

Instituto de Hematología e Inmunología

INMUNOFENOTIPAJE EN EL DIAGNÓSTICO DE SÍNDROMES LINFO Y MIELOPROLIFERATIVOS

Dra. Miriam Sánchez Segura, Lic. René Rivero Jiménez, Dra. Vianed Marsán Suárez, Lic. Mercedes Martínez Machado, Dr. Edgardo Espinosa Martínez, Dr. Alejandro González Otero, Dra. Consuelo Macías Abraham y Dr. Porfirio Hernández Ramírez

RESUMEN

Se realizó el inmunofenotipaje de células procedentes de médula ósea y de sangre periférica en 217 pacientes con síndromes linfoma y mieloproliferativos, a través del ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ). Del total de casos estudiados, 143 (62,44 %) fueron leucemias agudas (LA): 70 linfoides (LLA) y 38 mieloides (LMA). En 15 pacientes no se encontraron antígenos específicos de linaje y fueron clasificados como LA indiferenciadas. Entre las LLA, el 75,71 % fueron de fenotipo B, y la común la más frecuente. En 17 pacientes (11,88 %) los blastos expresaron antígenos de células T; 66 enfermos (30,41 %) presentaron síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPc), de estos, el 71,21 % fueron de fenotipo B. La frecuencia encontrada de síndromes linfoma y mieloproliferativos agudos y crónicos en nuestros pacientes se comportó de acuerdo con lo descrito por otros autores.

Descriptor DeCS: MÉDULA ÓSEA; TRASTORNOS LINFOPROLIFERATIVOS; TRASTORNOS MIELOPROLIFERATIVOS; ANTICUERPOS MONOCLONALES.

En los últimos años se han obtenido avances tan importantes en los conocimientos de las enfermedades hematológicas malignas, que el número de estos procesos se ha multiplicado y su clasificación se ha hecho compleja.¹

Las leucemias y linfomas del humano constituyen enfermedades heterogéneas, tanto clínica como morfológicamente, y se han utilizado varios sistemas de clasificación para dichas entidades, desde el propuesto por el grupo franco-americano-británico (FAB) para las leucemias en 1976 hasta la

clasificación más reciente morfológica, inmunológica y citogenética.^{2,3}

Los procesos leucémicos son las enfermedades malignas más frecuentes de los tejidos hematopoyéticos, seguidos por los linfomas y constituyen las neoplasias la incidencia más alta en los primeros 15 años de la vida y del 6 al 7 % de las neoplasias después de esa edad. Las leucemias son procesos neoplásicos en los que la médula ósea normal es invadida y desplazada por células malignas pertenecientes a diferentes líneas de células sanguíneas parcialmente

diferenciadas o indiferenciadas y el tipo de célula afectada constituye la base para la clasificación inicial de estas enfermedades.⁴

La linfocitosis sanguínea anormal es la característica fundamental de las enfermedades malignas crónicas de las células T y B, ya sean leucemias crónicas o linfomas no Hodgkin (LNHDG) de bajo grado.^{5,6} La leucemia mieloide crónica (LMC) es una enfermedad hematológica maligna que se considera tiene su origen en una célula madre hematopoyética con potencial de diferenciación linfoide y mieloide.⁷

La aplicación de los anticuerpos monoclonales al estudio y la clasificación de leucemias y linfomas ha logrado una transformación radical en la concepción y el manejo de estas patologías, desde el reconocimiento de nuevas entidades hasta el nacimiento de nuevas clasificaciones.⁸

La separación de las leucemias agudas (LA) en linfoides y mieloides, así como la definición de las leucemias agudas híbridas (LAH), tiene importancia pronóstica y terapéutica y complementa los estudios morfológicos y citoquímicos, de manera que ha sido posible discriminar más objetivamente el linaje de la célula implicada en estos procesos.^{3,9}

La clasificación inmunológica depende, además del uso de reactivos altamente específicos como los anticuerpos monoclonales, de métodos de inmunofenotipaje celular de elevada sensibilidad para detectar moléculas que actúan como marcadores de células linfoides y mieloides.^{3,10}

Con el objetivo de mejorar el diagnóstico, establecer el pronóstico y el tratamiento de pacientes con síndromes linfo y mieloproliferativos, así como conocer la frecuencia relativa de estas enfermedades en un período de 5 años, se realizó la caracterización inmunológica de los enfermos atendidos en nuestra institución.

MÉTODOS

En el período comprendido de 1992 a 1997 se estudiaron 217 pacientes, de ellos 117 del sexo masculino y 100 del femenino. Del total de pacientes estudiados 98 fueron niños, con edad promedio de 7,3 años (rango de 11 meses a 17 años) y 119 adultos, con edad promedio de 51,63 años (rango de 19 a 87 años), que acudieron al Departamento de Inmunología del Instituto de Hematología e Inmunología para el estudio de marcadores inmunológicos.

Se realizó la clasificación inmunológica mediante el inmunofenotipaje celular a todos los casos estudiados, con la aplicación de una batería mínima de anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos tanto para antígenos mieloides como linfoides (anexo).

Las células mononucleares se aislaron por el método de Boyüm modificado.¹¹ Para el inmunofenotipaje celular se aplicó el ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ), en el cual las células se unen a láminas portaobjeto de cristal recubiertas con poli-L lisina mediante una atracción electrostática de cargas¹² y permite la detección de antígenos nucleares y citoplasmáticos en estadios de diferenciación celular muy tempranos, cuando los antígenos aún no están expresados en la membrana celular, utilizando un agente permeabilizador de membranas (detergente Brij 56).

La reacción inmunológica se pone de manifiesto por la utilización de un sistema de doble anticuerpo marcado con peroxidasa, que tiene como objetivo amplificar la reacción. La utilización del colorante cloronaftol permite distinguir las células mieloides de las linfoides. El aminoetilcarbazol tiñe a las células positivas de amarillo-naranja y el hemalón, colorante utilizado para distinguir a las células

negativas, contiene hematoxilina, la cual permite diferenciar el núcleo de las células.

RESULTADOS

En este estudio clasificamos las leucemias agudas (LA) en 143 pacientes (65,89 %), leucemias crónicas en 44 pacientes (20,27 %), linfomas no Hodgkin (LNHDG) en 22 (10,13 %) y en 8 pacientes leucemia mieloide crónica (LMC) (3,68 %) (fig. 1).

De las LA estudiadas, 70 fueron leucemias linfoides agudas (LLA) y 38 leucemias mieloides agudas (LMA) (26,57%). Entre las LLA, el 75,71 % fue de fenotipo B (37,06 % del total de LA), y la común fue la más frecuente, con un total de 46 casos (65,71 %). En 17 pacientes (11,88 %) los blastos expresaron antígenos de células T. En 20 casos (13,98 %) se encontró leucemia aguda híbrida (LAH) y en 15 pacientes (10,48 %) no se hallaron antígenos

específicos de linaje y se clasificaron como LA indiferenciadas (LAI) (fig. 2).

Se observó prevalencia de LA entre los pacientes pediátricos, con 97 niños afectados (67,83 %). La mayoría de los pacientes leucémicos fueron del sexo masculino (62,93 %), tomando en consideración tanto niños como adultos.

Se realizó la distribución por grupos de edades de los niños con LA, la cual se comportó de la siguiente forma: 1 niño menor de 1 año, 35 se hallaban entre 1-4 años, 31 entre 5-9 años y 27 entre 10-17 años.

Se encontraron 8 casos de LMC en crisis blástica, 7 de estirpe linfoide (87,5 %) y 1 solo paciente con crisis blástica mieloide (12,5 %). Los síndromes linfoproliferativos crónicos solo se clasificaron en pacientes adultos, con un total de 66 enfermos (30,41 %); de estos, el 71,21 % fue de fenotipo B; 44 pacientes tuvieron leucemias crónicas (66,66 %), 34 leucemia linfoide crónica B (LLC-B) (77,27 %) y 10 casos de

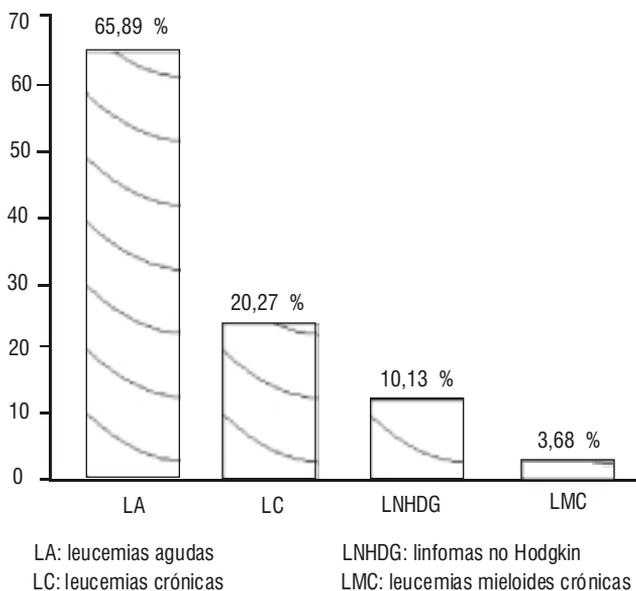


FIG. 1. Distribución de la frecuencia relativa de pacientes con síndromes linfo y mieloproliferativos.

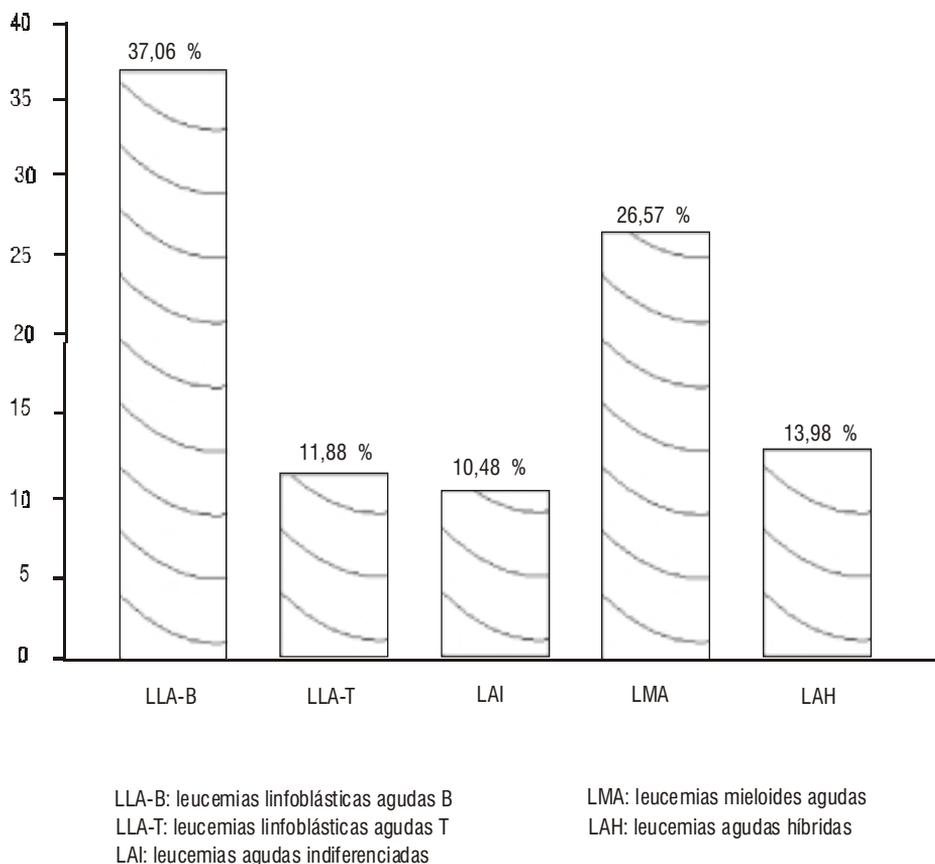


FIG. 2. Distribución de la frecuencia relativa de pacientes con leucemias agudas.

leucemia linfocítica crónica T (LLC-T), para el 22,72 %. Se diagnosticó LNHDG en 22 enfermos (33,33 %), 13 con fenotipo B (59,09 %) y 9 con fenotipo de células T (40,90 %), con predominio de esta patología en el sexo masculino, ya que la relación entre hombres y mujeres afectados fue de 2,6:1.

DISCUSIÓN

Con la aplicación de los anticuerpos monoclonales al estudio inmunofenotípico de las leucemias y linfomas, se ha logrado un importante avance en la comprensión

de la heterogeneidad y el comportamiento clínico y biológico de estos tumores.³

El análisis de los resultados de este estudio con respecto a la prevalencia de pacientes con LA, concuerda con lo comunicado por otros autores.^{13,14} Los estudios realizados en los años 1970 y 1980 demostraron que aproximadamente el 85 % de los blastos leucémicos eran de linaje B, mientras que el 15 % de estos correspondía a la LLA con características de células T;^{15,16} se consideró la LLA como la enfermedad maligna más frecuente de la infancia y dentro de esta la LLA común.^{17,18}

La LMA es menos frecuente que la LLA y representa una pequeña proporción

de casos durante la infancia y adolescencia y es descrita entre el 15 y 20 % de los pacientes con leucemia.¹⁹ En este trabajo, las observaciones al respecto se corresponden con lo descrito por otros autores, aunque con una cifra ligeramente superior, lo que podría atribuirse al hecho de que el estudio se realizó en el Instituto de Hematología e Inmunología, centro especializado que recibe pacientes complejos remitidos de otros centros del país.

La incidencia de LAH, la cual es considerada como una enfermedad rara identificada entre el 5 y 10 % de los casos de LA, se comportó en los pacientes de acuerdo con lo reportado por otros investigadores.^{20,21}

La variante indiferenciada es poco frecuente en el niño (4-12 %) y aumenta su frecuencia en la edad adulta.^{10,22} La cifra observada en este estudio (10,48 % de todos los casos con LA) se corresponde con lo comunicado para esta entidad.

El hallazgo de un mayor número de leucemias entre los pacientes pediátricos, así como el predominio en el sexo masculino sobre todo para la LLA y la frecuencia incrementada de esta patología en el grupo de edad de 1-4 años, ha sido ya comunicado con anterioridad. Varios autores han señalado que la leucemia en el niño predomina en los primeros 5 años de la vida y que presenta su mayor incidencia entre los 2 y 4 años. En una serie de 319 pacientes leucémicos se informó que el 54 % se encontraba entre 1 y 4 años.^{18,23,24}

En el curso de la LMC, las características celulares linfoblásticas se observan entre el 20 y 30 % de los pacientes y la mayoría, el 60 % de las líneas celulares implicadas, son mieloides.²⁵ Mori en una serie de 30 pacientes con LMC en crisis blástica encontró 21 con crisis blástica mieloide y solo 9 con linfoide.²⁶ En este trabajo se reporta una mayor frecuencia de las crisis blásticas linfoides (7 de 8 pacientes

estudiados), lo que podría parecer contradictorio, sin embargo, dada la pequeña proporción de casos incluidos con esta patología, no se pueden realizar análisis estadísticos para arribar a conclusiones.

Los SLPC comprenden un amplio espectro de enfermedades, dentro de los cuales debemos distinguir las leucemias de los linfomas. Con el desarrollo de técnicas inmunológicas para la detección de marcadores de superficie, se ha observado que la mayoría de estos trastornos son de linaje B.^{6,27} Más del 95 % de los pacientes con LLC tienen el fenotipo B, y se reporta el fenotipo T solo entre el 2 y 5 % de todos los casos.^{28,29} Hover y otros, en un estudio morfológico e inmunofenotípico de 25 casos de LLC-T, encontraron que esta entidad estaba presente en menos del 1 % de todos los pacientes con SLPC.³⁰ Los resultados en relación con las leucemias crónicas se corresponden con lo descrito en la literatura, con un porcentaje incrementado de pacientes con LLC-B y una minoría con características de linaje T, aunque el ligero incremento de esta última podría deberse a variaciones individuales en nuestro medio.

La frecuencia observada de pacientes adultos con LNHDG se corresponde con la de otros investigadores, con un predominio del fenotipo B sobre el T. Algunos autores han planteado que los LNHDG de la célula T son raros y constituyen del 15 al 20 % de los linfomas agresivos. En un trabajo realizado por el grupo de estudio de linfomas del adulto en Francia, de 1 883 pacientes con LNHDG agresivo, 288 (15 %) fueron de fenotipo T y 1 595 (85 %) fueron de fenotipo B, lo cual tiene importancia en cuanto al pronóstico, ya que ha sido generalmente observado que el LNHDG-T tiene peor pronóstico. Otros autores han reportado resultados similares.^{31,32} De igual manera, el comportamiento de los enfermos con LNHDG en este estudio con respecto al sexo, mostró un

predominio del sexo masculino, lo que concuerda con estudios realizados en diferentes países que muestran una relación masculino/femenino de 1,3:1 y que la enfermedad es 31 % más frecuente entre los hombres.^{33,34}

El inmunofenotipaje celular reviste gran importancia tanto para las LA como para los SLPc, ya que el estudio de los antígenos de diferenciación celular ha permitido establecer el origen de los diferentes subtipos de LLA y comprender su

diversidad clínica, lo que permite un diagnóstico definitivo de casos dudosos e identificar subtipos que tienen diferente conducta terapéutica. Además, ha permitido el reconocimiento de nuevas variedades de LNHDG y un manejo clínico-terapéutico más eficaz de los pacientes.

AGRADECIMIENTOS

A la técnica Soralis Gutiérrez Rivas por su valiosa colaboración.

Anexo

Batería mínima de anticuerpos monoclonales para el inmunofenotipaje de células

| Anticuerpos monoclonales | Linaje de las células que identifica | Procedencia del reactivo |
|--------------------------|--------------------------------------|---|
| Anti-CD10 (OKB-CALLA) | Célula B | Institute of Cancer Research, Londres, Inglaterra |
| Anti-CD19 (B4) | Célula B | Institute of Cancer Research, Londres, Inglaterra |
| Anti-CD20 (B1) | Célula B | Institute of Cancer Research, Londres, Inglaterra |
| Anti-CD22 (Leu 14) | Célula B | Hospital Clinic de Barcelona, España |
| Anti-cadenas μ | Célula B | Hospital Clinic de Barcelona, España |
| Anti-cadenas κ | Célula B | Hospital Clinic de Barcelona, España |
| Anti-cadenas λ | Célula B | Hospital Clinic de Barcelona, España |
| Anti-CD1 (NA 134) | Células T | Institute of Cancer Research, Londres, Inglaterra |
| Anti-CD7 (Leu 9) | Células T | Institute of Cancer Research, Londres, Inglaterra |
| Anti-CD2 (OKT11) | Células T | Filatov Institute Immunology, Rusia |
| Anti-CD4 (OKT4) | Células T | Filatov Institute Immunology, Rusia |
| Anti-CD8 (OKT8) | Células T | Filatov Institute Immunology, Rusia |
| Anti-CD3 (OKT3) | Células T | Hospital Clinic de Barcelona, España |
| Anti-CD5 (GRIS 1) | Células T | Hospital Clinic de Barcelona, España |
| Anti-CD13 (MY 7) | Células mieloides | Hospital Clinic de Barcelona, España |
| Anti-muramidasa | Células mieloides | Hospital Clinic de Barcelona, España |
| Anti-CD41 (943D) | Células mieloides | Hospital Clinic de Barcelona, España |
| Anti-CD33 (MY 9) | Células mieloides | Institute of Cancer Research, Londres, Inglaterra |
| Anti-CD14 (MY 4) | Células mieloides | Filatov Institute Immunology, Rusia |
| Anti-CD15 (Leu MI) | Células mieloides | Filatov Institute Immunology, Rusia |
| Anti-HLA-DR | Otros | Hospital Clinic de Barcelona, España |
| Anti-TdT | Otros | Hospital Clinic de Barcelona, España |

SUMMARY

The immunophenotyping of cells from bone marrow and from peripheral blood was carried out in 217 patients with lympho- and myeloproliferative syndromes by the immunocytochemical ultramicromethod (ICCUM). Of the total of studied cases, 143 (62.44%) were acute leukemias (AL): 70 acute lymphoid leukemias (ALL) and 38 acute myeloid leukemias (AML). There were not specific antigens of lineage in 15 patients, who were classified as undifferentiated acute leukemias. Among the ALL, 75.71% were of phenotype B, whereas the common one was the most frequent. In 17 patients (11.88%) the blasts expressed T-cell antigens. 66 patients (30.41%) presented chronic lymphoproliferative syndromes (CLPS) and, of them, 71.21% were of phenotype B. The frequency of acute and chronic lympho- and myeloproliferative syndromes found in our patients behaved according to what has been described by other authors.

Subject headings: BONE MARROW; DISORDERS, LYMPHOPROLIFERATIVE, DISORDERS; MYELOPROLIFERATIVE, DISORDERS; ANTIBODIES, MONOCLONAL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sullivan AK. Classification, pathogenesis and etiology of neoplastic diseases of the hematopoietic system. En: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens J, Lukens J, eds. *Wintrobe's clinical hematology*. 9a. ed. Philadelphia: Lea Febiger, 1993:1725-91.
2. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT. The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol* 1981;47:553-61.
3. Freedman A, Nadler L. Cell surface markers in hematologic malignances. *Semin Oncol* 1987;14:193-212.
4. Bello SA. Neoplasias hematológicas. En: Bello SA. *Síndromes hematológicos en pediatría*. México, DF: McGraw-Hill, Interamericana, 1998:188-94.
5. Garand R, Robillard N. Immunophenotypic characterization of acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders: practical recommendations and classifications. *Hematol Cell Ther* 1996;38:471-86.
6. Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. *Blood* 1991;78:1901-14.
7. Petzer AL, Eaves CJ, Barnett MJ, Eaves AC. Selective expansion of primitive normal hematopoietic cells in cytokine. Supplemented cultures of purified cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 1997;90:64-9.
8. Álvaro T, Bosch R, Salvadó MT, Martínez S. Perfil morfológico e inmunofenotípico de los síndromes linfoproliferativos. En: *Tercer curso de Hematopatología*. Tortosa: Instituto Catalá de la Salud, 1996:111-60.
9. Buccheri V, Shetty V, Yoshida N, Morilla R, Matutes E, Catovsky D. The role of an anti-myeloperoxidase antibody in the diagnosis and classification of acute leukaemia: a comparison with light and electron microscopy cytochemistry. *Br J Haematol* 1992;80:62-8.
10. Bernier M, Massy M, Delleuw N, Bron D, Debusscher L, Stryckmans P. Immunological definition of acute minimally differentiated myeloid leukemia (MO) and acute undifferentiated leukemia (AUL). *Leuk Lymphom* 1995;18(Suppl):13-7.
11. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:77-89.
12. Rivero RA, Bello M, Suárez LE, Cruz C, Martínez M, Palma L. Introducción de un ultramicrométodo inmunocitoquímico para la cuantificación de subpoblaciones identificadas con anticuerpos monoclonales. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1995;11:46-56.
13. Cabrera ME, Labra S, Ugarte S, Matutes E, Greaves MF. Inmunofenotipo, características clínicas y laboratorio de la leucemia linfoblástica aguda en Chile. *Rev Med Chile* 1996;124:293-9.

14. Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, Hiddemann W, Sauter S, Henze G, et al. Chemotherapy in 1998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 1994;84:3122-33.
15. Kersey JH. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. *Blood* 1997;90:4243-51.
16. Basso G, Rondelli R, Covezzoli A, Putti M. The role of immunophenotype in acute lymphoblastic leukemia of infant age. *Leuk Lymphom* 1994;15:51-60.
17. Nishigaki H, Ito Ch, Manade A, Kumagai M, Coustam-Smith E, Yanishhevski Y, et al. Prevalence and growth characteristics of malignant stem cells in B-lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 1997;89:3735-44.
18. Vergara B, González F, Torre A de la, Rivera L. Aspectos epidemiológicos de las leucemias infantiles en la región central del país. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1986;2:253-62.
19. Leith C, Kopecky K, Godwin J, Mc Connell T, Slovak M, Chen M, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance MDR1 and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group Study. *Blood* 1997;89:3323-9.
20. Legrand O, Perrot JY, Simonin G, Baudard M, Cardiou M, Blanc C, et al. Adult biphenotypic acute leukaemia: an entity with poor prognosis which is related to unfavourable cytogenetics and P-glycoprotein over-expression. *Br J Haematol* 1988;100:147-55.
21. Carbonell F, Swansbury J, Min T, Matutes E, Farahat N, Buccheri V, et al. Cytogenetic findings in acute biphenotypic leukemia. *Leukemia* 1996;10:1283-7.
22. Cruz C, Isla R. Producción de un heteroantisuero anti-antígeno común leucémico. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1985;1:166-76.
23. Orfao A, Ciudad J, González M, López A, Abad M, Bouza J. I. Flow cytometry in the diagnosis of cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;221:145-52.
24. Morera LM, Marsán V, Villaescusa R, Guerreiro AM, Figueredo M, Roque MC. HLA y leucemias. Estudio de 144 casos. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1997;13:27-37.
25. Griffin JD, Todd RF, Jerome R, Nadlee LM, Canellos GP, Rosenthal D, et al. Differentiation patterns in the blastic phase of chronic myeloid leukemia. *Blood* 1983;61:85-9.
26. Mori N, Morosetti R, Lee S, Spira S, Benyehuda D, Schiller G, et al. Allelotype analysis in the evolution of chronic myelocytic leukemia. *Blood* 1997;90:2010-4.
27. Arber DA, Lopategui JR, Brynes RK. Chronic lymphoproliferative disorders involving blood and bone marrow. *Am J Clin Pathol* 1993;99:494-503.
28. Borche L, Lim A, Binet JL, Dighiero G. Evidence that chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes are frequently committed to production of natural autoantibodies. *Blood* 1990;76:562-9.
29. Foon KA, Gale RP. Is there a T-cell form of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1992;6:867-73.
30. Hoyer JD, Ross CW, Li CY, Witzig TE, Gascoyne RD, Dewald GW, et al. True T-cell chronic lymphocytic leukemia. A morphologic and immunophenotypic study of 25 cases. *Blood* 1995;86:1163-9.
31. Gisselbrecht C, Gaulard P, Depage E, Coiffier B, Brière J, Haiour C, et al. Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998;92:76-82.
32. Melnyk A, Rodríguez A, Pugh WC, Cabanillas F. Evaluation of the revised. European American lymphoma classification confirms the clinical relevance of immunophenotype in 560 cases of aggressive non Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;89:4514-20.
33. Sukpanichnant S, Sonakul D, Piankijagum A, Wanachiwanawin W, Veerakul G, Mahasandana C, et al. Malignant lymphoma in Thailand: changes in the frequency of malignant lymphoma determined from a histopathologic and immunophenotypic analysis of 425 cases at Siriraj Hospital. *Cancer* 1998;83:1197-204.
34. Pollan M, López-Abente G, Moreno C, Vergara A, Aragonés N, Ruiz M, et al. Rising incidence of non-Hodgkin's lymphoma in Spain: analysis of period of diagnosis and cohort effects. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 1998;7:621-5.

Recibido: 19 de enero de 1999. Aprobado: 23 de noviembre de 1999.

Dra. *Miriam Sánchez Segura*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf.: (537) 578268. Fax:(537)378979. e-mail:ihidir@hemato.sld.cu