

Aplicación de la citometría de flujo en el diagnóstico inmunológico de los linfomas cutáneos T

Application of flow cytometry in the immunological diagnosis of cutaneous T-cell lymphomas

Lic. Bertha B. Socarrás Ferrer^I; Lic. Lázaro O. del Valle Pérez^I ; Dra. Vianed Marsán Suárez^I; Dra. Miriam Sánchez Segura^I; Lic. Ruby Alonso Ramírez^{II}; DraC. Consuelo Macías Abraham^{II}

^I Instituto de Hematología e Inmunología. Cuba.

^{II} Centro de Inmunología Molecular. Cuba.

RESUMEN

Se comunican las características inmunofenotípicas de 7 pacientes (5 del sexo masculino y 2 del femenino) con el diagnóstico clínico-morfológico de linfomas cutáneos de células T, atendidos en la consulta de Hematología del Instituto de Hematología e Inmunología. La edad de los pacientes osciló entre 17 y 88 años. El inmunodiagnóstico se realizó por inmunofluorescencia directa con un panel de anticuerpos monoclonales que incluyó marcadores linfoides B y T: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD22 y CD25. La lectura se realizó en un citómetro de flujo FaCScan (Becton-Dickinson). Cada marcador se consideró positivo si un porcentaje mayor al 20 % de los linfocitos expresaba el antígeno. Nuestros resultados mostraron que en la mayoría de los pacientes predominó el patrón general de los linfocitos T con función auxiliadora (CD3+, CD4+, CD8-). Se corrobora que la citometría de flujo es un procedimiento más rápido y menos laborioso que otros métodos de inmunofenotipaje celular, que nos permite un diagnóstico de certeza y la aplicación de una terapia efectiva.

Palabras clave: linfomas cutáneos T, citometría de flujo.

ABSTRACT

The immunophenotypic characteristics of 7 patients (5 males and 2 females) with clinicomorphological diagnosis of cutaneous T-cell lymphomas that received attention at the Hematology Department of the Institute of Hematology and Immunology were reported. The age of the patients ranged from 17 to 88 years old. The immunodiagnosis was obtained by direct immunofluorescence with a panel of monoclonal antibodies that included B and T lymphoid markers: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD22 and CD25. The reading was made in a FaCScan flow cytometer (Becton-Dickinson). Each marker was considered positive if a percentage over 20 % of the lymphocytes expressed the antigen. Our results showed the predominance in most of the patients of a general pattern of T-lymphocytes with auxiliary function (CD3+, CD4+, CD8-). It was corroborated that flow cytometry was a faster and less laborious method than other cellular immunophenotyping methods, and that it allowed to have an accurate diagnosis and to apply an effective therapy.

Key words: Cutaneous T-cell lymphomas, flow cytometry.

INTRODUCCIÓN

Los linfomas cutáneos (LC) son procesos linfoproliferativos malignos cuyo órgano diana es la piel, y según su origen se clasifican en T o B.¹⁻³

La incidencia global de los linfomas cutáneos de células T (LCCT) es de alrededor de 0,36 casos por 100 000 habitantes al año, lo que constituye una proporción pequeña dentro de los linfomas no hodgkinianos.^{4,5} Estas neoplasias aparecen fundamentalmente entre los 45 y los 65 años y son 2,2 veces más frecuentes en el sexo masculino que en el femenino. Las presentaciones clínicas más reportadas son la micosis fungoides (MF) y el síndrome de Sézary (SS).⁵⁻⁹

La MF es la forma más común de LCCT y a la vez, es la que presenta mayores dificultades diagnósticas, particularmente en la fase inicial de su desarrollo. Su incidencia es de 0,29 casos por 100 000 habitantes al año y su etiopatogenia se desconoce.^{10,11}

Por otro lado, el síndrome de Sézary es considerado como la expresión leucemizada de la MF; se caracteriza por eritrodermia, poliadenopatías y elevado número de linfocitos atípicos en sangre periférica (células de Sézary). Otras manifestaciones clínicas que se pueden presentar son: hiperpigmentación progresiva, hiperqueratosis palmoplantar y pérdida de pelos y uñas.^{3,12}

Tradicionalmente, el diagnóstico de cualquier lesión cutánea está basado en criterios clínicos e histopatológicos. Ninguno de estos criterios es absoluto, de ahí que se destaque la trascendencia de los estudios citogenéticos, inmunológicos y moleculares para un diagnóstico de certeza y pronóstico de la enfermedad, por lo que nos propusimos aplicar la citometría de flujo para el inmunodiagnóstico de 7 pacientes con LCCT atendidos en la consulta de Hematología del Instituto de Hematología e Inmunología.

MÉTODOS

Se estudiaron 7 pacientes (5 del sexo masculino y 2 del femenino) con un rango de edad que osciló entre 17 y 88 años, con diagnóstico clínico-morfológico LCCT. Las muestras se obtuvieron de sangre periférica y se depositaron en tubos con EDTA al 10 %.

Marcadores inmunológicos

El estudio inmunofenotípico se realizó por un método de inmunofluorescencia directa con un panel de anticuerpos monoclonales (AcMo) que detectan antígenos en linfocitos B y T. El análisis se realizó por citometría de flujo en un FaC Scan (Becton-Dickinson, EE.UU.) mediante el examen de la reacción con los AcMo en la ventana de la población linfoide.¹³ El panel utilizado incluyó: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD22 y CD25. Algunos AcMo estaban conjugados con ficoeritrina (RPE) y otros con isotiocianato de fluoresceína (FITC) ([tabla 1](#)). Todas las muestras fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 1 %. La lectura se realizó mediante la adquisición de 10 000 células en cada tubo. Cada marcador se consideró positivo si un porcentaje superior al 20 % de los linfocitos expresaban el antígeno.

RESULTADOS

La distribución de los casos diagnosticados con LCCT se describe en la [tabla 2](#). En la mayoría de los pacientes predomina el patrón general de los linfocitos T con función auxiliar CD3₊, CD4₊, CD8₊ (71,40 %). En la minoría (1 paciente) se expresan los marcadores con función citotóxica CD3₊, CD4₋, CD8₊ (14,3%). Un caso diagnosticado con SS mostró predominio de linfocitos T CD4₊ (14,3%). Hay otros marcadores con fines diagnósticos de células T como CD5 y CD7, que fueron variablemente positivos. Los marcadores B (CD19, CD22) y el de activación CD25 resultaron negativos en la población celular T.

DISCUSIÓN

Los LCCT constituyen un grupo de enfermedades neoplásicas caracterizado por infiltrados de células T malignas; dentro de estos se encuentran la MF y el SS, que son entidades que aunque difieren en sus manifestaciones clínicas se cree que son variantes de un mismo trastorno linfoproliferativo del linfocito T CD4.

El estudio inmunofenotípico en sangre periférica mostró la presencia de linfocitos T con predominio de T cooperadores CD3₊, CD4₊, CD8₊ y en el caso del paciente con SS, se apreciaron cifras de CD4 superiores al 90 % y disminución de las células CD3. Estos resultados corroboraron lo planteado por otros investigadores.^{4,5,14}

Un adecuado tratamiento depende de un diagnóstico de certeza morfológico, citogenético, inmunológico y molecular. En la actualidad se utiliza la aplicación intravenosa de anticuerpos monoclonales contra antígenos de diferenciación de células T y se trabaja en proposiciones experimentales para el tratamiento de los linfomas cutáneos que incluyen vacunación, terapia génica y trasplante autólogo de células madre,^{15,16} lo que permitiría una rápida curación, una mayor supervivencia y la incorporación de estos individuos a la vida útil de la sociedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jahn S, Asadullah K, Walden P, Steny W. Cutaneous malignant lymphomas. *Immunol Today* 1998;19:70-3.
2. Landis S, Murray T. Bolden Statistics 1998. *Cancer J Clin* 1998;48:6-29.
3. Faxas ME. Actualidad clínica biológica de los linfomas T cutáneos. *Rev Cubana Med* 2003;42:72-8.
4. Vieites B, Suárez JM. Linfomas cutáneos de células T. Revisión de los aspectos histopatológicos más relevantes. *Rev Española Pat* 2004;37:1-35.
5. Socarrás BB, del Valle LO, Marsán V, Macías C. Linfomas cutáneos. Aspectos relevantes. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2005;21(1) (citado el 14 de junio 2007). Disponible en:
www:<http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci.arttex&pid=S0864.0289200500010001&ing=es&nrm=iso>.ISSN
6. Vinogradova IE, Giliazitdinova EA, Zamulaeva IA, Zybunova EE, Kaplanskaia IB, Kranvchenko SK, et al. Clinicomorphological characteristics of Sezary`s disease and mycosis fungoides. *Ter Arkh* 2005;77:61-5.
7. Weiroch MP, Cornillet P, Perceau G, Durlach A, Bernard P. Frequency of associated malignancies in cutaneous lymphoma. A retrospective study of 86 ases. *Ann Dermatol Venezol* 2004;131:339-45.
8. Melnyk A, Rodríguez A, Pugh WC. Evaluation of the revised European-American by lymphoma classification confirms the clinical relevance of immunophenotype in 560 cases of aggressive primary cutaneous lymphoma study group of the European organization for research and treatment of cancer. *Blood* 1997;89:4514-20.
9. Liu V, McKee PH. Cutaneous T-cell lymphoproliferative disorders. Approach for the surgical pathologist: Recent advances and clarification of confused issues. *Adv Anat Pathol* 2002;2:79-100.
10. Rafficiaer E, Deisol G, Willemze R, Jaffe ES. Primary cutaneous CD30 positive T-cell lymphoproliferative disorders. En: Jaffe ES, Lee Harris N, Stein H, Vardiman IW. *Who classification tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press; 2001. pp. 221-4.
11. Kotz EA, Anderson D, Thiers BH. Cutaneous T-cell lymphoma. *J Eu Acad Dermatol Venereol* 2003;17:131-7.
12. Kuzel TM. System chemotherapy for the treatment of mycosis fungoides and Sezary Syndrome. *Dermatol Ther* 2003;16:355-61.
13. Simsir A, Fetsch P, Steter-Stevenson M, Abati A. Immunophenotypic analysis of non-Hodgkin`s lymphomas in cytologic specimens: A correlative study of immunocytochemical and flow cytometric technique. *Diag Citopath* 1999;20:279-84.

14. Fierro MT, Novetti M, Savola P. CD45 RA+ Immunophenotype in mycosis fungoides: Clinical, histological and immunophenotypical features in 22 patients. *J Cutan Pathol* 2001;28:356-62.

15. Jones D, Duvic M. The current state and future of clonality studies in mycosis fungoides. *J Invest Dermatol* 2003;121:8-10.

16. Prince HM, McCormack C, Ryan G, O`Keefe R, Seymour JF, Baker C. Management of the primary cutaneous lymphomas. *Australas J Dermatol* 2003;44:227-40.

Recibido: 15 de diciembre del 2007.

Aprobado: 3 de enero del 2008.

Lic. *Bertha B. Socarrás Ferrer*.

Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, Ciudad de La Habana, CP 10800, Cuba. Tel (537) 6438268, 6438695, 6434214. Fax (537) 6442334. e-mail: ihidir@hemato.sld.cu

Tabla 1. Panel de anticuerpos monoclonales (AcMo) utilizados en la citometría de flujo

Antígeno	Clon	Productor
CD2 RPE	T11	Coulter
CD3 FITC	UCHT ₁	Dako
CD4 FITC	Leu-3A	Becton-Dickinson
CD5 RPE	DK 23	Dako
CD7 RPE	3 A1	Coulter
CD8 RPE	DK25	Dako
CD19 RPE	Leu-12	Becton-Dickinson
CD22 RPE	4KB 128	Dako
CD25 RPE	IL-2R	Becton-Dickinson

Tabla 2. Inmunofenotipaje celular en los linfomas cutáneos T

Formas clínicas	Marcadores de membrana (distribución por paciente)									
	CD2	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8	CD19	CD22	CD25	%
MF (predominio CD4+)	7/5	7/5	7/5	7/3	7/1	7/0	7/0	7/0	7/0	71,4
MF (predominio CD8+)	7/1	7/1	7/0	7/0	7/1	7/1	7/0	7/0	7/0	14,3
SS (Predominio CD4+ >90 %)	7/1	7/1	7/1	7/1	7/0	7/0	7/0	7/0	7/0	14,3

MF: micosis fungoides; SS: síndrome de Sézary.