

## Asociación del inmunofenotipo linfocitario de sangre periférica con la presencia de linfomas no Hodgkin

Association of peripheral blood lymphoid immunophenotype with presence of non-Hodgkin lymphomas

Anamary Suárez Reyes<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0289-0230>

Carlos Agustín Villegas Valverde<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7478-0482>

María del Carmen Arango Prado<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8307-4296>

Tamara González Madruga<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4058-1255>

Elías Gracia Medina<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9389-9291>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [carlosvillega@infomed.sld.cu](mailto:carlosvillega@infomed.sld.cu)

### RESUMEN

**Introducción:** Los cambios en el inmunofenotipo de los linfocitos en los pacientes con linfoma no Hodgkin están asociados con el pronóstico y las respuestas terapéuticas. Sin embargo, no se ha establecido sistemáticamente la asociación con la enfermedad y por tanto su contribución al diagnóstico.

**Objetivo:** Evaluar la asociación del inmunofenotipo linfocitario en sangre periférica con la presencia del linfoma no Hodgkin.

**Métodos:** Se analizaron 31 muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico confirmado de linfoma no Hodgkin y de 68 individuos sanos como controles, durante el período de 2018 a 2020. Se empleó la citometría de flujo multiparamétrica para el inmunofenotipado. Se calculó el área bajo la curva y el índice de Youden para establecer puntos de corte en los porcentajes linfocitarios. La asociación de los cambios inmunofenotípicos con el linfoma no Hodgkin, se realizó mediante cálculos de Odd ratio.

**Resultados:** El aumento de linfocitos TCD8<sup>+</sup> y NKCD56<sup>opaco</sup> se asoció significativamente con la presencia de linfoma no Hodgkin (OR= 3,4 y 2,9; respectivamente). Por el contrario, la disminución de linfocitos TCD4<sup>+</sup>, T doble positivo, T doble negativo y NKCD56<sup>brillante</sup> también

se asoció con la existencia de linfoma no Hodgkin (OR= 23,0; 10,7; 6,9 y 15,8; respectivamente). Además, la disminución del índice CD4/CD8 también fue asociada con la enfermedad.

**Conclusiones:** Los cambios encontrados en los inmunofenotipos linfocitarios se asociaron de forma significativa con la presencia del linfoma no Hodgkin, lo cual representa una expresión sistémica de la enfermedad y sugiere su valor diagnóstico.

**Palabras clave:** inmunofenotipo linfocitario; citometría de flujo; sangre periférica; linfoma no Hodgkin; valor diagnóstico.

## ABSTRACT

**Introduction:** Lymphocyte immunophenotype changes in non-Hodgkin lymphoma patients are associated with prognosis and therapeutic responses. However, its association with the disease has not been systematically established. Therefore its contribution to the diagnosis process.

**Objective:** To assess the association of lymphocyte immunophenotype in peripheral blood with the presence of non-Hodgkin lymphoma.

**Methods:** 31 peripheral blood samples were analyzed from patients with a confirmed diagnosis of non-Hodgkin lymphoma and from 68 healthy individuals as controls, during the period 2018 to 2020. Multiparametric flow cytometry was used for immunophenotyping. The area under the curve and the Youden index were calculated to establish cut-off points in lymphocyte percentages. The association of immunophenotypic changes with non-Hodgkin's lymphoma was made using Odd ratio calculations.

**Results:** The increase in TCD8<sup>+</sup> and NKCD56<sup>dim</sup> lymphocytes from peripheral blood was significantly associated with the presence of non-Hodgkin lymphoma (OR= 3.4 and 2.9, respectively). Oppositely, the decrease in TCD4<sup>+</sup>, double positive T, double negative T and NKCD56<sup>bright</sup> lymphocytes was associated with the existence of non-Hodgkin lymphoma (OR= 23.0, 10.7, 6.9 and 15.8, respectively). Therefore, the decrease in the CD4/CD8 rate was also associated with the disease.

**Conclusion:** The changes found in these lymphocytic immunophenotypes were significantly associated with the presence of non-Hodgkin lymphoma, which represents a systemic expression of the disease and suggests its diagnostic value.

**Keywords:** lymphoid immunophenotype; flow cytometry; peripheral blood; non-Hodgkin Lymphoma, diagnostic values.

Recibido: 15/12/2021

Aceptado: 02/02/2022

## Introducción

Los linfomas no Hodgkin (LNH) son las hemopatías malignas más frecuentes en el mundo y ocupan el segundo lugar en mortalidad dentro de este grupo de enfermedades.<sup>(1)</sup> En Cuba ocupan el sexto lugar en mortalidad y su incidencia los sitúan en el octavo lugar, con tasas de 9,0 y 6,5 por 100 000 habitantes según sexo femenino y masculino respectivamente.<sup>(2)</sup> Estas neoplasias son derivadas de células linfoides, por esta razón, a diferencia de los tumores sólidos, la relación entre células inmunitarias y las malignas es diferente y más compleja, porque ambas pertenecen al sistema inmunológico.<sup>(3)</sup>

La inmunofenotipificación de linfocitos de sangre periférica (SP) proporciona información valiosa sobre la distribución, concentración y funcionalidad de las células inmunitarias circulantes, lo cual es útil en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con LNH.

Actualmente, es necesario extender el inmunofenotipo de los principales linfocitos T, B y NK a poblaciones de linfocitos no convencionales, como los linfocitos T dobles positivos (TDP) y T dobles negativos (TDN), ya que en los últimos años se ha descubierto su relación con el cáncer con un rol dual, por funciones antitumorales o protumorales.<sup>(4)</sup>

La citometría de flujo se utiliza de rutina en el estudio inmunofenotípico de las células patológicas en los LNH, pero también se puede usar para caracterizar los linfocitos no patológicos que circulan en estos pacientes. En el proceso de diagnóstico la inmunofenotipificación linfocitaria pudiera caracterizar las células normales y reactivas que circulan en los pacientes con LNH.<sup>(5)</sup> Por ejemplo, una mayor concentración de linfocitos TDP con una disminución de TCD4<sup>+</sup> se ha encontrado en los linfomas de Hodgkin.<sup>(6)</sup> El pronóstico de los pacientes con LNH se puede definir en función del inmunofenotipo circulante, como es el caso de los linfocitos TCD4<sup>+</sup>, los linfocitos TDN y los linfocitos NK, específicamente asociados a la supervivencia global.<sup>(7,8,9)</sup> Además, los inmunofenotipos linfocitarios se pueden evaluar como biomarcadores predictivos de respuesta, para estándares como la quimioterapia<sup>(10)</sup> y para las inmunoterapias incluido el uso del rituximab y similares, ya que linfocitos como los NK ejecutan la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, que es el mecanismo de acción principal de estos anticuerpos monoclonales.<sup>(11,12)</sup>

No existen suficientes estudios que, basados en el inmunofenotipo linfocitario circulante, contribuyan al proceso de diagnóstico de los pacientes con LNH, ya que estos inmunofenotipos están presentes tanto en individuos sanos como enfermos. Este procedimiento podría establecerse como un elemento esencial en

el manejo de los pacientes con LNH, con el consecuente papel en el diagnóstico, pronóstico y predicción de la respuesta terapéutica. Por estas razones, el objetivo de este estudio fue evaluar la asociación entre el inmunofenotipo linfocitario en SP con la presencia del LNH y de esta forma, su valor en el diagnóstico.

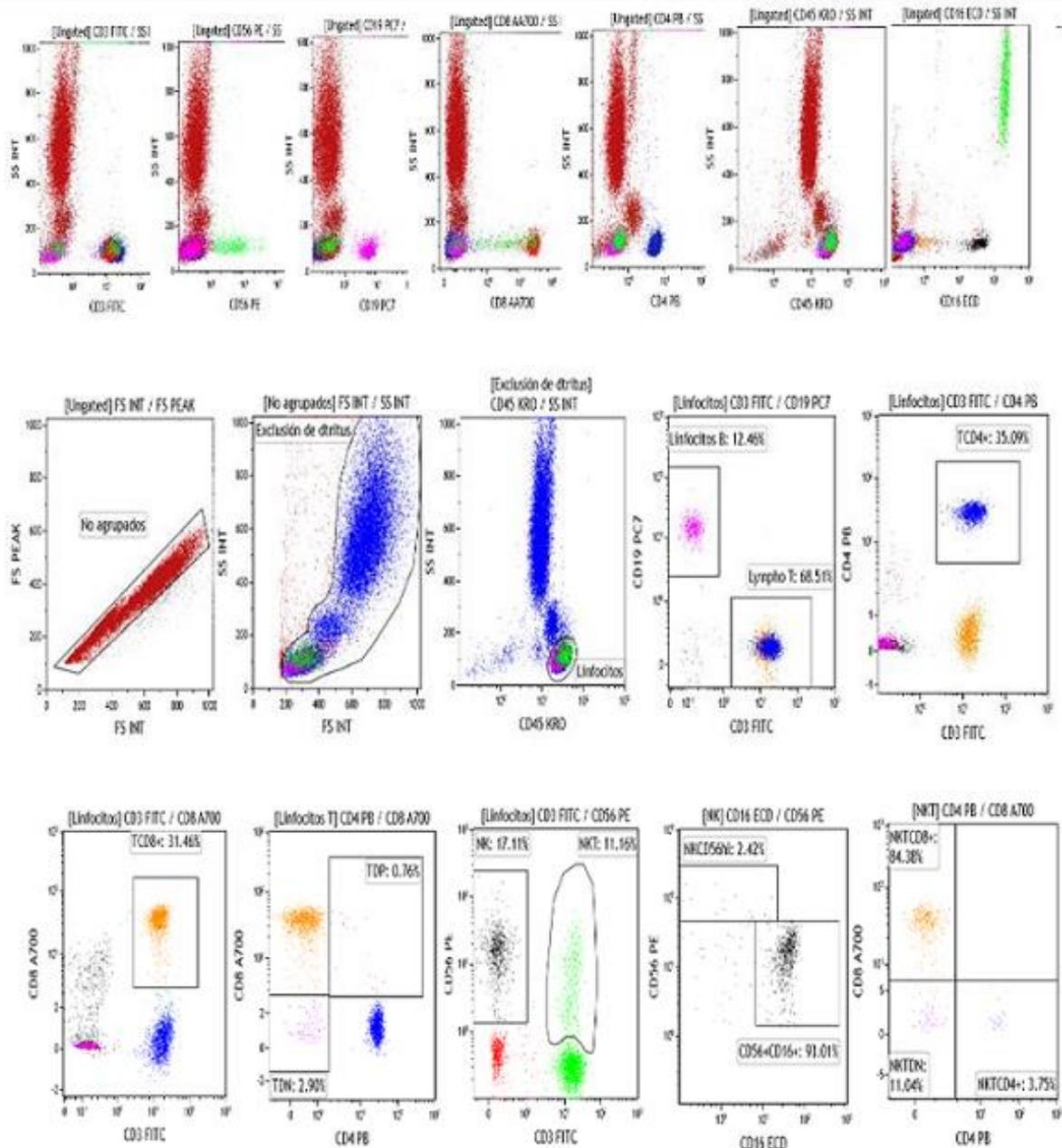
## Métodos

Se realizó un estudio analítico en muestras de SP de 31 pacientes con diagnóstico confirmado de LNH y 68 individuos sanos como controles, con el objetivo de evaluar la asociación entre los cambios inmunofenotípicos de linfocitos circulantes y la presencia del LNH, en el Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, de 2018 a 2020.

Se utilizaron 100  $\mu$ L de SP para el análisis de citometría, con el método de lisis sin lavado. Los anticuerpos conjugados empleados incluyen: anti-CD45 Krome-Orange (Clon J33), anti-CD19 PC-7 (Clon2 J3-119), anti-CD3 FITC (Clon2 UCHT1), anti-CD4 Pacific-Blue (Clon 13B8.2), anti- CD8 APC-Alexa Fluor 700 (Clon B9.11), anti-CD56 PE (Clon N901 NKH-1), ECD anti-CD16 (Clon 3G8). Todos los anticuerpos se adquirieron de Beckman Coulter (Francia).

La sangre se incubó en la oscuridad, durante 20 min a temperatura del laboratorio. Luego se añadió 1mL del tampón de lisis celular (VersaLyse, Beckman Coulter, Francia), se incubó en la oscuridad durante 15 min a temperatura del laboratorio.

Las muestras se adquirieron y analizaron con un citómetro Beckman Coulter Gallios de 10 colores, con software de análisis Kaluza C. versión 1.1 (Beckman Coulter). Se adquirieron al menos 50 mil eventos totales. Se muestra la estrategia de ventanas empleada y la definición de los inmunofenotipos (Fig. 1).



**Fig. 1** – Estrategia de ventanas para el análisis del inmunofenotipo linfocitario en muestras de sangre periférica. **A)** Controles de fluorescencia global, Fluorescencia vs dispersión lateral de la luz (SS, por sus siglas en inglés) por cada antígeno. **B)** Diseño de estrategia de ventanas tipo manual, lógica y secuencial. Se inició con gráfico de puntos para eliminar eventos coincidentes con la ventana de selección de “No agrupados”, seguida por la de eliminación de detritus celulares y hematíes resistente a la lisis, la de selección de linfocitos por fenotipo  $CD45^{alto}$  vs  $SS^{bajo}$ , así como la identificación de poblaciones y subpoblaciones de interés. Diseñado en software Kaluza C Versión 1.1.

Fluorocromos. **FITC**: isotiocianato de fluoresceína, **PE**: Ficoeritrina, **ECD**: R-Ficoeritrina-Texas Red®-X, **PC7**: ficoeritrina-cianidina 7, **AA700**: alofococianina-Alexa Fluor-700, **KRO**: Krome Orange, **CD**: Clúster de diferenciación. **NKCD56hi**: se refiere a células NK con una expresión brillante para el CD56 y expresión baja o nula de CD16, **CD56+CD16+**: se refiere a la subpoblación de NK con una

expresión opaca para el CD56 y alta del CD16, **TDN**: linfocitos T CD4/CD8 dobles negativos; **TDP**: linfocitos T CD4/CD8 dobles positivos, **NKTDN**: se refiere a células asesinas naturales T CD4/CD8 dobles negativas.

### **Análisis estadístico**

Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad, la mayoría de los datos no siguieron una distribución gaussiana. Se utilizaron las frecuencias absolutas y relativas, la mediana y los percentiles.

Se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de medianas.

Para evaluar la asociación de cambios en la subpoblación de linfocitos con la presencia de LNH, previamente se dicotomizaron las concentraciones de los linfocitos en dos pares: (alta y normal) y (baja y normal).

Los puntos de corte óptimos de los valores de la población de linfocitos se estimaron utilizando el índice de Youden, a partir de cálculos del área bajo la curva de características operativas del receptor (ROC, por sus siglas en inglés).

Los Odd Ratio (OR) fueron calculados como medidas de asociación. Se consideró que,  $p < 0,05$  indicaba significación estadística.

El proceso y presentación gráfica de los resultados se llevó a cabo con el software GraphPad Prism version 9.2.0, San Diego California, USA.

### **Aspectos éticos**

Los voluntarios sanos y pacientes accedieron a participar en el estudio y se siguieron los principios éticos emanados de la Declaración de Helsinki.

Se garantizó la confidencialidad de los datos obtenidos y su uso con fines exclusivos de la investigación.

El estudio no implicó riesgos éticos para los pacientes ya que no fueron sometidos a experimentación.

### **Resultados**

De los 31 pacientes con diagnóstico histopatológico de LNH en estadio temprano, 26 (64,5 %) fueron del sexo femenino. El 80,6 % tuvo entre 18 y 60 años y el 19,4 % 60 años y más. El 58,0 % eran linfomas difusos de células B grandes, el 19,4 % linfomas T, el 16,1 % del tipo folicular y solo el 6,5 % linfomas de linfocitos pequeños de células B.

Todos los pacientes mostraron alteración en al menos una población linfocitaria, en comparación con los porcentajes de poblaciones homólogas en los controles (Tabla 1). Se encontró que las poblaciones de linfocitos con función citotóxica estaban aumentadas en los pacientes con respecto a los controles (TCD8<sup>+</sup>, p=0,0075 y NKCD56<sup>opaco</sup>, p=0,0066). Por el contrario, los linfocitos TCD4<sup>+</sup> y NKCD56<sup>brillante</sup>, así como el índice CD4/CD8, fueron significativamente más bajos en los pacientes respecto a los controles (Tabla 1).

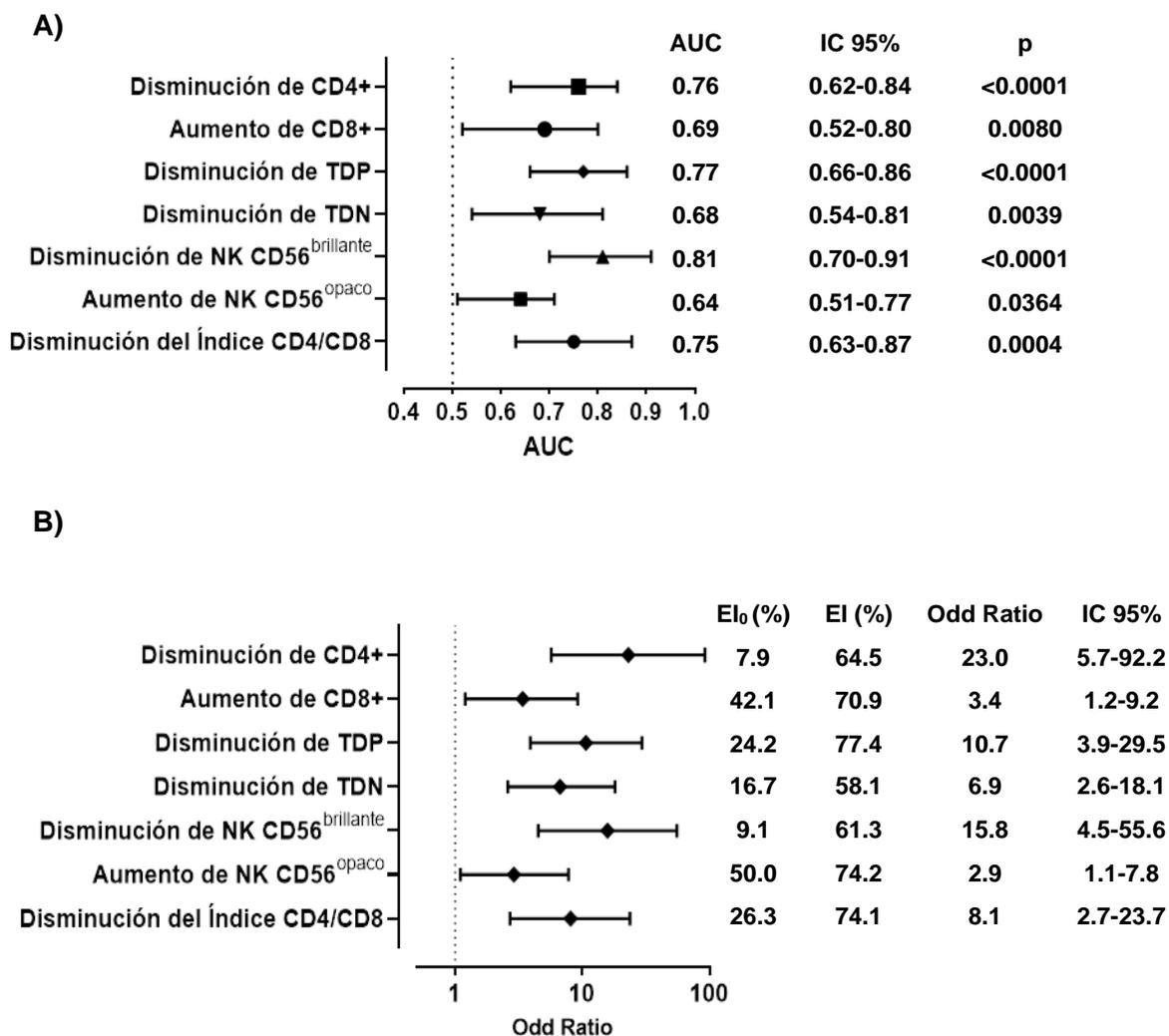
**Tabla 1** - Comparación de las subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica entre controles y pacientes con linfoma no Hodgkin

| Subpoblación linfocitaria                  | Controles (n=68) |                        | Pacientes (n=31) |                        | U Mann-Whitney |
|--|------------------|------------------------|------------------|------------------------|----------------|
|  | Mediana          | Percentiles (2,5-97,5) | Mediana          | Percentiles (2,5-97,5) |                |
| Linfocitos totales                         | 32,3             | 20,2-49,3              | 23,5             | 5,7-68,4               | 0,0004         |
| Linfocitos B                               | 8,95             | 3,20-19,9              | 6,97             | 0,0-28,3               | 0,1636         |
| Linfocitos T                               | 73,5             | 42,1-90,2              | 72,8             | 40,3-86,7              | 0,4301         |
| Linfocitos TCD4 <sup>+</sup>               | 42,8             | 15,4-58,4              | 31,4             | 7,69-67,1              | 0,0001         |
| Linfocitos TCD8 <sup>+</sup>               | 22,3             | 13,9-43,7              | 28,6             | 9,23-56,5              | 0,0075         |
| TDN  | 4,60             | 1,44-8,93              | 2,82             | 0,00-18,9              | 0,0035         |
| TDP  | 0,800            | 0,00-3,62              | 0,320            | 0,03-2,06              | <0,0001        |
| NK   | 11,8             | 3,77-23,6              | 10,6             | 1,96-38,5              | 0,3367         |
| NKCD56 <sup>brillante</sup>                | 6,40             | 0,21-17,0              | 0,870            | 0,00-28,1              | <0,0001        |
| NKCD56 <sup>opaco</sup>                    | 93,6             | 83,0-99,8              | 96,2             | 0,00-100               | 0,0066         |
| NKT  | 6,10             | 1,05-21,6              | 5,58             | 0,00-20,7              | 0,7533         |
| NKT CD4 <sup>+</sup>                       | 0,200            | 0,00-4,17              | 0,490            | 0,00-2,26              | 0,0769         |
| NKT CD8 <sup>+</sup>                       | 3,70             | 0,46-18,3              | 3,44             | 0,00-16,7              | 0,8101         |
| NKT DN                                     | 1,00             | 0,15-5,79              | 0,970            | 0,00-8,82              | 0,3082         |
| Índice: CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> | 1,90             | 0,70-4,10              | 1,18             | 0,20-4,68              | 0,0003         |

**Leyenda.** TDN: linfocitos T CD4/CD8 dobles negativos; TDP: linfocitos T CD4/CD8 dobles positivos;

NK: células asesinas naturales; NKT: linfocitos asesinos naturales T; NKT DN: linfocitos asesinos naturales T CD4/CD8 dobles negativos; CD: clúster de diferenciación

Los resultados del área bajo la curva ROC y el cálculo del índice de Youden, permitieron identificar los puntos de corte con gran precisión (Fig. 2A). El aumento de linfocitos TCD8<sup>+</sup> y NKCD56<sup>opaco</sup> de SP se asoció significativamente con la presencia de LNH (OR= 3,4 y 2,9; respectivamente). Por el contrario, la disminución de linfocitos TCD4<sup>+</sup>, TDP, TDN y NKCD56<sup>brillante</sup> se asoció con la existencia del LNH (OR= 23,0; 10,7; 6,9 y 15,8; respectivamente). Así mismo, la disminución del índice CD4/CD8 también se asoció con la enfermedad (Fig. 2B).



**Fig. 2** – Alteraciones en las concentraciones de algunas subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica, encontradas en los pacientes con linfomas no Hodgkin. **A)** Cálculo del área bajo la curva ROC para determinar los valores de cortes en la concentración relativa de cada población linfocitaria. El punto de corte óptimo se estimó mediante el índice de Youden. **B)** Determinación de las frecuencias de exposición de las alteraciones en la concentración linfocitaria en controles y pacientes, así como el cálculo del Odd Ratio. AUC: área bajo la curva (por sus siglas en inglés), ROC: curva de características operativas del receptor (por sus siglas en inglés) IC: intervalos de confianza, p: valor del estadístico Z, significativo <0.05, El<sub>0</sub>: frecuencia de exposición en los controles, EI: frecuencia de exposición en los pacientes.

## Discusión

El inmunofenotipado de poblaciones linfocitarias en SP de pacientes con LNH, permite definir su pronóstico y predecir la respuesta terapéutica, también forma parte de la evaluación del estado inmunológico del paciente con cáncer.<sup>(13)</sup> La evidencia científica acumulada sugiere que, los

modelos y los índices de clasificación de pronósticos, requieren incluir las distribuciones de las células inmunes, ya que estas juegan un papel importante en la ejecución de las funciones antitumorales por mecanismos de citotoxicidad, ya sean directos o mediados por anticuerpos.<sup>(13,14)</sup>

En los tumores sólidos, se ha demostrado que las poblaciones de linfocitos circulantes, son un factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de progresión<sup>(15)</sup> sin embargo, en los linfomas no se han sistematizado estos tipos de estudios. En el presente trabajo se encontró una disminución de linfocitos totales en los pacientes con LNH. Esto coincide con lo reportado en estudios previos, donde actualmente se considera un biomarcador pronóstico independiente, sobre todo cuando se combina con los valores de neutrófilos, para determinar el índice neutrófilo/linfocito.<sup>(16)</sup>

En el estudio se evidenció que los pacientes tenían una disminución de las subpoblaciones TCD4<sup>+</sup>, TDN y NKCD56<sup>brillante</sup>. Estas células tienen importantes funciones reguladoras de la respuesta inmunitaria y cuando están disminuidas, pueden afectar negativamente el pronóstico clínico. Estudios anteriores muestran que la disminución en estas poblaciones, así como del índice CD4/CD8, como también se encontró en esta investigación, se asocia con un mal pronóstico.<sup>(7,13,15)</sup> Además, se halló un aumento en los linfocitos TCD8<sup>+</sup>, que son citotóxicos y poseen funciones antitumoral. Asimismo, en los linfomas foliculares también se ha encontrado este aumento de TCD8<sup>+</sup>, junto a una disminución de TCD4<sup>+</sup> se ha asociado a mal pronóstico, lo cual se debe a que estas células TCD8<sup>+</sup> son un subconjunto expandido, pero con fenotipos exhaustos o senescentes.<sup>(14)</sup> En estos casos resulta importante profundizar en la caracterización inmunofenotípica de los TCD8<sup>+</sup>, porque se pueden implementar terapias dirigidas a los puntos de control, por ejemplo contra los receptores de muerte celular 1 (PD1, por sus siglas en inglés), para revertir este estado supresor y mejorar el pronóstico del paciente.<sup>(11)</sup> En cuanto a la disminución de los linfocitos NKT, los resultados concordaron con los encontrados por *Hus* y otros, aunque no fueron de forma significativa, lo cual pudo deberse al tamaño relativamente pequeño de la muestra.<sup>(3)</sup>

Con base en los cambios encontrados de los porcentajes linfocitarios, se procedió a dicotomizar dichas variable, según si sus medianas estaban elevadas o disminuidas, respecto a las medianas de los controles. Solo se tomaron aquellas poblaciones que resultaron con diferencias significativas. En este sentido, se determinaron los puntos de corte óptimos y se calculó su Odd Ratio, para evaluar los cambios que se asociaron a la presencia del LNH.

Varios estudios han demostrado la asociación de estos cambios linfocitarios con su impacto clínico en este grupo de enfermedades,<sup>(8,13,14,17)</sup> pero los resultados aportados por el presente

trabajo, muestran la fuerza de asociación de estos cambios con la presencia de LNH, áreas en las que no hay suficientes datos publicados. Esto demuestra la importancia de evaluar los inmunofenotipos sistemáticamente, como un primer paso, en el proceso de diagnóstico y seguimiento de los pacientes con LNH. Los autores del presente estudio son del criterio, que antes de asociar los cambios en las concentraciones linfocitarias con el pronóstico y la predicción de respuesta en los LNH, se deben establecer las regularidades de dichos cambios en este grupo de enfermedades. De esta forma se pueden predecir los riesgos de encontrar alteraciones en el perfil linfocitario circulante, debidos a la existencia de LNH.

Se detectó que la disminución de inmunofenotipos de linfocitos con función cooperadora y reguladora definas (TCD4<sup>+</sup>, TDN y NKCD56<sup>brillante</sup>) y el aumento de los citotóxicos (TCD8<sup>+</sup> y NKCD56<sup>opaco</sup>), se asociaron de forma positiva con la presencia de LNH. Sin embargo, el presente estudio no coincide con los resultados presentados por Bruna y cols. para la linfopenia de células B circulantes, asociadas con el linfoma folicular y el difuso de células grandes B, recién diagnosticado, también sin determinar su fuerza de asociación.<sup>(18)</sup> En el caso del presente estudio aunque existió una disminución de linfocitos B, esta no fue significativa, lo cual pudo estar relacionado con la composición heterogénea de los tipos de LNH que compusieron la muestra. Se coincide con los resultados encontrados por *Amini* y otros, donde se reporta una disminución de linfocitos T y de células NK del tipo secretor o regulador asociados a pacientes con linfomas.<sup>(19)</sup> Además, existió similitud con los resultados del trabajo de *De Tulio* y otros, que también encuentra disminución de TDN en los pacientes con LNH.<sup>(9)</sup>

La alteración linfocitaria que mayor fuerza de asociación mostró, fue la linfopenia de células TCD4<sup>+</sup>, al ser 20 veces más frecuente en los pacientes que en los controles. Este hallazgo es importante, debido a que se describe como un biomarcador pronóstico independiente, el cual se asocia 2,2 veces más con una menor supervivencia global y supervivencia libre de progresión, así como la resistencia a la quimioterapia.<sup>(20)</sup> No obstante, en ambos casos no se calculan las fuerzas de asociación. Una de las limitaciones del estudio radicó, en la composición heterogénea de los LNH que conformaron la muestra, por lo que se sugiere ampliar el estudio en tipos específicos de los LNH más frecuentes.

En conclusión, los LNH se asocian con una disminución de los linfocitos totales y de algunas de sus poblaciones principales como las TCD4<sup>+</sup>, TDN, TDP, NKCD56<sup>brillante</sup> y del índice CD4/CD8, también con el incremento de linfocitos TCD8<sup>+</sup> and NKCD56<sup>opaco</sup>. Los cambios encontrados en los inmunofenotipos linfocitarios se asociaron de manera significativa con la presencia del LNH, lo cual representa una expresión sistémica de la enfermedad y sugiere su valor diagnóstico.

## Referencias bibliográficas

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49. DOI: <https://10.3322/caac.21660>
2. MINSAP. Anuario estadístico de salud. La Habana 2021: MINSAP; 2021 [acceso 12/10/2021]; Disponible en: <https://files.sld.cu/bvscuba/files/2021/08/Anuario-Estadistico-Español-2020-Definitivo.pdf>
3. Hus I, Starosławska E, Bojarska-Junak A, Dobrzyńska-Rutkowska A, Surdacka A, Wdowiak P, *et al.* CD3+/CD16+CD56+ cell numbers in peripheral blood are correlated with higher tumor burden in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Folia Histochem Cytobiol.* 2011;49(1):183-7. DOI: <https://10.5603/fhc.2011.0025>
4. Csizmar CM, Ansell SM. Engaging the Innate and Adaptive Antitumor Immune Response in Lymphoma. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7):3302. DOI: <https://10.3390/ijms22073302>
5. Wu D, Thomas A, Fromm JR. Reactive T cells by flow cytometry distinguish Hodgkin lymphomas from T cell/histiocyte-rich large B cell lymphoma. *Cytometry Part B: Clin Cytometry.* 2016;90(5):424-32. DOI: <https://10.1002/cyto.b.21261>
6. Rahemtullah A, Reichard KK, Preffer FI, Harris NL, Hasserjian RP. A double-positive CD4+CD8+ T-cell population is commonly found in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2006;126(5):805-14.
7. Shin HJ, Kim DY, Chung JS, Shin KH, Lee H. Prognostic Impact of Peripheral Blood T-Cell Subsets at the Time of Diagnosis on Survival in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Acta Haematologica.* 2021;144(4):427-37. DOI: <https://10.1159/000510912>
8. Plonquet A, Haioun C, Jais JP, Debard AL, Salles G, Bene MC, *et al.* Peripheral blood natural killer cell count is associated with clinical outcome in patients with aaIPI 2–3 diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol.* 2007;18(7):1209-15.
9. De Tullio G, Minoia C, Serrati S, Merchionne F, Loseto G, La Pietra A, *et al.* The Functional Attitude and The Predictive Role Of An Unconventional Subset Of T Cells In Clinical Outcome Of Lymphoma Patients:  $\alpha\beta$ -Double Negative T Cells, Preliminary Data Of a Prospective Study. *Blood.* 2013;122(21):4506.
10. Hou H, Luo Y, Tang G, Zhang B, Ouyang R, Wang T, *et al.* Dynamic changes in peripheral blood lymphocyte subset counts and functions in patients with diffuse large B cell lymphoma during chemotherapy. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):282. DOI: <https://10.1186/s12935-021-01978-w>

11. Garcia-Marquez MA, Thelen M, Reinke S, Keller D, Wennhold K, Lehmann J, et al. Reverted exhaustion phenotype of circulating lymphocytes as immune correlate of anti-PD1 first-line treatment in Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. 2022;36(3):760-771. DOI: <https://10.1038/s41375-021-01421-z>
12. Yang Z, Yu W, Wang S, Zhou X, Liu S, Ma S. Peripheral blood lymphocyte subsets of newly diagnosed DLBCL patients and their dynamic changes with rituximab based immunochemotherapy. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(12):2909-16. DOI: <https://10.1080/10428194.2019.1617861>
13. Han X, Ruan J, Zhang W, Zhou D, Xu D, Pei Q, et al. Prognostic implication of leucocyte subpopulations in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2017;8(29):47790-800. DOI: <https://10.18632/oncotarget.17830>
14. Lu Y, Yu J, Gong W, Su L, Sun X, Bai O, et al. An Immune-Clinical Prognostic Index (ICPI) for Patients With De Novo Follicular Lymphoma Treated With R-CHOP/CHOP Chemotherapy. *Front Oncol*. 2021;11:708784. DOI: <https://10.3389/fonc.2021.708784>
15. Xia Y, Li W, Li Y, Liu Y, Ye S, Liu A, et al. The clinical value of the changes of peripheral lymphocyte subsets absolute counts in patients with non-small cell lung cancer. *Transl Oncol*. 2020;13(12):100849. DOI: <https://10.1016/j.tranon.2020.100849>
16. Mu S, Ai L, Fan F, Qin Y, Sun C, Hu Y. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in diffuse large B cell lymphoma patients: an updated dose-response meta-analysis. *Cancer Cell Int*. 2018;18:119. DOI: <https://10.1186/s12935-018-0609-9>
17. Zhang Y-P, Zhang R, Zhu H-Y, Wang L, Wu Y-J, Liang J-H, et al. Circulating Low Absolute CD4+ T Cell Counts May Predict Poor Prognosis in Extranodal NK/T-Cell Lymphoma Patients Treating with Pegaspargase-Based Chemotherapy. *Cancer Res Treat*. 2019;51(1):368-77. DOI: <https://10.4143/crt.2018.010>
18. Bruna R, Geuna M, Rota Scalabrini D, Cignetti A, Santoro N, Gottardi D, et al. Low Circulating B Lymphocytes in Newly Diagnosed Follicular and Diffuse Large B Cell Lymphoma: Differences Compared to Normal Subjects and Possible Prognostic Role. *Blood*. 2017;130(Suppl 1):1482. DOI: [https://10.1182/blood.V130.Suppl\\_1.1482.1482](https://10.1182/blood.V130.Suppl_1.1482.1482)
19. Amini RM, Enblad G, Hollander P, Laszlo S, Eriksson E, Ayoola Gustafsson K, et al. Altered profile of immune regulatory cells in the peripheral blood of lymphoma patients. *BMC Cancer*. 2019;19:316. DOI: <https://10.1186/s12885-019-5529-0>
20. Kusano Y, Yokoyama M, Terui Y, Nishimura N, Mishima Y, Ueda K, et al. Low absolute peripheral blood CD4+ T-cell count predicts poor prognosis in R-CHOP-treated patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer J*. 2017;7:e558. DOI: <https://10.1038/bcj.2017.37>

### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### **Contribuciones de los autores**

*Conceptualización:* Anamary Suárez Reyes, Carlos Villegas Valverde.

*Curación de datos:* Anamary Suárez Reyes, Carlos Villegas Valverde, María del Carmen Arango Prado, Tamara González Madruga, Elías Gracia Medina.

*Análisis formal:* Anamary Suárez Reyes, Carlos Villegas Valverde, María del Carmen Arango Prado, Tamara González Madruga, Elías Gracia Medina.

*Investigación:* Anamary Suárez Reyes, Carlos Villegas Valverde, María del Carmen Arango Prado, Tamara González Madruga, Elías Gracia Medina.

*Metodología:* Anamary Suárez Reyes, Carlos Villegas Valverde.

*Supervisión:* Carlos Villegas Valverde, María del Carmen Arango Prado, Elías Gracia Medina.

*Redacción del borrador original:* Anamary Suárez Reyes, Carlos Villegas Valverde.

*Redacción - revisión y edición:* Anamary Suárez Reyes, Carlos Villegas Valverde, María del Carmen Arango Prado, Tamara González Madruga, Elías Gracia Medina.