoexpresión positiva de los anticuerpos y el estadio clínico del linfoma de Hodgkin.

Aunque existe una gran cantidad de biomarcadores asociados con el pronóstico, en la práctica clínica ha sido una evolución lenta, debido a la falta de reproducibilidad en la interpretación de la inmunohistoquímica.

Otros autores aún indagan sobre los macrófagos asociados a tumores, es un campo de estudio que es amplio y productivo, aunque en este estudio no evidencia que apoya estos estudios, tomaremos en cuenta las limitaciones del estudio, anteriormente ya mencionadas.

El papel de los macrófagos como predictores del resultado clínico aún está desarrollándose y con enfoques diferentes de acuerdo a características clínicas más específicas.



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Tesis para obtener el Diploma de la Especialidad en Anatomía Patológica

BIBLIOGRAFÍA.

1. Lara-Torres C, Ortiz Hidalgo C. El diagnóstico histopatológico e inmuno histoquímico del linfoma de Hodgkin y su diagnóstico diferencial. *Patol Rev Lationoamericana* 2009;47(1):35-45.
2. Oliver W. Press, Sandra J. Horning. *William's Hematology*. Chapter 97: Hodgkin lymphoma. Ed. McGrawHill education, 9th edition, 2016. Pages 1603-1613.
3. Delgado-Lamas J, Vázquez-Villegas V, *Fundamentos de Hematología*, 5ta ed. México, Panamericana 2014 p.304-322.
4. Hillman Robert S., Ault Kenneth A., Rinder Henry M. *Hodgkin's Disease in Hematology in clinical practice*, 4th edition, 2005, pages 283-292.
5. American Cancer Society, consultado [enero 2019], disponible en: https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=2.13617139.594013208.1541898901-518313656.1541898901#!/
6. Volker D et al. *Hematology: Basics principles and practice*, Ed. Churchill Livingstone, 2005, Chapter 75: Hodgkin's disease: clinical manifestations, staging and therapy.
7. Jaffe ES, Stein H. Swerdlow. *Clasic Hodgkin Lymphoma*. WHO Classification of tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization. 4th edition, Lyon 2017. Chapter 15, pages 435-442.
8. Girish, Venjataraman, M. Kamran Mirza, Dennis A. Eichnauer, Volker Diehl. Current status of prognostication in classical Hodgkin lymphoma. *British Journal of Haematology*, 2014, 165, 287–299.
9. C. Montalbán Sanz, J.L. Calleja López. *Linfoma de Hodgkin: aproximación diagnóstica y terapéutica*. Ediciones Aula Médica. Madrid 2006.
10. Arber D, Rosai and Ackerman's *surgical pathology, Lymph nodes*, chapter 37, Ed. Elsevier, 11th edition, Philadelphia, 2018. Pages 1561-1569.

11. Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Jon C. Aster. Robbins y Cotran, patología estructural y funcional 9na edición. España. Elsevier, 2015. Capítulo 13: Enfermedades de los leucocitos, ganglios linfáticos, bazo y timo. Página 608
12. Mueller NE, Grufferman S. The epidemiology of Hodgkin's disease. In: Mauch P, Armitage J, Diehl V, et al., eds. *Hodgkin's Disease*. Philadelphia: Lippincott; 1999: 61-77.
13. Falko F, Hemapathology, Ed. Elsevier, 2017, Second edition, Chapter 28, Clasical Hodgkin's Lymphoma and related lesions, pages 525-545L.
14. Medeiros J, Miranda RN, Lymph nodes and extranodal lymphomas, 2nd ed. 2018: Elsevier, pages 266-290.
15. Winston YL, Hemapathology, Lymphoid neoplasms, Philadelphia 2013; Saunders Elsevier, Pages 192-199.
16. Anagnostopoulos I, Hansmann ML, Franssila K, et al. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood*. 2000;96: 1889-1899.
17. Schmid C, Pan L, Diss T, Isaacson PG: Expression of B-cell antigens by Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 1991; 139:701-7.
18. Falini B, Stein H, Pileri S y cols.: Expression of lymphoid-associated antigens on Hodgkin's and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. An immunocytochemical study on lymph node cytopins using monoclonal antibodies. *Histopathology* 1987; 11:1229-42.
19. Brown RE: Histogenesis of Reed-Sternberg and dendritic interdigitating cells in nodular sclerosing Hodgkin's disease. Immunohistochemical evidence for monocytoid precursors. *Ann Clin Lab Sci* 1997; 27:329-37.
20. Nakamura S et al. Hodgkin's disease expressing follicular dendritic cell marker CD21 without any other B-cell marker: a clinicopathologic study of nine cases. *Am J SurgPathol* 1999; 23:363-76.

21. Delsol G, Meggetto F, Brousset P y cols.: Relation of follicular dendritic reticulum cells to Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with emphasis on the expression of CD21 antigen. *Am J Pathol* 1993; 142:1729-38
22. Horie R, Watanabe T. CD30 expression and function in health and disease. *Immunology* 1998;10;457-70
23. Bertram S Hemapathology, foundations in diagnostic pathology. Hodgkin Lymphoma Chapter 11. Ed. Elsevier. Second edition, Philadelphia 2012.
24. Aber DA, Weiss LM. CD15: A review. *Appl Immunohistochem* 1993;1;17-30.
25. Dennis P. O'Malley, Ahmet Dogan, Yuri Fedoriw, L. Jeffrey Medeiros, Chi Young Ok, Mohamed E. Salama. American Registry of Pathology Expert Opinios: Inmunohistochemical evaluation of clasic Hodgkin Lymphoma. *Annals of Diagnostic Pathology* 39(2019)105-110
26. Jaudah AM, Wafaey G, et al. High tumour-associated macrophages infiltration is correlated with poor survival outcome in classical Hodgkin's lymphoma. *Journal of solid tumors*, 2016. Vol.6. No.1.
27. Guo et al. Meta-analysis of prognostic and clinical value of tumour-associated macrophages in adult classical Hodgkin lymphoma. *BMC Medicine* (2016) 14:159.
28. Kanzler H, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 1996; 184:1495-505.
29. Huang W et al. Department of Hematology, Nanfang, Biology of Tumor Associated Macrophages in Diffuse Large B Cell Lymphoma, DNA AND CELL BIOLOGY Volume 37, Number 12, 2018.
30. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3; 23-35.
31. Panico L, et al. Prognostic role of tumor associated macrophages and angiogenesis in classical Hodgkin lymphoma, *Leukemia & Lymphoma*, November 2013;54(11):2418-2425

32. Zaki et al. Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch* (2011) 459: 361-366.
33. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004; 25:677-86.
34. Solís-Martínez R, et al. Macrófagos asociados a tumores contribuyen a la progresión del cancer de próstata. *Gaceta Mexicana de Oncología.* 2015.
35. Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ, et al. Chemoterapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABDV, or MOPP alternating with ABDV. *N Engl J Med* 1992; 327: 1478-84.
36. Steidl et al. Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 2010;362: 875-885.
37. Scott DW, Steidl C. The clasical hodgkin lymphoma tumor microenvironment macrophages and gene expression-bassed modeling. *American Society of Hematology* 2014: 144-150.
38. Casulo C et al. Tumor associated macrophages in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma, *Leukemia Research* 37 (2013) 1178– 1183.
39. Klein J et al. CD163 inmunochemistry is superior to CD68 in predicting outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2014; 141:381-387
40. Azambuja D et al. Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology* 23:736-742, 2012.
41. Harris et al. CD163 versus CD68 in tumor associated macrophages of classical hodgkin lymphoma, *Diagnostic Pathology* 2012, 7:12.
42. Yoon et al. CD68 and CD163 as prognostic factor for Korean patients with Hodgkin lymphoma, *European Journal of Haematology* 88(292-305);2011
43. Ortiz-Hidalgo C. A short history of Hodgkin's disease and Burkitt's lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1994;10 (Suppl. 1): S27-S33.

44. Gruss H-J, Pinto A, Duyster J, Popemba S, Herrman F. Hodgkin's disease: a tumor with disturbed immunological pathways. *Immunol Today* 1997;18;156-63.
45. Horie R, Watanabe T. CD30 expression and function in health and disease. *Immunology* 1998;10;457-70.
46. Higgins RA, Blankenship JE, Kinney MC. Application of immunohistochemistry in the diagnosis of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132: 441-61.
47. Weiss LM, Chang KL: Molecular biologic studies of Hodgkin's disease. *Semin Diagn Pathol* 1992; 9:272-8.
48. Kuppers R, Hansmann ML, Rajewsky K: Clonality and germinal centre B-cell derivation of Hodgkin/ Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1998; 9(Suppl 5): S17-20.
49. Cossman J: Gene expression analysis of single neoplastic cells and the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *J Histochem Cytochem* 2001; 49:799-800.
50. Marafioti T, Hummel M, Foss HD, et al: Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* 95:1443–1450, 2000.
51. Ohshima K, Akaiwa M, Umeshita R, Suzumiya J, Izuhara K, Kikuchi M: Interleukin-13 and interleukin- 13 receptor in Hodgkin's disease: possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis. *Histopathology* 2001; 38:368-75.
52. Izban KF, Ergin M, Martinez RL, Alkan S: Expression of the tumor necrosis factor receptor associated factors (TRAFs) 1 and 2 is a characteristic feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Mod Pathol* 2000; 13:1324-31.
53. Sieweke MH, Allen JE. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science*. 2013; 342: 1242974.