

Validación del ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ) para el inmunofenotipaje de la leucemia linfocítica aguda pediátrica

Validation of immunocytochemical ultramicromethod (UMICIQ) for immunophenotyping of pediatric acute lymphoid leukemia

Dra. Vianed Marsán-Suárez,^I Lic. Lázaro del Valle-Pérez,^I Lic. Berta B. Socarrás-Ferrer,^I Dra. Miriam Sánchez-Segura,^I Dra.Cs. Consuelo Macías-Abraham,^I Dra.Cs. Zaima Mazorra-Hererra,^{II} Dra. Rosa M. Lam-Díaz^I

^I Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

^{II} Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar el ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ) con la citometría de flujo (CMF), para el diagnóstico inmunológico de la leucemia linfocítica aguda (LLA) pediátrica. Se procesó la médula ósea de 30 pacientes con LLA y se utilizó un panel mínimo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos expresados por las células B (CD10, CD19 y CD20), las células T (CD2, CD3 y CD7) y las mieloides (CD13). Los resultados de este estudio demostraron que ambos métodos permiten identificar la línea de origen de las células leucémicas, el nivel de maduración y su clasificación en diferentes subtipos inmunológicos. Tanto el UMICIQ como la CMF mostraron una alta sensibilidad y especificidad. Este estudio permitió validar el diagnóstico inmunológico de la LLA pediátrica por el UMICIQ mediante la CMF, tecnología de avanzada, altamente automatizada y utilizada internacionalmente para el inmunofenotipaje (IFC) celular de hemopatías malignas y de esta forma, demostró que las técnicas inmunocitoquímicas continúan siendo muy útiles para el IFC de neoplasias hematológicas y en particular, de la LLA.

Palabras clave: leucemia linfocítica aguda, inmunofenotipaje celular, inmunocitoquímica, citometría de flujo.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the immunocytochemical ultramicromethod (UMICIQ) with flow cytometry (CMF) for the immunological diagnosis of pediatric acute lymphocytic leukemia (ALL). Bone marrow from 30 patients with ALL was processed and a minimal panel of monoclonal

antibodies directed against antigens expressed on B cells (CD10, CD19 and CD20), T cells (CD2, CD3 and CD7), and myeloid (CD13) was used. The results of this study showed that both methods can identify the origin line of leukemia cells, the level of maturity and their classification in different immunological subtypes. Both UMICIQ and CMF showed high sensitivity and specificity. This study validated the immunological diagnosis of pediatric ALL by UMICIQ using CMF, which is an advanced, highly automated technology internationally used for immunophenotyping (IFC) cell hematological malignancies. Thus, it was demonstrated that immunocytochemical techniques remain very useful for IFC hematological malignancies and particularly in ALL.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, cell immunophenotyping, immunohistochemistry, flow cytometry.

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfocítica aguda (LLA) es la neoplasia más frecuente en la niñez con una incidencia anual de 3-4 casos por cada 100 000 niños menores de 15 años.¹ Se caracteriza por una expansión clonal de precursores linfocíticos transformados, en diferentes estadios de maduración.²

La utilización de técnicas de inmunofenotipaje celular (IFC) en la LLA, permite diferenciar las células blásticas de sus contrapartes normales, la línea específica de origen, el nivel de maduración y en algunos casos, la clonalidad del proceso.³⁻⁷

El análisis de los marcadores antigénicos en la LLA, puede realizarse sobre células frescas o permeabilizadas en suspensión y fijadas en preparaciones previamente centrifugadas, extendidas o sobre secciones de tejidos.^{5,6}

En las técnicas inmunocitoquímicas (ICQ), los anticuerpos monoclonales (AcMo) son conjugados a enzimas, fundamentalmente fosfatasa alcalina y peroxidasa. Estas técnicas son muy útiles cuando se desea estudiar antígenos intranucleares y citoplasmáticos, mediante el uso de detergentes no iónicos como el BRIJ 56, que facilita la penetración de los AcMo, sin causar daño a la estructura del antígeno.⁶

Además, dado que las preparaciones celulares o citopreparados pueden conservarse en condiciones apropiadas por largo tiempo, permiten realizar un análisis retrospectivo sin que se pierdan las características que identifican a las células marcadas y de esta forma, reclasificar a las neoplasias hematológicas.^{5,6}

Pueden aplicarse en preparados de médula ósea (MO) obtenidos por punción o biopsia con un número escaso de células, como ocurre en ciertos aspirados medulares, por ejemplo, en la fibrosis medular. Facilitan visualizar las células por microscopio óptico, observando simultáneamente la morfología celular y la expresión de determinados antígenos celulares y emplean AcMo en diluciones altas, lo que contribuye al ahorro de este recurso altamente costoso.⁶

Por su parte, la citometría de flujo (CMF) emplea AcMo conjugados a fluorocromos que son detectados y visualizados mediante un sistema informático apropiado y de forma rápida.⁷

Esta técnica presenta múltiples ventajas frente al uso del microscopio de fluorescencia y de las técnicas ICQ, entre las que se encuentran: analizar un elevado número de partículas en suspensión en un corto período (5 000 partículas/s); ofrecer información simultánea de varios parámetros,

como el tamaño y la complejidad celular, de una manera objetiva y precisa en un gran número de células.⁸

Permite identificar paralelamente antígenos de superficie y citoplasmáticos, cuantificar la intensidad antigénica por medio de los canales medios de fluorescencia, emplear múltiples marcajes y de esta manera, detectar la coexpresión de antígenos aberrantes sobre el mismo blasto.⁹

La CMF posee una sensibilidad superior a 1×10^{-4} , es decir, es capaz de detectar una célula tumoral entre 10 000 células normales.⁷⁻⁹

Entre las desventajas de la CMF se encuentran: su incapacidad para diferenciar en muestras que contienen un número reducido de células, las células normales de los blastos leucémicos y debido a la necesidad de utilizar una suspensión celular, hace que se pierda información sobre la arquitectura de los tejidos celulares, así como la interacción entre estas y el medio que las rodea.¹⁰

El ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ) fue desarrollado en Alemania por *Kranz y Thierfelder*¹¹ e introducido en Cuba por *Rivero* y otros,¹² para la cuantificación de subpoblaciones linfocitarias. Este método combina el uso de células con carga eléctrica negativa unidas electrostáticamente a láminas con múltiples sitios de reacción recubiertos por poli-L-lisina con carga positiva, seguido de una reacción inmunocitoquímica muy sensible, en que se emplean AcMo y un antisuero conjugado con peroxidasa. Fue modificado posteriormente por *Cruz* y otros,¹³ al sustituir en la fijación celular el glutaraldehído por el formaldehído, lo que incrementó la sensibilidad para la detección de algunos antígenos celulares, como: CD2, CD4 y CD16.

El UMICIQ se ha empleado fundamentalmente para la clasificación inmunológica y pronóstico de los síndromes linfoproliferativos y mieloproliferativos agudos y crónicos y en el diagnóstico de inmunodeficiencias celulares primarias y secundarias, como el SIDA.^{14,15}

El objetivo de este trabajo fue comparar el UMICIQ con la CMF para el IFC de la LLA pediátrica.

MÉTODOS

Se estudiaron 30 pacientes pediátricos con LLA diagnosticados en el Instituto de Hematología e Inmunología, en el periodo comprendido desde marzo de 2007 hasta diciembre de 2009.

El IFC de muestras procedentes de la MO se llevó a cabo paralelamente por el UMICIQ y por la CMF, con la utilización de un panel mínimo de AcMo dirigidos contra antígenos expresados por las células B (CD10, CD19 y CD20), las células T (CD2, CD3 y CD7) y las mieloides (CD13).

Para la CMF fue empleada similar batería de AcMo conjugados con ficoeritrina. La lectura se realizó en un FaCScan (*Becton Dickinson*, Estados Unidos), mediante la adquisición de 100 000 células por cada tubo.

Se consideró positivo para ambos métodos (UMICIQ y CMF), si el porcentaje fue igual o mayor al 20 % de los blastos que expresaron el antígeno.

Se determinaron las pruebas diagnósticas simples de sensibilidad, especificidad, índice de validez, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y prevalencia, para cada uno de los diferentes antígenos estudiados, tanto por el UMICIQ como por la CMF, con un intervalo de confianza de 95 %.^{16,17}

RESULTADOS

En los pacientes con LLA estudiados predominó el sexo masculino (70 %) sobre el femenino (30 %); la edad promedio fue de 6,1 años con un rango entre 4 meses - 17 años.

El IFC realizado tanto por el UMICIQ como por la CMF, mostró que 26 enfermos (86,7 %) presentaron LLA de fenotipo B común, uno pro-B, uno T (3,3 respectivamente), y 2 (6,7 %) expresaron antígenos de ambos linajes linfoides B y T y fueron clasificadas como leucemias agudas híbridas (LAH). En 4 pacientes (15,4 %) con fenotipo B común, se encontró, además, la expresión del antígeno mielóide CD13 y fueron diagnosticadas como LLA-común Mi+.

El UMICIQ mostró una sensibilidad y un valor predictivo negativo (VPN) de 100 % para todos los antígenos estudiados; una especificidad, índice de validez (IV) y valor predictivo positivo (VPP) de 100 % para los antígenos CD2, CD3, CD10, CD13 y CD20, respectivamente. Para el antígeno CD7 mostró una especificidad de 95,24 % y VPP de 90 %. Para el CD19 una especificidad de solo 50 % y VPP del 96,55 %. El IV fue similar para estos 2 antígenos (96,67 %). La prevalencia mayor se encontró para el antígeno CD10 (96,67 %) y menor para el CD2 (6,90 %) (tabla).

Tabla. Evaluación del ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ) para el inmunofenotipaje celular de la leucemia linfóide aguda pediátrica

Pruebas diagnósticas simples	Antígenos (%)						
	CD2	CD3	CD7	CD10	CD19	CD20	CD13
Sensibilidad	100	100	100	100	100	100	100
Especificidad	100	100	95,24	100	50	100	100
Índice de validez	100	100	96,67	100	96,67	100	100
Valor predictivo positivo	100	100	90	100	96,55	100	100
Valor predictivo negativo	100	100	100	100	100	100	100
Prevalencia	6,90	10	30	96,67	93,33	60	13,33

Nivel de confianza: 95 %.

DISCUSIÓN

Los resultados de la distribución de los pacientes según edad y sexo fueron similares a los encontrados por otros autores.¹⁸⁻²⁰

La mayoría de los pacientes con LLA de estirpe B presentaron el fenotipo común, lo que confirma la conocida preponderancia de este subtipo inmunológico en la infancia.²¹⁻²⁵

Actualmente, el mejor criterio para establecer el diagnóstico de LAH es el IFC de los elementos blásticos, al demostrar la coexpresión de antígenos de más de un linaje celular.⁴ En los 2 enfermos diagnosticados con esta variedad inmunológica se encontraron antígenos de ambas líneas linfoides B y T, que morfológicamente se observaron como una única población de blastos linfoides.

Los resultados de este estudio demostraron que ambos métodos permiten identificar la línea de origen de las células leucémicas, el nivel de maduración y su clasificación en diferentes subtipos inmunológicos.

El UMICIQ mostró una alta sensibilidad para todos los antígenos estudiados, los que fueron identificados de forma correcta. La especificidad fue también alta para la mayoría de los antígenos, excepto para el antígeno CD19 (50 %), lo cual no impidió la clasificación inmunológica de la LLA de fenotipo B, al estar incluidos en la batería otros 2 AcMo dirigidos contra antígenos linfoides B: CD20 y CD10.

Este estudio permitió validar el diagnóstico inmunológico de la LLA pediátrica por el UMICIQ mediante la CMF, tecnología de avanzada, altamente automatizada, utilizada internacionalmente para el IFC de hemopatías malignas y de esta forma, demostró que las técnicas ICQ continúan siendo muy útiles para el IFC de neoplasias hematológicas, sobre todo en países en desarrollo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr.Cs. *Antonio Bencomo Hernández* por su valioso aporte en la revisión minuciosa del manuscrito de este artículo científico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Farhi DC, Rosenthal NS. Acute lymphoblastic leukemia. Clin Lab Med. 2000 Mar;20(1):17-28. PMID: 10702893.
2. Svarch E, González A, Vergara B, Campos M, Dorticós E, Espinosa E, et al. Tratamiento de las leucemias en Cuba (1973-1995). Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 1997;12(2):1-7.
3. Garand R, Robillard N. Immunophenotype characterization of acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders practical recommendations and classifications. Hematol Cell Ther. 1996 Dec;38(6):471-86. PMID: 9030960.
4. Mauer AM. Acute lymphocytic leukaemia. En: Beutler E, Lichtman M, Coller B, Kipps T, editors. Williams Hematology. 5ª ed. New York: Mc Graw-Hill; 1995. p. 1004-5.
5. Gluzman D, Nadgornava V, Sklvareko L, Zavelevgch M, Koval S, Poludnenko L, et al. Study of morphocytochemical and immunophenotypic features of acute leukemia stem cells. Exp Oncol. 2008 Jun;30(2):102-5. PMID: 18566571.
6. Díaz N, Lardo M, Romero J, Merelli A, Carbia C, Sánchez J. Immunocytochemistry techniques for the diagnosis of hematologic neoplasms. Medicina. 1999;59(1):11-6. ISSN 0025-7680.
7. Drenon B, Fardel O, Fauchet R, Amiot J. Flow cytometry: application for the diagnosis and the follow-up of hematological malignancies. Ann Biol Clin. 2002 Nov-Dec;60(6):663-72. PMID: 12446230.
8. Pagnucco G, Vanelli L, Gervasi F. Multidimensional flow cytometry immunophenotyping of hematologic malignancy. Ann N Y Acad Sci. 2002 Jun;963:313-21.

9. Vogt RF Jr, Whitfield WE, Henderson LO, Hannon WH. Fluorescence intensity calibration for immunophenotyping by flow cytometry. *Methods*. 2000 Jul;21(3):289-96.
10. Paredes-Aguilera R, Romero-Guzmán L, López-Santiago N, Burbano-Ceron L, Camacho-Del Monte O, Nieto-Martínez S. Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in the diagnosis of acute leukemia. *Am J Hematol*. 2001 Oct;68(2):69-74.
11. 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.
12. 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 Ene-Jun;11(1):46-56.
13. Cruz C. 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 Ene-Jun;11(1):71-2.
14. Marsán V, Macías C, Rivero R, Sánchez M, Socarrás B, Gramatges A, et al. Inmunofenotipaje y supervivencia global de pacientes pediátricos con leucemias agudas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2002;18(1):34-40.
15. Cruz C, Pérez L, Rivero RA, González CM, 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.
16. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 3rd ed. Boston: PWS Kent Publishing Company; 1990.
17. Altman DG. *Practical statistics for medical research*. London: Champan & Hall; 1991.
18. Pui CH, Behm FG, Crist WM. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993 Jul 15;82(2):343-62.
19. Buckley JD, Buckley CM, Ruccione K, Sather HN, Waskerwitz MJ, Woods WG, et al. Epidemiological characteristics of childhood acute lymphocytic leukemia. Analysis by immunophenotype. The Childrens Cancer Group. *Leukemia*. 1994 May;8(5):856-64.
20. Ng SM, Lin HP, Ariffin WA, Zainab AK, Lam SK, Chan LL. Age, sex, haemoglobin level, and white cell count at diagnosis are important prognostic factors in children with acute lymphoblastic leukemia treated with BFM-type protocol. *J Trop Pediatr*. 2000 Dec;46(6):338-43.
21. Marsán V, Sánchez M, Socarrás B, Martínez M, Cos Y, del Valle L, et al. Leucemia linfoide aguda común. Inmunofenotipo, características clínicas y de laboratorio. Estudio de 87 niños. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. [serie en Internet]. 2004 Ago [citado 2011 Jun 30]; 20(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892004000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
22. Van Dongen J, Adriaasen HJ. Immunobiology of leukemia. En: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, editors. *Leucemia*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p. 83-130.
23. Behm F, Campana D. Immunophenotypic. En: Pui CH, editor. *Childhood Leukemias*. New York: Cambridge University Press; 1991. p. 111-36.

24. Orfao A, Ramudo L, López A, Rivas R, González M, Flores J, et al. Inmunofenotipaje de hemopatías malignas: de la investigación básica a la práctica asistencial. *Haematológica*. 2008;93(Extra 1):79-93.

25. Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia. *J Immunol Methods*. 2000 Sep 21;243(1-2):59-75.

Recibido: 15 de junio del 2012.

Aprobado: 15 de julio del 2012.

Dra. *Vianed Marsán-Suárez*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800. La Habana, Cuba. Tel (537) 643 8695, 643 8268, Fax (537) 644 2334. Correo electrónico: rchematologia@infomed.sld.cu. Website: <http://www.sld.cu/sitios/ih>