

# Original

## Utilización de la citomorfología junto con la citometría de flujo en material obtenido por PAAF en lesiones linfoproliferativas. Comparación de coste frente a la biopsia

J.J. Esquivias-López-Cuervo, M.I. Moreno-García, E. Villar-Álvarez, C. Marcos-Muñoz y F. Ruiz-Cabello

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.*

### SUMMARY

*Introduction: Fine needle aspiration (FNA) together with the flow cytometry (FC) constitute a diagnostic alternative to biopsy. Aim: To determine the efficacy of diagnosis with cytology plus FC (CCF) in lymphoproliferative illness, and to compare costs of FNA with those of biopsy. Results: CCF sensitivity was 96% in the reactive process, with a specificity of 97%. For diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma, according to type, a sensitivity of 89% was found, with a specificity of 100% and efficacy of 95%. Cytology together with FC was found to be four times less expensive than biopsy. Conclusions: FC and immunocytochemical techniques used with FNA should be improved as they are faster, less expensive, involve low morbidity and cause fewer problems for patients. Application of molecular biology technique should also be taken into account. Rev Esp Patol 2001; 34(3): 225-232.*

**Key words:** Fine needle aspiration - Lymph node - Cost - Flow cytometry - Cytology

### RESUMEN

*Introducción: El uso de la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) junto con la citometría de flujo (CMF) constituye una alternativa diagnóstica frente a la biopsia. Objetivos: Se compara la eficacia diagnóstica de la citología más CMF en enfermedades linfoproliferativas y se calcula el coste de la PAAF frente a la biopsia. Resultados: La sensibilidad de la CCF es del 96% en procesos reactivos y la especificidad del 97%. En el diagnóstico de los linfomas no Hodgkin, teniendo en cuenta el tipo, la sensibilidad es del 89%, la especificidad del 100% y la eficacia del 95%. La citología unida a la CMF resulta cuatro veces más barata que la biopsia. Conclusiones: Las técnicas de CMF e inmunocitoquímica para aplicar a las PAAF son aconsejables en determinados casos por su rapidez, economía, menor morbilidad y menores molestias para el paciente. Otra perspectiva a considerar es la aplicación de técnicas de biología molecular. Rev Esp Patol 2001; 34(3): 225-232.*

**Palabras clave:** PAAF - Ganglio linfático - Coste - Citometría de flujo - Citología

## INTRODUCCIÓN

La punción-aspiración con aguja fina (PAAF) constituye una alternativa diagnóstica atractiva frente a la biopsia (1) en el marco de la tendencia actual de la medicina, que aspira a atender a los pacientes en un tiempo razonable, con las mínimas molestias y con un resultado adecuado. Sin embargo, su valor en el diagnóstico de la patología linfoide es controvertido, con opiniones en contra de la utilización de la PAAF como único método en los linfomas de nueva aparición (2), aunque sí se considera útil su aplicación en el estudio de las recidivas. Otras opiniones avalan el uso de la citología con ayuda de técnicas inmunocitoquímicas (ICQ) para el estudio de las enfermedades linfoproliferativas (3-9).

Con la citometría de flujo (CMF) se detectan los tipos celulares mediante marcaje con anticuerpos, estableciendo la monoclonalidad o policlonalidad de la población celular y el tipo predominante. Esta técnica tiene la desventaja, con respecto a la inmunocitoquímica, de no poder visualizar las células positivas, aunque se obtienen algunos datos relativos a tamaño y complejidad en los histogramas FSC/SSC. No obstante, se ha usado con éxito en el diagnóstico de linfomas (10, 11).

En este estudio analizamos nuestra experiencia en el diagnóstico de linfomas con citología por PAAF combinada con la CMF y valoramos el coste, en comparación con el de la biopsia, para determinar la seguridad diagnóstica, las limitaciones y la rentabilidad de la misma.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se revisaron los casos de punción de ganglio linfático estudiados por CMF en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de las Nieves desde octubre de 1997 hasta mayo de 2000. Las punciones se realizaron por sospecha de linfoma o para descartarlo. Todas las punciones fueron efectuadas por patólogos. Se realizaron entre dos y cuatro punciones, con una media de tres, por cada nódulo. En los casos de lesión profunda, la punción se llevó a cabo mediante control por TAC o ecográfico, realizándola en estos casos el radiólogo, aunque la aspiración y extensión del material sobre los portaobjetos siempre fueron efectuadas por el patólogo. Los especímenes se prepararon para CMF y citología convencional.

Con el material celular obtenido por la PAAF se confeccionaron simultáneamente extendidos celulares que se tiñeron con Papanicolaou y Giemsa y suspensiones celulares en tampón de fosfato salino (PBS). Una parte de la suspensión celular en PBS se procesó según la técnica descrita por Tani y cols (3), fijando las preparaciones obtenidas en alcohol 95% en vez de hacerlo en acetona, y otra parte se suministró al laboratorio de marcaje inmunológico en el cual se realizó el estudio por CTF. Se utilizaron anticuerpos monoclonales en doble marcaje para CTF mediante inmunofluorescencia directa. Se empleó el citómetro FACSsort de Becton Dickinson. Los anticuerpos monoclonales usados fueron: CD19, CD3, CD4, CD8, CD20, CD5, FMC7, CD22, CD23, CD56, CD16, DR, CD7, CD2, CD25, CD11c, CD38, CD10, Kappa, Lambda, IgM, IgD, IgA e IgG. Para los anticuerpos citoplasmáticos se realizó permeabilización con Ortho Permeafix (Ortho Diagnostics).

Para inmunocitoquímica se utilizaron algunos de los siguientes anticuerpos, según se orientara el diagnóstico por morfología: LC, L26(CD20), UCHL1(CD45RO) CD5, D-ciclina, CD15, CD30, lisozima, IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda, EMA, citoqueratinas, vimentina, S100, BCL2.

Se orientó el diagnóstico por citomorfología considerando los tipos celulares. Cuando se observó polimorfismo celular, polinucleares e histiocitos, se pensó en un proceso reactivo, por lo que había que descartar una enfermedad de Hodgkin o una metástasis. En caso de predominio de algún tipo celular, como linfocitos pequeños, se planteó el diagnóstico diferencial entre linfoma de linfocitos pequeños, linfoma del manto, linfoma centrocítico y linfoma de la zona marginal. Las células algo mayores que los linfocitos pequeños, con nucléolo más o menos conspicuo, apuntan hacia la posibilidad de un linfoma linfoblástico y las células grandes hacia un linfoma centroblástico o linfoma B de células grandes. El hallazgo de células de tipo Sternberg en un entorno de linfocitos y en presencia de eosinófilos obliga a descartar una enfermedad de Hodgkin.

Para el diagnóstico por citometría de flujo se utilizaron algoritmos consensuados (12). Se determinó la monoclonalidad en caso de detectar población B o bien se estableció la carencia de algún CD T en el caso de linfocitos T.

La ICQ se usó en algunos casos para establecer positividad según orientara la CTF o la morfología.

Se calculó la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo y la eficacia del método.

## RESULTADOS

Se han estudiado 100 casos de punción realizada en 91 nódulos superficiales y 9 lesiones profundas, correspondientes a 91 pacientes. Sólo se han sometido a análisis aquellos casos de los cuales se ha podido tener acceso a la confirmación biopsica en el momento del estudio. Éstos suman un total de 36 casos, 34 de localización superficial y 2 de localización profunda (casos 12 y 14), correspondientes a 36 pacientes.

Los datos relativos a los casos estudiados y los diagnósticos emitidos se recogen en las Tablas 1 y 2. Los diagnósticos se han reunido en los cuatro grandes grupos siguientes:

**Reactivos.** De los seis casos diagnosticados como reactivos, la biopsia ha permitido detectar un error diagnóstico correspondiente al caso 20. El aspecto citológico se interpretó como proceso granulomatoso, compatible con una etiología tuberculosa, y resultó ser un linfoma de Hodgkin.

**Neoplásicos no linfoides.** Los cuatro casos correspondieron a un teratoma maligno de mediastino (caso 12), un carcinoma renal (caso 14) y dos carcinomas metastásicos (casos 17 y 23).

**Linfomas de Hodgkin.** De los cuatro diagnósticos de enfermedad de Hodgkin, tres fueron diagnosticados por citología y el cuarto se clasificó como proceso reactivo. En los cuatro la CMF dio un diagnóstico de proceso reactivo policlonal, con predominio de linfocitos T (CD4). En el caso 22 ocurrió lo contrario que en el 20: se tipificó citológicamente como compatible con enfermedad de Hodgkin y la biopsia puso de manifiesto un proceso tuberculoso.

**Linfomas no Hodgkin.** Hubo 22 casos de linfoma no Hodgkin. Quince fueron diagnosticados como *de novo* y 7 fueron recidivas.

## Estudio estadístico

Al agrupar los diagnósticos y comparar los emitidos mediante citología más citometría de flujo (CCF) con el diagnóstico de certeza, se obtuvo la tabla de contingencia (Tabla 3), en la que se apreció que los 36 casos estudiados correspondían a 6 linfadenitis reactivas o inflamatorias, 4 neoplasias no linfoides, 4 linfomas de Hodgkin y 22 no Hodgkin.

La Tabla 4 muestra la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivo y negativo de los casos reactivos, neoplásicos no linfoides, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin. En general, la capacidad del método para discriminar entre procesos reactivos y tumorales alcanzó una sensibilidad del 83% y una especificidad del 96% (Tabla 4.1). De los 22 linfomas no Hodgkin, 19 se consideraron diagnósticos definitivos, ya que 3 se clasificaron como linfomas de bajo grado, pero sin especificar el tipo (Tabla 4.5). En la biopsia dos de ellos resultaron ser linfomas de linfocitos pequeños y el tercero un linfoma centrocítico, del centro folicular.

## Coste

Para la comparación entre el coste de la citología unida a la citometría de flujo y el de la biopsia se han utilizado las unidades relativas de valor (URV) y los grupos de diagnósticos relacionados (GDR) vigentes en nuestro hospital. Para poder comparar los costes, se hace la equivalencia en pesetas según la estimación para el año 1999. El precio de la URV en las técnicas de CMF era de 450 ptas, el de la URV en Anatomía Patológica de 1319 ptas. y el punto GDR tiene un precio de 424.444 ptas. Teniendo en cuenta que, por término medio, una biopsia requiere seis técnicas de IHQ, se obtienen los costes, reflejados en la Tabla 5, de 97.548 ptas para la biopsia y 24.052 para la PAAF con citometría de flujo.

El ahorro del procedimiento asociado de PAAF con CMF con respecto a la biopsia es de 73.496 ptas.

## DISCUSIÓN

Nuestra experiencia indica que la PAAF unida a la citometría de flujo permite dar un diagnóstico definitivo en el 86% de los casos de linfoma no Hodgkin, porcentaje ligeramente superior a los obtenidos por Meda (76,7%) (9) y Young (80%) (8).

Tabla 1. Relación de casos objeto del estudio.

Caso	Edad	Sexo	Localización	De novo/recidiva	Diagnóstico
1	22	V	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
2	45	H	Superficial	Recidiva	Linfoma no Hodgkin
3	71	H	Superficial	De novo	Reactivo
4	42	V	Superficial	Recidiva	Linfoma no Hodgkin
5	54	H	Superficial	De novo	Reactivo
6	66	V	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
7	68	V	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
8	47	V	Superficial	Recidiva	Linfoma no Hodgkin
9	27	V	Superficial	De novo	Reactivo
10	36	V	Superficial	De novo	Enfermedad de Hodgkin
11	67	V	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
12	D	V	Profundo	De novo	Neoplasia no linfocítica
13	D	V	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
14	52	H	Profundo	De novo	Neoplasia no linfocítica
15	67	V	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
16	65	V	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
17	72	V	Superficial	De novo	Neoplasia no linfocítica
18	66	V	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
19	22	H	Superficial	De novo	Enfermedad de Hodgkin
20	D	V	Superficial	De novo	Enfermedad de Hodgkin
21	9	H	Superficial	De novo	Reactivo
22	71	H	Superficial	De novo	Reactivo
23	32	V	Superficial	De novo	Neoplasia no linfocítica
24	D	H	Superficial	De novo	Reactivo
25	74	H	Superficial	Recidiva	Linfoma no Hodgkin
26	D	H	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
27	42	V	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
28	69	V	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
29	74	V	Superficial	Recidiva	Linfoma no Hodgkin
30	74	H	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
31	66	V	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
32	33	V	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin
33	19	V	Superficial	Recidiva	Linfoma no Hodgkin
34	37	V	Superficial	Recidiva	Linfoma no Hodgkin
35	25	V	Superficial	De novo	Enfermedad de Hodgkin
36	62	V	Superficial	De novo	Linfoma no Hodgkin

D: edad desconocida

Muchos estudios han valorado la precisión de la PAAF a la hora de emitir un diagnóstico correcto de los linfomas no Hodgkin. La sensibilidad y la especificidad están entre el 95% y el 100%. Estos valores están de acuerdo con los resultados de este estudio: sensibilidad del 100% para el diagnóstico de linfoma y del 86%

cuando se considera la capacidad de precisar el tipo, y especificidad del 100%. La eficacia del método es del 91,6%.

La fiabilidad en el diagnóstico de los linfomas B es grande, ya que se puede determinar la monoclonalidad de los mismos.

**Tabla 2. Número de casos por cada diagnóstico.**

	Nº de casos
Reactivos/benignos	6*
Tumores no linfoides	4
Enfermedad de Hodgkin	4**
Linfoma de linfocitos pequeños/LLC-B	2
Linfoma de células del manto	3
Linfoma de la zona marginal	2
Inmunocitoma, l. plasmacitoide y mieloma	1
Linfoma centrofolicular grado I	5
Linfomas de bajo grado sin especificar	3
Linfoma B de células grandes	3
Linfoma del centro folicular	4
Linfoma T de alto grado	1
Linfoma T linfoblástico	1
Total	36

\*Un caso correspondió a enfermedad de Hodgkin.  
\*\*Un caso fue un falso positivo. Resultó ser un proceso tuberculoso.

En los linfomas de bajo grado, el diagnóstico diferencial entre linfoma de linfocitos pequeños, linfoma del manto, linfoma de la zona marginal y linfoma centrocítico debe hacerse a partir de los marcadores por CMF o por ICQ, ya que con la morfología sola es extraordinariamente difícil o incluso, la mayoría de las veces, imposible.

Una vez calificado el proceso por citomorfología como una proliferación de linfocitos pequeños, y si esta

proliferación es B y de carácter monoclonal, hay que establecer el diagnóstico diferencial entre: linfoma de linfocitos pequeños/LLC-B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma centrocítico, linfoma de células del manto y linfoma de la zona marginal. Para dilucidar el diagnóstico diferencial, la coexpresión de CD20 y CD5 restringe las posibilidades a linfoma de linfocitos pequeños y linfoma de células del manto. La negatividad o expresión débil de CD22 y la expresión débil de Ig de superficie junto a la positividad de CD23, llevan al diagnóstico de linfoma de linfocitos pequeños, mientras que la negatividad a CD23, Ig de superficie altas y CD22 elevado son rasgos de linfoma del manto, según el sistema de puntuación de E. Matutes y cols. (13). La positividad por ICQ a la D-ciclina o BCL-1 corrobora el diagnóstico de linfoma del manto. El linfoma linfoplasmacítico es positivo a CD23 (10), aunque esta positividad no lo diferencia del linfoma de células pequeñas (11). Los rasgos plasmacitoides por morfología serán de gran utilidad diagnóstica. Si las células son CD5 negativas, la positividad a CD10 favorecerá el diagnóstico de linfoma centrocítico frente al linfoma de la zona marginal (8).

La mayor dificultad con la CMF en el diagnóstico de los linfomas B tuvo lugar cuando había alteraciones celulares o escasa Ig de superficie.

El diagnóstico de los linfomas B de alto grado es factible ante la presencia de células grandes. Sin embargo, tanto en el linfoma de grandes células B como en el centroblástico, se puede plantear el diagnóstico diferencial con la hiperplasia de centros germinales, por lo que es indispensable la demostración de monoclonalidad por CMF.

**Tabla 3. Tabla de contingencia entre los diagnósticos de citología combinada con CMF y los diagnósticos por biopsia.**

Diagnóstico citológico + citometría de flujo	Diagnóstico de certeza				Total
	1	2	3	4	
Reactivo	5				6
Tumoral, no linfoma		4			4
Enfermedad de Hodgkin					4
Linfoma no Hodgkin				22	22
Total	6	4	4	22	36

1. Reactivo
2. Tumoral, no linfoma
3. Enfermedad de Hodgkin
4. Linfoma no Hodgkin

**Tabla 4. Cálculo de sensibilidad, especificidad y eficacia de la citología unida a citometría de flujo (CMF).**

1. REACTIVO		
Citología + CMF	Diagnóstico de certeza	
	+	-
+	5	1
-	1	29
Sensibilidad (S): 5/6=83%; Especificidad (E): 29/30=96%; Valor predictivo positivo (VPP): 5/6=83%; Valor predictivo negativo (VPN): 29/30=96%; Eficacia: 34/36=94%		
2. TUMORAL NO LINFOMA		
Citología + CMF	Diagnóstico de certeza	
	+	-
+	4	0
-	0	32
S: 4/4:100%; E:100%; VPP: 100%; VPN: 100%; Eficacia: 100%		
3. ENFERMEDAD DE HODGKIN		
Citología + CMF	Diagnóstico de certeza	
	+	-
+	3	1
-	1	31
S: 3/4: 75%; E: 31/32=96%; VPP: 3/4: 75%; VPN: 31/32=96%; Eficacia: 34/36=94%		
4. LINFOMA NO HODGKIN		
Citología + CMF	Diagnóstico de certeza	
	+	-
+	22	0
-	0	14
S:100%; E: 100%; VPP: 100%; VPN: 100%; Eficacia: 100%		
5. LINFOMA NO HODGKIN. TIPO		
Citología + CMF	Diagnóstico de certeza	
	+	-
+	19	3
-	0	14
S: 19/22=86%; E: 100%; VPP: 100%; VPN: 14/17=82%; Eficacia: 33/36=91,6%		

En cuanto a los linfomas T, en este estudio sólo se contó con dos casos comprobados por biopsia. Aunque no hay un marcador inmunofenotípico semejante a las cadenas ligeras de inmunoglobulina, el diagnóstico puede sospecharse ante la identificación de un fenotipo T anormal y por la pérdida de uno o más de los antígenos pan-T. La dificultad está en que generalmente hay también una población reactiva a T y la CMF no distinguirá entre población reactiva y neoplásica, aunque en la actualidad se está detectando monoclonalidad T por el estudio de anticuerpos anti V. La citomorfología ayuda a encontrar anisonucleosis marcada, irregularidad de la membrana nuclear e hiper cromatismo (14), como observamos en el caso 19.

Los linfomas linfoblásticos muestran una citología más característica, gran actividad y positividad a TdT y CD34.

Nuestra experiencia al obviar la biopsia para emitir el diagnóstico por PAAF y CMF en los linfomas no Hodgkin es similar a la de otros (8, 15, 16).

En la enfermedad de Hodgkin, la eficacia diagnóstica depende de la facilidad para identificar las células de Sternberg-Reed (S-R) sobre un fondo de células reactivas inflamatorias.

Uno de los dos errores con los que contamos corresponde a un falso positivo en el que las células histiocitarias de la TBC se confundieron con células de Hodgkin. La revisión crítica del caso permitió visualizar correctamente la necrosis y las células de Langhans. Hay que señalar también que no se contó con una información clínica adecuada. La revisión puso de manifiesto que con dicha información clínica la valoración de los extendidos hubiera sido distinta.

El otro caso fue un falso negativo, al no reconocerse las células de S-R.

En nuestra opinión, en el linfoma de Hodgkin, el diagnóstico nunca puede ser de absoluta certeza con la PAAF, debiendo ser recomendada siempre la biopsia. Esta opinión es compartida por Brenton (9) y por Young (8).

Las lesiones reactivas muestran un aspecto citológico polimorfo, como ya se ha comentado. Para establecer la monoclonalidad, se ha recomendado una proporción kappa/lambda de 5,5/1 o una proporción lambda/kappa de 1,7/1. Pero con esta condición aumentan los falsos positivos y negativos (17).

En general, los tumores no linfoides no han presentado dificultades diagnósticas. La CMF mostró un pa-

Tabla 5. Coste de la CMF, PAAF y biopsia, desglosado, atendiendo a las URV y GDR.

		URV/GDR	Ptas.	Total ptas.
CMF	(a)	30	450	13.500
PAAF superficial	(b)	8	1319	10.552
Estudio histológico del ganglio por patólogo	(c)	13	1319	17.147
IHQ/ICQ	(d)	5	1319	6595
Toma de biopsia por cirujano de lesión superficial	(e)	0,0962	424.444	40.831
Coste de PAAF + CMF = a + b = 24.052 ptas.				
Coste de biopsia = e + (6*d) + c = 97.548 ptas.				

trón policlonal o no identificó las células. El uso de la ICQ es de gran utilidad para la caracterización de las células neoplásicas en casos dudosos.

En este estudio no se ha calculado el coste del tiempo de espera en la realización de la biopsia frente a la citología, ni la demora en emitir el diagnóstico. Tampoco se ha cuantificado la morbilidad, ni se han tenido en cuenta las molestias ocasionadas al enfermo, pero es obvio que la mayor rapidez y la considerable disminución de las molestias para el enfermo son factores inherentes a la citología. No se ha calculado el coste en las lesiones profundas, pero en éstas la diferencia es considerablemente mayor, ya que la intervención quirúrgica supone un gasto más elevado.

En el cálculo somero realizado aquí, se refleja un ahorro de 73.496 ptas. en la PAAF con respecto a la biopsia. Según los cálculos de Rimm y cols. (1), el ahorro es de 250 a 750 dólares por cada PAAF.

En una época de contención del gasto en los cuidados sanitarios, el procedimiento de la PAAF ofrece una alternativa a la biopsia económicamente ventajosa y, en el caso de los procesos linfoproliferativos, la incorporación de la CMF permite alcanzar una gran eficacia diagnóstica. Sin embargo, ello no significa renunciar a la biopsia, que sigue siendo el procedimiento de mayor precisión. Será preciso efectuar una juiciosa selección de los casos, teniendo en cuenta las posibilidades que ofrece la punción.

De los 36 casos aquí estudiados, en 31 coincidió el diagnóstico de la citología con CMF y el de la biopsia, lo que, de haber obviado la biopsia, hubiera supuesto un ahorro de 3.023.988 ptas. Pero hay que tener en cuenta los 5 casos en los que el diagnóstico no fue coincidente, por lo que es necesario acoger esta técnica con extrema prudencia.

Tenemos que dirigir nuestros esfuerzos a perfeccionar las técnicas de ICQ y CMF para alcanzar una mayor fidelidad diagnóstica. La posibilidad de aplicar técnicas de biología molecular a material obtenido por PAAF es una realidad y se contempla como un factor que puede cambiar la patología diagnóstica en un futuro inmediato (18, 19).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rimm DL, Stastny JF, Rimm EB y cols. *Comparison of the costs of fine-needle aspiration and open surgical biopsy as methods for obtaining a pathologic diagnosis*. Cancer (Cancer Cytopathology) 1997; 81: 51-56.
2. Young JA. *Fine needle aspiration cytopathology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1993.
3. Tani EM, Christensson B, Porwit A, Skoog L. *Immunocytochemical analysis and cytomorphologic diagnosis on fine needle aspirates of lymphoproliferative disease*. Acta Cytol 1988; 32: 209-215.
4. Levitt S, Cheng L, DuPuis M, Layfield L. *Fine needle aspiration diagnosis of malignant lymphoma with confirmation by immunoperoxidase staining*. Acta Cytol 1985; 29: 895-902.
5. Sneige N, Dekmezian R, Katz RL, Fanning TV, Lukeman JL, Ordoñez NF, Cabanillas F. *Morphologic and immunocytochemical evaluation of 220 fine needle aspirates of malignant lymphoma and lymphoid hyperplasia*. Acta Cytol 1990; 34: 311-322.
6. Martin SE, Zhang HZ, Magyarosy E y cols. *Immunologic methods in cytology: Definitive diagnosis of non-Hodgkin's lymphomas using immunologic markers for T- and B-cells*. Am J Clin Pathol 1984; 82: 666-673.
7. Cafferty LL, Katz RL, Ordoñez NG y cols. *Fine needle aspiration diagnosis of intraabdominal and retroperitoneal lymphomas by a morphologic and immunocytochemical approach*. Cancer 1990; 65: 72-77.
8. Young NA, Al-Saleem TI y cols. *Utilization of fine-needle aspiration cytology and flow cytometry in the diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma*. Cancer (Cancer Cytopathol) 1998; 84: 252-261.

9. Meda BA, Buss DH, Woodruff RA, Cappellari JO, Rainer RO y cols. *Diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma. The usefulness and limitations of combined fine-needle aspiration, cytomorphology and flow cytometry.* Am J Clin Pathol 2000; 113: 688-699.
10. Zander DS, Iturraspe JA, Asmt MT, Everet ET, Ascp MT, Massey JK, Braylan RC. *Flow cytometry: In vitro assesment of its potential application for diagnosis and classification of lymphoid processes in cytologic preparations from fine-needle aspirates.* Am J Clin Pathol 1994; 101: 577-586.
11. Robins DB, Katz RL, Swan F Jr, Atkinson EN, Ordóñez NG, Huh YO. *Immunotyping of lymphoma by fine-needle aspiration: A comparative study of cytospin preparations and flow cytometry.* Am J Clin Pathol 1994; 101: 569-576.
12. Smithz RG, The working group on flow cytometry and image analysis. *Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies.* Leukemia 1996; 10: 877-895.
13. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R y cols. *The immunological profile of cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL.* Leukemia 1994; 8: 1640-1645.
14. De May RM. *Lymph nodes.* En: The art and science of cytopathology: Aspiration cytology. ASCP Press, Chicago 1996; 779-846.
15. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphoma: Summary and description of a working formulation for clinical usage.* Cancer 1982; 49: 2112-2135.
16. Chernoff WG, Lampe HB, Cramer H y cols. *The potential clinical impact of the fine needle aspiration/flow cytometric diagnosis of malignant lymphoma.* J Otolaryngol 1992; 21: 1-15.
17. Samoszuk MK, Krailo M, Yan QH y cols. *Limitations of numerical ratios for defining monoclonality of immunoglobulin light chains in B-cell lymphomas.* Diagn Immunol 1985: 133-138.
18. Movilia A, De Servi B, Assi A. *Application of PCR in the diagnosis of B-type non-Hodgkin's lymphomas in cytological specimens from fine-needle aspiration.* Pathologica 2000; 92(3): 172-176.
19. Rimm DL. *Molecular biology in cytopathology.* Cancer (Cancer Cytopathology) 2000; 90: 1-9.