

Técnicas

Instituto de Hematología e Inmunología

INTRODUCCIÓN DEL MÉTODO INMUNOCITOQUÍMICO DE LA FOSFATASA ALCALINA-ANTIFOSFATASA ALCALINA PARA LA CLASIFICACIÓN INMUNOLÓGICA DE LOS SÍNDROMES LINFO Y MIELOPROLIFERATIVOS AGUDOS

Lic. Berta B. Socarrás Ferrer, Dra. Vianed Marsán Suárez, Dra. Miriam Sánchez Segura y Dra. Consuelo Macías Abraham

RESUMEN

Se realizó el inmunofenotipaje celular en 30 pacientes con el diagnóstico de síndromes linfocítico y mieloproliferativos agudos por el método inmunoenzimático fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (APAAP) introducido en nuestro laboratorio. Los marcadores estudiados fueron: CD3, CD5, CD7, CD10, CD13, CD15, CD22, CD33, CD34 y CD41 mediante los anticuerpos monoclonales correspondientes, según cada caso. De las leucemias agudas, 16 resultaron ser leucemias linfocíticas (LLA) (53,3 %) y 12 mieloides (LMA) (40 %). Entre las LLA, el 50 % fue del fenotipo B y del resto, 1 caso del tipo T (LLA-T) (3,33 %). Un paciente se diagnosticó como leucemia aguda híbrida (LAH) (3,33 %) y el otro se clasificó como leucemia aguda indiferenciada (LAI) (3,33 %). Se concluye que el APAAP es un método más rápido y tan eficaz como otros métodos enzimáticos para la clasificación inmunológica de los síndromes linfocítico y mieloproliferativos.

DeCS: TRASTORNOS LINFOPROLIFERATIVOS; TRASTORNOS MIELOPROLIFERATIVOS; TÉCNICAS PARA INMUNOENZIMAS/métodos; LEUCEMIA.

El avance más importante en la identificación de poblaciones y subpoblaciones de linfocitos ha sido la aplicación de anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos para el reconocimiento de antígenos expresados en la superficie celular, los cuales corresponden a determinados estadios de diferenciación o fase de activación de estas células.^{1,2}

El diagnóstico de certeza, pronóstico y tratamiento de las hemopatías malignas depende de la correcta clasificación inmunológica, que se realiza precisamente mediante la identificación de diferentes conjuntos de diferenciación (CD, de *cluster of differentiation*) y los estudios citogenético, morfológico, citológico y recientemente el estudio molecular.³⁻⁵

Existen numerosos métodos para la identificación y la cuantificación de las células que participan en la respuesta inmune, entre estos podemos mencionar los métodos inmunocitoquímicos, por ejemplo, el ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ), que emplea anticuerpos conjugados con peroxidasa⁶ y el método inmunoenzimático de la fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (APAAP), que emplea anticuerpos conjugados a esta enzima⁷ y son utilizados en nuestro laboratorio.

Con este método se realizó la clasificación inmunológica de 30 pacientes con síndromes linfó y mieloproliferativos agudos, lo cual contribuye a mejorar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estos pacientes con hemopatías malignas.

MÉTODOS

Se estudiaron 30 pacientes con hemopatías malignas, 13 del sexo femenino y 17 del masculino, con un rango de edad de 2-69 años, diagnosticados y atendidos en el Instituto de Hematología e Inmunología. Para la aplicación del método APAAP se realizaron extendidos de sangre provenientes de punción digital y de médula ósea en láminas portaobjetos de cristal. El área del frotis a estudiar se delimitó con lápiz con punta de diamante y se preparó un microtubo para cada AcMo en la dilución 1:20. Se estudiaron los siguientes antígenos celulares: CD3, CD5, CD7, CD10, CD15, CD22, CD33, CD34 y CD41 (tabla) mediante los AcMo específicos, según el caso. Se fijaron las láminas en acetona pura durante 10 min a temperatura ambiente (TA), después se lavaron en una solución amortiguadora de tris hidroximetilamino metano 0,5 M, pH 7,6. Las láminas lavadas se colocaron en una cámara húmeda y se le añadieron 50 μ L del AcMo (para cada monoclonal se utilizó una lámina) y se incubaron durante 30 min a TA. Nuevamente

se lavaron con la solución amortiguadora durante 2 min. Una vez concluido el lavado, se distribuyó sobre cada lámina la fracción purificada de inmunoglobulina del antisuero de conejo-anti-ratón (Linking) y se incubaron durante 30 min a TA. Posteriormente se lavaron con el mismo amortiguador y se les añadió el complejo APAAP, que consiste en complejos solubles de fosfatasa alcalina del intestino de ternero y un AcMo de ratón anti-fosfatasa alcalina.

En el momento de utilizar se preparó la solución de coloración reveladora APAAP: 20 μ L de NAFTOL-AX-MX fosfato; 5 μ L de levamisol y una punta de rojo violeta, que se añadió e incubó durante 25 min en la oscuridad. Posteriormente se lavaron las láminas con el amortiguador y luego en agua corriente. Después de concluidos los lavados, se realizó una contracoloración, para lo cual se distribuyó sobre cada lámina un volumen de aproximadamente 200 μ L de hematoxilina de Gill y pasados 8 min, se enjuagaron con agua corriente y se montaron con glicerol.

Se realizó la lectura en microscopio óptico DIALUX 20 EB (Leitz, RFA). Se contaron al menos 200 células en cada lámina.

RESULTADOS

Se realizó la introducción del método APAAP para el inmunofenotipaje celular de síndromes linfó y mieloproliferativos agudos.

De las leucemias agudas estudiadas, 16 resultaron leucemias linfoides (LLA) (53,33 %) y 12 leucemias mieloides (LMA) (40 %). Entre las LLA, el 50 % presentaron el fenotipo B. En el resto, en 1 paciente (3,33 %) los blastos expresaron antígenos de células T (LLA-T). Un caso fue diagnosticado como leucemia aguda híbrida (LAH) (3,33 %) con expresión de antígenos linfoides T y mieloides y 1 paciente se clasificó como leucemia aguda indiferenciada (LAI) (3,33 %) (figura).

TABLA. Panel de anticuerpos monoclonales (AcMo) para el inmunofenotipaje celular

CD dirigidos contra células B	AcMo	Fuente
CD10	OKB-CALLA	<i>Institute of Cancer Research</i> , Londres, Inglaterra
CD19	anti-CD19	<i>Institute of Cancer Research</i> , Londres, Inglaterra
CD22	Leu 14	Hospital Clínico de Barcelona, Barcelona, España
Dirigidos contra células T		
CD3	OKT3	Hospital Clínico de Barcelona, Barcelona, España
CD5	Cris-1	Hospital Clínico de Barcelona, Barcelona, España
CD7	Leu9	<i>Institute of Cancer Research</i> , Londres, Inglaterra
Dirigidos contra células mieloides		
CD13	My7	Hospital Clínico de Barcelona, Barcelona, España
CD33	My9	<i>Institute of Cancer Research</i> , Londres, Inglaterra
CD15	Leu21	<i>Filatov Institute of Immunology</i> , Rusia
CD41	943D	Hospital Clínico de Barcelona, Barcelona, España
Otros		
CD34	K3	<i>Greiner Laboratory</i> , Alemania

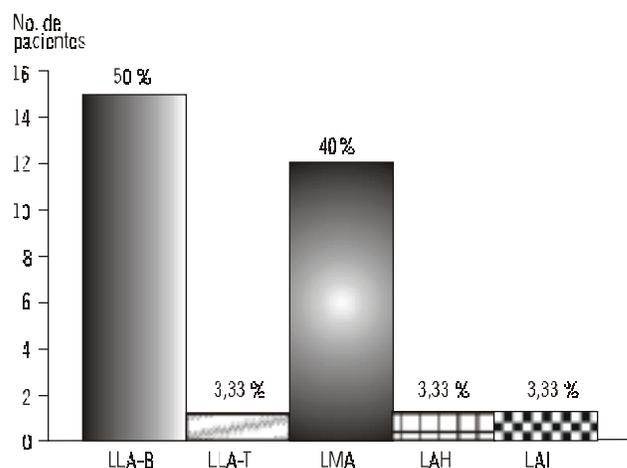


FIGURA. Distribución de la frecuencia relativa de los pacientes con leucemias agudas estudiadas por el método APAAP.

LLA-B: Leucemia linfóide aguda tipo B LMA: Leucemia mielóide aguda
 LAI: Leucemia aguda indiferenciada LLA-T: Leucemia linfóide aguda tipo T
 LAH: Leucemia aguda híbrida

DISCUSIÓN

Las preparaciones y extendidos celulares se pueden tipificar con fines diagnósticos por métodos inmunocitoquímicos, con la participación de enzimas fundamentalmente fosfatasa alcalina^{7,8} y peroxidasa^{6,9-11}, y con el empleo de AcMo que reconocen a los antígenos celulares. Estos métodos se aplican con éxito en la caracterización inmunológica de las células malignas en pacientes con leucemias y otras enfermedades hematológicas. Estas técnicas presentan ventajas sobre otros métodos diagnósticos (inmunofluorescencia indirecta) porque permiten visualizar las células marcadas a través del microscopio óptico, la observación simultánea de la morfología celular y la reacción inmunológica antígeno-anticuerpo, además de que brindan la posibilidad de conservar a 4 °C las preparaciones coloreadas por largos períodos, sin que se pierdan las características de las células marcadas. El método APAAP permite también el inmunofenotipaje con las siguientes características técnicas: se realiza en extendidos de sangre periférica o medular, por lo que no es necesario el uso del Ficoll para el aislamiento de las células mononucleares; es un método rápido, pues los resultados se obtienen a las 4 horas de extraídas las muestras; y por último, en el método APAAP se pueden conservar las láminas sin procesar en congelación a -20 °C durante largos períodos, lo que permite

estudios retrospectivos, aunque se necesita una lámina para cada AcMo.

En el caso de los métodos como el UMICIQ, se utilizan células no deshidratadas adheridas por atracción electrostática a la superficie de láminas portaobjeto recubiertas con poli-L-lisina, por lo que se requiere del aislamiento de las células mononucleares con la aplicación de un gradiente de Ficoll, lo que provoca un mayor tiempo de ejecución y costo del sistema de diagnóstico, las muestras no se pueden conservar sin procesar y se realizan 21 determinaciones en una misma lámina con el uso de pequeños volúmenes (ultramicrométodo) de reactivos, pues el interés está dirigido a realizar tanto estudios de marcadores en la superficie celular como intranucleares e intracitoplasmáticos.

Por los resultados alcanzados, podemos concluir que el método APAAP es un procedimiento rápido y eficaz, es aplicable con confiabilidad para la clasificación inmunológica de los síndromes linfocítico y mieloproliferativos en nuestro laboratorio y se puede utilizar en la evaluación de poblaciones y subpoblaciones celulares en otras investigaciones biomédicas y otros centros del Sistema Nacional de Salud, por lo que recomendamos su generalización a través de la fabricación nacional de un juego diagnóstico con características similares al OPTICIM que comercializa CIMAB SA, pero basado en el procedimiento descrito en este trabajo.

SUMMARY

The cellular immunophenotyping was carried out in 30 patients with the diagnosis of acute lympho- and myeloproliferative syndromes by the alkaline phosphatase-alkaline antiphosphatase immunoenzymatic method (APAA) introduced in our laboratory. The CD3, CD5, CD7, CD10; CD13, CD15, CD22, CD33 and CD41 markers were studied by using the corresponding monoclonal antibodies, according

to each case. Of the acute leukemias, 16 were lymphoid leukemias (ALL) (53.3 %) and 12 were myeloid leukemias (AML) (40 %). Among the ALL, 50 % were phenotype B and of the rest, 1 case was type T (ALL-T) (3.33 %). A patient was diagnosed acute hybrid leukemia (AHL) (3.33 %) and the other was classified as acute undifferentiated leukemia (AUL) (3.33 %). It is concluded that the APAA is faster and as efficient as other enzymatic methods for the immunologic classification of the lympho- and myeloproliferative syndromes.

Subject headings: LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS; DISORDERS; IMMUNOENZYME TECHNIQUES/methods; LEUKEMIA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sánchez-Madrid F. Linfocitos T: diferenciación. Subpoblaciones. Activación. En: Laraga V, Fresno M. Enjuanes. *Inmunología*. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1987:129-30. (Edición Revolucionaria).
2. Boffil M, Janossy G, Lee CA. Laboratory control values for CD4 and CD8. Lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis. *Clin Exp Immunol* 1992;88:243-52.
3. Schlossman SF. CD Antigens 1993. *Immunol Today* 1994;5:98-9.
4. Dewal GM. Chromosome abnormalities in malignant hematologic disorders. *Mayo Clin Proc* 1985;60:675.
5. Martínez G. The molecular heterogeneity of chronic Lymphocytic leukemia. Further data. *Hematología* 1988;73:169-72.
6. Rivero RA, Bello M, Suárez LE, Cruz C, Martínez M, Palma L. Introducción de un ultramicrométodo inmunocitoquímico para la cuantificación de subpoblaciones linfocitarias identificadas con anticuerpos monoclonales. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1995;11(1):46-56.
7. Cordell F, Fallin B, Erber WN. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase. *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-29.
8. Houmand A, Abrahamsen B, Tinggaard D, Pedersen N. Relevance of ki-67 expression in the classification of non-Hodgkin's Lymphomas. A morphometric and double-immunostaining study. *Histopathology* 1992;20:13-20.
9. Kranz BR, Thierfelder S. Improve detection of terminal transferase (TdT): the use of detergents on glutaraldehyde-fixed-non-dehydrated cells prevents denaturation and diffusion artifacts. *Leuk Res* 1986;10:1041-9.
10. Cruz C, Rivero R, Suárez L. Detección mejorada del antígeno CD2 por un ultramicrométodo inmunocitoquímico en células T no deshidratadas unidas a láminas recubiertas con poli-L-Lisina y fijadas con vapores de formaldehído. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1995;11(1):71-2.
11. Cruz C, Pérez L, Rivero R, González C, Pérez J. Ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ): su aplicación para cuantificar linfocitos T CD4⁺ en portadores del VIH y en pacientes con SIDA. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1996;12(1):41-6.

Recibido: 22 de noviembre de 1999. Aprobado: 27 de noviembre de 1999.

Lic. *Berta B. Socarrás Ferrer*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf.: (537)578268. Fax: (537)338979. e-mail: ihidir@hemato.sld.cu