

VALORACIÓ INICIAL DE PACIENTS AMB LIMFOCITOSIS

Limfopoesi:

El sistema limfoide normal està format pels òrgans limfoides primaris o centrals i els secundaris o perifèrics. En l'adult la medul·la òssia (MO) i el timus exerceixen la funció d'òrgans primaris; en aquests s'originen els limfòcits B i T respectivament a partir de la cèl·lula mare hematopoètica pluripotencial, madurant posteriorment sense requerir la presència d'antígens. Als òrgans secundaris és on s'inicien les respostes immunes i estan formats pels ganglis limfàtics, la melsa, l'anell de Waldeyer i els acúmul limfoides dispersos a la mucosa del tub digestiu (plaques de Peyer), el tracte respiratori i el genitourinari. Aquí, els limfòcits troben l'ambient adequat per poder interaccionar amb els antígens i les cèl·lules presentadores d'antígens (CPA).

Els limfòcits B (B de bursa de Fabrici) són els responsables de produir anticossos com a resposta a l'estímul antigènic. Els limfòcits T (T de timus) són els responsables de la resposta immune cel·lular.

Les cèl·lules B madures comprenen el 10-15% dels limfòcits de la sang perifèrica, el 25-50% dels del gangli i de la melsa, i el 10% dels de la medul·la òssia. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per posseir Ig de superfície que els serveixen com a receptors per reconèixer els antígens. Les cèl·lules B "verges" són limfòcits petits que circulen en sang perifèrica i també ocupen els fol·licles primaris i les zones del mantell fol·licular dels ganglis limfàtics. En trobar l'antigen que encaixa específicament amb els seus receptors de superfície, les cèl·lules B "verges" es transformen, proliferen i maduren en cèl·lules plasmàtiques o de memòria. Aquesta maduració en cèl·lula plasmàtica de vida curta es produeix directament després de la unió amb l'antigen fora del centre germinal i independent de les cèl·lules T; és la resposta primària d'anticossos IgM. Altres cèl·lules B exposades a l'antigen emigren al centre del fol·licle primari, on proliferen i es transformen en centreblasts, i modulen l'expressió de diverses molècules. Al centre germinal es desenvolupa una hipermutació somàtica dels gens de les regions variables de les cadenes pesades i lleugeres de les Ig, i el canvi de classe de cadena pesada d'IgM a IgG o IgA. Els centreblasts maduren a centròcits que expressen immunoglobulines de superfície (Sig) diferents dels seus precursors com a conseqüència de les mutacions produïdes. Els centròcits amb més afinitat per l'antigen que està exposat per les cèl·lules fol·liculars dendrítiques i, gràcies a la interacció amb aquestes i amb les cèl·lules T, són rescatats de l'apoptosi i es diferencien en cèl·lules plasmàtiques de vida llarga o de memòria. Les cèl·lules B de memòria post germinals se situen a la zona marginal del fol·licle limfoide, però també emigren a sang perifèrica i es localitzen a la polpa blanca de la melsa i al teixit limfoide associat a les mucoses (MALT, de l'anglès *mucosa associated lymphoid tissue*).

Els limfòcits T són els responsables de la immunitat cel·lular, és a dir, dels fenòmens de citotoxicitat, hipersensibilitat retardada, rebuig d'empelts i de la reacció de l'empelt contra el receptor. Els limfòcits T madurs suposen el 70-80% dels limfòcits normals de la sang perifèrica, el 90% dels del conducte toràcic i el 30-40% dels presents en els ganglis limfàtics i la melsa. El procés de diferenciació i maduració dels precursors dels limfòcits T originats a la medul·la òssia (protimocets) es realitza a les diferents zones del timus sota la influència del microambient epitelial. Les cèl·lules T madures antigenoespecífiques es produeixen a l'escorça tímica. Les cèl·lules T que reconeixen pèptids propis s'eliminen per apoptosi.

Els limfòcits T madurs passen a sang perifèrica i, posteriorment, se situen a la zona paracortical del gangli limfàtic i formen un maniguet perivascular al voltant de les arterioles esplèniques. Els limfòcits T i, en menor grau els B, mantenen una constant recirculació entre la sang i els teixits, cosa que permet una vigilància immunològica permanent.

En contrast amb els limfòcits B, que reconeixen els antígens en la seva conformació primitiva, perquè es produeixi el reconeixement dels limfòcits T cal que els antígens siguin processats en petits pèptids i presentats juntament amb les molècules del complex major d'histocompatibilitat (HLA). Aquesta funció de processament antigènic és duta a terme per les CPA. L'exposició a l'antigen estrany determina la proliferació

Catlab Informa

i la posterior diferenciació dels limfòcits T en els diversos subtipus de cèl·lules efectores, en un complex i equilibrat procés en què intervenen les cèl·lules del sistema mononuclear fagocític i on s'alliberen gran quantitat de citocines. El reconeixement de l'antigen es produeix pel receptor antigènic del limfòcit T, en connexió amb el sistema HLA; concretament, les cèl·lules T col·laboradores (CD4+) reconeixen els determinants HLA de classe 2 i les cèl·lules T citotòxiques-supressores (CD8+) els determinants de classe 1. Un petit nombre de limfòcits T persisteixen, després de l'exposició a l'antigen, com a cèl·lules de memòria capaces de desenvolupar una resposta més ràpida i efectiva si l'organisme és exposat de nou al mateix antigen.

A més dels limfòcits B i T, el 15 % dels limfòcits circulants el conformen les anomenades *cèl·lules agressores naturals* (*natural killer*, NK). Les cèl·lules NK tenen morfologia de limfòcits grans granulars. Aquestes cèl·lules posseeixen receptors de membrana per al fragment Fc de la IgG i presenten activitat citolítica directa, ja sigui intervinguda per la regió Fc dels anticossos o independent dels mateixos (activitat citolítica natural, no mediada pel sistema HLA, dependent dels receptors *killer* activadors i receptors *killer* inhibidors [KIR]). Les cèl·lules NK exerceixen un important paper en la vigilància i destrucció de les cèl·lules que espontàniament pateixen transformació maligna i en la defensa contra les infeccions víriques.

Limfocitosi:

En persones adultes es considera limfocitosi un recompte absolut de limfòcits superior a $4 \times 10^9/L$ i en nens de fins a 10 anys, superiors a $7 \times 10^9/L$.

Per valorar una limfocitosi, cal tenir en compte l'edat del pacient, la història clínica, temps d'aparició i evolució de la limfocitosi, exploració física (àrees ganglionars, fetge, melsa), paràmetres de laboratori i troballes morfològiques dels limfòcits.

Les causes es poden dividir en 2 grans grups: limfocitosis reactives i limfocitosis clonals o síndromes limfoproliferatives (SLP).

Estudi inicial:

- **Anamnesi:** Interrogar el pacient pel motiu de consulta; antecedents personals i familiars; ús de fàrmacs. L'edat i el temps d'aparició són importants per orientar la causa de la limfocitosi. Preguntar per símptomes B (pèrdua de pes, febre i/o sudoració nocturna). Valoració per sistemes.
- **Exploració física:** Mucosa oral, lesions cutànies, àrees ganglionars (cervical, axil·lar, inguinal), fetge i melsa.
- **Analítica:** Amb hemograma, VSG, funció renal i hepàtica. Proteinograma, LDH i Beta-2 microglobulina en cas de sospitar un SLP.
- **Morfologia de frotis sanguini:** Indicada en limfocitosi persistent, d'augment progressiu o sospita d'un SLP. Com detallarem més endavant, CATLAB treballa amb uns criteris per a la revisió de frotis de les mostres de rutina i també descriurem les alteracions morfològiques que se solen trobar tant a les limfocitosis reactives com a les patològiques.
- **Serologia infecciosa:** Tenint en compte l'edat i la clínica del pacient, valorar sol·licitar serologies per a les diferents infeccions que cursen amb limfocitosis descrites a l'apartat següent.
- **Immunofenotip de població limfoide en sang perifèrica:** Útil per a la detecció de limfòcits clonals o patològics. Que no es detectin, no descarta un SLP ja que alguns tipus de limfoma no solen tenir expressió en sang perifèrica com el Limfoma de Hodgkin, el Limfoma B difús de cèl·lula gran, etc.
- **Proves d'imatge:** Rx de tòrax i ecografia abdominal per descartar esplenomegàlia. En cas d'un SLP, per a l'estudi d'extensió, en hematologia clínica es valorarà sol·licitar un TAC o PET-TAC segons el tipus.

Altres estudis que seran sol·licitats en hematologia en cas de sospita d'un SLP per confirmar el diagnòstic i estudiar-ne l'extensió són: Aspirat / Biòpsia de medul·la òssia, Biòpsia ganglionar, Citogenètica i Biologia Molecular.

Catlab Informa

Causas de limfocitosi:

1) Limfocitosis Reactives:

- Infeccions bacterianes subagudes / cròniques: Brucel·losi, tuberculosi, sífilis, malaltia per esgarrapada de gat.
- Síndromes mononucleòsiques (**Fig. 1**): Virus d'Epstein-Barr (80-90% dels casos), Citomegalovirus (d'especial importància en gestants i en immunodeprimits), *Toxoplasma gondii*, primoinfecció per VIH, Herpes virus humà tipus 6, Rubèola, Virus varicel·la-zòster, virus de l'hepatitis. El quadre es caracteritza per febre, odinofàgia (supurativa en el 30% dels casos), adenomegàlies cervicals, astènia i esplenomegàlia principalment. A l'anàlítica destaca a més de la limfocitosi, l'elevació dels enzims hepàtics.
- Altres infeccions: tos ferina, Rickettsiosi
- Limfocitosis cròniques: malalties autoimmunes, tumors sòlids, timoma, inflamació crònica, tabaquisme, sarcoïdosi, hipoesplènia (funcional o anatòmica), limfocitosis B policlonal persistent (LBPP) limfocitosis generalment associada a dones fumadores amb presència de limfòcits binuclears en sang perifèrica (**Fig. 2**).
- Limfocitosis Agudes: limfocitosis d'estrès (IAM, insuficiència cardíaca, xoc sèptic, cirurgia major, traumatismes, estatus epilèptic, crisi drepanocítica, reaccions d'hipersensibilitat), fàrmacs (hidantoïnes, penicil·lina, fenilbutazona).

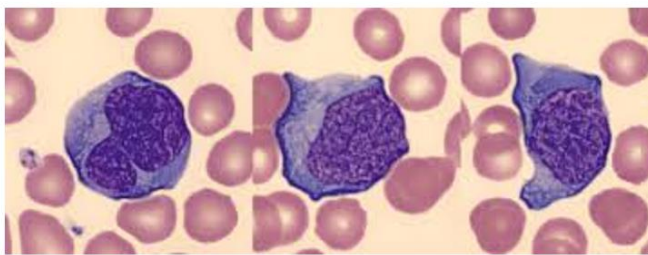


Fig. 1: Linfocitos activados o reactivos de la Mononucleosis infecciosa

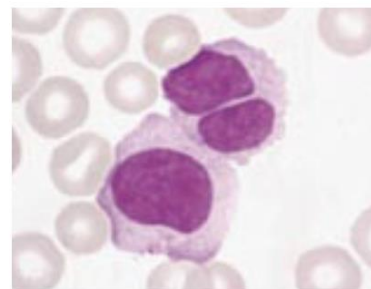


Fig. 2: Linfocito binucleado de la Linfocitosis B Policlonal Persistente

2) Limfocitosis clonals o Síndromes limfoproliferatives:

En aquesta publicació no aprofundirem sobre la darrera classificació de l'OMS de les neoplàsies del sistema limfoide. A grans trets es divideixen en neoplàsies de cèl·lules B, neoplàsies de cèl·lules T i neoplàsies de cèl·lules NK. Dins de cada grup, hi ha alguns limfomes que tenen expressió en sang perifèrica (expressió leucèmica). A continuació, mostrem els més importants amb la morfologia típica dels limfòcits trobats a cadascun d'ells:

- De cèl·lules B:

. Leucèmia Limfàtica crònica (LLC):

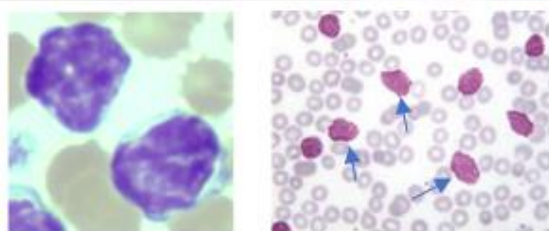


Fig. 3: LLC típica o clàssica: limfòcits petits amb cromatina condensada (aspecte de closca de tortuga o grumelée) i citoplasma escàs. Els limfòcits proliferants són anormalment fràgils pel que s'esquincen amb facilitat al fer l'extensió, generant-se així les ombres Gumprecht (fletxes).

Catlab Informa

• Limfoma Folicular:

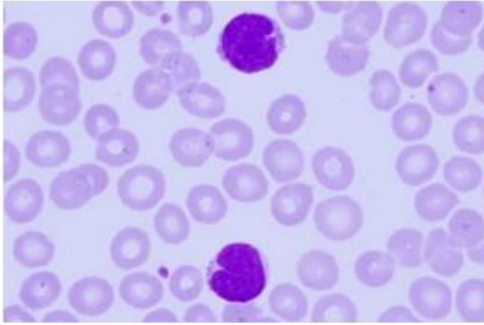


Fig. 4: Centròcits amb característiques morfològiques típiques: tamany petit, citoplasma escàs i fenedura nuclear.

• Leucèmia Prolimfocítica:

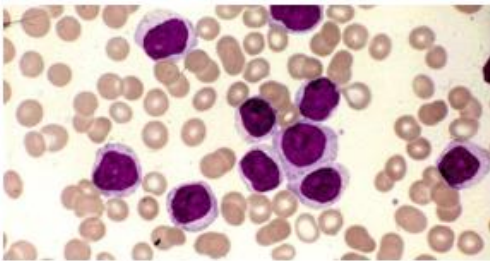


Fig. 5: Prolimfòcits de tamany mitjà i Cromatina semimadura amb un nuclèol visible i prominent de localització central.

• Limfoma del mantell:

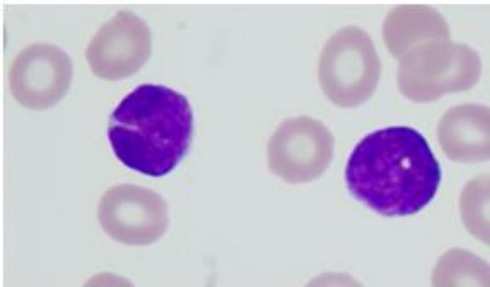


Fig. 6: La variant clàssica és polimorfa pel que fa al tamany nuclear i a la irregularitat del contorn nuclear. El tamany cel·lular és més aviat petit i el nucli, que ocupa quasi tota la cèl·lula, presenta una cromatina d'aspecte puntejat molt característic amb 1 o 2 fenedures poc profundes.

• Limfoma esplènic de la zona marginal:

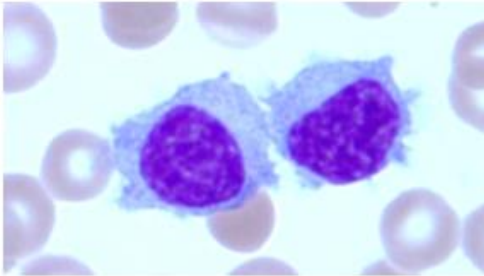


Fig. 7: Limfòcits vellosos: de mida superior als limfòcits normals, nucli amb cromatina condensada, rodó o ovalat, normalment sense nuclèol visible. El citoplasma és basòfil amb prolongacions velloses curtes.

Catlab Informa

. Tricoleucèmia:

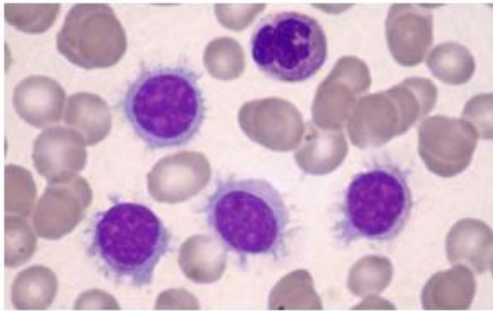


Fig. 8: Tricoleucòcits de tamany mitjà o gran, nucli amb diferents configuracions (rodona, ovoide o indentada) de posició relativament excèntrica. La cromatina és laxa i pot presentar un petit nuclèol. Ampli citoplasma, de tonalitat blava-grisàcea. La principal característica són les nombroses projeccions a mode de pèl que donen nom a la cèl.lula.

. Limfoma Limfoplasmacític:

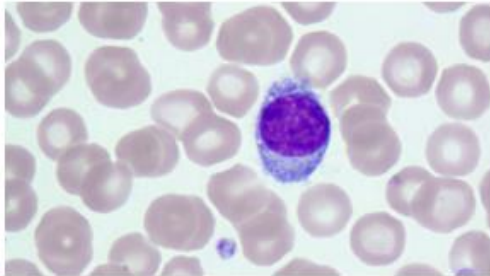


Fig. 9: Limfoplasmacít de mida petita/mitjana, nucli excèntric amb cromatina condensada, amb presència de cossos de Dutcher (inclusions nuclears de Ig), citoplasma moderat, basòfil, en ocasions amb vacuoles. A més s'observen eritròcits en pila de monedes (Rouleaux).

. Limfoma de Burkitt:

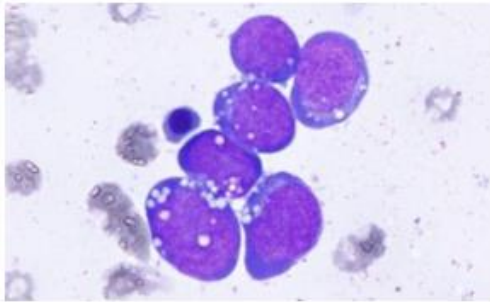


Fig. 10: Cèl.lules d'aspecte blàstic, monomorf, de mida mitjana, cromatina laxa, un o més nuclèols visibles i citoplasma molt basòfil amb abundants vacuoles.

Catlab Informa

- De cèl·lules T:

- **Síndrome de Sézary:** Expressió Leucèmica de la micosi Fungoide (Limfoma T cutani)

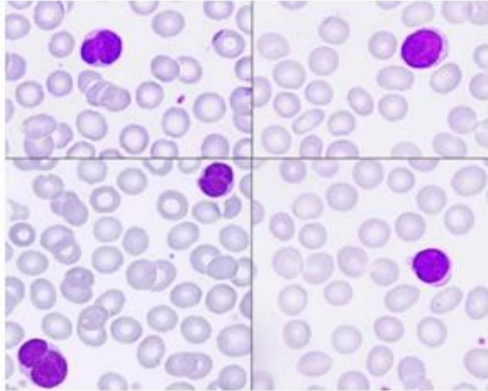


Fig. 11: Cèl·lules limfoides atípiques de mida petita, aspect madur amb nucli irregular "cerebriforme".

- **Leucèmia / Limfoma T de l'Adult:** associat al virus HTLV-1

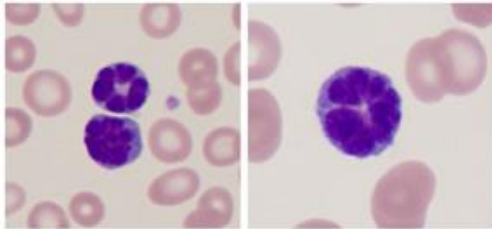


Fig. 12: Limfòcits de mida mitjana amb nucli irregular amb forma de flor.

- **Leucèmia de Limfòcits grans granulars T:**

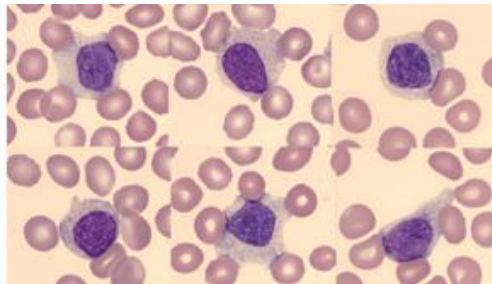


Fig. 13: Cèl·lules limfoides de mida gran, nucli rodó, dens i citoplasma ampli i clar en el que destaca la presència de grànuls azuròfils.

- De cèl·lules NK:

- **Leucèmia agressiva de cèl·lules NK:**

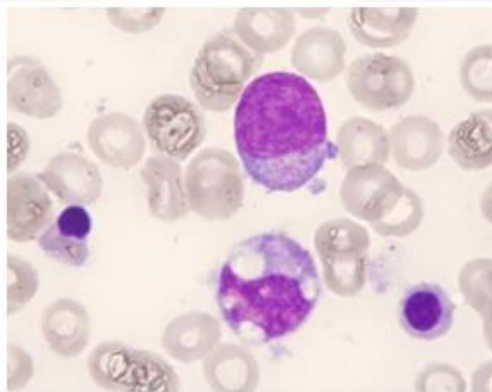


Fig. 14: Cèl·lules limfoides de mida gran amb abundants grànuls citoplasmàtics.

Catlab Informa

Estudi de les limfocitosis a CATLAB:

El laboratori central de CATLAB (Viladecavalls) analitza diàriament una mitjana de 2.200 hemogrames procedents de 43 centres d'atenció primària i 3 hospitals de segon nivell de la zona del Vallès Occidental, abastant una població de 1.050.000 habitants.

En la nostra rutina de treball, tenim algorismes per fer la revisió del frotis en pacients amb alteracions del paràmetre dels limfòcits, tenint en compte l'edat de la persona, el nombre absolut de limfòcits i les alertes de l'analitzador. Quan a una mostra se li genera una revisió de frotis, se li realitza una extensió de sang perifèrica per mitjà de l'extensor/tenyidor SP50 per a després ser analitzada per microscòpia digital mitjançant el Cellavision® DI-60. Tots dos analitzadors treballen connectats en cadena als 5 analitzadors Sysmex XN-9100 amb què compta el laboratori per a la realització dels hemogrames (**Fig. 15**).



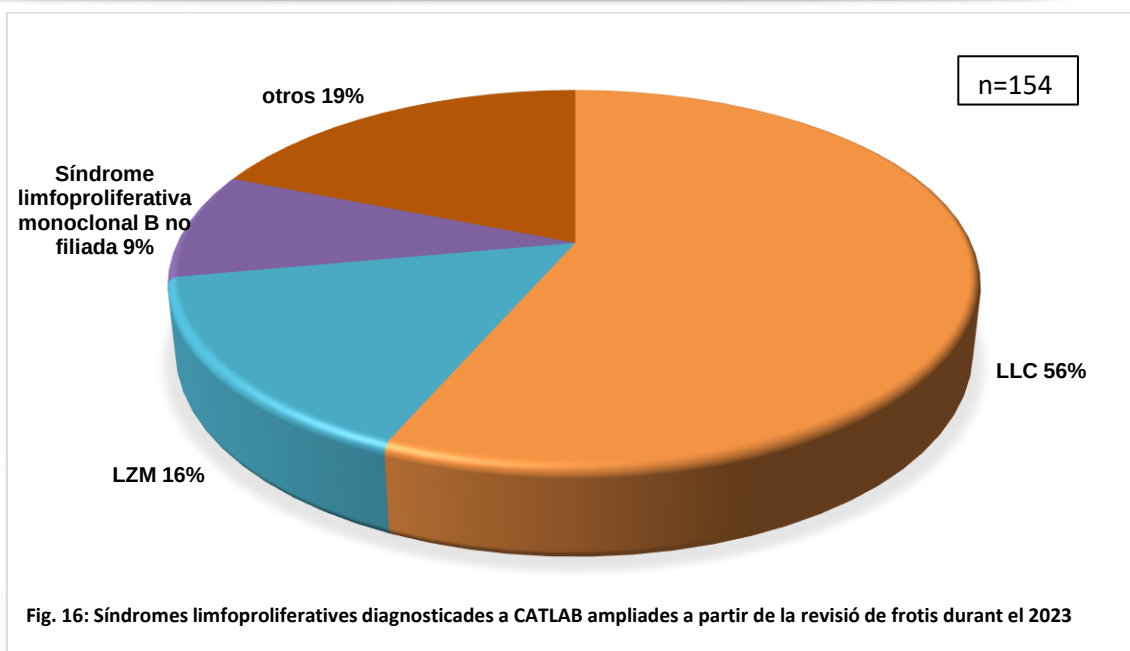
Fig. 15: Cadena Sysmex XN-9100 composta per, de dreta a esquerra, de 3 analitzadors XN-10; 2 analitzadors XN-20; un distribuïts TS; 1 extensor-tenyidor SP-50 i un Cellavision® DI-60

Les imatges cel·lulars obtingudes pel Cellavision® són revisades inicialment pels tècnics especialistes en laboratori (TEL) que realitzen el recompte cel·lular i descriuen les principals alteracions morfològiques detectades. Posteriorment el Facultatiu d'hematologia revisa aquest informe i decideix si valida el resultat o fa una nova revisió mitjançant microscòpia òptica. Si se sospita d'un SLP no diagnosticat prèviament, s'amplia l'estudi per citometria de flux i en cas de confirmar-se, s'envia un avís al metge sol·licitant per correu electrònic o per trucada telefònica.

El 2023 vam generar 238 estudis d'immunofenotip per descartar un SLP T/B, dels quals 154 (65%) van resultar positius per a algun tipus de SLP. Dels positius, en 140 (91%) coincidia la descripció morfològica amb el SLP diagnosticat per citometria de flux; i el SLP més freqüent va ser la Leucèmia limfàtica crònica (LLC) amb un 56% (**Fig. 16**).

En un proper CATLAB-Informa del departament de citometria, es descriuran amb més detall els SLP diagnosticats a les diferents mostres biològiques de les diverses procedències.

Catlab Informa



DEPARTAMENT D'HEMATOLOGIA CATLAB:

- Jorge Medina jmedina@catlab.cat
- Teresa Villalba tvillalba@catlab.cat
- Miquel Diaz mdiaz@catlab.cat

Bibliografía:

1. Miguel A. Sanz. Manual práctico de Hematología Clínica. 7ª edición (2022).
2. J. M. Moraleda Jiménez. Pregrado de Hematología. 4ª edición.
3. S. Woessner Casas; L. Florensa Brichs. La citología óptica en el diagnóstico Hematológico. 5ª edición.
4. Grupo Español de Citología Hematológica. Atlas GECH. <https://atlas.gechem.org/index.php?lang=es>
5. Esther Sánchez Domingo. Diagnóstico de Síndromes Linfoproliferativos a partir de la revisión de frotis de sangre periférica en nuestro laboratorio. 35º congreso de la Asociación Española de Técnicos de Laboratorio.