

Instituto de Hematología e Inmunología

INMUNOFENOTIPAJE CELULAR EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS HÍBRIDAS

Dra. Vianed Mars^{En} Suárez, Dra. Miriam S^{En}chez Segura, Lic. René Rivero Jiménez, Lic. Mercedes Martínez Machado, T⁰c. Soralis Gutiérrez Rivas, Dr. Edgardo Espinosa Martínez, Dr. Alejandro González Otero y Dra. Consuelo Macías Abraham

RESUMEN

Se estudiaron 118 leucemias agudas en un período de 4 años. El fenotipaje celular se realizó a través del ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ), mediante la utilización de un panel de anticuerpos monoclonales con el que se evaluó la expresión de antígenos linfoides y mieloides. La expresión de antígenos mieloides en pacientes con leucemia linfóide aguda se encontró en el 28,4 % y de antígenos linfoides en pacientes con leucemia mieloide aguda en el 56,7 %. Las leucemias agudas híbridas representaron el 16,1 % del total de pacientes estudiados: 73,7 % al inicio de la enfermedad y el 26,3 % restante en el estudio posterior al tratamiento de inducción de la remisión, lo que sugiere en estos últimos la posibilidad de cambio de linaje por la selección de variantes resistentes a drogas procedentes del clon original, o la aparición de neoplasias secundarias por el uso de drogas genotóxicas.

Descriptores DeCS: INMUNOFENOTIPICACION; INMUNOHISTOQUIMICA/métodos; LEUCEMIA MIELOCISTICA AGUDA/diagnóstico; LEUCEMIA LINFOCITICA/diagnóstico.

En la leucemia aguda (LA), el evento leucemogénico induce defectos en el crecimiento y diferenciación de los blastos leucémicos, lo que da lugar a la expansión clonal de precursores hematopoyéticos transformados.¹

En el estudio de las células leucémicas se incluyen técnicas inmunológicas que utilizan anticuerpos monoclonales (AcMo) que han permitido conocer que los fenotipos leucémicos no siempre son perfectas réplicas de sus contrapartes normales.²

Los cambios cromosómicos en la estructura, el control o en ambos aspectos de determinados genes hacen que los blastos leucémicos no muestren correspondencia total en cuanto a la expresión fenotípica de antígenos de superficie celular, al compararlos con sus equivalentes normales en los diferentes compartimentos y tejidos corporales.³

El inmunofenotipaje celular con el ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ) es útil para la caracterización y subdivisión de las LA, complementando a

la evaluación morfológica por microscopio de luz, ya que permite la discriminación entre las leucemias linfoides agudas (LLA) y las leucemias mieloides agudas (LMA), y dentro de las primeras, aquéllas de células T y células B; así como el diagnóstico de leucemias agudas híbridas (LAH), donde los blastos expresan características de más de un linaje, lo que representa la transformación maligna de una célula progenitora, su inmortalización y la expresión de genes aberrantes por alteraciones genéticas específicas.⁴⁻⁸

Las LAH pueden afectar a adultos y niños, particularmente menores de 2 años. Aparecen inicialmente o raramente durante una recaída de las LLA o de las LMA con posterioridad al tratamiento inductor de

remisión.⁸ Se ha señalado que por lo general tienen un pronóstico reservado, de ahí que requieran de una terapia más agresiva para inducir períodos mayores de remisión completa, así como de alo o autoinjerto para erradicar permanentemente la enfermedad.⁹⁻¹¹

El objetivo de nuestro trabajo fue analizar la frecuencia de LAH en un grupo de LA atendidas en nuestra institución.

MÉTODOS

Se estudiaron 118 pacientes con LA, 70 del sexo femenino y 48 del masculino, con una edad promedio de 19 años y un rango de 11 meses -80 años, diagnosticados en el IHI en el período comprendido desde

TABLA 1. *Relación de anticuerpos monoclonales utilizados para el inmunofenotipaje celular*

I.	Dirigidos contra antígenos expresados por células B: anti-CD10 (OKB CALLA) anti-CD19; anti CD20 (B1) Institute of Cancer Research, Londres anti CD22 (Leu 14) anti-cadena μ anti-cadena K anti-cadena λ Hospital Clínico de Barcelona
II.	Dirigidos contra antígenos expresados por células T: anti-CD1 (NA 134) anti-CD7 (Leu 9) Institute of Cancer Research, Londres anti-CD2 (OKT 11) anti-CD4 (OKT 4) anti-CD8 (OKT 8) Filatov Institute of Immunology anti-CD3(OKT3) anti-CD5 (Cris 1) Hospital Clínico de Barcelona
III.	Dirigidos contra antígenos expresados por células mieloides: anti-CD13 (My 7) anti-muramidasa anti-CD41 (943 D) Hospital Clínico de Barcelona anti-CD33 (My 9) Institute of Cancer Research anti-CD14 anti-CD15 (Leu M1) Filatov Institute of Immunology
IV.	Otros: anti-HLA-DR anti-deoxi-nucleotidil transferasa terminal (Tdt) Hospital Clínico de Barcelona

1992 hasta 1996. A todos los casos se les realizó inmunofenotipaje para su clasificación inmunológica, con un panel de anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos contra antígenos linfoides y mieloides (tabla 1). La obtención de células mononucleares procedentes del aspirado de médula ósea se realizó mediante la técnica de Boyüm modificada.¹² Las células se ajustaron a una concentración de 3×10^6 células/mL. El inmunofenotipaje celular se realizó mediante el UMICIQ para la detección de antígenos de membrana, citoplasmáticos e intranucleares (estos últimos previa permeabilización de la membrana, con el uso del detergente Brij- 56). En este método las células no deshidratadas se unen electrostáticamente a láminas portaobjeto preparadas con 21 pocillos recubiertos con poli L-lisina.¹³

Para el revelado de la reacción se empleó un sistema de doble anticuerpo marcado con peroxidasa para incrementar la sensibilidad del sistema. En la tinción y contratinción se emplearon cloronaftol, aminoetilcarbazol y hemalón, respectivamente, lo que permite diferenciar entre células con actividad endógena de peroxidasa (mieloide=cloronaftol positivas) y las que a su vez reaccionan con los distintos AcMo y los conjugados con peroxidasa exógena (aminoetil-carbazol positivas), mientras que el hemalón favorece la visualización de la morfología celular.

Las LAH se clasificaron de acuerdo con el número y especificidad de antígenos de linaje no esperado según el sistema de Catovsky⁹ (tabla 2), y definidas como tal cuando la suma de los puntos de 2 linajes por separado fue mayor que 2.

TABLA 2. Sistema de Catovsky para la clasificación de las leucemias agudas híbridas

Puntos	Linaje B	Linaje T	Linaje mieloides
2	CD22c	CD3(c/m)	Reacción a PE
1	CD10	CD2	CD13m
	CD19	CD5	CD33
0,5	Tdt	Tdt	CD11b/CD11c
		CD7	CD 14
			CD 15

c: citoplasmático; m: membrana; PE: peroxidasa endógena > 5%; Tdt: deoxi-nucleotidil transferasa terminal.

RESULTADOS

Del total de LA, 63 (53,4 %) fueron LLA y 27 (22,9 %) LMA. En 9 pacientes (7,6 %) no se encontraron antígenos específicos de linaje y fueron clasificados como LA indiferenciadas.

El 28,4 % de las LLA expresaron antígenos mieloides: el CD14 fue positivo en el 60 %, el CD15 en el 45 %, la mieloperoxidasa en el 25,4 %, el CD33 en el 20 % y la glicoforina A en el 10 %. En 7 LLA se encontró la expresión de un antígeno mieloides, en 3 la coexpresión de 2 antígenos mieloides y sólo 1 paciente mostró 3 de estos antígenos.

La combinación más frecuente encontrada fue la coexpresión de los antígenos CD15/CD14 con los antígenos CD10/CD22 citoplasmático/Tdt.

El 56,7 % de las LMA expresaron antígenos linfoides. La Tdt fue positiva en el 62,9 %, el CD10 en el 33,3 %, el CD5 en el 29,6 %, el CD7 en el 11,1 %, el CD20 en el 7,4 % y el CD2, el CD3 citoplasmático y de superficie, así como el CD19, en el 3,7 %.

En 3 LMA se encontró la expresión de un solo antígeno linfoides, y la coexpresión de 2, 3 y 4 antígenos linfoides se encontró

en 7, 3 y 2 casos, respectivamente. Las combinaciones que con mayor frecuencia se observaron fueron las de los antígenos CD5/CD2/Tdt y CD10/Tdt.

Las LAH representaron el 16,1 % del total de pacientes. De ellas, 73,7 % al inicio de la enfermedad y 26,3 % con posterioridad al tratamiento de inducción de la remisión; de éstas 42,1 % fueron positivas a antígenos B y mieloides, 42,1 % fueron positivas a antígenos T y mieloides, 10,1 % fueron positivas a ambos marcadores linfoides y 5,3 % presentaron diferenciación trilineal.

DISCUSIÓN

La prevalencia observada de antígenos mieloides en LLA (28,4 %) (LLA-M+), fue similar a la encontrada por otros autores.^{2,8,14,15} Vecchio¹¹ en una serie de 54 pacientes con LLA-T, analizó la expresión de antígenos aberrantes mieloides. Todos los pacientes con expresión en sus blastos de CD7+, CD2+, CD4-, CD8-, CD1- (LLA-T temprana), expresaron además CD34+, HLA-DR+ y CDw65+, lo que sugería una expresión coordinada de antígenos mieloides con los expresados en células progenitoras en la LLA-T, y que las fases tempranas de la ontogenia de células T están relacionadas con la vía de diferenciación mieloide. La influencia negativa de la expresión de antígenos mieloides en LLA ha sido observada sólo en adultos y no en niños.

En una serie de 328 casos de LLA, sólo 2 fueron positivos para la glicoforina A. Sin embargo, la revisión de esa serie reveló que ambos pacientes, aunque tenían una morfología linfoide, no expresaban un inmunofenotipo de LLA y fueron realmente eritroleucemias crípticas, lo cual evidencia la no correlación entre la morfología y el inmunofenotipo en ciertos casos.²

El antígeno CD10 no es específico de linaje, pero se expresa selectivamente por ciertos tipos celulares. Se ha descrito su expresión muy ligera en los granulocitos. Su expresión en LMA ha sido encontrada por otros autores, y debe destacarse que fueron tratadas como LLA con buena respuesta.^{4,8,16}

Los antígenos CD2 y CD7 no se expresan solamente en células T, se han encontrado también en mieloblastos leucémicos. De igual forma, el antígeno CD5, que es un antígeno asociado a las células T, se expresa también en una subpoblación de células B representada anormalmente en la leucemia linfoide crónica, y en algunos precursores mieloides.^{2,4,11,16}

La frecuencia de la positividad de Tdt en pacientes con LMA varía del 5 al 40 %, en dependencia del método de detección.¹⁶⁻¹⁹ En nuestro estudio, encontramos una frecuencia mayor (62,7 %), todo lo cual demuestra que no es un marcador restringido al linaje linfoide.

Se ha demostrado por técnicas de biología molecular, que muchas de las LMA Tdt positivas presentan reordenamientos de genes que codifican para cadenas de inmunoglobulinas o para el receptor de células T.¹¹ Esta correlación entre inmunofenotipo y genotipo indica que la expresión de antígenos linfoides en las LMA no es un evento al azar y forma parte de un programa de diferenciación coordinado.

Las LMA con expresión de antígenos linfoides son clasificadas como LMA-L+, las que encontramos en el 56,7 % de nuestros pacientes. La coexpresión de un solo antígeno linfoide en LMA es detectado con mucha más frecuencia que la coexistencia de 2 o más de estos marcadores. La expresión de CD2/CD5, CD2/CD7, CD7/CD19 por mieloblastos, ha sido encontrada por varios autores.^{11,16,18}

TABLA 3. Sistema de Garand para la clasificación de las leucemias agudas híbridas

Puntos	Linaje B	Linaje T	Linaje mielóide	Linaje megacariocítico	Linaje eritroide
2	CD22(c/m)	CD3(c/m)	Anti-MPO	CD41	Glicoforina A
	CD79a c	TCR $\alpha\beta$ (c/m)	CD13c	CD42	HbF
	C μ	TCR $\gamma\delta$ (c/m)		CD61	RhD
	IgS			FVIII	
1	CD19	CD2	CD13c	CD36	CD36
	CD20	CD5	CD33	ABH	ABH
		CD8	CD36		
			CDw65		
0,5	CD10	CD7	CD11b/c		
	CD24	CD1a	CD14		
	Tdt	CD4	CD15		
			CD64		
			CD117		

m: membrana; c: citoplasmático; Tdt: deoxi-nucleotidil transferasa terminal; TCR: receptor de célula T; Hb: hemoglobina; ABH: grupo sanguíneo ABH.

Nosotros observamos además la coexpresión de CD10/Tdt en 3 subpoblaciones de blastos mieloides diferentes. Estas LMA-L+ muestran una alta incidencia de linfadenopatías e infiltración meníngea, así como una pobre respuesta a la terapia inductora de la remisión. Se ha señalado que la expresión del antígeno CD7 en LMA condiciona un peor pronóstico, sin embargo, la expresión de CD56 (asociado a célula NK) favorece el pronóstico de éstas.

En nuestro estudio, encontramos una frecuencia de 16,1 % de LAH similar a la observada por otros autores.^{8,9,20,21} Esta variedad constituye un tipo poco frecuente de leucemia, probablemente con arresto de la maduración en una célula progenitora multipotencial con capacidad para diferenciarse a ambos linajes, mielóide o linfóide, demostrado por la participación de determinados genes, sus productos o ambos eventos, tanto en células mieloides como linfoides.

La aplicación de sistemas de puntuación para la caracterización de las LAH han sido de utilidad práctica, ya que han permitido estandarizar el diagnóstico de esta variedad de leucemias; entre estos uno de los que más se ha usado es el sistema de Catovsky empleado en nuestro estudio, que utiliza un pequeño número de antígenos. Recientemente se ha propuesto otro sistema de puntuación que incluye un número mayor de determinantes antigénicos y amplía el estudio de los linajes celulares¹⁰ (tabla 3). La realización de estudios futuros que comparen ambos sistemas, nos dará la posibilidad de definir cuál de ellos es el más útil y práctico, y así se podría analizar el costo/beneficio de estas pruebas.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor *Porfirio Hernández Ramírez*, por la revisión minuciosa de nuestro trabajo.

SUMMARY

118 acute leukemias were studied during 4 years. The cellular phenotyping was carried out through the immunocytochemical ultramicromethod by using a panel of monoclonal antibodies with which the expression of lymphoid and myeloid antigens was evaluated. The expression of myeloid antigens in patients with acute lymphoid leukemia was found in 28.4 %, whereas the expression of lymphoid antigens in patients suffering from acute myeloid leukemia was observed in 56.7 %. The acute hybrid leukemias accounted for 16.1 % of the total of patients studied: 73.7 % at the onset of the disease and the other 26.3 % in the study following the induction treatment of the referred patients, which suggests in the latter the possibility of changing lineage by selecting variants resistant to drugs from the original clon, or the appearance of secondary neoplasias due to the use of genotoxic drugs.

Subject headings: IMMUNOPHENOTYPING; IMMUNOHISTOCHEMISTRY/ methods; LEUKEMIA, MYELOCYTIC, ACUTE/diagnosis; LEUKEMIA, LYMPHOCYTIC/diagnosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sullivan AK. Clasificación, pathogenesis, and etiology of neoplastic diseases of the hematopoietic system. En: Lee GR, Bitllet TC, Ferstre J, Athens J, Lukens J, eds. Wintrob's clinical hematology. 9 ed. Philadelphia: Lea and Feiber, 1993:1725-83.
2. Greaves MF, Chan LC, Furley AJ, Watt SM, Molgaard HV. Lineage promiscuity in hematopoietic differentiation and leukemia. Blood 1986;67:1-11.
3. Mauer AM. Acute lymphocytic leukemia. En: Beutler E, Lichtman M, Coller B, Kipps T, eds. Williams Hematology. 5. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1995:1004-5.
4. Terstappen L, Safford M, Könemann S, Loken MR, Zurlutlerk Büchner T. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis. Leukemia 1991;5:757-67.
5. Cabrera ME, Labra SG, Ugarte SU, Matutes E, Greaves MF. Inmunofenotipo, características clínicas y laboratorio de la leucemia linfoblástica aguda en Chile. Estudio de 500 niños y 131 adultos. Rev Med Chile 1996;124:293-9.
6. Reilly JT. Use and evaluation of leucocyte monoclonal antibodies in the diagnostic laboratory: a review. Clinic Lab Haem 1996;18:1-5.
7. Orfao A, Ciudad J, González M. Flow cytometry in the diagnosis of cancer. Scand J Clin Lab Invest 1995;221:145-52.
8. Mirro J, Zipf TF, Pui CH, Kichingman G, Williams D, Melven S, et al. Acute mixed lineage leukemia: clinicopathologic correlations and prognostic significance. Blood 1985;66:1115-23.
9. Catovsky D, Bucheri V, Matutes E, Dyer MJ, Shetty V, Yoshida N, et al. A classification of acute leukaemia for the 1990's. Ann Hematol 1991;62:16-112.
10. Garand R, Robillard N. Immunophenotypic characterization of acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders: practical recommendations and classifications. Hematol Cell Ther 1996;38:471-86.
11. Del Vecchio L, Finicio O, Lo Pardo C, Pane N, Schiarone EM, Vacea C, et al. Co-ordinate expression of T-cell antigens on acute myelogenous leukemia and of myeloid antigens on T-acute lymphoblastic leukemia. Speculation on a highly balanced bilinearity. Leukemia 1991;5:815-8.
12. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 1968;21:77-89.
13. 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.

14. Orfao A, Ciudad J, López-Berges MC, López A, Vidriales B, Caballero MD. Acute lymphoblastic leukemia (ALL): detection of minimal residual disease (MRD) at flow cytometry. *Leuk Lymph* 1994;13:87-90.
15. Basso G, Rondelli R, Covezzoli S, Putti M. The role of immunophenotype in acute lymphoblastic leukemia of infant age. *Leuk Lymph* 1994;15:51-60.
16. Vidriales MB, Orfao A, González M, Hernández JM, López-Berges MC, García MA. Expression of NK and lymphoid associated antigens in blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 1993;7:2026-9.
17. Howar MR, Reid MM. Expression of myeloid antigens in acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 1994;88:897-8.
18. Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, López-Berges MC, Valverde B, González M, et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol* 1995;70:189-94.
19. Macedo A, Orfao González M, Vidriales MB, López-Berges MC, Martínez A, et al. Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. *Leukemia* 1995;9:993-8.
20. Macedo A, San Miguel JF, Vidriales MB, López-Berges MC, García-Marcos MA, González M, et al. Phenotypic changes in acute myeloid leukaemia: implications in the detection of minimal residual disease. *J Clin Pathol* 1996;49:15-8.
21. Buccheri V, Matutes E, Dyer M, Catovsky D. Lineage Commitment in biphenotypic acute leukemia. *Leukemia* 1993;7:919-27.

Recibido: 5 de marzo de 1998. Aprobado: 31 de diciembre de 1998.

Dra. *Vianed Marsán Suárez*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfono: (537) 578268. Fax: (537) 338979. e-mail:ihidir@hemato.sld.cu