

# Citometría de flujo en linfoma de Hodgkin: diagnóstico inmunofenotípico y microambiente tumoral

---

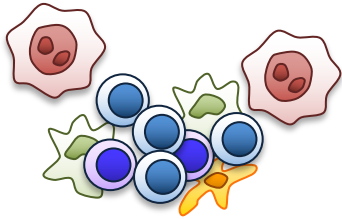
**Samuel Romero Domínguez**

Servicio de Hematología y Hemoterapia  
Hospital Universitario y Politécnico La Fe

Valencia, 29 de septiembre de 2023

# Índice

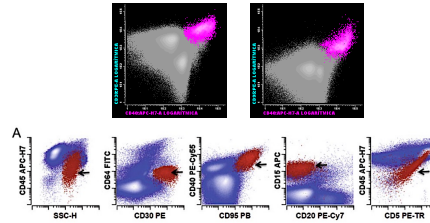
## 1. Fisiopatología del LH



Neoplasia inmunomediada  
por excelencia



## 2. Diagnóstico IF

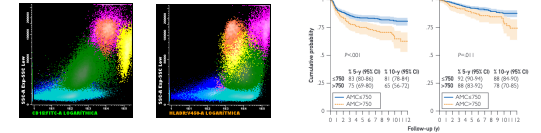


¿Podemos diagnosticar el LH  
clásico mediante CFM?



## 3. Estudio IF del MAT

- I. Tejido tumoral
- II. Sangre periférica

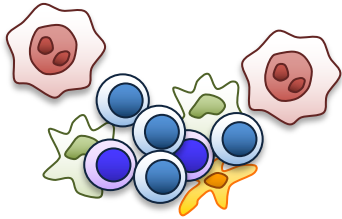


¿Podemos estudiar el MAT del LH?

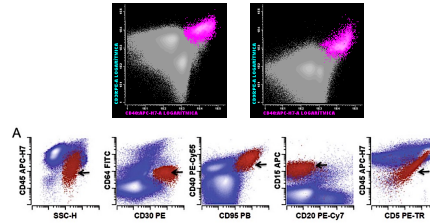
¿Qué valor pronóstico tiene?

# Índice

## 1. Fisiopatología del LH

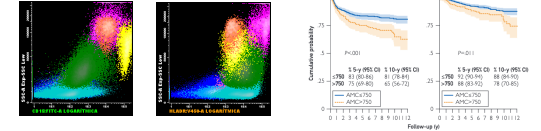


## 2. Diagnóstico IF



## 3. Estudio IF del MAT

- I. Tejido tumoral
- II. Sangre periférica

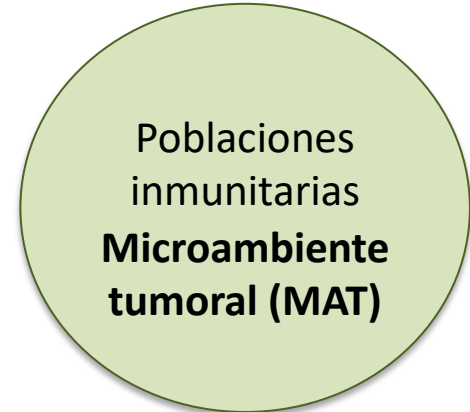
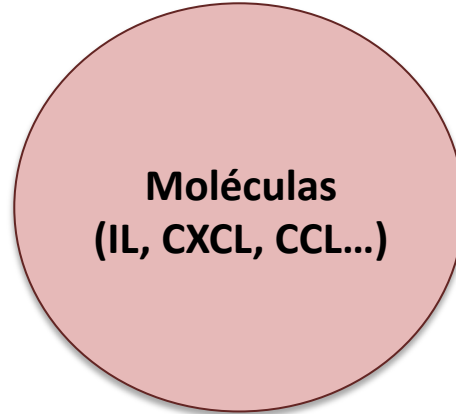
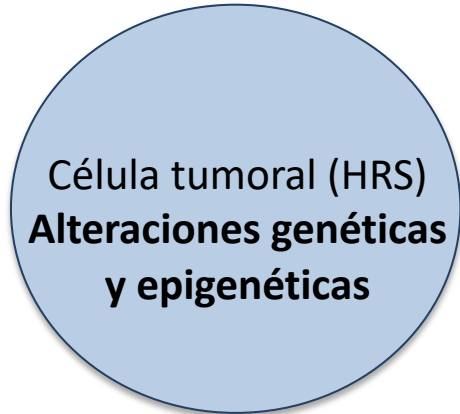


Neoplasia inmunomediada por excelencia

# Fisiopatología del LH

## Mecanismos implicados

---



# Fisiopatología del LH

## Alteraciones genéticas y epigenéticas

### Múltiples mecanismos genéticos y epigenéticos implicados en la biología del LH

#### Epigenética

Modificación expresión genes sin alteraciones DNA



- Pérdida marcadores LB
- Hipermetilación promotores
- Silenciando reguladores clave del programa LB
- Sobreexpresión antagonistas transcripcionales (*NOTCH1*, *ID2*)



**DAC: vorinostat**  
**ATO + tto LNH-B**

#### NF-κB

Factores transcripción familia REL: papel inmunitario e inflamatorio



- Ganancia/amplificación: *REL* (70%), *MAP3K14*, *BCL3*
- Mutaciones reguladores negativos: *NFKBIA*, *NFKBIE*, *TNFAIP3*
- ↑ TNFR (CD30, CD40)
- Activación VEB (LMP1 y 2)



**CD30: brentuximab, CART**  
**Bortezomib**

#### JAK/STAT

Señal extracel. → señal intracel. (JAK)  
→ fact. transcripción (STAT):  
inflamación y regulación inmune



- **Amp. 9q24.1: JAK2**
- Mutaciones activadoras: *STAT6*
- Mutaciones inactivadoras: *SOCS1*, *PTPN1*
- IL-13, IL-13R, IL-21
- VEB (LMP1)

**JAK-2: Ruxolitinib**  
**JAK-1: Itacitinib**

#### Otros



- **Ciclo celular, apoptosis:** p15, p16, p53, *FAS*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*
- **PI3K-AKT**
- **CMH:** mut. *B2M*
- **Amp. 9q24.1:** *PD-L1*, *PD-L2*

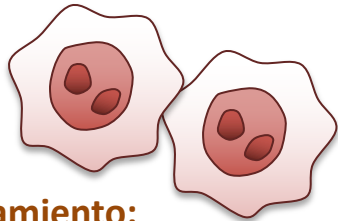


**ICP: Nivo, pembro...**  
**PI3K: Idela, copanlisib**  
**Bcl-2: Venetoclax**

# Fisiopatología del LH

## Moléculas

Las células de HRS producen diversas citoquinas y quimiocinas que modulan el MAT



### Reclutamiento:

- Eosinófilos: IL-5, **CCL5**, CCL28, GM-CSF
- Mastocitos y mesenquimales: **CCL5**
- LT: **CCL5**, CCL17, CCL20, CCL22
- NK: CXCL9, CXCL10, INF- $\gamma$ , no IL-2
- Monocitos/TAM: **CCL5**, M-CSF, IL-4, IL-13

### Proliferación MAT:

- Treg: IL-7
- Monocitos/TAM: M-CSF
- Fibroblastos: IL-13, TNF- $\alpha$ , **TGF- $\beta$** , FGF
- Mesenquimales: TNF- $\alpha$ , **TGF- $\beta$**
- Angiogénesis: VEGF, FGF, **TGF- $\beta$**
- Inhibición células efectoras: **IL-10**, **TGF- $\beta$** , PGE2

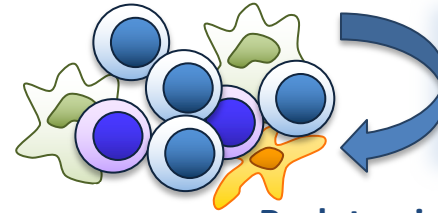
Crecimiento HRS



Selección poblaciones celulares

↑ inmunosupresoras

↓ Proinflamatorias /efectoras



Selección poblaciones celulares

### Reclutamiento:

- Fibroblastos: eotaxina, **CCL5**
- Mesenquimales: **CCL5**
- Monocitos/TAM: CCL3, CCL17, IL-10, TGF- $\beta$ , PGE2
- LT: IL-3, IL-10

### Proliferación HRS:

- LT: CCR5 lig, IL-3.
- Monocitos/TAM: CCR5 lig, IL-15, CD137L
- Mesenq.: CCR5 lig, IL-7, IL-6
- PMN: APRIL

- LTh
- Treg
- TAM M2
- MDSC
- CAF

- LT CD8+ (citotox.)
- NK
- TAM M1

# Fisiopatología del LH

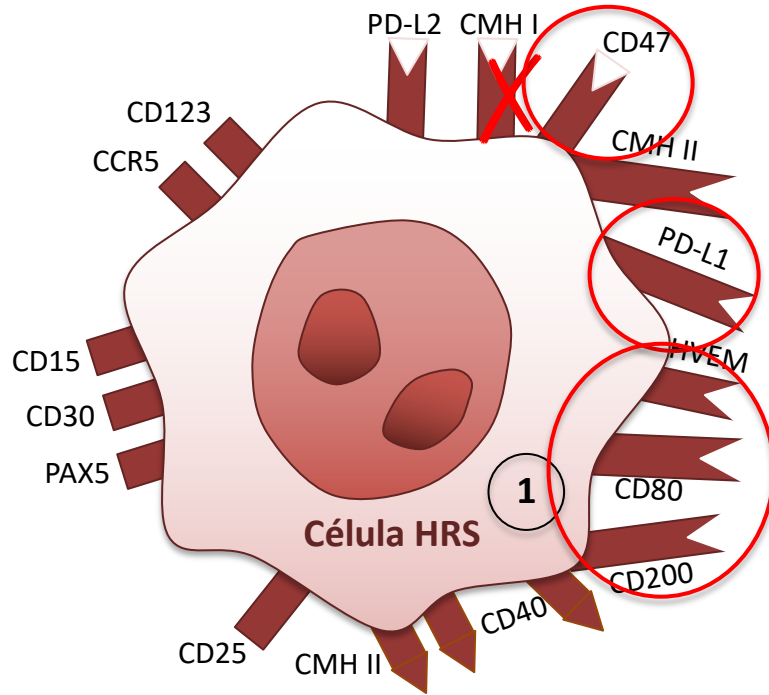
## Microambiente tumoral

---

- Células Hodgkin y Reed-Sternberg 1-2% de la celularidad del tumor
- Las células inmunitarias son educadas por las tumorales mediante citoquinas, quimiocinas y moléculas de superficie, en parte relacionado con las alteraciones genéticas (integración)
- Infiltrado inflamatorio muy polimorfo: neutrófilos, macrófagos, linfocitos T (*helper*, reguladores, citotóxicos), linfocitos B, células NK, eosinófilos, mastocitos, células plasmáticas, fibroblastos
- Predominio cuantitativo y/o funcional de las poblaciones celulares inmunosupresoras respecto a las efectoras → respuesta inmunitaria inefectiva
- El MAT puede ser evaluado por la CMF...

# Fisiopatología del LH: MAT

## 1. Células de HRS



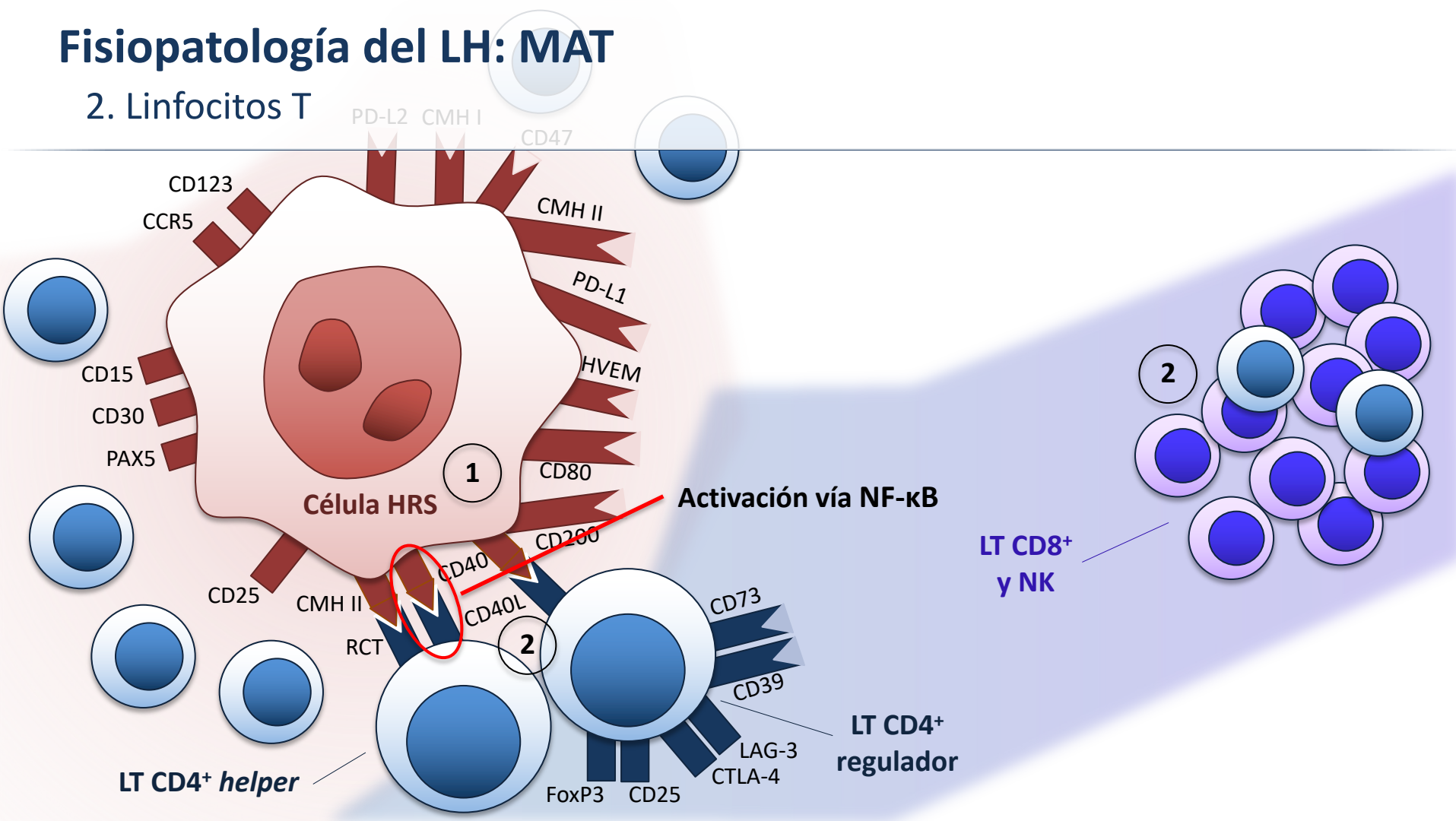
## Células muy particulares por...

- Células linfocitos B: PAX5+
- Ausencia marcadores pan-B: CD19-, CD20-, CD79b-
- Origen centro germinal (pre-centroblasto): hipermutaciones somáticas
- Ausencia marcadores CG: Bcl-6-, Bcl-2-
- Ausencia CD45
- Expresión característica: CD30+ ( $\approx 100\%$ ), CD15+ ( $\approx 75\%$ )
- Raros casos, marcadores linfocitos T: CD2, CD4
- Expresión otros marcadores: MUM1/IRF4, HLA-DR, CD25, CD86 (CTLA-4 ligando) CD95 (Fas-ligando) CD123, CD200, CD274 (PD-L1)
- Múltiples mecanismos de evasión inmune



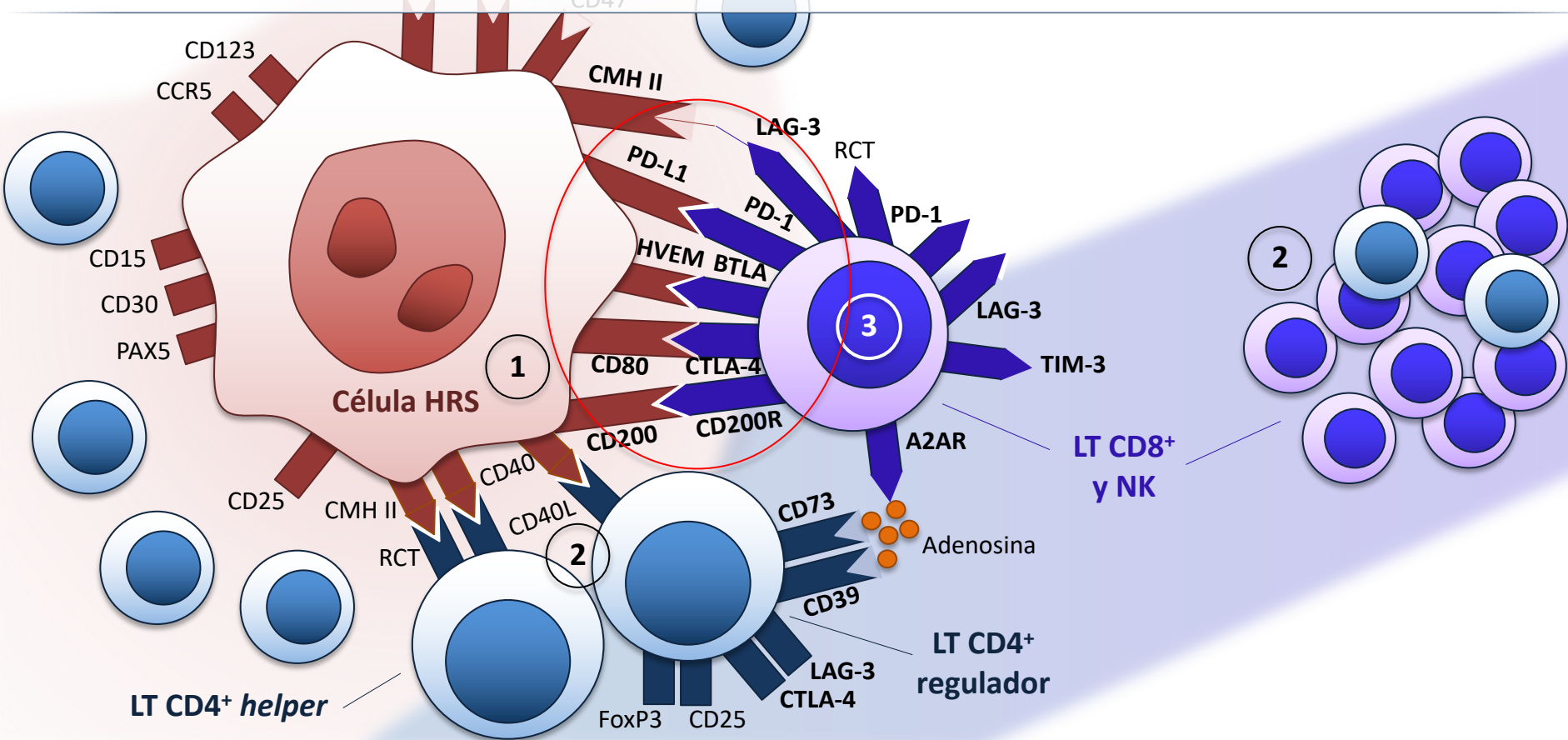
# Fisiopatología del LH: MAT

## 2. Linfocitos T



# Fisiopatología del LH: MAT

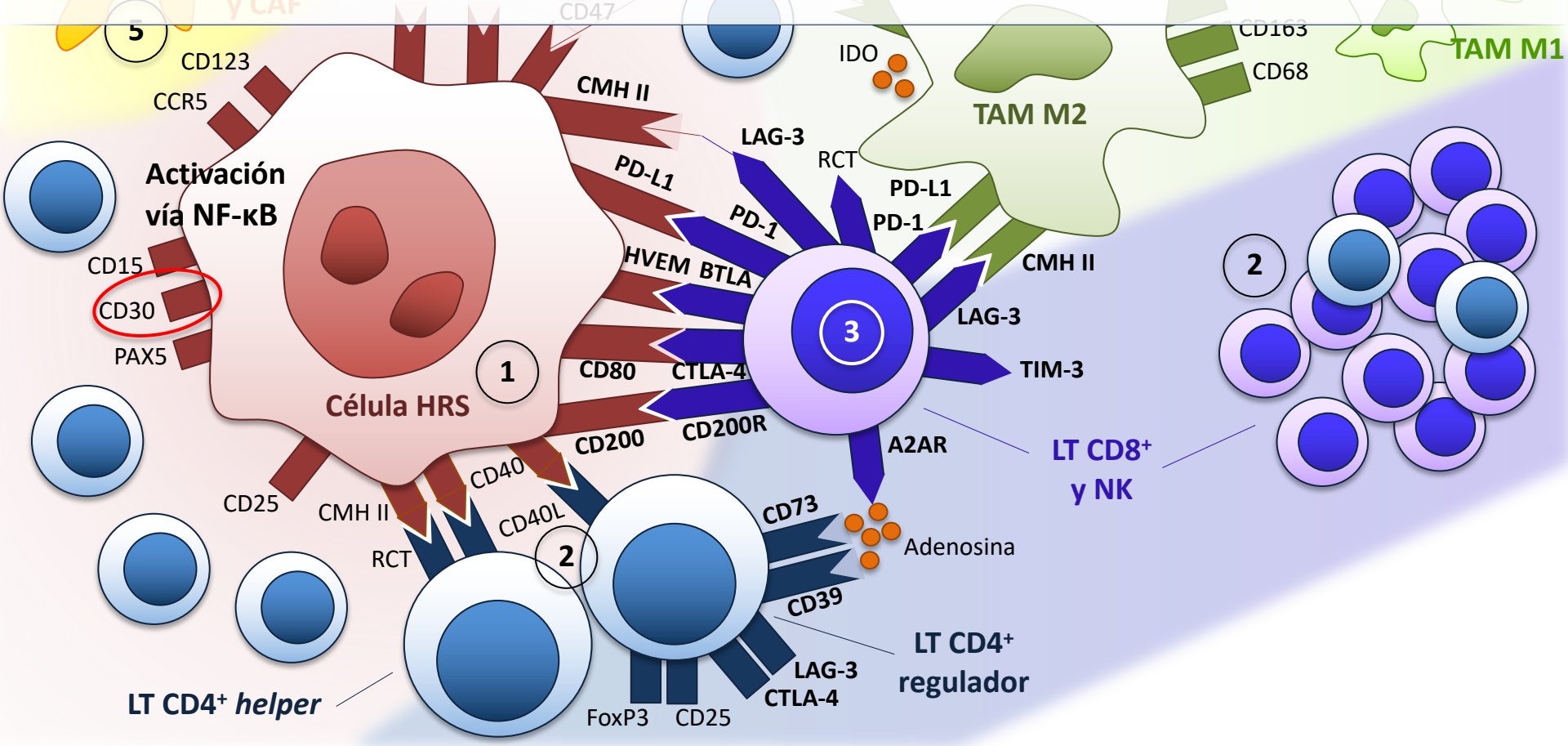
## 3. Punto de control inmune (*immune check point*)

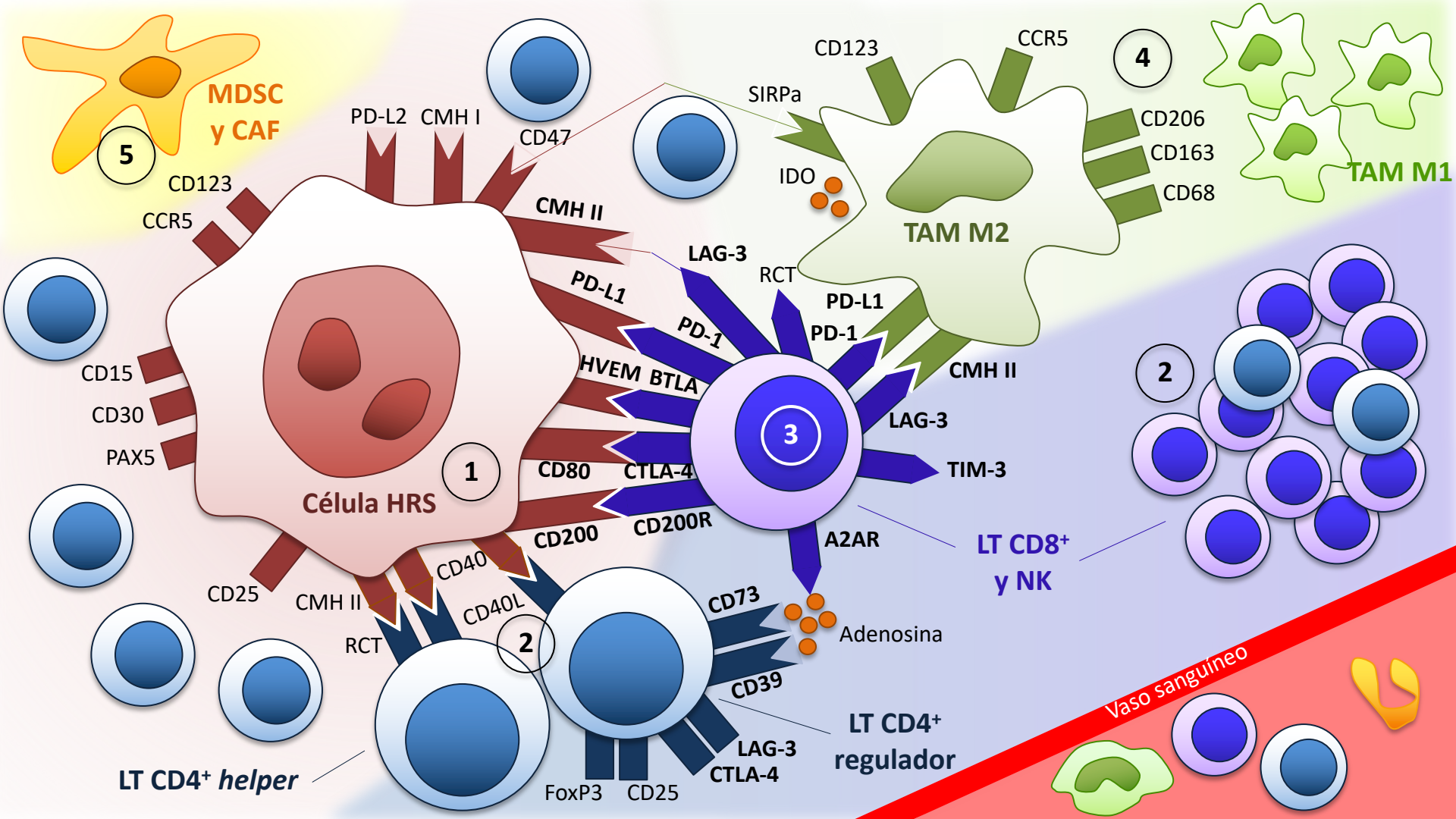


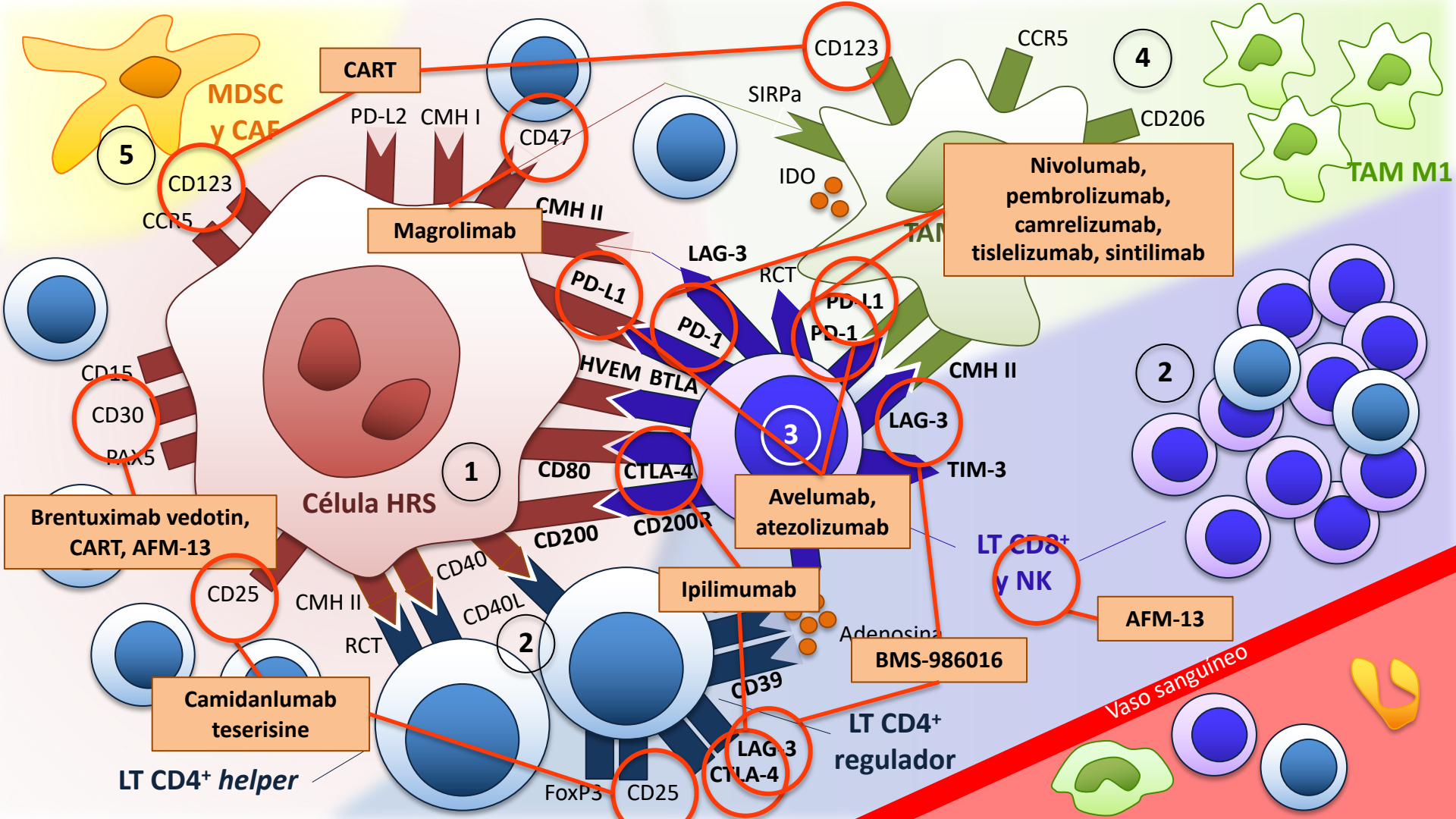


# Fisiopatología del LH: MAT

## 5. Células mieloides supresoras (MDSC) y fibroblastos asociados al cáncer (CAF)



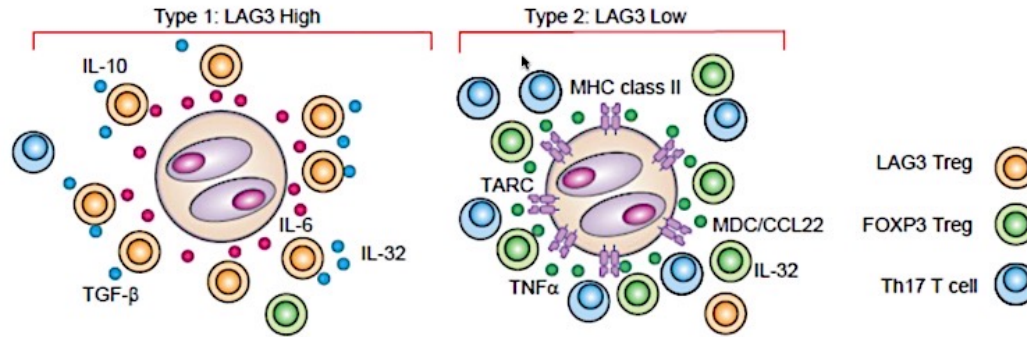




# Fisiopatología del LH: MAT

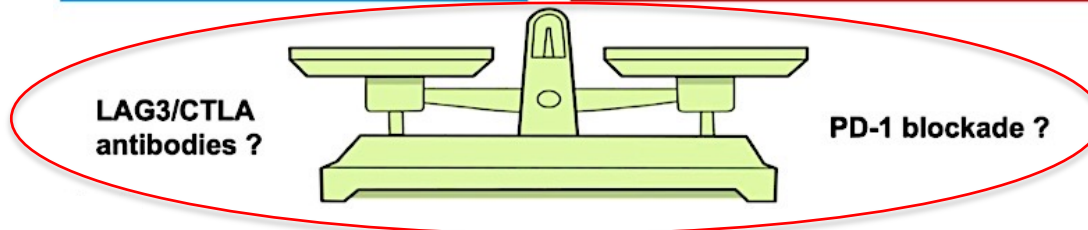
## Importancia de la expresión de CMH tipo I o II

Se diferencian dos tipos de MAT en función de la expresión de CMH I o II y del tipo específico de Treg → tto. dirigido del inhibidor del checkpoint??



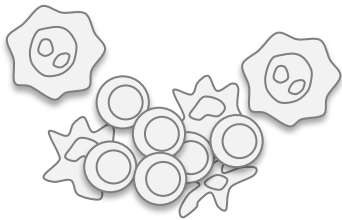
**“Mediated immunosuppression”**  
through induced regulatory cells  
(LAG-3-positive Tr-1 cells)

**“Inflammatory HRS cell support”**  
through natural Tregs and T-helper cells  
(FoxP3/Th17 enriched environments)



# Índice

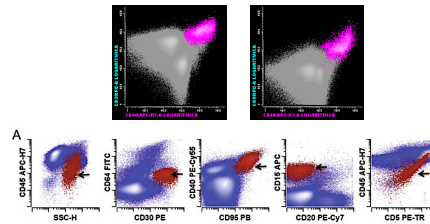
## 1. Fisiopatología del LH



Neoplasia inmunomediada  
por excelencia

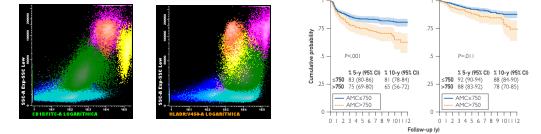


## 2. Diagnóstico IF



## 3. Estudio IF del MAT

- I. Tejido tumoral
- II. Sangre periférica



¿Podemos diagnosticar el LH clásico mediante CFM?



# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Características de las células de HRS

### Dificultades

Muy elevado FSC/SSC

Escasa proporción (<1%)

Difícil aislamiento (rosetas LT)

CD45-/+d

### Facilidades

Muy elevado FSC/SSC

Marcadores “específicos” (CD30, CD40)

Marcadores atípicos para LB  
(CD15, CD25, CD123)

# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

Panel de estudio IF de las células de HRS

**Proponen 1 tubo para LH clásico y linfoma primario mediastínico y 2 tubos para LH predominio linfocítico nodular y LCGB rico en células T**

| Fluoro-cromo                | APC-Cy7 | ECD | APC  | PE-Cy7 | PE   | PE-Cy5.5 | APC-H7 | FITC | APC-A700 | PB   |
|-----------------------------|---------|-----|------|--------|------|----------|--------|------|----------|------|
| <b>6 colores LH clásico</b> | CD3     | -   | CD95 | CD20   | CD30 | CD40     | -      | CD64 | -        | -    |
| <b>9 colores LH clásico</b> | -       | CD5 | CD15 | CD20   | CD30 | CD40     | CD45   | CD64 | CD71     | CD95 |

| Fluoro-cromo         | V450 | ECD | APC  | PE-Cy7 | PE    | PE-Cy5.5 | APC-H7 | FITC | APC-A700 | A488 | A594 |
|----------------------|------|-----|------|--------|-------|----------|--------|------|----------|------|------|
| <b>Tubo 1 LH PLN</b> | CD75 | CD5 | CD54 | CD20   | CD32  | CD40     | CD45   | CD64 | CD71     | CD10 | CD38 |
| <b>Tubo 2 LH PLN</b> | DAPI | CD5 | CD54 | CD10   | Bcl-6 | CD40     | CD20   | CD64 | CD71     | -    | CD38 |

# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Panel de estudio IF de las células de HRS

### Marcadores de selección de células HRS y exclusión de poblaciones

| Fluoro-cromo            | APC-Cy7 | ECD | APC  | PE-Cy7 | PE   | PE-Cy5.5 | APC-H7 | FITC | APC-A700 | PB   |
|-------------------------|---------|-----|------|--------|------|----------|--------|------|----------|------|
| 6 colores<br>LH clásico | CD3     | -   | CD95 | CD20   | CD30 | CD40     | -      | CD64 | -        | -    |
| 9 colores<br>LH clásico | -       | CD5 | CD15 | CD20   | CD30 | CD40     | CD45   | CD64 | CD71     | CD95 |

*Fromm JR. et al. 2014*

*Glynn E, et al. Methods Mol Biol. 2019*

*Grewal RK, et al. Cytometry B Clin Cytom. 2019*

# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Panel de estudio IF de las células de HRS

### Marcadores de selección de células HRS y exclusión de poblaciones

| Fluoro-cromo            | APC-Cy7 | ECD | APC  | PE-Cy7 | PE   | PE-Cy5.5 | APC-H7 | FITC | APC-A700 | PB   |
|-------------------------|---------|-----|------|--------|------|----------|--------|------|----------|------|
| 6 colores<br>LH clásico | CD3     | -   | CD95 | CD20   | CD30 | CD40     | -      | CD64 | -        | -    |
| 9 colores<br>LH clásico | -       | CD5 | CD15 | CD20   | CD30 | CD40     | CD45   | CD64 | CD71     | CD95 |

- CD3 y CD5 → Exclusión LT
- CD20 → Exclusión LB
- CD30<sup>+++</sup>, CD40<sup>+/+++</sup>, CD95<sup>+/+++</sup> y CD45<sup>-/+d</sup> → Marcadores identificación + ↑SSC
- CD15<sup>+</sup> y CD71<sup>-/+</sup> → Marcadores adicionales identificación
- CD64 → Exclusión células estirpe monocítica

2 poblaciones de células HRS:

- CD3/CD5<sup>+</sup> y CD45<sup>+</sup> → HRS + rosetas LT
- CD3/CD5<sup>-</sup> y CD45<sup>-/+d</sup> → HRS aisladas

# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Panel de estudio IF de las células de HRS

**Table 4**

**Criteria for identifying an HRS-cell population. The putative HRS-cell population must meet all of the following criteria**

- |   |  |
|---|--|
| 1 | Express CD30, CD40, and CD95   |
| 2 | Have increased light scatter properties (compared to background lymphocytes)   |
| 3 | Lack moderate to bright expression of CD20   |
| 4 | Lack expression of CD64  |
| 5 | Represent a discrete cell population in multidimensional projections of the immunophenotypic data with increased autofluorescence as compared to CD30+ reactive immunoblasts |

# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Panel de estudio IF de las células de HRS

### Diagnóstico diferencial (por inmunofenotipo) del LH clásico

Table 1

*Immunophenotype of the HRS cells (unblocked) and differential diagnosis*

| CHL  | NLPHL   | ALCL  | Metastatic small cell carcinoma  | TCRLBCL   |
|--|---|---|--|---|
| <b>Positive for:</b> CD30, CD15, CD40, CD71, CD86, CD95, CD64 and HLA-DR<br><b>Negative for:</b> CD3, CD19, CD20, CD45 | <b>Positive for:</b> CD20, CD45<br><b>Negative for:</b> CD15, CD30, CD5<br>Background cells are CD4 and B cells | <b>Positive for:</b> CD45, CD95, CD5, CD30<br><b>Negative for:</b> CD40, CD20, CD64, CD15 | <b>Positive for:</b> CD15, CD95, CD71<br><b>Negative for:</b> CD30, CD40, CD45, CD5, CD20, CD3 | <b>Bright positivity for:</b> CD20 and CD45<br><b>Negative for:</b> CD15, CD30, CD64, CD5<br>Background cells are CD 8 positive |

#### Diagnóstico diferencial célula HRS



- Inmunoblastos (CD30+) → CD30++, autofluorescencia
- ALCL (↑SSC, CD30+, CD40-/+) → CD40++, LT “normales”
- LDCGB (CD30+, CD20++) → CD30++, CD20-/+, ↑SSC

#### Células HRS no LH clásico

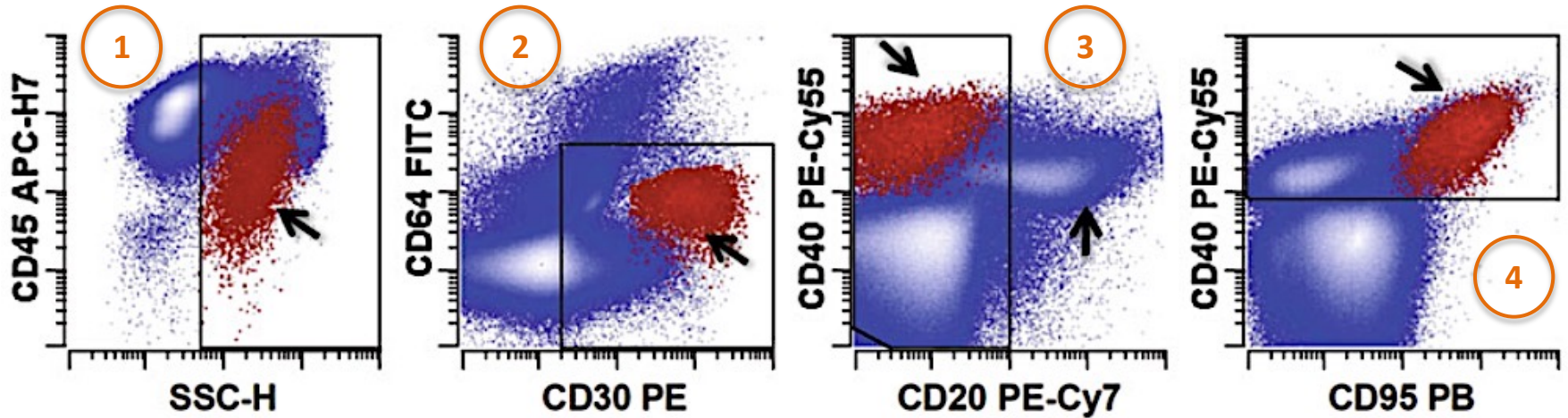


- LNH-T (periférico) → población clonal T
- LNH-B (LDCGB, LLC) → población clonal B

# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Panel de estudio IF de las células de HRS

### Estrategia de selección para detectar las células de HRS

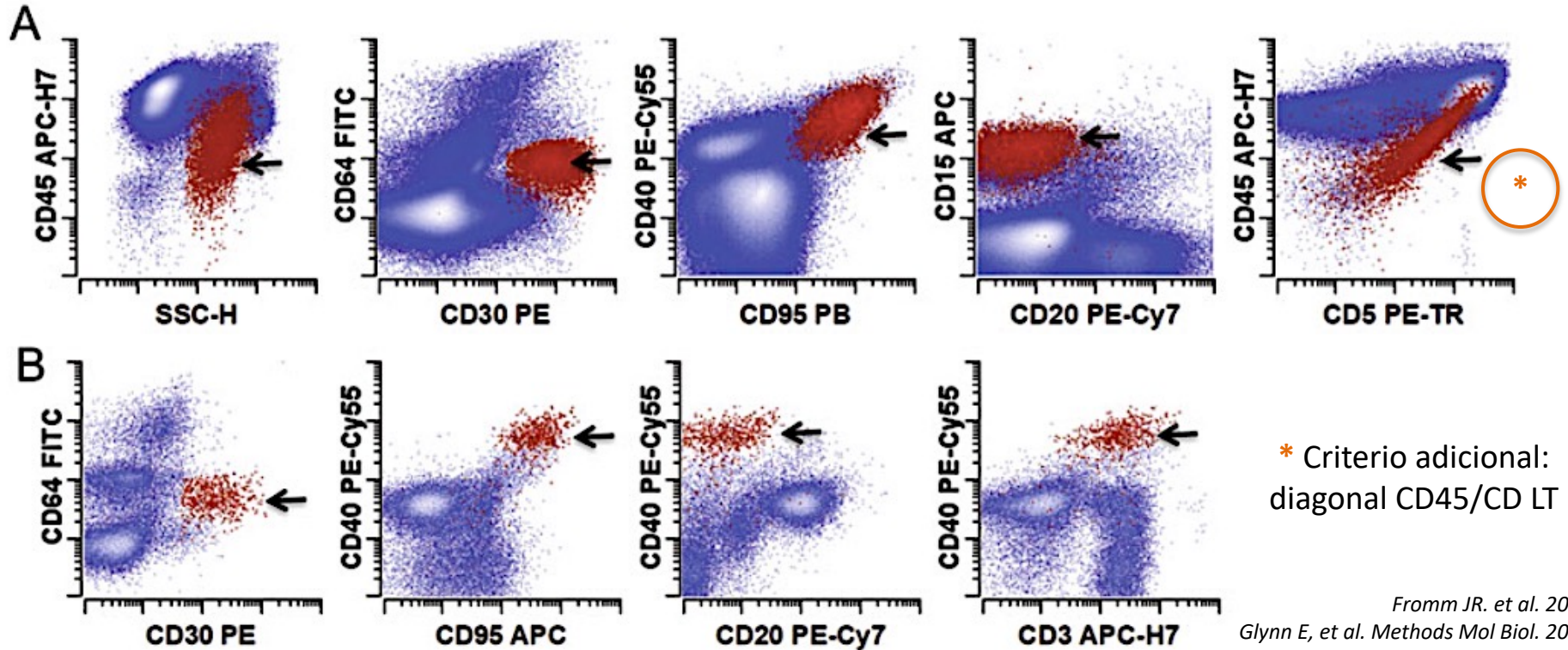


1. Aumento SSC
2. Expresión intensa CD30 + discreta autofluorescencia FITC
3. Expresión CD40, ausencia o expresión débil CD20
4. Expresión CD95

# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

Panel de estudio IF de las células de HRS

Estrategia de selección para detectar las células de HRS



Fromm JR, et al. 2014

Glynn E, et al. *Methods Mol Biol.* 2019

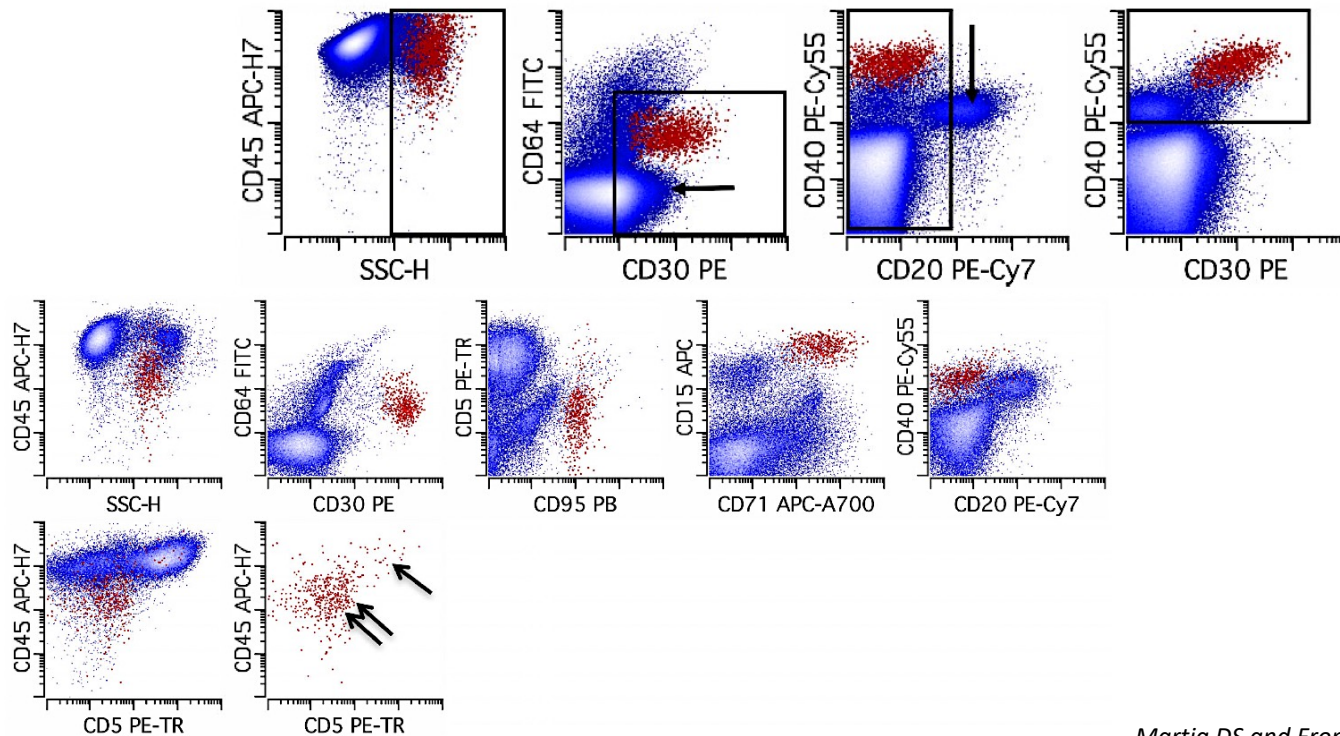
Grewal RK, et al. *Cytometry B Clin Cytom.* 2019



# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Panel de estudio IF de las células de HRS

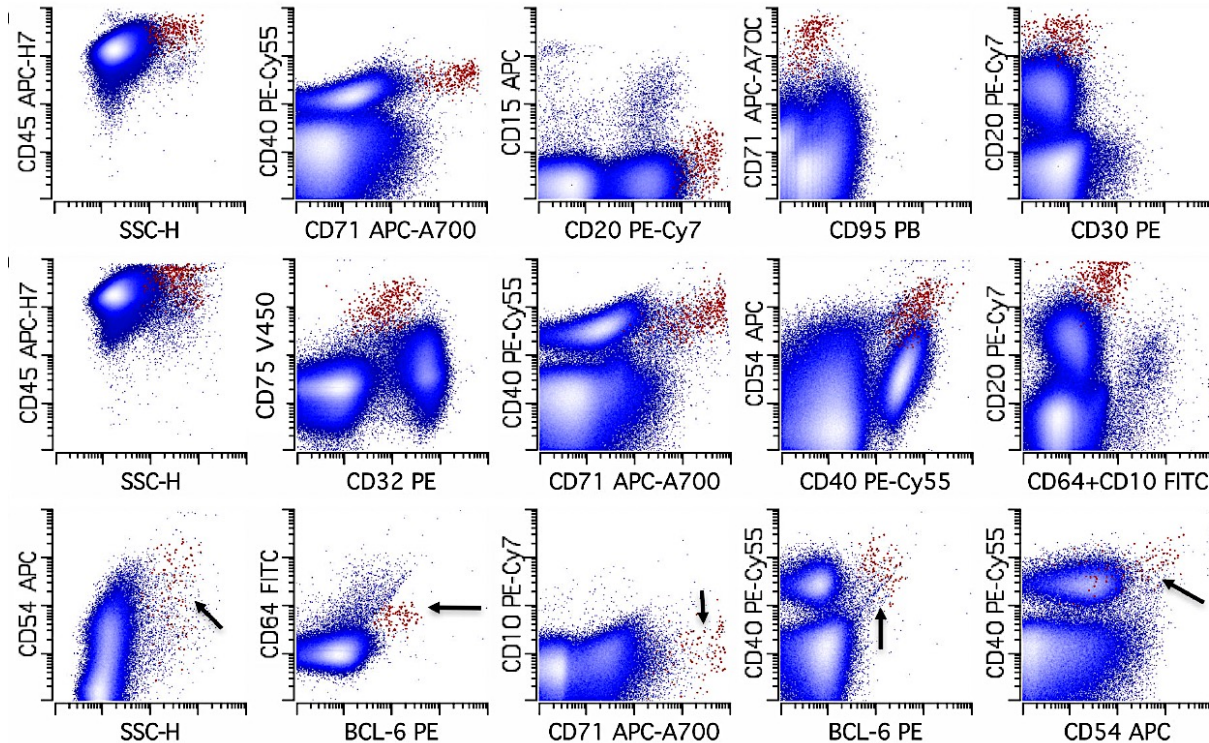
### Estrategia de selección para detectar las células de HRS



# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Panel de estudio IF de las células de HRS

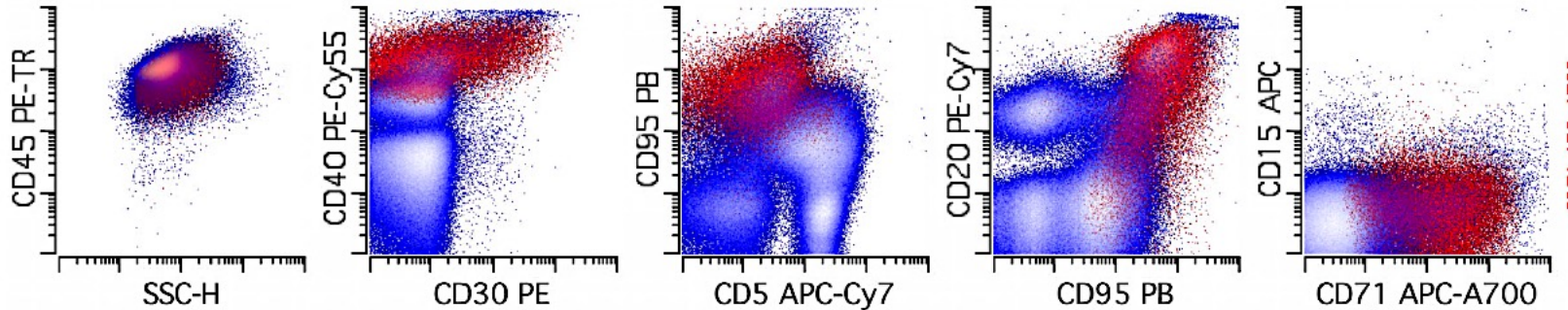
### Estrategia de selección para detectar el LH predominio linfocítico nodular



# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Panel de estudio IF de las células de HRS

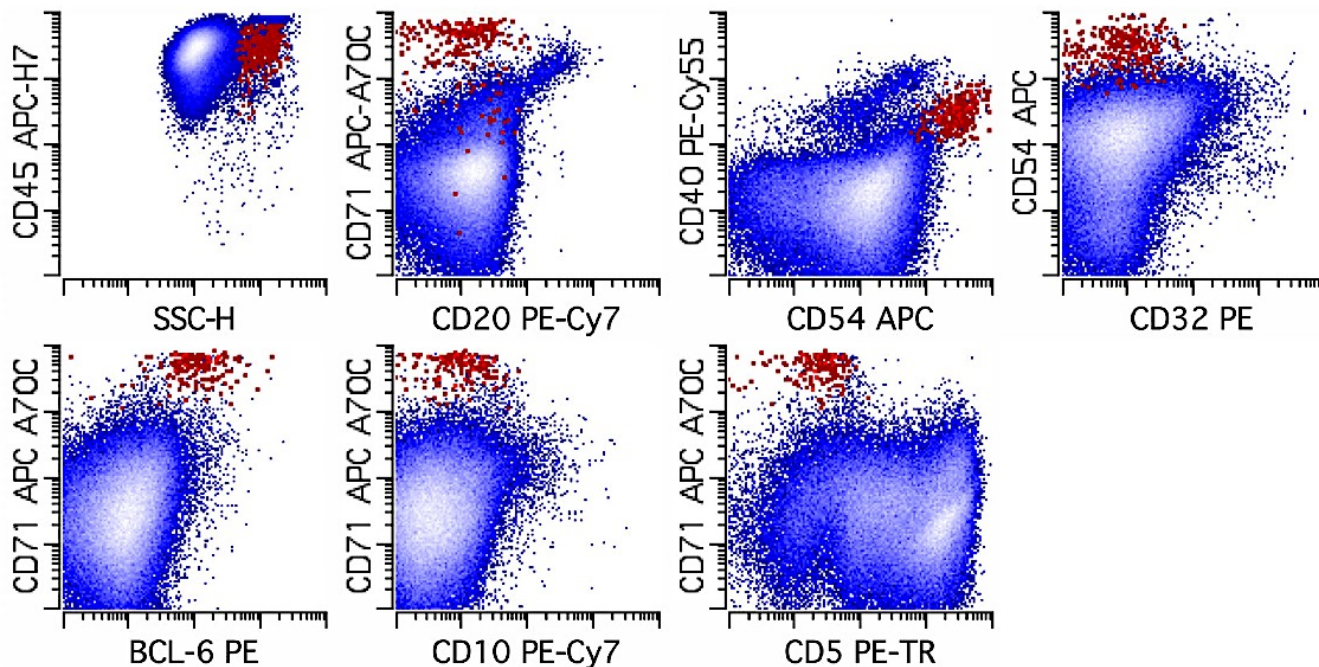
### Estrategia de selección para detectar el linfoma primario mediastínico



# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Panel de estudio IF de las células de HRS

### Estrategia de selección para detectar el LCGB rico en linfocitos



# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Panel de estudio IF de las células de HRS

| Fluoro-cromo  | HV450  | HV500 | FITC | PE   | PerCP-Cy5.5 | PECy7 | APC   | APC-H7 |
|---------------|--------|-------|------|------|-------------|-------|-------|--------|
| <b>Tubo 1</b> | CD20   | CD45  | CD25 | CD95 | CD3         | CD19  | CD123 | CD40   |
| <b>Tubo 2</b> | HLA-DR | CD45  | CD15 | CD30 | CD3         | CD19  | CD123 | CD40   |

### 1. Detección de las células de HRS

- Marcadores de **selección** células HRS: CD30, CD40 y CD95
- Marcadores de **exclusión** células HRS: CD3, CD19 y CD20++
- Marcadores de **caracterización** células HRS: CD15, CD20, CD25, CD123 y HLA-DR

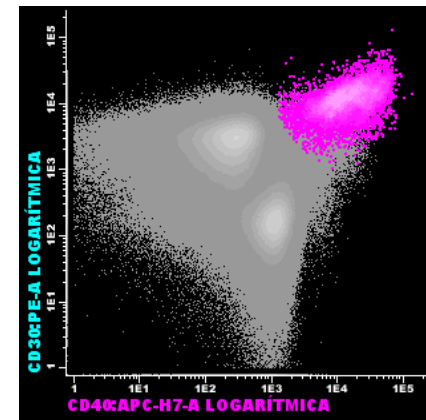
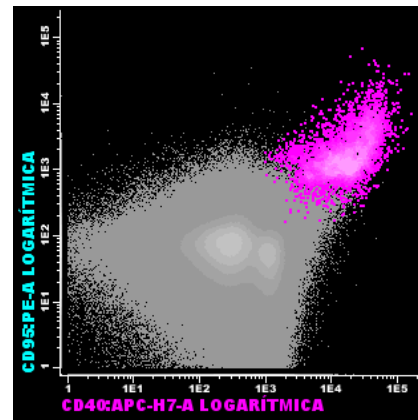
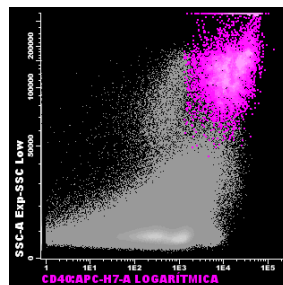
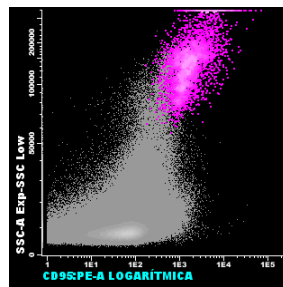
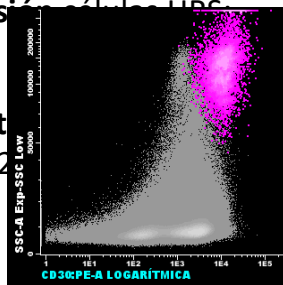
# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Panel de estudio IF de las células de HRS

| Fluorocromo | HV450  | HV500 | FITC | PE   | PerCP-Cy5.5 | PECy7 | APC   | APC-H7 |
|-------------|--------|-------|------|------|-------------|-------|-------|--------|
| Tubo 1      | CD20   | CD45  | CD25 | CD95 | CD3         | CD19  | CD123 | CD40   |
| Tubo 2      | HLA-DR | CD45  | CD15 | CD30 | CD3         | CD19  | CD123 | CD40   |

### 1. Detección de las células de HRS

- Marcadores de **selección** células HRS: CD30, CD40 y CD95
- Marcadores de **exclusión** de células HRS: CD3, CD19 y CD20++
- Marcadores de **caracterización** de células HRS: CD15, CD20, CD22



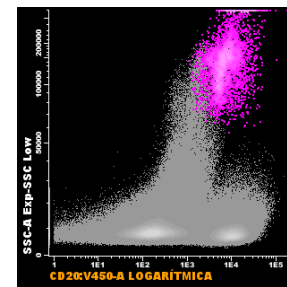
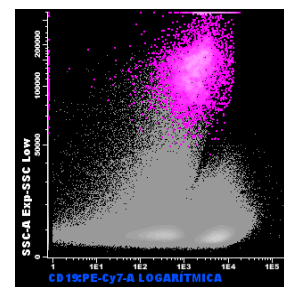
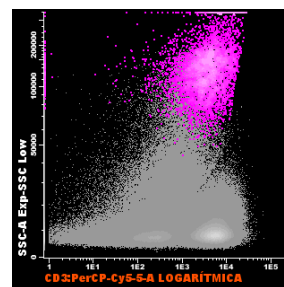
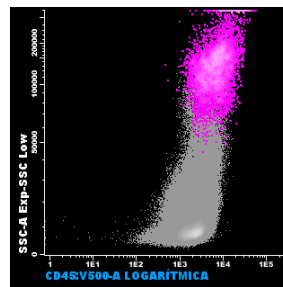
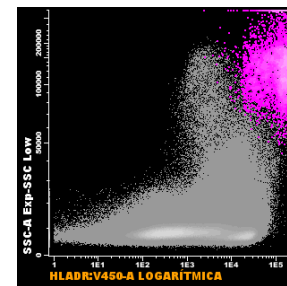
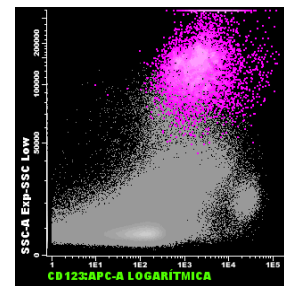
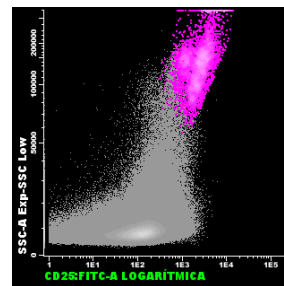
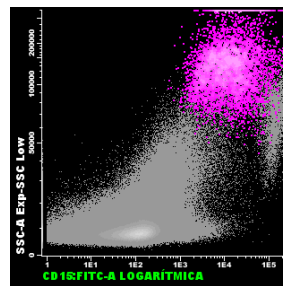
# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Panel de estudio IF de las células de HRS

| Fluorocromo | HV450  | HV500 | FITC | PE   | PerCP-Cy5.5 | PECy7 | APC   | APC-H7 |
|-------------|--------|-------|------|------|-------------|-------|-------|--------|
| Tubo 1      | CD20   | CD45  | CD25 | CD95 | CD3         | CD19  | CD123 | CD40   |
| Tubo 2      | HLA-DR | CD45  | CD15 | CD30 | CD3         | CD19  | CD123 | CD40   |

## 2. Caracterización células de HRS

- Marcadores de **selección** células HRS: CD30, CD40 y CD95
- Marcadores de **exclusión** células HRS: CD3, CD19 y CD20++
- Marcadores de **caracterización** células HRS: CD15, CD20, CD25, CD123 y HLA-DR



# Diagnóstico inmunofenotípico del linfoma de Hodgkin

## Panel de estudio IF de las células de HRS

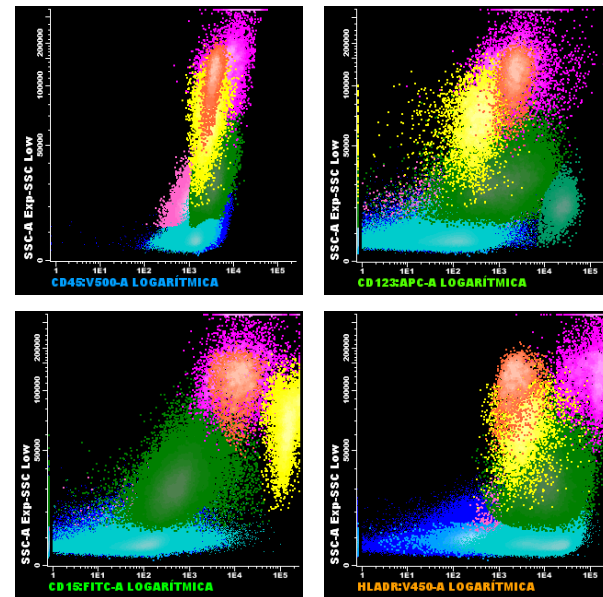
| Fluorocromo   | HV450  | HV500 | FITC | PE   | PerCP-Cy5.5 | PECy7 | APC   | APC-H7 |
|---------------|--------|-------|------|------|-------------|-------|-------|--------|
| <b>Tubo 1</b> | CD20   | CD45  | CD25 | CD95 | CD3         | CD19  | CD123 | CD40   |
| <b>Tubo 2</b> | HLA-DR | CD45  | CD15 | CD30 | CD3         | CD19  | CD123 | CD40   |

### 3. Estudio del MAT

| Población             | Linfocitos          | LT                   | LT CD4 <sup>+</sup> | LT CD8 <sup>+</sup> | NK               | LB                   |
|-----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|------------------|----------------------|
| Mediana, %<br>(rango) | 96,8<br>(97,6-84,2) | 67,75<br>(54,9-84,6) | 79<br>(61-88)       | 16,9<br>(11-33,9)   | 0,6<br>(0,2-2,8) | 32,15<br>(15,2-48,9) |

| Población             | Neutrófilos         | Monocitos       | Eosinófilos      | Basófilos     | CP               | CDP                |
|-----------------------|---------------------|-----------------|------------------|---------------|------------------|--------------------|
| Mediana, %<br>(rango) | 0,89<br>(0,09-2,69) | 0,64<br>(0-6,8) | 0,46<br>(0-3,79) | 0<br>(0-0,22) | 0,05<br>(0-2,18) | 0,45<br>(0,1-2,25) |

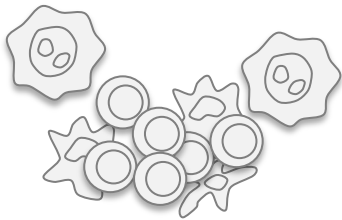
CP = células plasmáticas, CDP = células dendríticas plasmocitoides





# Índice

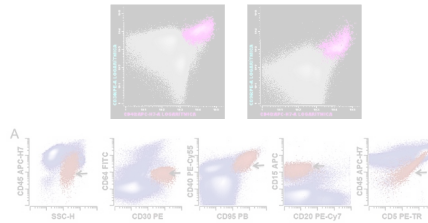
## 1. Fisiopatología del LH



Neoplasia inmunomediada  
por excelencia



## 2. Diagnóstico IF

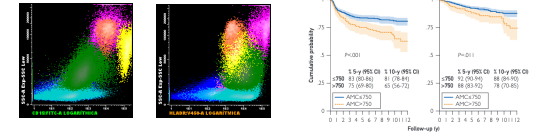


¿Podemos diagnosticar el LH  
clásico mediante CFM?



## 3. Estudio IF del MAT

- I. Tejido tumoral
- II. Sangre periférica



**¿Podemos estudiar el MAT en el LH?  
¿Qué valor pronóstico tiene?**

# Estudio inmunofenotípico del MAT

## Tejido tumoral: valor pronóstico de la población linfoide

LEUKEMIA & LYMPHOMA, 2017  
VOL. 58, NO. 5, 1144–1152  
<http://dx.doi.org/10.1080/10428194.2016.1239263>



ORIGINAL ARTICLE: RESEARCH

### The number of tumor infiltrating T-cell subsets in lymph nodes from patients with Hodgkin lymphoma is associated with the outcome after first line ABVD therapy\*

Sara Alonso-Álvarez<sup>a</sup>, María Belén Vidriales<sup>a</sup>, María Dolores Caballero<sup>a</sup>, Oscar Blanco<sup>a</sup>, Noemí Puig<sup>a</sup>, Alejandro Martín<sup>a</sup>, María Jesús Peñarrubia<sup>b</sup>, Esther Zato<sup>b</sup>, Josefina Galende<sup>c</sup>, Abelardo Báñez<sup>d</sup>, Miguel Alcoceba<sup>a</sup>, Alberto Orfão<sup>a</sup>, Marcos González<sup>a</sup> and Ramón García-Sanz<sup>a</sup>

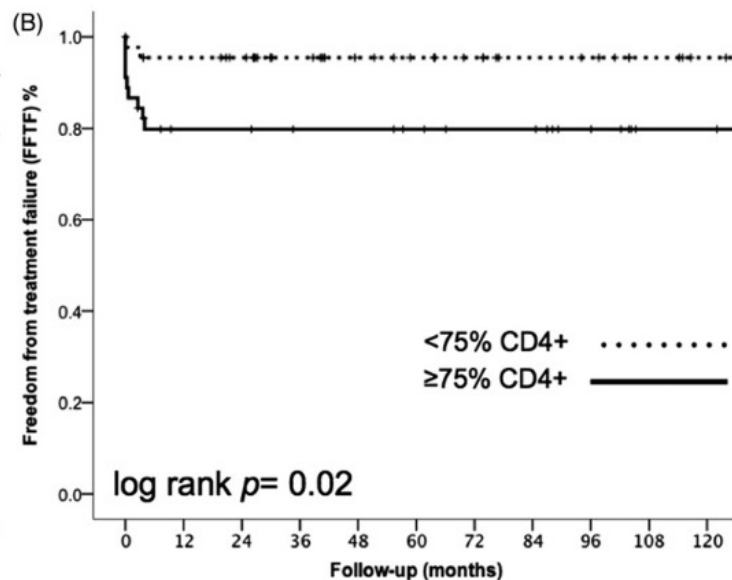
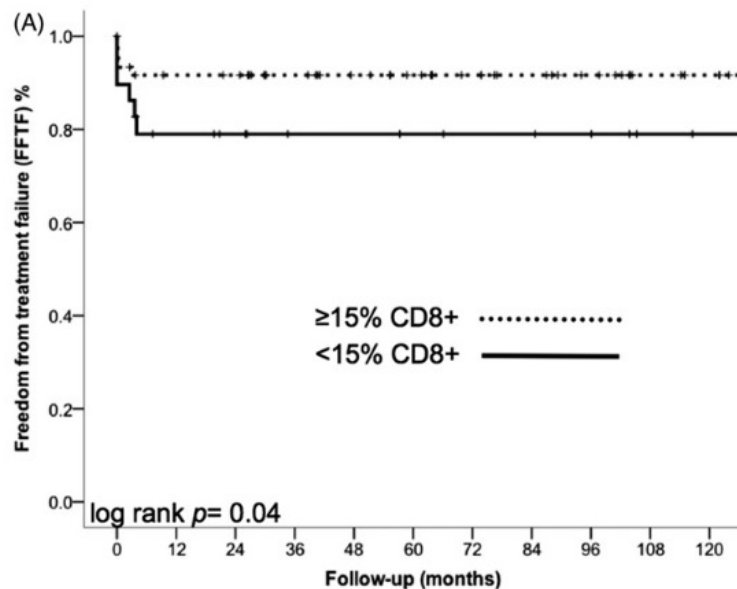
- 92 pacientes LH tratados con ABVD
- Estudio LB, LT totales, CD4+, CD8+ y ratio CD4+/CD8+

| Cell subtype                             | Early-stage disease, N = 37 | Advanced-stage disease, N = 55 | Total   | Linfos (92%) |
|--|-----------------------------|--------------------------------|---------|--------------|
| Total CD19 <sup>+</sup> B-lymphocytes    | 28 ± 13                     | 26 ± 15                        | 24 ± 13 | (28%)        |
| CD3 <sup>+</sup>                         | 65 ± 14                     | 61 ± 19                        | 63 ± 16 | (72%)        |
| CD4 <sup>+</sup>                         | 35 ± 15                     | 33 ± 19                        | 34 ± 16 | (54%)        |
| CD8 <sup>+</sup>                         | 10 ± 6                      | 11 ± 11                        | 10 ± 9  | (12%)        |
| Other non-lymphoid cells and tumor cells | 7 ± 10                      | 12 ± 15                        | 10 ± 14 |              |

# Estudio inmunofenotípico del MAT

Tejido tumoral: valor pronóstico de la población linfoide

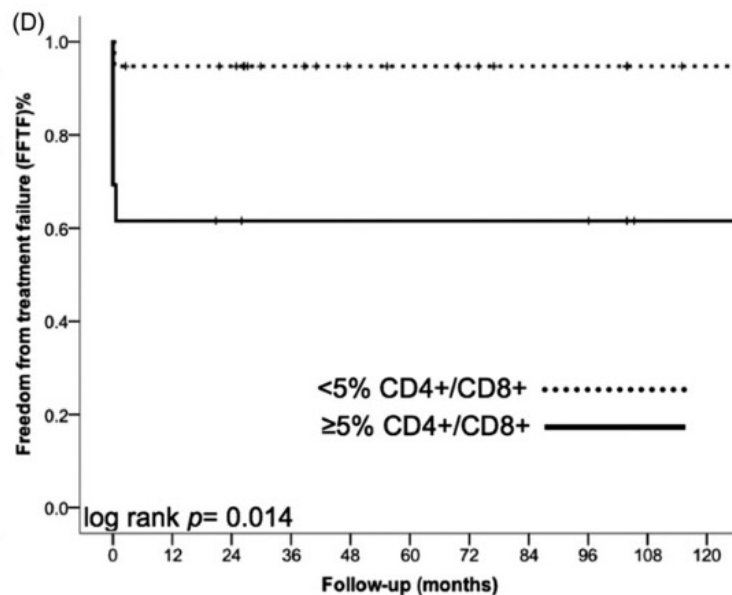
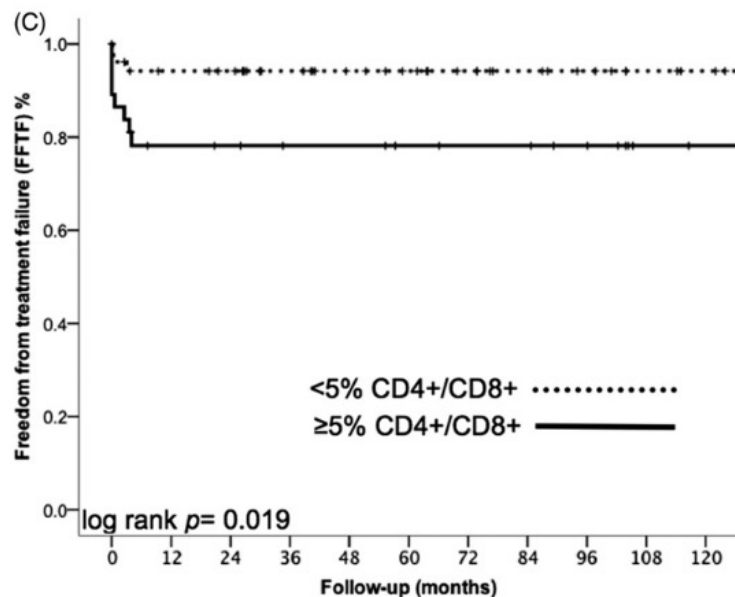
**A mayor % LT CD4+ y menor % LT CD8+ (mayor ratio CD4+/CD8+),  
peor *freedom from treatment failure***



# Estudio inmunofenotípico del MAT

Tejido tumoral: valor pronóstico de la población linfoide

**La ratio CD4+/CD8+ es la única variable independiente que predice la *freedom from treatment failure* en LH estadio avanzado**

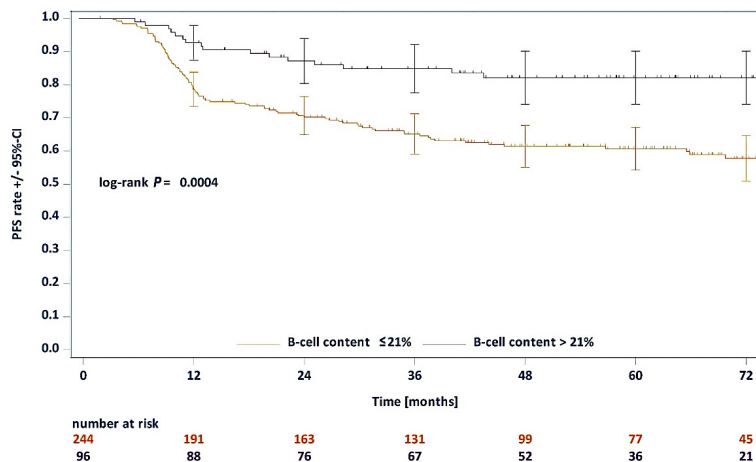


# Estudio inmunofenotípico del MAT

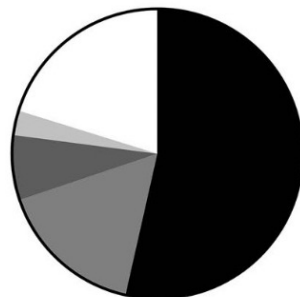
Tejido tumoral: valor pronóstico de la población linfoide

**El bajo recuento de linfocitos B en el MAT se asocia a un peor pronóstico**

HD12, HD15 y HD18 (escBEACOPP)<sup>1</sup>

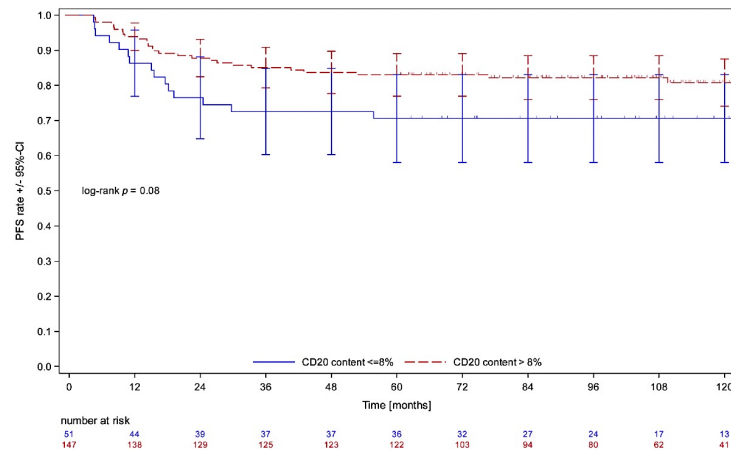


All subtypes



53.52% CD3  
16.31% CD20  
7.23% CD68  
2.74% CD30  
20.20% other

HD14 (ABVD\*)<sup>2</sup>



- No correlación con LB en SP

- Validado en otra cohorte independiente
- Tanto para SLP como SG

1. Jachimowicz RD, et al. *Haematologica*. 2021

2. Grund J, et al. *Br J Haematol*. 2023

# Estudio inmunofenotípico del MAT

## Tejido tumoral: valor pronóstico de la población linfoide

Ann Hematol (2014) 93:1319–1326  
DOI 10.1007/s00277-014-2044-x

ORIGINAL ARTICLE

### Flow cytometry CD4<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> lymphocyte subset in the microenvironment of Hodgkin lymphoma-affected lymph nodes

Rosa Di Gaetano · Valentina Gasparetto · Andrea Padoan · Barbara Callegari · Laura Candiotti · Maria Colomba Sanzari · Antonio Scapinello · Giuseppe Tagariello

- Estudian por CMF las subpoblaciones linfoides y el subgrupo LT CD4+, CD26-, CD38+ (linfocitos activados) → marcador surrogado Treg
- En LH hay un mayor predominio de LT y menor de LB, con un aumento de LT CD4+, CD26-, CD38+ (activados), respecto a individuos sanos

RESEARCH ARTICLE

WILEY Pediatric Blood & Cancer  aspho The American Society of Pediatric Hematology/Oncology

### Flow cytometry for assessment of the tumor microenvironment in pediatric Hodgkin lymphoma

Meret Henry<sup>1,2</sup>  | Steven Buck<sup>1</sup> | Süreyya Savaşan<sup>1,2</sup> 

- Estudio por CMF de las subpoblaciones linfocitarias y subtipos de LT (CD38+, DR+ -LT activados-)
- A mayor proporción de LT CD38+, DR+, mejor tasa de respuestas completas mantenidas y supervivencia libre de enfermedad

## Regular Article

LYMPHOID NEOPLASIA

### Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells

Paul Greaves, Andrew Clear, Andrew Owen, Sameena Iqbal, Abigail Lee, Janet Matthews, Andrew Wilson, Maria Calaminici, and John G. Gribben

Centre for Haemato-oncology, Bart's Cancer Institute, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, Charterhouse Square, London, United Kingdom

- Estudian por CMF a partir de muestras congeladas: Th1 y Th2, LT memoria, Treg, secreción citoquinas, estudios de funcionalidad y proliferación linfocitaria

*Di Gaetano R, et al. Ann Hematol. 2014*  
*Henry M, et al. Pediatr Blood Cancer. 2018*  
*Greaves P, et al. Blood. 2013*

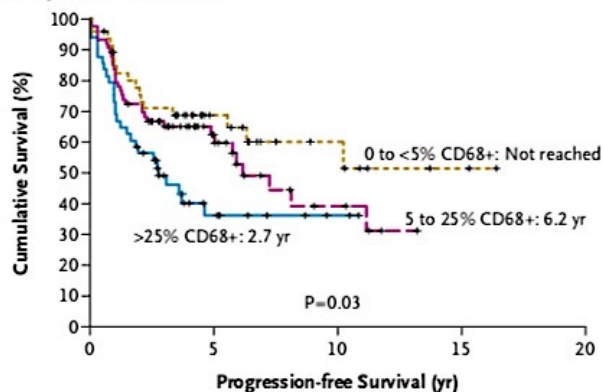
# Estudio inmunofenotípico del MAT

## Tejido tumoral: macrófagos asociados al tumor

### A mayor porcentaje de TAM, peor supervivencia

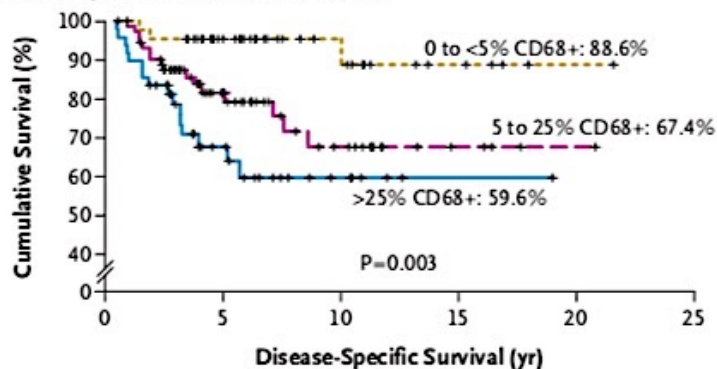
- 130 muestras congeladas de adenopatías LH
- Estudio mediante GEP de las firmas celulares del MAT

A Median Progression-free Survival



| No. at Risk    |    |    |   |   |   |
|----------------|----|----|---|---|---|
| 0 to <5% CD68+ | 46 | 17 | 7 | 2 | 0 |
| 5 to 25% CD68+ | 72 | 21 | 6 | 0 | 0 |
| >25% CD68+     | 48 | 9  | 2 | 0 | 0 |

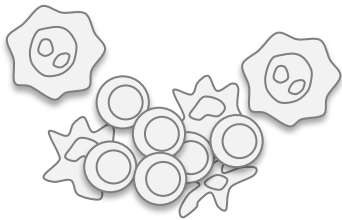
B 10-Yr Disease-Specific Survival in All Patients



| No. at Risk    |    |    |    |   |   |   |
|----------------|----|----|----|---|---|---|
| 0 to <5% CD68+ | 46 | 28 | 13 | 5 | 1 | 0 |
| 5 to 25% CD68+ | 72 | 33 | 14 | 4 | 1 | 0 |
| >25% CD68+     | 48 | 19 | 6  | 1 | 0 | 0 |

# Índice

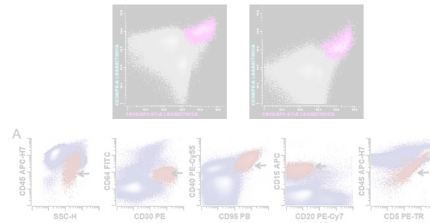
## 1. Fisiopatología del LH



Neoplasia inmunomediada por excelencia



## 2. Diagnóstico IF



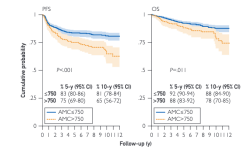
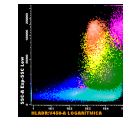
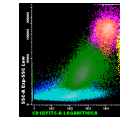
¿Podemos diagnosticar el LH clásico mediante CFM?



## 3. Estudio IF del MAT

I. Tejido tumoral

II. Sangre periférica



¿Podemos estudiar el MAT en el LH?

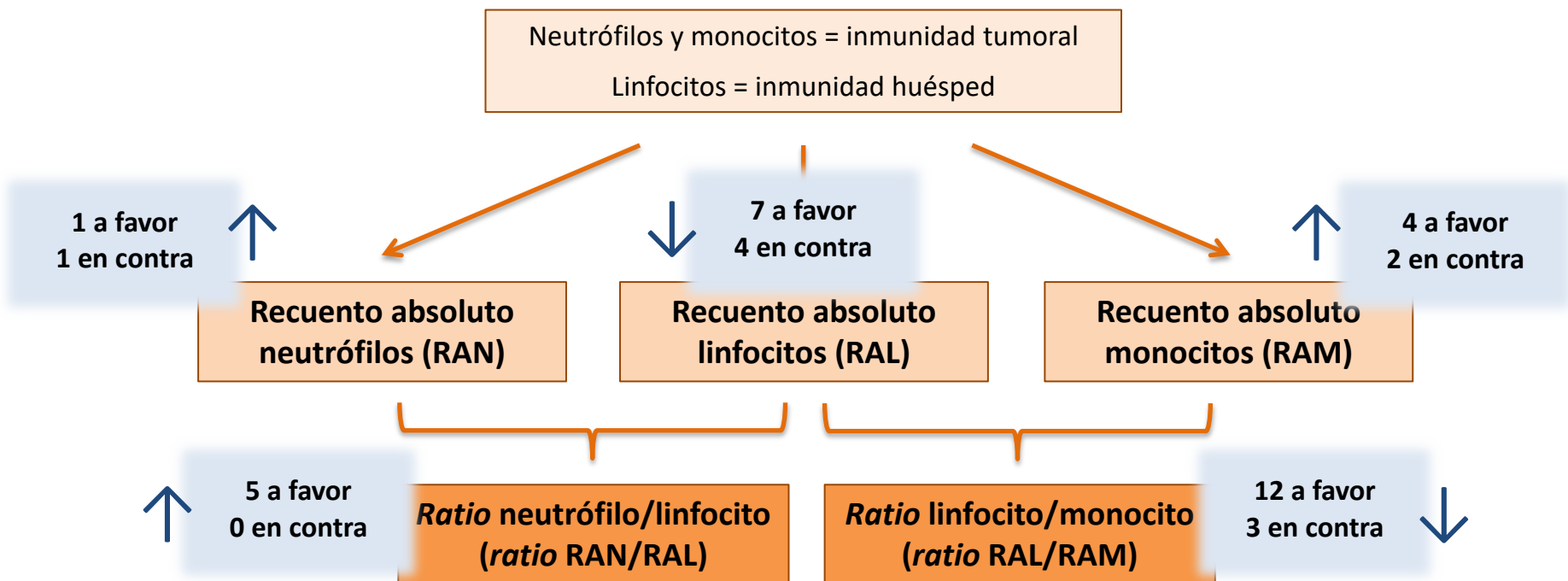
¿Qué valor pronóstico tiene?



# Estudio inmunofenotípico del MAT

Sangre periférica: estudios de las poblaciones del hemograma

Las poblaciones inmunitarias en sangre periférica reflejan el estado inmune tumoral y del huésped, adquiriendo valor pronóstico en el LH



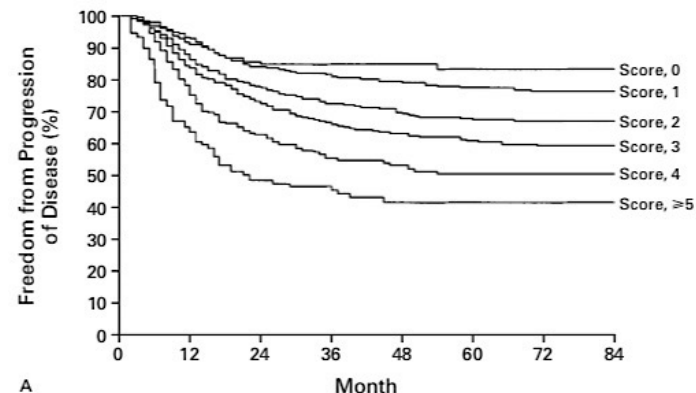
# Estudio inmunofenotípico del MAT

Sangre periférica: recuento absoluto de linfocitos

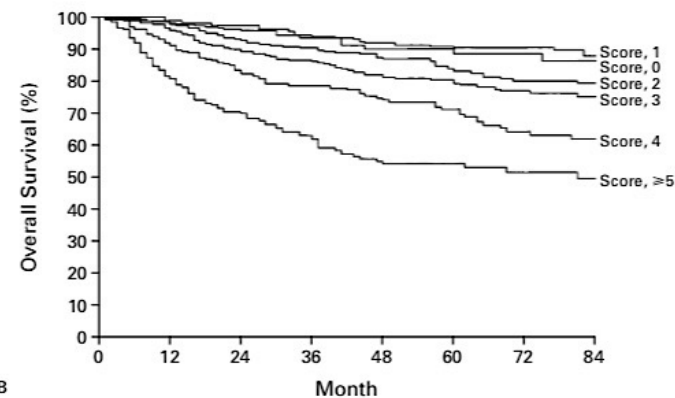
La linfopenia constituye uno de los parámetros de mal pronóstico del IPS Hasenclever

TABLE 2. THE FINAL COX REGRESSION MODEL.\*

| FACTOR   | LOG HAZARD RATIO | P VALUE | RELATIVE RISK |
|--|------------------|---------|---------------|
| Scrum albumin, <4 g/dl   | 0.40±0.10        | <0.001  | 1.49          |
| Hemoglobin, <10.5 g/dl   | 0.30±0.11        | 0.006   | 1.35          |
| Male sex   | 0.30±0.09        | 0.001   | 1.35          |
| Stage IV disease   | 0.23±0.09        | 0.011   | 1.26          |
| Age, ≥45 yr  | 0.33±0.10        | 0.001   | 1.39          |
| White-cell count, ≥15,000/mm <sup>3</sup>                            | 0.34±0.11        | 0.001   | 1.41          |
| Lymphocyte count, <600/mm <sup>3</sup><br>or <8% of white-cell count | 0.31±0.10        | 0.002   | 1.38          |



A

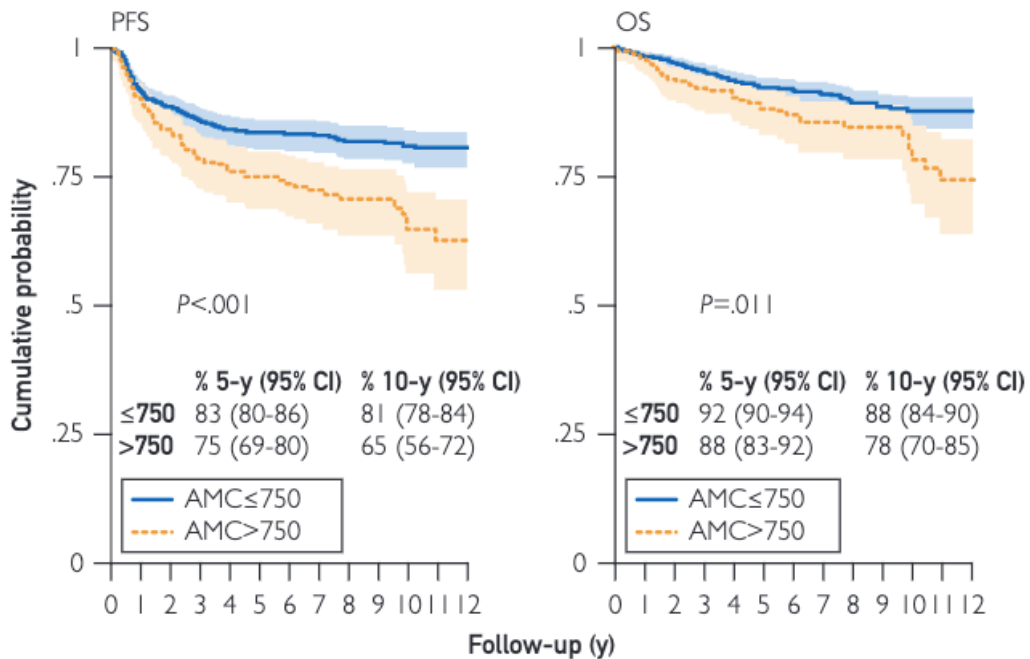


B

# Estudio inmunofenotípico del MAT

Sangre periférica: recuento absoluto de monocitos

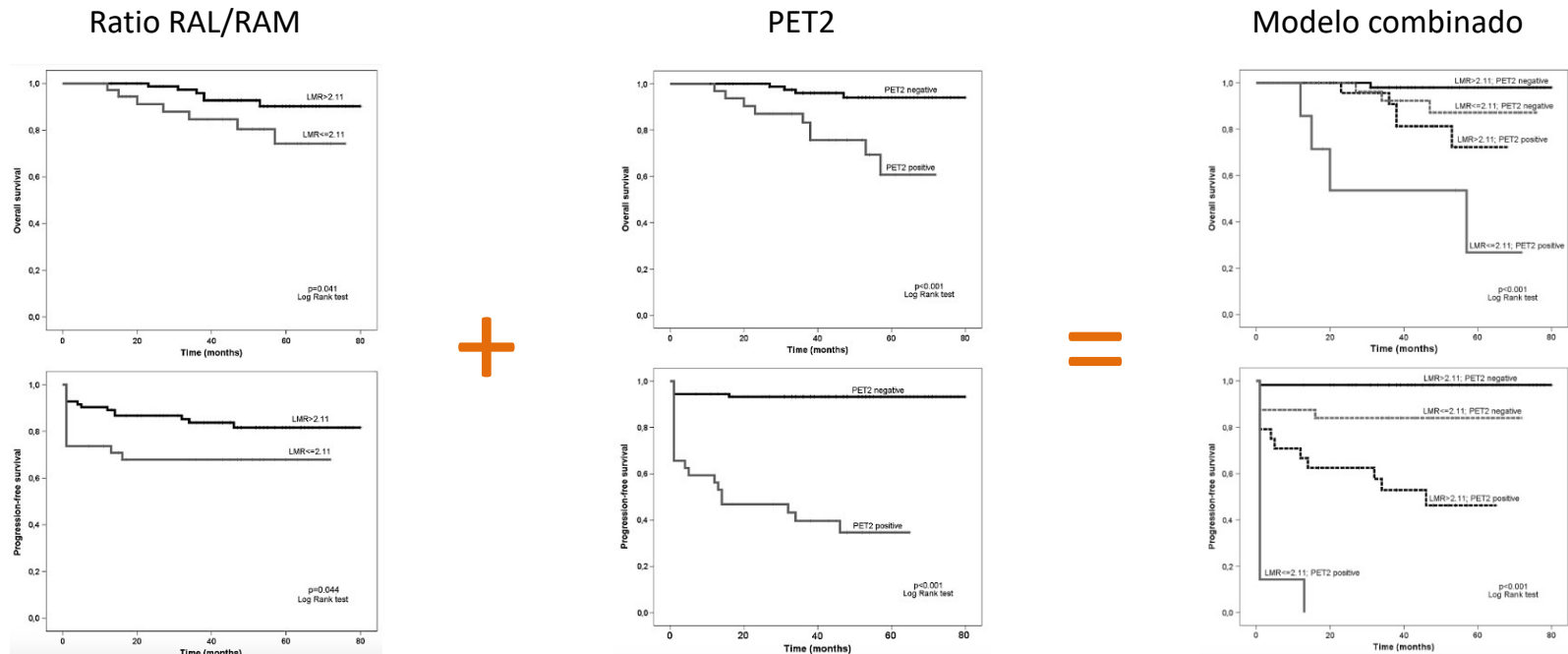
Un mayor RAM se asocia con una peor SLP y SG



# Estudio inmunofenotípico del MAT

Sangre periférica: ratio RAL/RAM

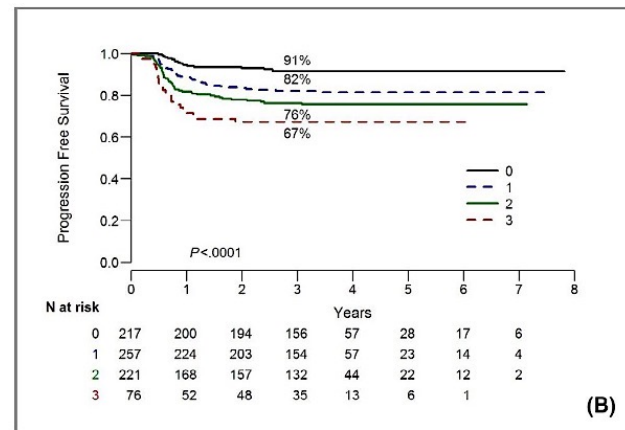
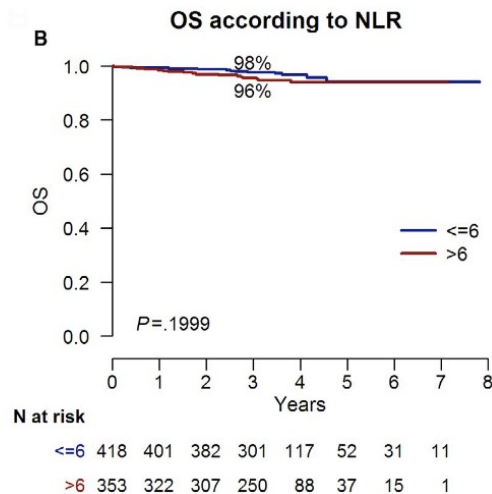
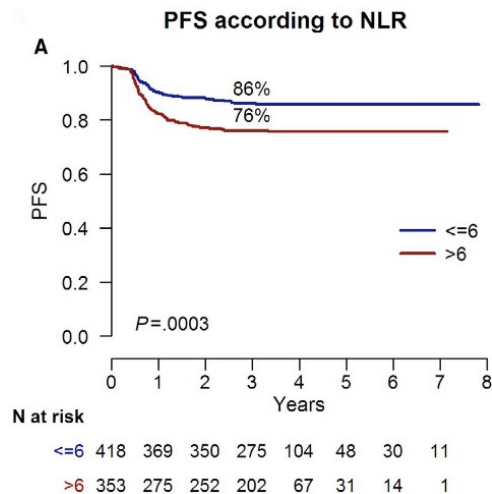
Una menor *ratio* RAL/RAM se asocia a un peor pronóstico independiente de la PET2



# Estudio inmunofenotípico del MAT

Sangre periférica: ratio RAL/RAM

Una mayor *ratio* RAN/RAL se asocia a una peor SLP y predice la positividad de la PET2



**FIGURE 4** Outcome prediction based on the combination of IPS, NLR, and presence of large nodal mass at diagnosis

| SCORE    | N, (%)   | PET2-, N(%) | PET2+, N(%) | OR (95%CI)        | p-value |
|----------|----------|-------------|-------------|-------------------|---------|
| <b>0</b> | 217 (28) | 196 (90)    | 21 (10)     | 1.0               |         |
| <b>1</b> | 256 (33) | 214 (84)    | 42 (16)     | 1.8<br>(1.1-3.3)  | 0.03    |
| <b>2</b> | 220 (29) | 165 (75)    | 55 (25)     | 3.1<br>(1.8-5.5)  | <.0001  |
| <b>3</b> | 76 (10)  | 45 (59)     | 31 (41)     | 6.4<br>(3.4-12.4) | <.0001  |

# Conclusiones

- El MAT es crítico en la fisiopatología del LH, es la base para el desarrollo de terapias dirigidas



I. Tejido tumoral

- Podemos detectar las células de HRS mediante CFM (CD30, CD40, CD95,  $\uparrow$ FSC y SSC)
- También podemos caracterizar inmunofenotípicamente las células de HRS



- La CFM permite analizar el MAT y cuantificar sus poblaciones inmunitarias
- El MAT tiene una implicación pronóstica tanto en tejido tumoral como en sangre periférica, aunque desconocemos gran parte de su funcionamiento y no tiene aplicación terapéutica

Neoplasia inmunomediada  
por excelencia

¿Podemos diagnosticar el LH  
clásico mediante CFM?

¿Podemos estudiar el MAT del LH?  
¿Qué valor pronóstico tiene?



**¡MUCHAS  
GRACIAS!**

