

Artículos originales

Instituto de Hematología e Inmunología

INMUNOFENOTIPAJE Y SUPERVIVENCIA GLOBAL DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIAS AGUDAS

Dra. Vianed Marsán Suárez, Dra. Consuelo Macías Abraham, Lic. René Rivero Jiménez, Dra. Miriam Sánchez Segura, Lic. Beatriz Socarrás Ferrer, Lic. Anissa Gramatges Ortiz, Dra. María Teresa Milanés Roldán, Dr. Alejandro González Otero y Dr. Porfirio Hernández Ramírez

RESUMEN

El inmunofenotipaje celular (IFC) permite identificar la línea específica de origen de las células leucémicas y su nivel de maduración. Se determinó la frecuencia de los distintos subtipos inmunológicos de leucemias agudas (LA) y su posible relación con la supervivencia global de los pacientes. Se estudiaron 117 niños con LA entre 1983 y 1999. El IFC se realizó mediante el ultramicrométodo inmunocitoquímico y el de fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina. Del total de LA, 77(65,8 %) fueron linfoides agudas (LLA), 26 (22,2 %) mieloides agudas, 9 (8 %) LA indiferenciadas y 5 (4 %) se clasificaron como LA híbridas. Del total de LLA, 59 (76,6 %) fueron de fenotipo B y 18 (23,4 %) de fenotipo T. Se observó una mayor sobrevida en los pacientes de linaje B en relación con los de linaje T y mieloides, con una diferencia muy significativa ($p < 0,001$). La supervivencia también se analizó entre las diferentes variedades de LA de linaje B y se observó una menor sobrevida de los pacientes con fenotipos más inmaduros.

DeCS: INMUNOFENOTIPIFICACION; LEUCEMIA MIELOIDE/diagnóstico; LEUCEMIA MIELOIDE/clasificación; LEUCEMIA MIELOIDE/inmunología; LEUCEMIA LINFOCITICA/diagnóstico; LEUCEMIA LINFOCITICA/clasificación; LEUCEMIA LINFOCITICA/inmunología; ANTICUERPOS MONOCLONALES/uso diagnóstico; TASA DE SUPERVIVENCIA; NIÑO.

Las leucemias agudas (LA) constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias caracterizadas por una expansión clonal de células precursoras hematopoyéticas transformadas.^{1,2}

En la actualidad, es posible identificar utilizando un panel de anticuerpos

monoclonales (AcMo), la línea específica de origen de las células leucémicas y su nivel de maduración. Estos estudios de inmunofenotipaje celular (IFC) son esenciales para distinguir la leucemia linfocítica aguda (LLA) de la leucemia mielocítica aguda pobremente diferenciada (LMA-

M0), y clasificar la primera en subtipos inmunológicos.^{3,4}

En nuestro estudio analizamos el inmunofenotipo de las células leucémicas en un grupo de niños con diagnóstico de LA para conocer la frecuencia de los distintos subtipos inmunológicos y su posible relación con la supervivencia global de los pacientes, así como comparar estos resultados con los publicados por otros autores.

MÉTODOS

Se estudiaron 117 pacientes con LA, 68 del sexo masculino y 49 del femenino, con una edad promedio de 7 años y un rango entre 5 meses y 15 años, diagnosticados en el Instituto de Hematología e Inmunología en el período comprendido desde julio de 1983 hasta diciembre de 1999.

El IFC de muestras procedentes de médula ósea o sangre periférica se llevó a cabo mediante los métodos ultramicroinmunoquímico (UMICIQ)^{5,6} y de fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (APAAP).⁷

A continuación se relacionan los AcMo utilizados para el inmunofenotipaje celular:

1. *Dirigidos contra antígenos expresados por células B:*

- Anti-CD10(OKB-CALLA).
- Anti-CD19; anti-CD20(B1).
 - *Institute of Cancer Research*, Londres.
 - *Fundación Tettamanti*, Italia.
- Anti-CD22(Leu 14).
- anti cadena μ .
- Anti cadena κ .
- 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(OKT 3).
- Anti-CD5(Cris-1).
 - *Hospital Clínico de Barcelona*.
 - *Fundación Tettamanti*, Italia.

III. *Dirigidos contra antígenos expresados por células mieloides:*

- Anti-CD 13(My7).
- Anti-muramidasa.
- Anti-CD41(943D).
 - *Hospital Clínico de Barcelona*.
 - *Fundación Tettamanti*, Italia.
- Anti-CD33 (My 9).
 - *Institute of Cancer Research*.
- Anti-CD14.
- Anti-CD15 (Leu M1).
 - *Filatov Institute of Immunology*.
 - *Fundación Tettamanti*, Italia.

IV. *Otros.*

- Anti-HLA-DR.
- Anti-deoxi-nucleotidil transferasa terminal (Tdt).
 - *Hospital Clínico de Barcelona*.

De acuerdo con la expresión de antígenos celulares sobre las células blásticas, las LLA fueron clasificadas como de estirpe B (pro-B, común, pre-B y B) y de estirpe T (pro-T, pre-T, cortical y T) (tabla 1).

Se definieron como LA indiferenciadas (LAI), aquéllas que sólo expresaron los antígenos HLA-DR y Tdt, o al menos uno de ellos.¹

Se clasificaron como LLA-Mi⁺, aquellas LLA que expresaron hasta 2 antígenos mieloides⁸ y como LMA-Li⁺ aquellas LMA que expresaron hasta 2 antígenos linfoides.⁹ Las LA híbridas(LAH) se clasificaron según el criterio de *Catovsky* y otros.^{10,11}

TABLA 1. Clasificación inmunológica de las leucemias linfoides agudas

Leucemias linfoblásticas inmunofenotípaje	
<i>Estirpe B</i>	
pro-B	HLA-DR+/TdT+/CD19+
común	HLA-DR+/TdT+/CD19+/CD10+
pre-B	HLA-DR+/CD19+/CD10+/CD20+/Igc+
B	HLA-DR+/CD19+/CD10+/CD20+/IgS+
<i>Estirpe T</i>	
pro-T	CD7+
pre-T	CD7+/CD5+
cortical	CD7+/CD5+/CD1+/CD3+/CD4+CD8+
T	CD7+/CD5+/CD3+/CD4+ o CD8+

TdT: deoxinucleotidil transferasa terminal; Igc: inmunoglobulina intracitoplasmática; IgS: inmunoglobulina de superficie.

El cálculo de la supervivencia global de las LA de estirpe B, T y mieloide se realizó por el método de Kaplan-Meier,¹² y la comparación entre ellas por el método de log-rang.¹³

RESULTADOS

Del total de pacientes estudiados, 77 (65,8 %) fueron de linaje linfóide, 26 (22,2 %) de linaje mieloide, 9 (8 %) se clasificaron como LAI y 5 (4 %) como LAH. Del total de LLA, 59 (76,6 %) fueron de estirpe B y 18 (23,4 %) de estirpe T. De las LLA de estirpe B, 48 (81,3 %) fueron común, 7 (11,9 %) pro-B, 3 (5,1 %) pre-B y 1 (1,7 %) B. De las LLA de estirpe T, 6 (33,4 %) presentaron fenotipo de timocito común y se clasificaron como corticales.

En 4 pacientes (22,2 %) se encontraron fenotipos pro-T, pre-T y T, respectivamente (tabla 2).

Del total de pacientes con LLA, 13 (16,9 %) fueron LLA-Mi⁺; de estas 9 (69,2 %) con fenotipo B y 4 (30,8 %) con fenotipo T. Del total de LLA de linaje B Mi⁺, 1 fue clasificada como pro-B y 8 de fenotipo común (tabla 3).

Los antígenos mieloides expresados en las LLA de estirpe B fueron CD 13, CD14, CD15, CD33 y glicoforina A.

TABLA 2. Frecuencia de distribución relativa de niños con leucemias agudas

Variedad de leucemia aguda	Frecuencia No. de casos (%)
<i>LLA-B</i>	
pro-B	7(11,9)
común	48(81,3)
pre-B	3 (5,1)
B	1(1,7)
Total	59
<i>LLA-T</i>	
pro-T	4(22,2)
pre-T	4(22,2)
cortical	6(33,4)
T	4(22,2)
Total	18
<i>LMA</i>	
M0	9(34,6)
M3	1(3,8)
M4	8(30,8)
M5	7(27)
M7	1(3,8)
Total	26
<i>LAI</i>	9(8)
<i>LAH</i>	5(4)
Total	117

LLA: leucemia linfóide aguda; LMA: leucemia mieloide aguda; LAI: leucemia aguda indiferenciada; LAH: leucemia aguda híbrida.

De las 4 LLA de estirpe T mi⁺, 2 fueron pro-T y 2 pre-T. Los antígenos mieloides expresados fueron CD13, CD14, CD15 y CD33.

Del total de pacientes con LMA, 9 (34,6 %) fueron clasificadas como M0, los antígenos CD13, CD33 y HLA-DR fueron positivos en más del 75 % de los pacientes y la enzima TdT⁺ en el 25 % de éstos.

Sólo en 1 paciente (3,8 %) se diagnosticó la variedad M7, y se encontraron positivos los antígenos CD13, CD33, HLA-DR y CD41.

Las células blásticas de los pacientes diagnosticados con las variedades M0 y M7 no mostraron características morfológicas y citoquímicas típicas de diferenciación mieloide; no se encontraron células clonales positivas, lo que indica que la actividad de la mieloperoxidasa fue negativa.

TABLA 3. Fenotipos expresados en las leucemias linfoblásticas Mi⁺ y en las leucemias mieloides agudas Li⁺

	No. de casos	Inmunofenotipaje	
LLA-Mi ⁺	1	HLA-DR+/Tdt+/CD19+/CD13+	
	2	HLA-DR+/Tdt+/CD19+/CD10+/CD13+/CD33+	
	3	HLA-DR+/Tdt+/CD19+/CD10+/CD33+	
	4 y 5	HLA-DR+/Tdt+/CD19+/CD15+	
	6-8	HLA-DR+/Tdt+/CD19+/CD10+/CD14+	
	9	HLA-DR+/Tdt+/CD19+/D10+/glicoforina A+CD7+/CD13+	
	10	CD7+/CD13+/CD33+	
	11	CD7+/CD5+/CD13+/CD14+	
	12	CD7+/CD5+/CD13+/CD14+	
	13	CD7+/CD5+/CD15+	
	LMA-Li ⁺	1	HLA-DR+/CD13+/CD33+/Tdt+
		2	HLA-DR+/CD13+/CD33+/CD2+
		3	HLA-DR+/CD13+/CD33+/CD7+
4		HLA-DR+/CD13+/CD33+/CD10+	
5		HLA-DR+/CD13+/CD33+/CD15+/CD2+	
6		HLA-DR+/CD13+/CD33+/CD14+/CD5+	
7		CD13+/CD33+/CD5+/HLA-DR-	
8		HLA-DR+/CD13+/CD33+/CD15+/CD3+	

LLA-Mi⁺: leucemia linfocítica aguda con expresión de hasta 2 antígenos mieloides; LMA-Li⁺: leucemia mielocítica aguda con expresión de hasta 2 antígenos linfocíticos; Tdt: deoxinucleotidil transferasa terminal.

Se diagnosticaron 8 pacientes (30,8 %) con LMA-Li⁺. Los antígenos linfocíticos encontrados en estos pacientes fueron CD2, CD3, CD5, CD7, CD10 y Tdt (tabla 3).

El análisis de la supervivencia global de las LA de estirpe B, T y mielocítica mostró una mayor supervivencia en los pacientes de linaje B en relación con los de linaje T y mielocítico, con una diferencia altamente significativa ($p < 0,001$).

La supervivencia en los pacientes de linaje B al 1er., 2do., 4to., 5to. y 9no. años, fue de 97 %, 88 %, 84 %, 74 % y 58 %, respectivamente. Cuando se analizó la supervivencia en

los pacientes de linaje T al 1er., 2do., y 5to. años, esta fue de 82 %, 69 % y 46 %, respectivamente. Por su parte, los pacientes con LMA mostraron al 1er. y 2do. años de la enfermedad una supervivencia del 59 % y 49 %, respectivamente (fig. 1). La supervivencia también se analizó entre las diferentes variedades de LA de linaje B, y se observó una peor supervivencia de los pacientes con fenotipos más inmaduros (fig. 2).

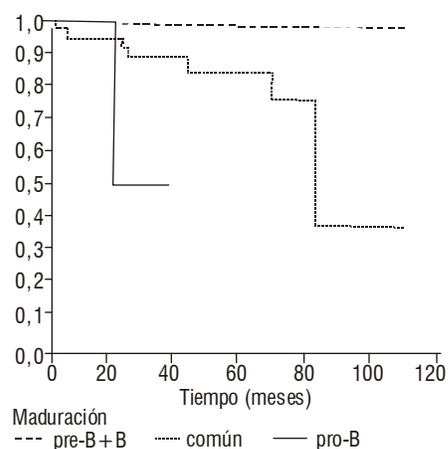


FIG. 1. Supervivencia global en niños con leucemias agudas.

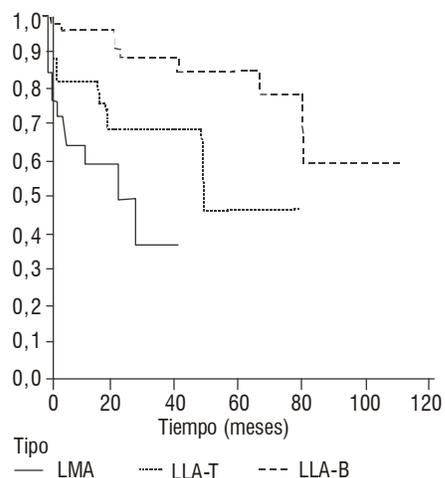


FIG. 2. Supervivencia global en niños con leucemias linfocíticas agudas B según estado de maduración.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que la distribución de los diferentes subtipos de LLA del niño en Cuba es similar a la que se observa en países como Inglaterra, Estados Unidos, Italia o Alemania. Esta misma distribución se ha descrito en otros países como Taiwan, Australia, en niños blancos de Sudáfrica, así como en niños mexicanos y caucásicos chilenos.^{1,2,4,14,15}

La mayoría de los pacientes con LLA de estirpe B se identificaron con el fenotipo común (81,3 %), lo que confirma la conocida preponderancia de este subtipo inmunológico en la infancia. Esta variedad incide con similar frecuencia en ambos sexos, preferentemente entre los 2 y 5 años de edad; la mayoría de los pacientes poseen baja masa tumoral reflejada en el recuento leucocitario y raramente poseen masa mediastínica.^{1,2,4,16} La LLA común pudiera resultar de una respuesta anómala a una infección común, probablemente viral, que ocurre relativamente tardía en la infancia en los países más desarrollados.¹⁴

La frecuencia de LLA pro-B en este estudio es similar a informes de otros investigadores. Esta variedad, antes denominada nula, predomina en niños menores de 1 año, y probablemente representa el estadio más precoz de la diferenciación de los precursores de célula B.^{2,4,16,17}

La incidencia de LLA pre-B es semejante a la informada por algunos grupos iberoamericanos (del 4,5 al 11 %) y menor que la señalada por grupos anglosajones (del 18 al 25 %).^{8,17} Si bien se desconoce el motivo de esta diferencia, esto podría estar relacionado con factores genéticos y ambientales, como se ha planteado con otros subtipos de leucemias.¹⁷

En nuestro estudio la frecuencia de la LLA-T (15,3 %), se comportó de forma

similar a la encontrada en países desarrollados, y menor a la observada en investigaciones en India, Egipto, África ecuatorial y en niños mapuches chilenos, en los cuales existe un incremento del fenotipo T,^{14,18,19} lo que pudiera explicarse por la alta frecuencia de infecciones precoces en la infancia en los países menos desarrollados, debido al hacinamiento y al menor nivel de protección con vacunas, lo que estimula su inmunidad y aumenta la incidencia relativa de leucemia T.¹⁴

La mayoría de las LMA presentan fenotipos heterogéneos, en contraste con las LLA, que generalmente muestran expresión homogénea de sus marcadores antigénicos. Virtualmente los antígenos pan-mieloides CD13 y CD33 se expresan juntos por los blastos mieloides; sin embargo, en una minoría de los casos, estos expresan solo uno de estos antígenos.¹

Existen algunos marcadores que muestran una alta correlación con la clasificación FAB,²⁰ como es el antígeno monocítico CD 14 en la M4 y en la M5, que pueden ser confirmadas con CD11c, CD36 o ambos, y la expresión de glicoforina A en la M6. La variedad M3 se caracteriza por un inmunofenotipo más homogéneo, con expresión de los antígenos CD13, CD33 y negatividad del HLA-DR; por su parte, el CD15 puede encontrarse positivo entre el 10 y el 25 % de los casos.^{1,8,9}

El IFC es muy útil para el diagnóstico de las variedades M0 y M7, ya que estos blastos no muestran características típicas de diferenciación mieloides, tanto morfológicas como citoquímicas, entre ellas la actividad de la mieloperoxidasa, por lo que no es posible sobre estos datos descartar el diagnóstico de una LLA.^{8,9}

Para el diagnóstico de la variedad M0, las células leucémicas deben ser positivas para uno de los antígenos pan-mieloides CD13 o CD33 y ser negativas para antígenos

linfoides. La mieloperoxidasa es positiva frecuentemente por microscopia ultraestructural.⁸

El diagnóstico de la variedad M7 debe ser confirmado por la demostración ultraestructural de peroxidasa plaquetaria o por la detección de los antígenos plaquetarios CD41, CD42, CD61 y el relacionado con el factor VIII.^{1,8}

El IFC es útil además en la identificación de subgrupos de LA con pobre pronóstico.²¹ En nuestro estudio se encontró una mayor sobrevida en los pacientes con LLA de estirpe B en relación con los de estirpe T y mieloide, lo cual es similar a lo encontrado por otros autores.^{4,14-16}

La variedades de LLA pro-B, LLA-T(CD1-/CD3-) y LMA CD7⁺ se han identificado como las de peor pronóstico.^{1,9,19} En nuestro estudio se comprobó que dentro

de las LLA de estirpe B, las pro-B mostraron una menor sobrevida. La expresión de marcadores mieloides en la LLA del adulto se ha asociado con un pobre pronóstico; sin embargo, en niños esta correlación no ha sido demostrada,^{1,4,14,15,21} hecho que se pudiera explicar por la utilización de diferentes protocolos de tratamiento en estos 2 grupos etáreos.

En nuestro estudio, el IFC demostró ser útil para el diagnóstico y la clasificación de la LLA, de las variedades M0 y M7 de la LMA, de la LAH, así como para la identificación de grupos de peor pronóstico. Nuestros resultados demostraron que la incidencia de los distintos subtipos inmunológicos de LA y su relación con la sobrevida de los pacientes, es similar a la encontrada en la población caucásica en otras partes del mundo.

SUMMARY

Cell immunophenotyping (CIP) identifies the specific line of origin of leukemic cells and their maturing level. The frequency of the various immunological subtypes of acute leukemias (AL) and their possible relationship with global survival rate of patients were determined. One hundred and seventeen children with AL were studied from 1983 to 1999. The CIP was conducted through the immunocytochemical ultramicromethod and the alkaline phosphatase - anti-alkaline phosphatase method. Seventy seven (65,8%) of all AL were acute lymphoid leukemias (ALL), 26(22,2%) acute myeloid (AML), 9 (8%) undifferentiated AL, and 5 (4%) were hybrid AL. Fifty-nine (76,6%) ALL belonged to phenotype B and 18 (23,4%) to phenotype T. A higher survival rate was observed in phenotype B ALL patients than in phenotype T ALL and myeloid anemia patients, with a very significant difference ($p < 0,001$). Survival was also analyzed among the various types of phenotype B acute leukemias; a lower survival rate was observed in patients with more immature phenotypes.

Subject headings: IMMUNOPHENOTYPING; LEUKEMIA, MYELOID/diagnosis; LEUKEMIA, MYELOID/classification; LEUKEMIA MYELOID/immunology; LEUKEMIA, LYMPHOCYTIC/diagnosis; LEUKEMIA, LYMPHOCYTIC/classification; LEUKEMIA, LYMPHOCYTIC/immunology; MONOCLONAL ANTIBODIES/diagnostic use; SURVIVAL RATE; CHILD.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Dongen JJM, Adraansen HJ. Immunobiology of Leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, eds. Leukemia. 6 ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996.p.83-130.
2. Farhi DC, Rosenthal NS. Acute lymphoblastic leukemia. Clin Lab Med 2000;20(1):17-28.
3. Orfao A, Ciudad J, González M, López A, Abad M, Bouza P, et al. Flow cytometric in the diagnosis of cancer. Scand J Clin Lab Invest 1995;55(Supp 222):141-52.
4. Malta A, Baez F, Flores A, Ocampo E, Pacheco C, Biondi A, et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia. Int J Pediatr Hematol Oncol 1997;4:121-5.
5. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 1968;21(Supp 97):77-89.
6. Suárez L, Cruz C, Rivero RA. Ultramicrométodo inmunocitoquímico. Titulación de anticuerpos utilizados para el inmunofenotipaje celular. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1995;11(1):57-62.
7. Erber WN, Mason DY. Immunoalkalinephosphatase labelling of haematological samples. Technique and Applications. Leuk Res 1985;9:829-30.
8. Kalidi HS, Chang KL, Medeiros LJ, Brynes RK, Slovak ML, Murata- Collins JL, et al. Acute lymphoblastic leukemia. Survey of immunophenotype, French-American- British classification, frequency of myeloid antigen expression, and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. Am J Clin Pathol 1999;111(4):467-76.
9. Reading C, Estey E, Huh Y, Claxton D, Sánchez G, Terstappen L, et al. Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. Blood 1993;81(11):3083-90.
10. 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;62:16-21.
11. Bucheri V, Matutes E, Dyer MJS, Catovsky D. Lineage commitment in biphenotypic acute leukemia. Leukemia 1993;7:919-27.
12. Kaplan EL. Non parametric estimation for incomplete observations, J Am Stat Assoc 1958;53:457-81.
13. Harrington D, Fleming TR. A class of rank test procedures for censored survival data. Biometrika 1992;69:133.
14. 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;124:293-99.
15. Paredes R, Romero L López N, Bravo A, Correa C, Joly E, et al. Inmunofenotipo de la leucemia aguda linfoblástica en niños mexicanos. Sangre 1999;44(3):188-94.
16. Melnick SJ. Acute lymphoblastic leukemia. Clin Lab Med 1999;19(1):169-86.
17. Tiensiwakul P, Lertlum T, Nuchprayoon I, Seksam P. Immunophenotyping of acute lymphoblastic leukemia in pediatric patients by three color flow cytometric analysis. Asian Pac J Allergy Immunol 1999;17(1):17-21.
18. Burges R, Hansen-Hagge TE, Drexler HG, Gramatzki M. Heterogeneity of T-acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cell lines: suggestion for classification by immunophenotype and T-cell receptor studies. Leuk Res 1999;23:19-27.
19. Cascavilla N, Musto P, De Arena G, Ladogana S, Melillo L, Michele A, et al. Are "early" and "late" T-Acute lymphoblastic leukemias different diseases? A Single Center Study of 34 patients. Leuk Lymphoma 1995;21:437-42.
20. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnic HR, et al. Proposal for the classification of the acute leukaemias (FAB cooperative group). Br J Haematol 1976;33:451-8.
21. García JA, Monteserin MC, Delgado I, Benito L, Ona F. Aberrant immunophenotype detected by flow cytometric in acute lymphoblastic leukemia. Leuk Lymphoma 2000; 36(3-4):275-84.

Recibido: 11 de julio del 2001. Aprobado: 28 de septiembre del 2001.

Dra. *Vianed Marsán Suárez*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf. (537) 578262. Fax (537)33-8979. e-mail:ihidir@hemato.sld.cu