



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

ESCUELA DE POST-GRADO

**Identificación de fenotipos aberrantes en leucemia aguda
y su seguimiento de la enfermedad mínima residual en la
población del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga
Asenjo de junio del año 2009 a agosto del año 2012**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar el Título de Especialista en Hematología

AUTOR

Pedro Antonio Arauco Nava

LIMA – PERÚ
2014

Identificación de fenotipos aberrantes en leucemia aguda en Hospital Nacional Almanzor
Aguinaga Asenjo, Pedro Arauco Nava

DEDICATORIAS:

A mis Padres Victor y Rosario

Por la tenacidad que

Me inspira cada día.

Identificación de fenotipos aberrantes en leucemia aguda en Hospital Nacional Almanzor
Aguinaga Asenjo, Pedro Arauco Nava

A mi esposa Vanessa,

Con mucho amor y gratitud.

Identificación de fenotipos aberrantes en leucemia aguda en Hospital Nacional Almanzor
Aguinaga Asenjo, Pedro Arauco Nava

AGRADECIMIENTOS:

Mi sincero agradecimiento

Al Dr. Richard Dyer Velarde Alvarez y a la Dra. Celina Herrera Cunti

Por las enseñanzas brindadas

Durante mi formación como especialista

Identificación de fenotipos aberrantes en leucemia aguda en Hospital Nacional Almanzor
Aguinaga Asenjo, Pedro Arauco Nava

Mi profunda gratitud a todo el personal

Del servicio de Hematología Clínica

Del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoien

Identificación de fenotipos aberrantes en leucemia aguda en Hospital Nacional Almanzor
Aguinaga Asenjo, Pedro Arauco Nava

INDICE

RESUMEN	7
MARCO TEORICO	8
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	14
DISCUSION	18
CONCLUSIONES	21
BIBLIOGRAFIA	22
ANEXOS	27

I. RESUMEN

La citometría de flujo multiparamétrica es el método de elección para la caracterización inmunofenotípica de las células hematopoyéticas clonales presentes en los distintos procesos leucémicos agudos. El objetivo fue analizar la expresión de antígenos de membrana y evaluar la presencia de fenotipos aberrantes en los blastos de pacientes con diagnóstico de leucemia aguda, que permiten el monitoreo de la respuesta al tratamiento. Se revisaron los inmunofenotipos de 82 muestras de pacientes adultos derivadas a nuestro laboratorio en un período de 3 años. El inmunofenotipo se realizó por citometría de flujo con un amplio panel de anticuerpos monoclonales con el que se evaluó la expresión de antígenos de linaje linfoide, mieloide y también antígenos de maduración. De las 82 muestras estudiadas, 60.9% presentaron un fenotipo compatible con leucemia linfoblástica B (LLA-B), 29.2% con leucemia mieloide aguda (LMA), 7.5% con leucemia linfoblástica T (LLA-T) y 2.4% con leucemias agudas poco frecuentes. La presencia de fenotipos aberrantes se observó en 89% de los casos, los fenotipos aberrantes identificados fueron: 1) infidelidad de linaje: LMA (54%), LLA-B (40%), LLA-T (29%); 2) ausencia de expresión antigénica: LMA (21%), LLA-B (35%), LLA-T (70%); 3) alteración de la expresión antigénica: LMA (67%), LLA-B (66%), LLA-T (84%); 4) asincronismo madurativo: LMA (26%), LLA-B (37%) y 5) fenotipo ectópico: LLA-T 96%). El análisis por citometría de flujo multiparamétrica de las leucemias agudas permitió la identificación de fenotipos aberrantes en la mayoría de nuestros pacientes, que son de utilidad para el monitoreo de la respuesta al tratamiento (enfermedad mínima residual)

Palabras clave: inmunofenotipo, leucemia aguda, fenotipos aberrantes

II MARCO TEORICO

Las leucemias agudas son un grupo heterogéneo de enfermedades hematológicas caracterizadas por la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas clonales. La detección de esta población celular y la identificación de su linaje hematopoyético son de relevante importancia para el diagnóstico y tratamiento de estas patologías (1). En la últimas décadas la caracterización inmunofenotípica ha sido incorporada en distintas clasificaciones de leucemias agudas, como la clasificación inmunológica del European Group for the Immunological Characterización of Leukemias (EGIL) (2) y la Clasificación de de tumores de Tejidos Hematopoyéticos y linfoides de la World Health Organization (WHO) (3-5). Actualmente la citometría de flujo multiparamétrica es el método diagnóstico de elección para la caracterización inmunofenotípica de los blastos leucémicos y permite detectar alteraciones en la expresión de antígenos capaces de diferenciar células hematopoyéticas normales de células neoplásicas, siendo esto de gran utilidad para el monitoreo de la enfermedad mínima residual (EMR) (6 – 10) . En general, estos inmunofenotipos aberrantes pueden ser:

- 1) Infidelidad de linaje o coexpresión de antígenos asociados a otro linaje.
- 2) Ausencia de expresión de antígenos específicos de linaje.
- 3) Alteración de la expresión de antígeno, ya sea por sobreexpresión, menor expresión o expresión parcial de cierto antígeno por célula.
- 4) Asincronismo madurativo en el cual antígenos de estadios inmaduros son coexpresados con antígenos presentes en estadios más maduros.
- 5) Fenotipo ectópico o presencia de células con fenotipo no presente en ese tipo de muestra en condiciones normales.
- 6) Características anormales de tamaño y complejidad interna de la población celular (11, 12).

FENOTIPOS ABERRANTES LLA-B
ASINCRONISMOS DE EXPRESION
CD10+++ TdT +
CD10-/d TdT +
CD10+ CD34+
CD10+++ CD20+++
CD10- CD20-/+ CD34+
CD22+++ CD34+
CD45-/+ CD34-/+
CD22++ CD20-
CD20+ TdT +
IgMc+ TdT+
BAJA EXPRESION ANTIGENICA
CD22-/+d
SOBRE EXPRESION ANTIGENICA
CD34+++
CD10+++
INFIDELIDAD DE LINEA
CD2
CD7
CD13
CD33
CD15
CD65
FENOTIPOS INFRECIENTES
CD45-
CD34+CD10-
CD34-CD10++
CD20-CD10-

Identificación de fenotipos aberrantes en leucemia aguda en Hospital Nacional Almanzor

Aguinaga Asenjo, Pedro Arauco Nava

FENOTIPOS ABERRANTES LLA-T
ASINCRONISMOS DE EXPRESION
TdT+ CD5+
FENOTIPOS ECTOPICOS
CD1a+
CD3-CD4+CD8+
CD3dim CD7+
CD3dim/- CD4-CD8-
FENOTIPOS INFRECIENTES
CD34+CD7+
PERDIDAS ANTIGENICAS
CD5-

FENOTIPOS ABERRANTES LMA
INFIDELIDAD DE LINEA,
CD2
CD7
CD19
CD20
CD5
SOBRE-EXPRESION DE ANTIGENOS
CD33 ⁺⁺⁺
CD34

Identificación de fenotipos aberrantes en leucemia aguda en Hospital Nacional Almanzor

Aguinaga Asenjo, Pedro Arauco Nava

CD13
CD117
CD15
HLA DR
ANORMAL FLUORESCENCIA SCATTER
ALTO FSC/SSC
CD2
CD34
CD7
CD117
CD19
CD20
BAJOFSC/SSC
CD13 [↑]
CD33 [↑]
CD15
ASINCRONISMOS DE EXPRESION
CD34 ⁺ HLA-DR ⁻ CD33 ⁺
CD34 ⁺ CD56 ⁺
CD34 ⁺ CD11b ⁺
CD34 ⁺ CD33 ⁺⁺
CD34 ⁺ CD14 ⁺
CD34 ⁺ CD117 ⁺ HLA-DR ⁻
CD34 ⁺ CD117 ⁻ CD15 ⁺
CD34 ⁺ CD33 ⁻ CD13 ⁺ HLA-DR ⁺

En los últimos años se ha visto que algunos patrones inmunofenotípicos aberrantes podrían reflejar alteraciones citogenéticas de las células neoplásicas (13). Por lo tanto, la identificación de estos inmunofenotipos presentes en la célula leucémica no solo permite el monitoreo de la respuesta al tratamiento quimioterápico y detección de EMR (14 – 17) sino también puede utilizarse en algunos casos para la identificación de alteraciones citogenéticas concretas y sugerir los estudios moleculares que confirmen la presencia de dichas alteraciones (18 , 19)

En el presente estudio analizamos retrospectivamente los resultados obtenidos por citometría de flujo de 82 muestras de pacientes con leucemias agudas, para determinar las características de expresión de los distintos antígenos de membrana y evaluar la ocurrencia de fenotipos aberrantes que son de utilidad para el posterior monitoreo de la respuesta al tratamiento y detección de EMR.

III MATERIAL Y METODOS

Se analizó retrospectivamente el inmunofenotipo de un total de 82 pacientes adultos y niños con diagnóstico de leucemia aguda, cuyas muestras de médula ósea o sangre periférica fueron enviadas desde el servicio de Hematología Clínica del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo – EsSalud Chiclayo al Laboratorio de Citometria de Flujo, para su inmunotipificación por citometría de flujo durante el período Junio 2009- Agosto 2012. Al ser muestras derivadas, no fue posible obtener consentimiento informado. Cuarentaicinco (55%) fueron hombres y treintaisiete (45%) mujeres con una edad promedio de 25 años (rango: 06 meses- 89 años).

Se estudiaron 61 muestras de médula ósea, 21 muestras de sangre periférica. Las muestras de médula ósea y sangre periférica fueron previamente tratadas con una solución de CINH4 para la lisis de eritrocitos. Para la inmunomarcación se utilizó un amplio panel de anticuerpos monoclonales conjugados con *fluorescein* (FITC), *phycoerythrin* (PE) y *isothiocyanate phycoerythrin cyanin 5* (PE-Cy5) o *alaloficocianina* (APC) para identificar todos los linajes

hematopoyéticos (20 – 23) : CD45 PerCP, CD45 PE-Cy5, DR FITC, CD34 FITC, CD34 PE, CD1a PE, CD2 PE, CD3 PerCP, CD4 FITC, CD5 PE, CD7 FITC, CD8 PE, CD10 PE, CD11b FITC, CD13 PE, CD14 PE, CD15 FITC, CD19 PE-Cy5, CD20 FITC, CD22 PE, CD33 PE, CD38 PE, CD56 PE, CD61 FITC, CD64 FITC, CD71 FITC, CD79a PE, CD117 PE, TdT FITC, MPO PE, anti Kappa FITC, anti Lambda FITC. A las distintas combinaciones de anticuerpos monoclonales se agregó 50 µl de una suspensión de aproximadamente 1×10^6 (6) células y se incubó en oscuridad durante 20 minutos a 4 °C. Luego se realizó un lavado con 1ml de PBS/azida y se resuspendieron las células en 0.5 ml de una solución de formol al 0.5%. Para el estudio de antígenos intracitoplasmáticos (MPO, TdT, CD3ic, CD79a), luego de la marcación de superficie las células fueron tratadas con la solución permeabilizante de *becton dickinson* durante 10 minutos, se lavaron con 2 ml de PBS/azida y finalmente se realizó la marcación intracitoplasmática. La adquisición de los datos se realizó en un citómetro de flujo FACS Calibur (*becton dickinson, san José, ca, usa*) equipado con *laser de argón 15nW (excitación a488 nm)* utilizando el programa *cell-Quest*. La calibración y compensación de fluorescencia fue realizada usando esferas Calibrite (*becton dickinson*). Se adquirieron al menos 20000 eventos por tubo en modo lineal para tamaño celular (*forward scatter, fsc*) y complejidad interna (*side scatter, ssc*) y en modo logarítmico para la señal de fluorescencia. Para el análisis multiparamétrico basado en propiedades físicas como FSC y SSC y de intensidad de fluorescencia, se utilizó el programa *paint-a-gate*. Los blastos fueron definidos usando los *dot plot* CD45 vs. SSC y FSC vs. SSC como CD45 débil o moderado y SSC bajo o moderado (18, 24, 25). Los antígenos de superficie fueron considerados positivos cuando 20% de los blastos lo expresaban

IV RESULTADOS

La mejor estrategia para identificar y cuantificar los blastos patológicos en la mayoría de las muestras fue utilizando la combinación CD45/SSC en cada tubo del panel. Otras combinaciones útiles fueron CD34/SSC en el caso de blastos CD34(+) y CD19/SSC tratándose de linfoblastos de linaje B. De menor utilidad fue la combinación FSC/SSC, especialmente en las muestras con menor recuento de blastos. De las 82 muestras estudiadas 50 (60.9%) presentaron un fenotipo de linaje linfoide B compatible con leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B), 24 (29.2%) fenotipo de linaje mieloides compatible con leucemia mieloides aguda B (LMA), 6 (7.5%) fenotipo linfoide T compatible con leucemia linfoblástica aguda T (LLA-T) y 2 (2.4%) fenotipo de leucemias agudas poco frecuentes como una leucemia aguda bifenotípica (1.4%) y una leucemia aguda de células dendríticas (1.4%). Las características de edad, sexo y antecedentes clínicos informados al laboratorio de cada uno de los tipos de leucemia se muestran en la tabla 1.

TABLA 1.– antecedentes de los pacientes informados al laboratorio por los médicos tratantes

	LMA	LLA-B	LLA-T	LA poco frecuentes
	Total: 24	Total: 50	Total: 06	Total: 02
Edad (años)	46	34	21	38
	(9-87)	(2-73)	(3-68)	(1-76)
Sexo M/F	14/10	27/23	3/1	1/1
Antecedentes				
Leucopenia	8	15	1	0
Anemia	23	49	4	2
Plaquetopenia	20	47	4	2
Leucocitosis	16	35	3	2

La expresión de CD45 fue variable, expresándose en la mayoría de los casos con intensidad de fluorescencia intermedia. La ausencia de expresión de CD45 se observó en los blastos de 14/50 (28%) LLA-B, en su mayoría CD34 (+). En cambio, 02/06 (33.3%) de las LLA-T. Las células patológicas de LMA expresaron CD13 en el 93% de los casos, CD33 en el 92%, CD117 en el 68% y mieloperoxidasa en el 70%. La expresión de un marcador de inmadurez no específico para linaje, como el CD34, se dio en el 55% de los casos. De las 24 LMA, 06 (25%) presentaron un patrón inmunofenotípico mielo-monocítico con presencia de dos poblaciones celulares: una de blastos mieloides CD34 (+) y otra monocítica CD64 y CD14 positivos. Cuatro (16.6%) mostraron un fenotipo característico de leucemia aguda promielocítica con expresión de mieloperoxidasa, CD33 y CD13 y ausencia de DR y CD15. El CD34 fue negativo en el 68% de los casos y la presencia de autofluorescencia se observó en el 55% de las muestras. La frecuencia de fenotipos compatibles con eritroleucemia fue muy baja: una (4.1%).

En las LLA-B, la presencia de CD19 se observó en todos los casos, mientras que el CD79a fue expresado en el 94% y el CD22 en el 86%. La expresión de CD20 fue variada, desde negativa en el 47% de los casos hasta positiva en todos los blastos en el 32%. Un 83% de las LLA-B expresaron CD10, un 79% fueron positivas para CD34 y un 64% para TdT. Según los patrones inmunofenotípicos 5/50 (10%) fueron caracterizadas como LLA-proB, 42/50 (84%) como LLA-B común y 3/50 (6%) como LLA-B madura con presencia de clonalidad para cadenas livianas de inmunoglobulinas.

De las LLA-T 1/6 (16.6%) fue clasificada como LLA-proT, 4/6 (66.6%) como LLA-T cortical y 1/6 (16.6%) como LLA-T madura. Todas expresaron CD7 y CD3 ic, observándose expresión de CD2 y CD5 en el 83.3% de los casos, CD1a en el 66.6% y CD34 en el 33.2%. Un 16.6% presentó fenotipo CD4(-)CD8(-), 66.6% CD4(+)CD8(+), 16.6% CD4(+)CD8(-).

La leucemia bifenotípica fue definida según la clasificación del EGIL y el score de Matute (37), que expreso marcadores mieloides y linfoides T. El fenotipo de las leucemias agudas poco frecuentes se muestra en la Tabla 2.

Identificación de fenotipos aberrantes en leucemia aguda en Hospital Nacional Almanzor

Aguinaga Asenjo, Pedro Arauco Nava

La presencia de fenotipos aberrantes se observó en 73 de los 82 (89%) casos estudiados (Tabla 3). En la mayoría de los cuales 67 (81.7%) se identificaron más de una aberración fenotípica. Un 54.16% (13/24) de las LMA presentaron infidelidad de linaje coexpresando uno o más de los siguientes antígenos linfoides: CD56 (20.8%), CD7 (16.6%), CD2 (16.6%), CD4 (8.3%), CD19 (4.16%), CD10 (4.16%). Un 37.5% de las cuales expresaron dos o más antígenos linfoides en los mismos blastos. El 75% de las células patológicas mieloides con coexpresión de antígenos linfoides expresaron el antígeno de inmadurez CD34. En las LLA-B el 40% (20/50) presentó infidelidad de linaje. Los antígenos coexpresados fueron: CD13 (20%), CD33 (16%), CD15 (6%), CD2 (6%), CD56 (4%) y CD11b (2%).

TABLA 2.– Inmunofenotipo de las leucemias agudas poco frecuentes

Leucemia aguda	Inmunofenotipo
Bifenotípicas	
Mieloide-Linfoide T:	CD34(+), DR(+), CD13(+), CD33(+), CD117(+), MPO(+), CD3ic(+), CD7(+)
Células dendríticas:	CD45(++) DR(+++) CD38(+++) CD2(+) CD123(+) CD34(-), ausencia de antígenos específicos de línea

Identificación de fenotipos aberrantes en leucemia aguda en Hospital Nacional Almanzor
 Aguinaga Asenjo, Pedro Arauco Nava

TABLA 3.– frecuencia de los fenotipos aberrantes en leucemias agudas

	LMA	LLA-B	LLA-T
Fenotipos aberrantes	87.5%	90%	100%
1. Infidelidad de linaje	54%	40%	25%
	CD56(22%), CD7(17%)	CD13(20%),	CD10(25%),
	CD2(14%), CD4(9%),	CD33(15%),	CD13(25%),
	CD19(5%), CD10(4%),	CD15(6%), CD2(6%),	DR(25%),
	CD20 y CD22(<1%).	CD56(3%),CD11b(1%)	CD117(25%),
2. Ausencia de expresión de Ag.	21%	35%	75%
	DR(8%), CD117(6%),	CD45(28%)	CD3s(25%),
	CD33(4%),CD13(3%)	CD79a(5%),	CD4(75%),
	CD4(5%),CD14(5%)	CD38(2%), DR(1%),	CD8(25%)
		CD20(1%), CD22(1%)	CD2(25%),
3. Alteración de la expresión de Ag	66.6%	66%	75%
4. Asincronismo madurativo	25%	38%	
	CD34(+)CD15(+):6%	CD34(+)CD20(+): 24%	
	CD34(+)CD117(-):5%	CD34(+)CD10(-): 13%	
	CD13(-) CD33(+):4.6%		
	CD13(+)CD33(-): 3%		
	CD117(+)CD15(+): 2.7%		
	DR(+)CD15(+): 2%		
	CD34(+)DR(-): 2%		
5. Fenotipo ectópico	95.8 %		

lma: leucemia mieloide aguda; lla-b: leucemia linfoblástica aguda b; lla-t: leucemia linfoblástica aguda-t.

V. DISCUSION

Para el diagnóstico de las leucemias agudas se deben tener en cuenta tanto las características clínicas de la enfermedad como los estudios de laboratorio que incluyen la morfología, citoquímica, inmunofenotipo y citogenética de las células neoplásicas involucradas (3). El estudio del inmunofenotipo es de gran importancia, no sólo para asignar el linaje de las células patológicas sino también para identificar aberrancias fenotípicas que diferencian a las células leucémicas de los precursores normales (26-27). En este estudio se evaluó el inmunofenotipo de 82 leucemias agudas consecutivas para determinar cuáles eran los fenotipos más frecuentemente encontrados, evaluar la expresión antigénica de los mismos e identificar las aberraciones fenotípicas presentes con nuestro panel de anticuerpos monoclonales utilizados.

Más de la mitad de las leucemias agudas (60.9%) presentaron un fenotipo de linaje linfoide B, un 29.2 % presentaron fenotipo mieloide y un 6.5% tuvieron un fenotipo linfoide T; estos datos son coincidentes con los reportados en la bibliografía (28-30).

Los antígenos más frecuentemente expresados en las LMA de esta serie fueron el CD13 y el CD33, con el 93% y el 92% respectivamente. Legrand y col. (31) y Weber y col. (32) describen niveles de expresión similares al nuestro aunque con una mayor frecuencia de expresión de CD34 (68% y 71% vs. 55%). Todas las LLA-B expresaron el antígeno linfoide B CD19, 94% expresaron CD79a, 86% el CD22 con débil intensidad de fluorescencia y 83% el CD10. El 53% de nuestras LLA-B expresaron CD20 de variada intensidad de fluorescencia y un 24% coexpresaron CD20 y CD34. La expresión de CD20 estaría relacionada a un pronóstico desfavorable en este tipo de leucemias (33, 34). Solamente en las LLA-B se observó ausencia de CD45 en las células patológicas (35, 36). En las LLA-T los antígenos más frecuentemente expresados fueron: CD3ic (100%), CD7 (100%), CD2 (91%) y CD5 (91%); el CD3 en superficie sólo se expresó en el 29% de las leucemias. Los fenotipos más comúnmente identificados fueron CD4CD8 doble positivo (54%), CD1a(+) (65%) y CD34(-) (71%). Con mucha menor frecuencia (< 5%) se identificaron por inmunofenotipo leucemias bifenotípicas (37 - 42), leucemias indiferenciadas (8-10), leucemia de células

dendríticas (44-47). Los estudios iniciales de citometría de flujo en médula ósea normal permitieron caracterizar los patrones inmunofenotípicos de las poblaciones hematopoyéticas medulares e identificar y diferenciar las células progenitoras normales de los blastos patológicos presentes en una leucemia aguda. La literatura (48-51) demuestra una gran variedad de patrones fenotípicos aberrantes en las LA (52- 54). Las anormalidades fenotípicas incluyen la expresión de antígenos de un linaje diferente, la ausencia o sobreexpresión de un antígeno comúnmente expresado, la coexpresión de antígenos presentes en diferentes estadios de maduración y la presencia de fenotipos nunca presentes en médula ósea (11-12). Actualmente la identificación de estos fenotipos aberrantes al momento del diagnóstico de una leucemia aguda es de gran valor para la detección de enfermedad mínima residual y el seguimiento del paciente durante su tratamiento (55 – 58).

En los últimos años varios trabajos han demostrado que algunos inmunofenotipos aberrantes estarían asociados a alteraciones moleculares específicas (13, 19, 59, 60) y con el pronóstico (61, 64) lo que ha sido reflejado en la clasificación de la WHO del año 2008 (3). El análisis de los fenotipos aberrantes en nuestra serie de pacientes demostró su presencia en la mayoría de los casos (100% en las LLA-T, 89% en las LLA-B y 86% en las LMA. Esta alta frecuencia es concordante con datos recientes de la literatura (9, 12, 65). La infidelidad de linaje se vio con mayor frecuencia en las LMA, seguido por las LLA-B y en menor frecuencia por las LLA-T. En las LMA, el CD56 fue el antígeno linfoide más frecuentemente expresado y su presencia fue descrita como de pronóstico desfavorable por varios autores (66). Los antígenos linfoides T más comúnmente expresados fueron el CD7 (17%) y el CD2 (14%), este último con mayor incidencia en las leucemias agudas promielocíticas y mielomonocíticas. El CD19 fue el antígeno linfoide B más frecuentemente identificado; su hallazgo es de importancia por su asociación con LMA con translocación t (8,21) de mejor pronóstico (21, 67) En las LLA-B fueron mayormente expresados los antígenos mieloides CD13 y CD33 siempre con intensidad de fluorescencia débil y frecuentemente expresados ambos antígenos en la misma célula. La presencia de estos antígenos mieloides junto con características de expresión de CD38 débil, CD34 y CD10 es altamente sugerente de presencia de translocación t (9; 22) (8, 68). La presencia de antígenos de linaje linfoide T fue mucho menor, entre ellos fueron identificados el CD2 (6%) y CD56 (3%). En las LLA-T solamente se observó expresión de antígenos

Identificación de fenotipos aberrantes en leucemia aguda en Hospital Nacional Almanzor

Aguinaga Asenjo, Pedro Arauco Nava

mieloides CD13 (12%), CD33 (4%) y CD117 (4%) como expresión de CD10 (17%) y HLA-DR (8%); estos valores son mucho menores a los descritos por Marks y col. en una serie de 356 pacientes. Un 92% de las LLA-B y un 73% de las LMA con infidelidad de linaje expresaron también CD34, lo que indicaría una mayor inmadurez de estas de hemopatías malignas de la investigación básica a la células patológicas. El asincronismo madurativo fue observado en las LLA-B y en las LMA, siendo los más frecuentes CD34(+) CD20(+) y CD34(+)CD10(-) para las LLA-B y CD34(+) CD15(+) y CD34(+) CD117(-) para las LMA.

Un patrón fenotípico atípico CD33 intenso y homogéneo, CD13 de expresión heterogénea, DR, CD34 y CD15 negativos y frecuente autofluorescencia fue identificado en el 17% de las LMA. Este patrón está reportado como altamente predictivo de LMA-M3 con t (15,17) (8-21)

VI. CONCLUSIONES

En conclusión, el presente estudio muestra que la citometría de flujo realizada con un amplio panel de anticuerpos monoclonales es de importancia clínica para caracterizar el linaje de las leucemias agudas, clasificarla e identificar fenotipos aberrantes presentes en la mayoría de los casos y que son una vital herramienta para evaluar pronóstico, sugerir estudios citogenéticos específicos y control de tratamiento con la evaluación de enfermedad mínima residual.

Conflictos de intereses:

El autor declara no tener conflictos de interés

VII BIBLIOGRAFIA

1. Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; 115: 453-74.
2. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Characterization of Leukemias (EGIL).1995; *Leukemia* 9: 1783-6.
3. Swerdlow Sampo E, Harris NL, Jaffe ES, et al. WHO
Cl Tissues. 4 ed. Lyon, France: IARC Press, 2008. th
4. Harris NL, Jaffe ES, Diebol J, et al. World Health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the clinical advisory committee meeting- airlie house, Virginia, November 1997. *J clin oncol* 1999; 17: 3835-49.
5. Vandiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 2009; 114: 937-51.
6. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997; 90: 2863-92.
7. Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia. *Journal of Immunological methods*. 2000; 243: 59-75.
8. Ortuño Giner FJ, Orfao A. Aplicación de la citometría de flujo al diagnóstico y seguimiento inmunofenotípico de las leucemias agudas. *med clin (barc)* 2002; 118: 423-36.
9. Orfao A, Ramundo L, López A, et al. Inmunofenotipaje práctica asistencial. *Haematologica* 2008; 93: 79-86
10. Craig FE, Foon KA. Flow cytometry immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111: 3941-67.

11. Bahia DMM, Yamamoto M, Chauffaille ML, et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and clinical significance. *Haematologica* 2001; 86: 801-6.
12. Al-Mawali A, Gillis D, Hissaria P, Lewis I. Incidence, sensitivity and specificity of leukemia associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *Am J clin pathol* 2008; 129: 934-45.
13. Hrusák O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002. 16: 1233-58.
14. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical Blood, 1995; 85: 1416-34.
15. Campana D, Coustan-Smith E, Janossy G. The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1990; 76: 163-71.
16. . Vidriales B, Pérez JJ, López-Berges C, et al. Análisis de la enfermedad mínima residual mediante citometría de flujo en la leucemia mieloide aguda. *Methods find exp clin pharmacol* 2004; 26: 1-5.
17. Farahat N, Morilla A, Owusu-Ankomah K, et al. Detection of residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia by quantitative flow cytometry. *british Journal of Haematology* 1998; 101: 158-64
18. Orfao A, Schmitz G, Brando B, et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: Current status and future directions. *Clinical chemistry* 1999; 45: 1708-17.
19. Peters JM, Qasim Ansari M. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch pathol lab med* 2011; 135: 44-54.
20. Wood BL, Arroz M, Barnett D, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia . *Cytometry b* 2007; 72: S14-S22.
21. Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias . *Haematologica* 2001; 86: 675-92.

22. van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, Marvelde JG, Westerdal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease induced shifts. *Cytometry part b* 2004; 60: 1-13.
23. Ruiz-Arguelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Duque R E, Orfao A. on behalf of the participants of the Latin American Consensus Conference. Report on the Latin American Consensus Conference for cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Cytometry b* 2005; 70: 39-44.
24. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis: use of CD45 and right-angle light scatter on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J clin pathol* 1993; 100: 534-40.
25. Nicholson J, Hubbard M, Jones B. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry* 1996; 26: 16-21.
26. Orfao A, De Santiago M, Vidriales B, Tabernero MD, López-Berges MC, Bortoluci A. Immunofenotipo del mieloblasto normal y patológico. *Haematologica* 2001; 86: 339-43.
27. Farrahath N, Lens D, Zomas A, Morilla R, Matutes E, Catovsky D. Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and leukemic B-cell precursors. *british Journal of Haematology* 1995; 91: 640-6.
28. Gujral S, Badrinath Y, Kumar A, et al. Immunophenotypic Profile of Acute Leukemia: Critical Analysis and Insights a Tertiary Care Center in India. *cytometry part b* 2009; 76: 199-205.
29. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al. Early T-cell precursor leukemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukemia identified in two independent cohorts. *lancet oncol* 2009; 10: 147-56.
30. Landau H, Lamanna N. Clinical Manifestations and Treatment of Newly Diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Current Hematologic Malignancy Reports* 2006; 1: 171-9.
31. Legrand O, Perrot JY, Baudard M, et al. The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood* 2000; 96: 870-7.
32. Webber BA, Cushing MM, Li S. Prognostic Significance of Flow Cytometric Immunophenotyping in Acute Myeloid Leukemia. *Int J clin exp pathol* 2008; 1: 124-30.
33. Maury S, Huguet F, Leguay T, et al. Adverse prognostic significance of CD20 expression in adults with Philadelphia chromosome-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010; 95: 324-8.

34. Thomas DA, O'Brien S, Jorgensen JL, et al. Prognostic significance of CD20 expression in adults with *de novo* precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009; 113: 6330-7.
35. Ratei R, Sperling C, Karawajew L, Schott G, Schrappe M, Harbott J. Immunophenotype and clinical characteristic of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *ann Hematol* 1998; 77: 107-14.
36. Behm FG, Raimondi SC, Schell MJ, Look AT, Rivera GK, Pui CH. Lack of CD45 antigen on blast cells in childhood acute lymphoblastic is associated with chromosomal hyperdiploidy and other favorable prognostic features. *Blood* 1992: 1011-6.
37. Matutes E, Morilla R, Harahat N, et al. Definition of acute biphenotypic leukemia. *Haematologica* 1997; 82: 64-6.
38. Béné MC. Biphenotypic, bilineal, ambiguous or mixed lineage: strange leukemias!. *Haematologica* 2009; 94: 891- 3.
39. Xiao-Qian Xu, Jian-Min Wang, Shu-Qing Lü, et al. Clinical and biological characteristics of adult biphenotypic acute leukemia in comparison with that of acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a case series of a Chinese population. *Haematologica* 2009; 94: 919-27
40. Zhao XF, Gojo I, York T, Ning Y, Baer MR. Diagnosis of biphenotypic acute leukemia: a paradigmatic approach. *Int J clin exp pathol* 2010; 3: 75-86.
41. Bagg A. Lineage ambiguity, infidelity, and promiscuity in immunophenotypically complex acute leukemias. Genetic and morphologic correlates *Am J clin pathol* 2007; 128: 545-8
42. Aribi A, Bueso-Ramos C, Estey E, et al. Biphenotypic acute leukaemia: a case series. *british Journal of Haematology* 2007; 138, 213-6
43. García-Sanz R, Orfao A, González M, et al. Primary plasma cell leukemia: Clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 1999; 93: 1032-7.
44. MacDonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DNJ. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002; 100: 4512-20.
45. Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, et al. Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies. *Blood* 2002;
46. Combariza JF, Londoño M, Cardona AF. Leucemia de células dendríticas: reporte de un caso. *rev colomb cancerol* 2008; 12: 161-5.
47. Lichtman MA, Segel GB. Uncommon phenotypes of acute myelogenous leukemia: basophilic, mast cell, eosinophilic and myeloid dendritic cell subtypes: a review. *Blood cells mol dis* 2005; 35: 370-83.
48. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometry analysis of human bone

marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987; 70: 1316-24.

49. Lucio P, Parreira A, van den Beemd MWM, et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor B-ALL. *Leukemia* 1999; 13: 419-27.

50. Macedo A, Orfao A, Ciudad J, et al. Phenotypic analysis of CD34 subpopulations in normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1995; 9: 1896-901.

51. McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, Picker LJ, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood* 2001; 98: 2498-507.

52. Olaru D, Campos L, Flandrin P, et al. Multiparametric analysis of normal and postchemotherapy bone marrow: implication for the detection of leukemia associated immunophenotypes. *Cytometry part b* 2008; 74: 17-24.

53. Weir EG, Cowan K, LeBeau P, Borowitz MJ. A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for residual disease detection. *Leukemia* 1999; 13: 558-67.

54. Macedo A, Orfao A, Vidriales B, Lopez-Berges MC, Valverde B, Gonzalez M. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *ann Hematol* 1995; 70: 189-94.

55. Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, et al. Detection of abnormalities in B-cell differentiation pattern is a useful tool to predict relapse in precursor B-ALL. *British Journal of Haematology* 1999; 104: 695-705.

56. Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry part b* 2008; 74: 331-40.

VIII. ANEXOS

PANEL SMD/LA

MARCADORES DE ESTIRPE O LINAJE

	FITC	PE	PerCP	APC
TUBO 1	MPO	CD79a	CD45	CD3c
(previo control de permeacion)				
TUBO 2	TdT	CD10	CD45	CD19

APLICAR PANEL COMPLEMENTARIO SEGÚN LINAJE

FL-1	FL-2	FL-3	FL-4
FITC	PE	PerCP	APC

LINFOIDE B

TUBO 3	CONTROL AUTOFLUORESCENCIA			
TUBO 4	CD13	CD11b	CD45	CD34
TUBO 5	CD15	CD33	CD45	CD34
TUBO 6	CD20	CD10	CD45	CD19
TUBO 7	IgM cy	CD22	CD45	CD19

LINFOIDE T/NK

TUBO 3	CONTROL AUTOFLUORESCENCIA			
TUBO 4	CD8	CD4	CD45	CD3
TUBO 5	CD7	CD56	CD45	CD3
TUBO 6	CD5	CD2	CD45	CD3
TUBO 7	CD123	CD56	CD45	CD3
TUBO 8	TCR(a/b)	TCR (g/d)	CD45	CD3

MIELOIDE

TUBO 3	CONTROL AUTOFLUORESCENCIA			
TUBO 4	CD13	CD11b	CD45	CD34
TUBO 5	HLA-DR	CD11b	CD45	CD34
TUBO 6	CD15	CD33	CD45	CD34
TUBO 7	HLA-DR	CD56	CD45	CD34
TUBO 8	CD38	CD13	CD45	CD34
TUBO 9	CD64	CD14	CD45	CD34
TUBO 10	CD61	CD117	CD45	CD34
TUBO 11	CD71	CD33	CD45	CD34

Identificación de fenotipos aberrantes en leucemia aguda en Hospital Nacional Almanzor

Aguinaga Asenjo, Pedro Arauco Nava

SINDROME LINFOPROLIFERATIVO CRONICO (DLPC)

FL-1	FL-2	FL-3	FL-4
FITC	PE	PerCP	APC

PANEL BASE:

TUBO 1	Control autofluorescencia			
TUBO 2	CD10	CD20	CD45	CD19
TUBO 3	CD8	CD4	CD45	CD3
TUBO 4	CD5	CD23	CD45	CD19
TUBO 5	CD7	CD56	CD45	CD3

ESTIRPE B:

TUBO 6	KAPPA	CD20	CD45	CD19
TUBO 7	LAMBDA	CD20	CD45	CD19
TUBO 8	CD38	CD20	CD45	CD19
TUBO 9	CD11c	CD20	CD45	CD19
TUBO 10	CD103	CD25	CD45	CD19
TUBO 11	IgM	IgD	CD45	CD19
TUBO 12	FMC-7	CD22	CD45	CD19

LNH T/NK:

TUBO 6	CD5	CD2	CD45	CD3
TUBO 7	CD5	CD25	CD45	CD3
TUBO 8	TCR (a/b)	TCR (g/d)	CD45	CD3