

Caracterización inmunofenotípica de leucemia aguda. Análisis de 257 casos

Lucero G^{*}, Luna N^{*}, Amoroso Copello MP^{##},
Alcón Alvarez M^{*}, Caviglia D[#], Dibar E^{**},
Fantl D^{**}, Makiya M^{**}, Musso A^{*}, Nucifora E^{**},
Penchasky D^{**}, Precerutti A^{**}, Richard L⁺,
Santos I^{*}, Viñuales E^{**}, Koziner B^{*}.

**Unidad de Investigaciones Oncobematológicas-Oncolab, ##Hospital Francés,
#Hospital Militar Central, @Sanatorio San Patricio,
**Hospital Italiano, +Sanatorio Jockey Club.*



ARTICULO
ORIGINAL

HEMATOLOGIA, Vol. 2 N° 1: 13-18
Enero - Abril

INTRODUCCION

El análisis inmunofenotípico, junto con los estudios morfológicos y citoquímicos, se aplica de rutina en la caracterización de las leucemias agudas. La fenotipificación inmunológica no sólo permite asignar linaje a los blastos leucémicos sino también definir subtipos inmunológicos en leucemia linfoblástica aguda (LLA) (1-4), caracterizar a blastos mieloides con diferenciación mínima (5), y reconocer leucemias de fenotipo atípico y bifenotípicas verdaderas (6-11).

El empleo de un gran número de anticuerpos monoclonales y de la citometría de flujo ha permitido conocer la gran heterogeneidad inmunofenotípica que presenta la leucemia aguda.

En el presente trabajo reportamos los hallazgos inmunofenotípicos de los blastos de 257 pacientes con diagnóstico de leucemia aguda y la incidencia de cada uno de los subtipos inmunológicos identificados.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes

Entre mayo de 1992 y julio de 1997 se remitieron a nuestro laboratorio las muestras de médula ósea o sangre periférica heparinizadas de 257 pacientes con leucemia aguda de novo para caracterización inmunofenotípica.

195 pacientes fueron adultos (≥ 15 años) y 62 pediátricos. (Rango de edad: 3 meses a 84 años).

Se utilizaron para la clasificación los criterios diagnósticos propuestos por el Grupo Francés-Americano-Británico (FAB) (12).

INMUNOFENOTIPIFICACION

Se purificaron las células mononucleares en gradientes de densidad de Ficoll-Hypaque.

Con una fracción de las células lavadas se confeccionaron citocentrifugados utilizando una citocentrífuga Cytospin II (Shandon) para determinaciones citoquímicas, morfológicas, detección de antígenos citoplasmáticos (CD3c, CD22c, CD13c) y mieloperoxidasa (MPO) por método inmunológico.

Para la detección de antígenos citoplasmáticos en citocentrifugados se utilizó la técnica de fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (FAAFA) (13). Esta técnica también se empleó para confirmar la positividad a glicoproteínas plaquetarias por citometría de flujo para descartar falsos positivos por adhesión de plaquetas (14).

Para la inmunomarcación y análisis por citometría, las células fueron resuspendidas en PBS y tratadas con suero de cabra al 10%, inactivado por calor, para prevenir la unión inespecífica.

La inmunofenotipificación de membrana se realizó en un equipo Profile II (Coulter) analizando 5000 a 10.000 eventos para cada anticuerpo monoclonal. Se utilizó el siguiente panel de anticuerpos monoclonales empleando tinciones dobles: HLA-DR, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14, CD19, CD22, CD33, CD34 (QBend-10 Immunotech), CD41, CD61, Glicoforina A.

Las leucemias fueron clasificadas como positivas para el antígeno si 20% o más de las células eran positivas en el análisis.

En los casos de fenotipo atípico, la coexpresión fue confirmada por doble tinción directa (isotiocianato de fluoresceína/ficoeritrina).

Método estadístico

Las asociaciones entre la expresión de antígenos de superficie fue estudiada usando el test del chi cuadrado. Fue considerado significativo el valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

De los 257 casos de leucemia aguda, 150 casos (58.4%) correspondieron a leucemia mieloide aguda, 95 casos (36.9%) a LLA, 10 casos (4.0%) a leucemia bifenotípica y 2 casos (0.7%) a leucemia aguda indiferenciada.

Leucemia mieloide aguda (LMA)

137 casos (91.4%) correspondieron a pacientes adultos y 13 casos (8.6%) a pacientes pediátricos.

La Tabla 1 muestra la clasificación de las LMA según FAB.

Tabla 1- Distribución de subtipos FAB en LMA

FAB	Nº de pacientes	Incidencia(%)
M0	16	10.7
M1	43	28.7
M2	28	18.7
M3	11	7.3
M4	28	18.7
M5	14	9.3
M6	3	2.0
M7	6	4.0
L.a mas-toblasto	1	0.7

La expresión de los antígenos mieloides fue de 76.4% (113 de 148 casos) para CD13, 77.7% para CD33 (115 de 148 casos), y 28.6% para CD14 (42 de 147 casos) (Tabla 2).

60 % de los casos reaccionaron con CD13 y CD33 y 96.0% de los casos fueron positivos o bien para CD13 o para CD33. 4 de los 6 casos negativos a CD13 y CD33 fueron mieloperoxidasa positivos (2 M1 y 2 M2), 1 caso correspondió a M5 (CD14 y alfa-naftila-

Tabla 2- Características inmunofenotípicas en LMA según FAB

FAB	HLA-DR	CD13	CD14	CD33	CD34
M0(n=16) (%>20%)	13/16 (81.3%)	14/16 (87.5%)	0/16 (0%)	13/16 (81.3%)	12/14 (85.7%)
M1(n=43)	36/43 (83.7%)	32/43 (74.4%)	5/43 (11.6%)	33/43 (76.7%)	27/39 (69.2%)
M2(n=28)	18/28 (64.3%)	18/28 (64.3%)	2/28 (7.1%)	21/28 (75.0%)	12/23 (52.2%)
M3(n=11)	0/11 (0%)	11/11 (100%)	1/11 (0.9%)	11/11 (100%)	1/8 (12.5%)
M4(n=28)	28/28 (100%)	24/27 (88.9%)	20/27 (74.1%)	21/28 (75.0%)	12/26 (46.2%)
M5(n=14)	14/14 (100%)	9/14 (64.3%)	13/14 (92.8%)	13/14 (92.8%)	3/14 (21.4%)
M6(n=3)	1/3 (33.3%)	2/3 (66.7%)	0/3 (0%)	2/3 (66.7%)	0/3 (0%)
M7(n=6)	3/5 (60.0%)	3/6 (50.0%)	1/5 (20.0%)	1/5 (20.0%)	3/5 (60.0%)
TOTAL (n=149) %>20%	113/148 (76.4%)	113/148 (76.4%)	42/147 (28.6%)	115/148 (77.7%)	73/132 (55.3%)

cetoesterasa positivo) y el otro caso a una M6 (Glicoforina A +).

El antígeno HLA-DR se detectó en el 76.4% de los casos.

La negatividad a HLA-DR característico de la LMA-M3, se observó también en otros subtipos, siendo más frecuente en M2. La expresión de CD34 fue del 55.3%. La positividad a CD34 se observó no sólo en M0, M1 y M2 sino también en M4 y M5.

La expresión atípica de antígenos linfoides fue detectada en los blastos del 28.2% de los casos. El antígeno CD7 fue el más frecuente y se observó en 20 de 93 casos estudiados (21.5%).

Los casos de LMA CD7 positivos correspondieron frecuentemente a M0/M1 (60%) y a M4 (20%) (Tabla 3).

Tabla 3-Distribución en subtipos FAB de las LMA-CD7+

LMA-CD7+(n=20)							
M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
4/20 (20.0%)	8/20 (40.0%)	2/20 (10.0%)	0/20 (0%)	4/20 (20.0%)	2/20 (10.0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)

Las LMA-CD7+ mostraron una diferencia significativa con respecto a las LMA-CD7- en los porcentajes de positividad a HLA-DR ($p < 0.01$) y una mayor tendencia, si bien no significativa, a expresar el antígeno CD34 (70.0% vs. 55.0%) (Tabla 4).

Tabla 4- Características fenotípicas de LMA-CD7+ y LMA-CD7-

	HLA-DR	CD13	CD33	CD34
LMA-CD7+	95.0%	85.0%	90.0%	70.0%
LMA-CD7-	62.5%	82.1%	85.0%	55.0%
	$p < .01$	$p > 0.5$	$p > 0.5$	$p = 0.5-0.25$

Los antígenos linfoides CD2, CD19, y CD10 se detectaron en el 4.1%, 1.3% y 1.3% de los casos respectivamente.

La leucemia a mastoblastos fue negativa para HLA-DR, CD34 y CD14, positiva para CD13 Y CD33 y mostró coexpresión de los antígenos CD4 y CD25.

Leucemia linfoblástica aguda

Los fenotipos de LLA fueron clasificados en los siguientes subtipos principales: LLA de célula B temprana (HLA-DR+, CD19+) LLA-común (LLA-c) (CD19+, CD10+), LLA-B (IgS+), y LLA-T (Pre-T o T).

No se analizó el subtipo de LLA pre-B pura, dado que la expresión de la inmunoglobulina citoplasmática investigada a partir de diciembre de 1994, fue realizada en sólo 46 de los 95 casos presentados.

De los 95 casos de LLA, 46 (48.4%) correspondieron a pacientes adultos (≥ 15 años) y 49 casos

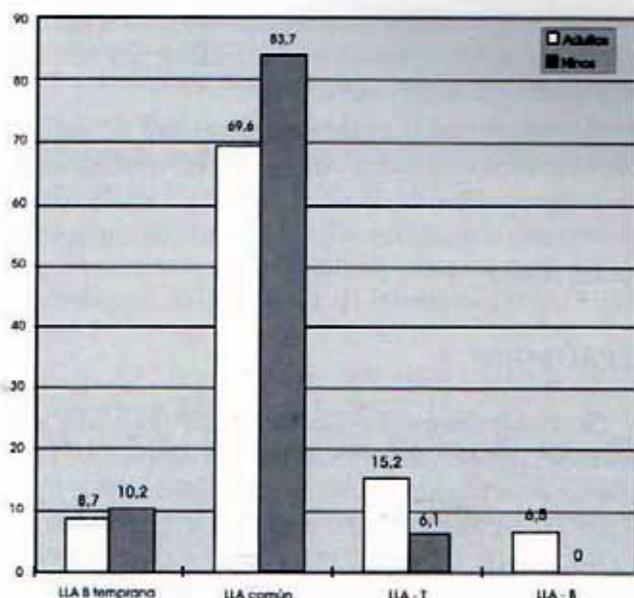


Figura 1. Subgrupos inmunofenotípicos de LLA

(51.6%) a pacientes pediátricos.

El 90.5% (86 de 95 casos) fueron de línea B y el 9.5% (9 de 95 casos) de línea T.

Se analizaron las características inmunofenotípicas subdividiendo a los pacientes de acuerdo a la edad.

La Figura 1 ilustra la incidencia de subgrupos inmunofenotípicos en niños y adultos con LLA.

La incidencia de los subtipos inmunofenotípicos en adultos fue de 8.7% para la LLA-B temprana, 69.6% para la LLA-c, 6.5% para la LLA-B y 15.2% para la LLA-T.

En niños la incidencia fue de 10.2% para la LLA-B temprana, 83.7% para la LLA-c, y 6.1% para la LLA-T. No se observó ningún caso de LLA-B en esta serie.

Estos datos muestran una mayor incidencia de LLA-c en los niños (83.7% vs. 69.6%). También se observó una más alta incidencia de LLA-T en adultos que en niños (15.2 vs. 6.1%).

Todos los casos fueron positivos para HLA-DR y la expresión del antígeno CD19 fue del 98.8% (85/86).

La expresión de CD34 fue del 65.2% en LLA de línea B, no observándose diferencias significativas entre niños y adultos (63.9% vs. 66.7%).

En LLA-T la expresión de CD34 fue de 22.2% (2 de 9 casos).

La Tabla 5 muestra las características inmunofenotípicas de las LLA-T.

Tabla 5-Hallazgos inmunofenotípicos en LLA-T

	Niños (n=3)	Adultos (n=6)
HLA-DR	0/3	0/6
CD2	3/3	5/6
CD3	0/2	0/6
CD7	3/3	5/6
CD10	1/3	1/6
CD34	0/2	2/6
CD4	0/2	1/5
CD8	0/2	1/5
CD3c	3/3	6/6
CD22c	0/3	0/6

Todas las LLA-T fueron positivas para CD3c y negativas para CD22c. Una de las LLA-T en un adulto fue positiva sólo para CD3c.

La expresión atípica de antígenos asociados a línea mielóide se observó en el 4.2% de los casos (4/95). El CD13 fue el antígeno mielóide más frecuente (3.1%) seguido del CD33 (1.1%).

En los 4 casos el fenotipo inmunológico de los blastos correspondió a LLA-c y fueron CD34+.

Tabla 6-Expresión de antígenos en L.A bifenotípicas

	CD2	CD5	CD7	CD3c	CD10	CD19	CD22c	CD13	CD14	CD33	CD34	MPO
Caso 1	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
Caso 2	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Caso 3	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Caso 4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Caso 5	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
Caso 6	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Caso 7	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Caso 8	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Caso 9	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Caso 10	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+

Leucemia aguda bifenotípica (LAB)

En 10 de los 257 casos de leucemia aguda encontramos coexpresión de antígenos de más de una línea con criterio de LAB (15).

Se observó coexpresión de antígenos: mieloides y linfoides B en 6 casos, mieloides y linfoides T en 3 casos y linfoides B y T en 1 caso. Todos los casos de LAB fueron CD34 positivos.

La Tabla 6 muestra los hallazgos inmunofenotípicos en las LAB.

Leucemia aguda indiferenciada

En 2 de los casos (0.7%) el análisis inmunofenotípico no permitió identificar el linaje de los blastos.

Los blastos de 1 caso mostraron un fenotipo de célula progenitora positiva sólo a HLA-DR y CD34. El otro caso fue positivo a los antígenos HLA-DR, CD34, CD13 y CD10. En ninguno de los casos se detectaron antígenos citoplasmáticos específicos de línea.

CONCLUSIONES

Reportamos la expresión antigénica e incidencia de subtipos inmunológicos en 257 pacientes con diagnóstico de leucemia aguda.

El panel de anticuerpos monoclonales utilizado y el análisis de antígenos de superficie por citometría de flujo, junto con los estudios morfológicos, citoquímicos e inmunoenzimáticos para la detección de antígenos citoplasmáticos, permitió conocer el linaje de los blastos en el 99.2% de los casos (255 de 257 casos).

En este estudio los resultados de reactividad de los anticuerpos monoclonales en LMA fue similar al descrito en otros trabajos (16-18).

Nuestros datos, mostraron una más alta incidencia de LLA común en niños y de LLA-T en adultos, como ha sido previamente reportado (2, 3, 19-23).

La expresión atípica de antígenos asociados a otras

líneas fue más frecuente en LMA que en LLA (28.2% vs. 8.2%). Si bien los porcentajes de incidencia de leucemias agudas con antígenos asociados a otras líneas son muy dispares, nuestros resultados son semejantes a los reportados por algunos autores (17, 25). Estas discrepancias pueden ser atribuidas a diferencias en los criterios de positividad, al empleo de un número diferente de marcadores, y a la metodología empleada. Creemos que la doble marcación debe ser utilizada de rutina para la confirmación de la coexpresión.

En LMA el antígeno linfocítico más frecuente fue el CD7.

Nuestro estudio confirmó la expresión frecuente de HLA-DR y CD34 en LMA-CD7+ encontrada por otros autores (26-28).

En LLA el antígeno mielocítico más frecuente fue el CD13.

En conclusión, la inmunofenotipificación en leucemia aguda provee una base sólida para la clasificación de esta enfermedad heterogénea. Observamos que los resultados aquí presentados son coincidentes con los reportados por la literatura.

Asimismo resulta evidente la necesidad de realizar otros estudios orientados a estudiar la correlación entre los subgrupos inmunofenotípicos y las características biológicas que pudieran aportar información de significación clínica.

RESUMEN

Se fenotipificaron los blastos de 257 pacientes con leucemia aguda (LA) mediante citometría de flujo utilizando un panel de 17 anticuerpos monoclonales (HLA-DR, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14, CD19, CD22, CD33, CD34, CD41, CD61, y anti Glicoforina A). 195 pacientes fueron adultos (≥ 15 años) y 62 pediátricos.

149 casos (58.4%) correspondieron a LMA, 95 casos

(36.9%) a LLA, 10 casos (4%) a LA bifenotípica, y 2 casos (0.7%) a LA indiferenciada.

La clasificación de LMA según FAB fue: M0: 16/150 (10.7%), M1: 43/150 (28.7%), M2: 24/150 (18.7%), M3: 11/150 (7.3%), M4: 28/150 (18.7%), M5: 14/150 (9.3%), M6: 3/150 (2.0%), y M7: 6/150 (4.0%) y 1 LA a mastoblastos (0.7). En LMA la expresión de CD13 fue del 76.4%, de CD33 77.7%, de CD14 28.6%, de HLA-DR 76.4% y de CD34 55.3%. La expresión atípica de antígenos linfoides representó el 18.7%: CD7: 21.5%, CD2: 4.1% CD10: 1.3% y CD19: 1.3%. Fenotípicamente las LMA-CD7+ resultaron con más frecuencia HLA-DR+ y CD34+ que las LMA-CD7-. De los 95 pacientes con LLA, 46 (48.4%) resultaron adultos y 49 (51.6%) resultaron pediátricos. El 90.5% fueron de línea B y 9.5% de línea T. Los subtipos de LLA de línea B se manifestaron: LLA de célula B temprana: 10.6%, LLA común (LLA-c): 85.9% y LLA-B: 3.5%. Fue más frecuente la LLA-c en niños y la LLA-T en adultos. La expresión en LLA en general resultó del 60% (65.2% en LLA de línea B y de 22.2% en línea T).

La expresión atípica de antígenos en LLA se constató menor que en LMA (4.2%) siendo el CD13 el más frecuente. Las leucemias bifenotípicas fueron: mielóide/linfóide T: 3 de 10 casos, Mielóide/linfóide B: 6 de 10 y linfóide B/T 1 de 10. Los hallazgos aquí presentados son coincidentes con los descriptos en la literatura.

BIBLIOGRAFIA

1. Foon, KA and Todd, RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. **Blood** 1986; 68:1-31.
2. Crist WM, Grossi CE, Pullen J, et al. Immunologic markers in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Sem. Oncol.** 1985; 12:1055.
3. Pui CH, Behm FG, Crist WM. Clinical and biological relevance of immunologic markers studies in childhood acute lymphoblastic leukemias. **Blood** 1993; 82:343-362.
4. Sobol RE, Royston I, Le Bien TW, et al. Adult acute lymphoblastic leukemia phenotypes defined by monoclonal antibodies. **Blood** 1995; 65:730-735.
5. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). **Br. J. Haematol.** 1991; 78:325-320.
6. Gale RP, Ben-Bassat. Hybrid acute leukemia. **Br. J. Haematol.** 1987; 65:261, 1987.
7. Drexler, HG, Thiel E and Ludwig WD. Review of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia** 1991;5:637-645.
8. Sobol RE, Mick R, Royston I, et al. Clinical relevance of myeloid antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine** 1987; 316:1111-1117.
9. Wiersma SR, Ortega J, Sobel E, et al. Clinical relevance of myeloid antigen expression in acute lymphoblastic leukemia of childhood. **New England Journal of Medicine** 1991; 324:800-808.
10. Pui CH, Behm FG, Singh B, et al. Myeloid-associated antigen expression lacks prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia with intensive multiagent chemo-therapy. **Blood** 1990; 75:198-202.
11. Cross AH, Goorha RM, Nuss R, et al. Acute myeloid leukemia with T lymphoid features: a distinct biologic and clinical entity. **Blood** 1988; 72:579.
12. Meyer PR, Krugliak L, Neely S, et al. Acute leukemias with both myeloid and lymphoid markers. **Am. J. Clin. Pathol.** 1986; 86:461.
13. Mason TC, Phifer RF, Spicer SS et al. An immunoglobulin enzyme bridge method for localizing tissue antigens. **J. Histochem. Cytochem.** 1969; 17:563.
14. Betz S, Foucar K, Head D, et al. False positive flow cytometric platelet glycoprotein IIb/IIIa in myeloid leukemias secondary to platelet adherence to blasts. **Blood** 1992; Vol.79, N°9, pp. 2399-2403(1992).
15. Garand R, Bené MC, and GEIL. A new approach of acute lymphoblastic leukemia-Leukemia Immunophenotypic classification - 1984-1994. The GEIL Experience. **Leukemia and lymphoma**, 1994; Vol 13, Suppl.1, pp. 1-5.
16. Griffin JD, Mayer RJ, Weinstein, et al. Surface marker analysis of acute myeloblastic leukemia: identification of differentiation-associated phenotypes. **Blood**;1983 62:557.
17. Kenneth B, Matthews J, and The Australia Leukemia Study Group. Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia. **Blood** 1994; 84: 1220 -1225.
18. Drexler HG, Menon M, Klein M, et al. Correlation of surface marker expression with morphologically defined subclasses of acute myeloid leukemia. **Clin. Exp. Immunol.** 1986; 65:363.
19. Crist W, Pullen J, Boyett J, et al. Acute lymphoid leukemia in adolescents: clinical and biologic features predict a poor prognosis-A Pediatric Oncology Group Study. **J. Clin. Oncol.** 1988; 6:34.
20. Clarkson B, Ellis S, Little C, Gee T, et al. Acute lymphoblastic leukemia in adults. **Sem. Oncol.** 1985; 12:160.
21. Hoelzer D, Thiel E, Loeffler H, et al. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. **Blood** 1988; 71:123-131.
22. Foa R, Baldini L, Cattoretti, et al. Multimarker phenotypic characterization of adult and childhood acute lymphoblastic leukemia: an Italian multicentre study. **British Journal of Haematology** 1985; 61: 251-259.

23. De Rossi G, Grossi C, Foa R, et al. Immuno-phenotype of acute lymphoblastic leukemia cells: The experience of The Italian Cooperative Group (Gimena) **Leukemia and Lymphoma** 1993; 9:221-223.
24. Copelan E, and Mc Guire E. The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. **Blood** 1995; 85:N°5 1151-1168.
25. Ludwig W, Reiter A, Loeffler H, et al. **Leukemia and Lymphoma** 1994; 13:supp. 1,71-76.
26. Miwa H, Nakase K, and Kita K. Biological Characteristics of CD7 (+) acute leukemia. **Leukemia and Lymphoma** 1995; 21:239-244
27. Bradstock K, Kirk J, Grimsley P, et al. Acute myeloid leukemia with T-lymphoid features: incidence and clinical correlations. **Br. J. Haematol.** 1989; 72 : 512-518.
28. Kita K, Miwa H, Nakase K, et al. Clinical importance of CD7 expression in acute myelocytic leukemia. **Blood** 1993; 81:2399-2405.