

Utilidad del inmunofenotipo en el diagnóstico y clasificación de las leucemias

Dra. Aurora Romero Coronel *, Blgo. Javier Garcia León **

* Médico Patólogo Instituto Oncológico SOLCA

** Biólogo Instituto Oncológico SOLCA

ABSTRACTO

El Servicio de Citometría de Flujo del Hospital Dr. Juan Tanca Marengo de SOLCA, presenta la casuística obtenida durante dos años y medio en sus diversas actividades técnicas para el desarrollo de nuevas herramientas en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico en las enfermedades hemato-oncológicas.

Palabra Clave: Inmunofenotipo.

ABSTRACT

We presented the experience that have been acquired in the Service of flow Citometry from Hospital Dr Juan Tanca Marengo of SOLCA, showing casuistry during two years and means its several technical activities for the development of new tools in diagnosis, treatment and prognosis in the hemato-oncologic di-seases.

Word Key: Immunofhenotype.

Introducción

El final de la década de los noventa ha traído una eclosión de nuevos métodos diagnósticos que han determinado un nuevo enfoque en la clasificación de las neoplasias hematológicas.^{1,2,4} Así, en pocos años hemos pasado de las clasificaciones basadas en la morfología o en la respuesta clínica a un intento de clasificación basado en la etiopatogenia molecular.^{2,4,5} Sin embargo, es evidente que todavía queda un largo camino por recorrer para complementar este propósito; es por ello que en la reciente propuesta de la Organización Mundial de la Salud (OMS) aún conviven entidades clasificadas con métodos muy sofisticados junto a otras perfiladas de manera mas convencional.^{4,6,7}

Aunque la citometría se utiliza tanto para el análisis de leucemias agudas como para el de las leucemias linfoides crónicas, los objetivos son distintos. En las enfermedades linfoproliferativas crónicas (leucemias y linfomas el análisis

inmunofenotípico se hace con el objetivo de distinguir procesos neoplásicos (monoclonales).^{7,8,9} A su vez, se necesitan otras técnicas para separar los procesos que son inmunofenotípicamente heterogéneos en grupos malignos (Hodking, etc) y benignos (hiperplasias reactivas, monocleosis, etc.)

En cambio el diagnóstico de las leucemias agudas generalmente se hace utilizando criterios clínicos y de laboratorio básico (palidez, fatiga, citopenias, presencia de células blásticas, etc).^{6,7,10} El análisis inmunofenotípico tiene como objetivo no el de detectar la leucemia aguda sino el asignar el linaje a la proliferación blástica ya establecida. Ciertas combinaciones de anticuerpos pueden definir inmunofenotipos únicos que pueden ser de utilidad en la detección de la enfermedad mínima residual al distinguir poblaciones normales de precursores hematopoyéticos y proliferación leucémicas de baja frecuencia.^{12, 23}

En la fase inicial (diagnóstica) de una leucemia aguda generalmente existen células blásticas a frecuencias relativamente altas (>30%) en la médula ósea.¹⁴ Esto permite definir la población leucémica con facilidad utilizando parámetros citométricos combinados.

Correspondencias y Separatas:

Dra. Aurora Romero C.
Servicio de Patología
ION Solca Guayaquil
Av. Pedro Menéndez Gilbert (junto a la Atarazana)
Guayaquil - Ecuador



Para poder realizar estos estudios es necesario la utilización de anticuerpos monoclonales basados en el principio de la relación antígeno-anticuerpo. Las células del sistema hematopoyético fueron de los primeros inmunógenos utilizados en la producción de anticuerpos monoclonales (AcMo). Algunos de éstos (AcMo) reaccionan con antígenos (Ags) bien definidos, específicos para una determinada línea celular e incluso para un estadio madurativo concreto; otros, sin embargo, detectan Ags más ampliamente distribuidos, pero pese a ello pueden ser de utilidad diagnóstica dentro del contexto de un papel apropiado de (AcMo).^{15,16} De esta forma, los (AcMo) permiten establecer el origen de la mayoría de las leucemias y linfomas, siendo de especial valor en aquellos casos en que la morfología y citoquímica no son concluyentes o cuando no permiten identificar grupos de pacientes con pronósticos diferentes. Los estudios inmunofenotípicos no solo tienen utilidad diagnóstica, sino también en la investigación de enfermedad mínima residual (ERM) y del comportamiento de las poblaciones linfocitarias, tanto en las hematopatías como en el trasplante medular.²² Por otro lado los Ags definidos mediante (AcMo) son muchas veces expresión de funciones celulares (adhesión, proliferación, activación); de ahí que su identificación nos aporte información sobre aspectos funcionales de las células hematopoyéticas. En los últimos años, en el arsenal de los estudios inmunofenotípicos, se ha incluido la posibilidad de detectar el producto proteico de algunos oncogenes, como bcl-2, c-myc, o p53, mediante (AcMo) apropiados.

Actualmente la citometría de flujo (CMF) ha adquirido gran difusión debido fundamentalmente a su rapidez, objetividad y facilidad para emplear dobles y triples marcajes directos, incluida la detección de Ags citoplasmáticos. En este sentido, no hay que olvidar que, en las células hematopoyéticas precursoras, los Ags primero aparecen en el citoplasma y luego en la membrana (ej: CD22 en linfocitos B, CD3 en linfocitos T y CD13 en células mieloides).⁷

La manera más fácil de establecer estas diferencias es mediante el examen visual de los histogramas. El análisis interactivo implica que el observador analiza histogramas multiparamétricos y luego interviene para refinar el análisis y/o para correlacionar la información citométrica con la información clínicomorfológica.¹⁴

Si la población blástica es unimodal, aunque la fluorescencia no sea muy intensa comparada con el control, el 100% de la población blástica es positiva.

Luego es superfluo designar la positividad numéricamente si la población blástica es multimodal, es posible que el delimitador contenga dos grupos de células cuya intensidad de fluorescencia varíe o considerar la presencia un proceso multiclonal.

Si la población blástica es unimodal y de muy baja fluorescencia para un antígeno, es inútil asignar porcentajes arbitrarios para asignar positividad.¹³

Es más racional utilizar el análisis de Kolmogorov-Smirnov. Este análisis está diseñado para establecer diferencias estadísticamente definitivas entre dos poblaciones (control y experimental) que exhiban pequeñas variaciones en la distribución de fluorescencia. (Fig 1.)

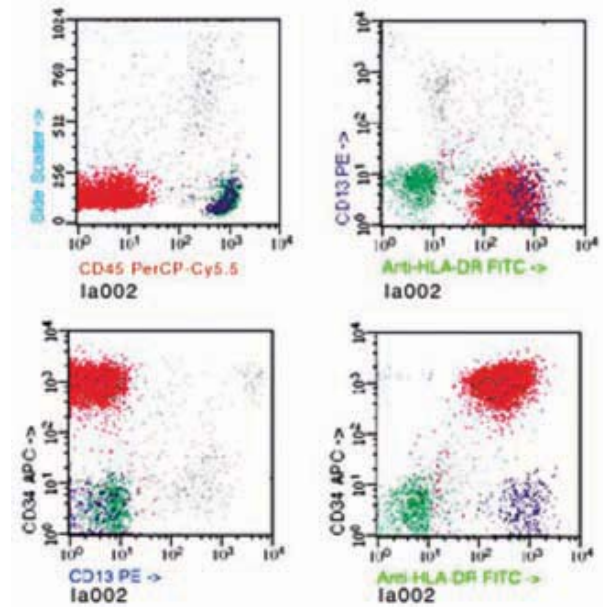


Fig 1. La revisión de la exhibición de CD45/RALS demuestra una población importante de las células de CD45-negativo (rojo) también expresa CD34 y HLADR. El CD34 contra la exhibición de HLADR parte las células leucémicas de los linfocitos normales residuales de DR+ (b) (azules) y las células Dr-negativas, probablemente de células T. Podemos mirar simultáneamente la expresión de un antígeno mielóide (CD13), que en este caso está ausente de las células leucémicas, y el presente en solamente algunas células normales residuales (no coloreadas).

UTILIDAD DEL INMUNOFENOTIPO

El grupo EGIL recomienda estudiar las leucemias agudas linfoblásticas (LAL) en dos pasos. El primero con el objetivo de caracterizar la línea celular proliferante como **B, T o mielóide**; este primer paso incluiría los marcadores más específicos y más precoces de cada una de estas líneas, así como unos pocos marcadores asociados al nivel de maduración, pero no específicos de línea; un segundo panel se haría en función de los resultados del primero con el objeto de precisar el subtipo de la célula neoplásica.¹⁷ En este sentido, integrando las recomendaciones más recientes

para el estudio de las leucemias agudas, se propondría estudiar CD10, CD19, CD13, CD33, CD34, CD45, CD7, CD14, CitMPO, citCD3, y HLADR para la caracterización inicial, estudiando posteriormente: **A) la línea T** : CD1a, CD2, CD5, CD4, CD8 y TdT; **para línea B**: CD20, CD79a, CD22, CD45, CitIgM y TdT; **C) para serie mieloide**: CD15, CD11b, CD16, CD10, CD33, CD13, CD56, CD64, CD65 y CD117, además de CD19, TdT, CD2, CD7 y sCD3 para el estudio de infidelidad; **D) para serie monocítica**, se analizarían complementariamente a los antígenos descritos para la serie mieloide en general, CD4 y CD14; **E) para la serie megacariocítica**: CD61, CD41 y CD42b y **F) para la serie eritroide**, CD71, CD36, Glicoforina A y CD45.^{2,7,22}

Leucemias Linfoblásticas

Las leucemias agudas linfoblásticas (LAL) fueron las primeras neoplasias en beneficiarse de los estudios inmunológicos, siendo clasificadas inicialmente en B, T o nulas (no T-no B) según expresan sIg, formaban rosetas con hematíes de carnero o carecían de ambos marcadores, respectivamente.¹⁸ Posteriormente, el descubrimiento de un Ag presente en el 70% de las LLA infantiles (cALLA) o CD10 permitió definir un nuevo fenotipo, común, al que pertenecían la mayoría de las LLA nulas. Además, todas las LLA, excepto las sIg+, expresaban la enzima intranuclear transferasa terminal deoxinucleotidílica (TdT).

A lo largo de la década de los 80 se obtuvieron numerosos AcMo que detectan Ags de línea linfocítica B y T, demostrándose que la mayoría de las LLA no T – no B (comunes y nulas) son de origen B. En la diferenciación B, los primeros Ags en aparecer son CD19 en la membrana y CD22 a nivel de citoplasma. Inmediatamente después o incluso a la vez aparece CD10 y más tarde CD20. Posteriormente el linfocito B adquiere cadena pesada μ de Igs en el citoplasma para expresarla finalmente en la membrana. De acuerdo a estos marcadores, las LLA de origen B se clasifican actualmente en: B-precoz (CD19+CD22c+); común (CD10+); pre B (Cig+) y B (Igs) (Tabla 1).^{1,2}

Tabla 1. Clasificación Inmunológica de las leucemias linfoblásticas de línea B

Fenotipo	CD19	CD22c	CD10	Cig-u	sIg	TdT
Bprecoz (ProB)	+	+	-	-	-	+
B común	+	+	+	-	-	+
Pre B	+	+	+	+	-	+
B	+	+	+/-	-	+	+/-

El análisis interactivo implica que el observador analiza histogramas multiparamétricos y luego interviene para refinar el análisis y/o para correlacionar la información citométrica con la información clínicomorfológica.¹⁴ Debe reseñarse que aunque todas son de origen B, el término

LLA-B se reserva para las del fenotipo más maduro Igs+.

Los hallazgos inmunofenotípicos se han intentado correlacionar tanto con la clasificación morfológica (FAB) como, más recientemente, con el patrón de reordenamiento de los genes de Ig y el receptor de célula T (Rct).

Con respecto a la morfología, sólo existe correlación entre el subtipo FAB-L3 y LLA-B Igs+. El reordenamiento de Igs y Rct se asocia, lógicamente, a LLA-B y T, respectivamente; si bien en un 10-20% de los casos se detectan reordenamientos cruzados, sobre todo en el caso de los genes T y . Además, el reordenamiento de las Igs y Rtc es posterior a la aparición de los antígenos CD19, CD22c, CD7, CD3c, por lo que los estudios inmunofenotípicos tienen mayor utilidad para la clasificación de las LLA.²²

Algunos subtipos inmunológicos se asocian con alteraciones citogenéticas específicas, lo que ha motivado un intento de clasificación integradora-morfología (M), inmunofenotipo (I) y citogenética (C) (MIC): En la LLA Pre-B es frecuente la t(1;19), en la LLA-B (Igs+) la t(8;14) y sus variantes (Tabla 2), en la LLA-B precoz y leucemias mixtas, la t(4;11) y en la LLA-T la delección del gen TAL y la translocación T(1;14). Con respecto al valor pronóstico de la clasificación inmunológica, aunque su influencia parece haber variado en función de la intensificación de la terapéutica de las LLA, es evidente que, con tratamientos convencionales, el fenotipo común se asocia con mejor pronóstico que el Pre B y T y que las LLA Igs+ les corresponde la peor evolución en la población pediátrica, aunque no en adultos, posiblemente por la alta frecuencia de t(9;22), de mal pronóstico, en las LLA CALLA+ de los adultos.^{4,9} (Tabla 2)

Tabla 2. Subtipos de leucemias aguda y alteraciones cromosómicas/moleculares.

Alteración cromosómica	Genes	Incidencia
LLA B		
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL (ARNm)	Adultos 30-35% Niños 5-8%
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1 (ARNm)	5-8%
t(4;11)(q21;q23)	MLL-F4 (ARNm)	≈ 3%
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1 (ARNm)	Niños 20%
LLA-T		
TAL1 del	SIL-TAL (ADN)	10-25%
t(11;14)(p13;q11)	RHOM1-TCRD (ADN)	3-5%
t(1;14)(p34;q11)	TAL1-TCRD (ADN)	1-3%
t(10;14)(q24;q11)	HOX11-TCRD (ADN)	1-3%
LMA		
t(8;21)(q22;q22)	AML1- ETO (ARNm)	5-8%
t(15;17)(q23;q21)	PML-RARA (ARNm)	5-10%
inv (16)(p13;q22)	CBFB-MYC11 (ARNm)	3-5%
aberraciones 11q23	MARN de MLL aberrante	≈ 10%
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL (ARNm)	1-3%

La presencia de Igs que define a la LLA-B madura condiciona un peor pronóstico cuando se emplea quimioterapia convencional, si bien, como hemos señalado anteriormente,



esta situación parece estar cambiando con el empleo de protocolos más agresivos. La presencia de antígenos asociados a diferenciación mieloide (ej: CD13, CD33, CD15, CD14...) no parece modificar el pronóstico de las LLA infantiles; en cambio, en adultos suele asociarse con una reducción substancial en el porcentaje de remisiones completas y con una menor supervivencia.

Leucemias Linfoblásticas de Línea T

Las LLA de línea T tienen una marcada dispersión frontal (FSC) y baja o intermedia dispersión lateral (SSC)/CD45 pueden apreciarse tanto en la región de monocitos como en la de linfoblastos y/o mieloblastos. Estas entidades se definen por la expresión citoplasmática o en membrana de CD3; en este sentido es importante recordar que la reactividad para CD2 y/o CD7, no es suficiente para describir un caso como línea T, aunque CD7 se exprese en la práctica totalidad de las LLA-T. Por otra parte es de resaltar que una característica de las neoplasias T en general, y de las LLA-T en particular, es la pérdida de antígenos de línea y la expresión aberrante de antígenos de otras líneas, lo que puede dificultar su clasificación. Así mismo merece destacar la baja frecuencia de positividad para los antígenos CD34 y HLADR, particularmente en niños donde se asocia a un peor pronóstico.

Las LLA de origen T se dividen en dos grandes grupos: Pre-T y tímicas. Las Pre-T se identifican por la expresión del Ag CD7 en la membrana o CD3 en el citoplasma que son los marcadores T más precoces. Las restantes LLA-T son de origen tímico. 1) El fenotipo T-Precoz se caracteriza por la adquisición de receptor para hematíes de carnero (CD2); 2) a nivel del timocito cortical común la célula coexpresa los Ags CD4 y CD8 junto a CD1), mientras que 3) el timocito medular maduro expresa CD3s y CD4 o CD8 pero no los dos a la vez. Este último estadio es más propio de linfoma linfoblástico que de la LLA-T (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación Inmunológica de las leucemias linfoblásticas de línea T

Fenotipo	TdT	CD7	CD3c	CD2	CD3s	CD1	CD4	CD8
Pre T	+	-	+	-	-	-	-	-
Timocito								
Precoz	+	+	+	+	-	-	-	-
Cortical	+	+	+	+	-	+	+	+
Medular	+	+	+	+	+	-	+/-	+/-

LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS

En las leucemias mieloblásticas (LMA) el estudio inmunofenotípico tiene, aparentemente, menor utilidad que la LLA. Los primeros Ags en detectarse en la diferenciación hematopoyética mieloide normal son CD33 y CD13. Al igual que ocurriera en la linfopoyesis, CD13 se expresa primero

en citoplasma y después en la membrana. La expresión de alta intensidad de los Ags CD15 y CD14 es específica de granulocítico y monocitos maduros, respectivamente; sin embargo, ambos se coexpresan en los precursores mieloides, lo que cuestiona su utilización para diferenciar leucemias granulocíticas (M1, M2 y M3) de monocíticas (M5). La glicoforina A es un marcador eritroide específico, pero aparece relativamente tarde en la eritropoyesis, por lo que muchas M6 son negativas. En cambio la diferenciación megacariocítica dispone de excelentes marcadores desde los primeros estadios de diferenciación (CD61, CD41, y CD42 que reconocen a las glicoproteínas IIIa, IIb, / Iia y complejo IX / Ib, respectivamente) lo que les convierte en el arma clave para la detección de las leucemias megacarioblásticas (M7). De hecho, la utilidad de los AcMo en el diagnóstico de las MA se centra en las M7 y MO (indiferenciadas) y quizás también en la variante microgranular de la leucemia promielocítica (HLA-DR) que morfológicamente, puede plantear problemas diagnósticos con la M4 (HLA-DR+), así como para distinguir las M5 de algunos linfomas leucemizados con los que pueden presentarse a confusión. En las otras variantes de la LA realmente el único papel de los AcMo, salvo los estudios de investigación es confirmar el diagnóstico cito-morfo químico. A diferencia de esto, en las LLA no existe una clasificación inmunológica de las LMA totalmente aceptada; una posible opción incluiría los siguientes fenotipos: mieloblástico (positivo sólo para MPO, CD33 y/o CD13); granulomonocítico (CD61+ y/o CD41). (Tabla 4).

Tabla 4. Sistemas de puntuación para la definición de leucemias agudas bifenotípicas.

Puntos	Línea B	Línea T	Línea mieloide
2	CD79a	CD3	MPO
	cIgM	Ret-∞	Lisozima
	cIgM	Ret-∞	
1	CD19	CD2	CD13
	CD10	CD5	CD33
	CD20	CD8	Cdw65
		CD10	
0.5	TdT	TdT	CD14
	CD24	CD7	CD15
	CD1a	CD1A	CD64

El pronóstico de esas variantes no parece ser diferente, pues si bien inicialmente se consideró que el fenotipo megacarioblástico y el minoritario conllevan mal pronóstico, estos datos no se han corroborado en estudios posteriores. Respecto a los antígenos individuales en la tabla 2-3 se resumen los datos correspondientes a 20 series revisadas de la literatura, incluyendo nuestros propios datos. Como puede observarse, los únicos Ags de células precursoras o línea mieloide que parecen influir en el pronóstico de las LMA, todos ellos de forma negativa, en al menos el 50% de las series, son CD34 y CD11b. Con respecto a la coexpresión de Ags asociados a la línea linfocítica, sólo CD7 parece condicionar un pronóstico adverso y existe controversia respecto a la influencia de CD2, antígeno que últimamente se ha asociado con leucemia promielocítica.^{19,20,21} (Fig. 2).



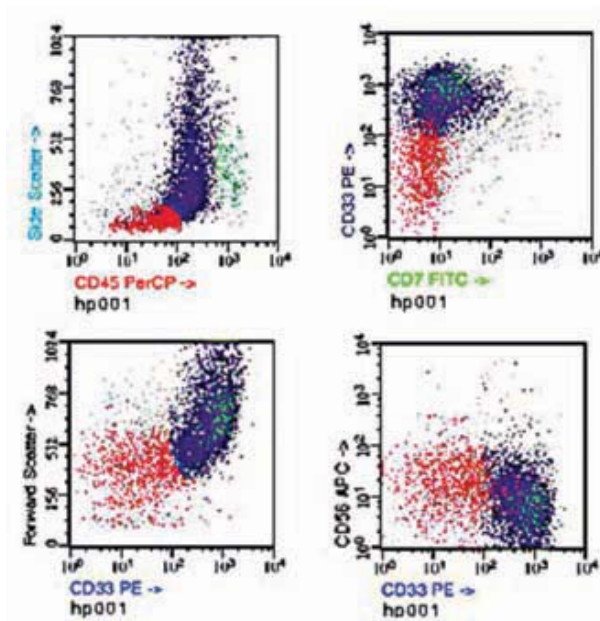


Fig 2. A primera vista la exhibición de CD45/RALS parece demostrar un caso directo de la leucemia mieloide con la diferenciación.

Sin embargo las células (rojas) son considerablemente más pequeñas, y demuestran menos expresión del antígeno mieloide asociado CD33, que las células más altas de RALS. Hay una cierta expresión aberrante parcial de CD7 en la población mieloide también.

Leucemias Bilineales y Bifenotípicas/Híbridas

La existencia de las leucemias linfoblásticas con coexpresión de antígenos asociados a línea mieloide y viceversa, de leucemias mieloblásticas con antígenos de línea linfóide, se conoce desde hace más de 10 años. Al margen de los problemas conceptuales que entrañan, con frecuencia generan serias dudas diagnósticas y, consecuentemente, terapéuticas. En la literatura existe notable confusión a la hora de emplear este diagnóstico. En primer lugar nos parece importante precisar la distinción entre leucemia bilineales, en las que coexisten dos poblaciones de blastos independientes - una mieloide y otra linfóide - y leucemias bifenotípicas en las que solo una población de blastos coexpresa antígenos asociados a la línea linfóide y mieloide. (Tabla 5).

Puntos	Línea B	Línea T	Línea mieloide
2	CD79a cIgM cIgM	CD3 Rct- ∞ B Rct- γ δ	MPO Lisozima
1	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 CD33 Cdw65
0.5	TdT CD24 CD1a	TdT CD7 CD1A	CD14 CD15 CD64

Se define como leucemia aguda bifenotípica la que simultáneamente puntúa >1 para línea linfóide y >2 para mieloide.

Las primeras son muy raras (<1%), mientras las segundas son relativamente frecuentes.

Para su correcto diagnóstico resulta imprescindible el empleo de dobles o triples marcajes. En segundo lugar, debe recordarse que son muy pocos los antígenos realmente específicos de línea: CD79, IgM, y CD22 citoplasmático para la línea linfóide B; CD79, Rct-ab y Rct-gd para la línea linfóide T y mieloperoxidasa y lisozima para la línea mieloide. En este sentido, por ejemplo, el Ag CD4 que inicialmente se consideró característico de una subpoblación de linfocitos T, hoy se sabe que esta también presente en la estirpe monocítica. Por otro lado, la incidencia de leucemias bifenotípicas está en relación directa con el número de marcadores utilizados y por eso en la literatura se describen resultados muy dispares. El grupo de St. Jude describe una incidencia del 22% en las LLA y del 60% en LMA; sin embargo, esta incidencia baja a un 6% y 17%, respectivamente, cuando se utiliza como criterio la coexpresión de dos o más Ags de línea opuesta.²⁴ Recientemente, el Grupo Europeo para la Caracterización Inmunológica de las Leucemias (EGIL) ha establecido un sistema de puntuación para definir las leucemias bifenotípicas tal y como se recoge en la tabla 2-4. Se han barajado varias explicaciones para la aparición de estas leucemias: regulación aberrante de la expresión genómica, transformación maligna de una célula stem pluripotente o una rara célula progenitora que en condiciones normales coexpresa características de más de una línea. No obstante, ninguna de ellas parece definitiva y, en este sentido, sobre una serie de 170 LA, hemos comprobado que la expresión de antígenos linfoides no se correlaciona con el reordenamiento de los genes de Igs y Rct. Por último, respecto al pronóstico de estas leucemias, ya hemos señalado la influencia de marcadores individuales de infidelidad de línea en el contexto de LLA y LMA; basta ahora añadir que en el caso de LA con expresión de Ag asociados a línea linfóide, si falla la respuesta al tratamiento convencional de LA, debe plantearse el empleo de un esquema orientado a LLA. Por otro lado, en el caso de leucemias con dos líneas celulares o bifenotípicas con dos o más marcadores de infidelidad quizá sea aconsejable el empleo de regímenes terapéuticos que cubran ambas líneas de diferenciación, como por ejemplo DATOP.



Material y Métodos

Recepción de muestra

1. Recepción de Historia Clínica
2. Análisis de marcadores a determinar. (Tabla 6)
3. Médula Ósea o sangre periférica (solo si presenta un nivel elevado de blastos)
4. Anticoagulante EDTA

Tabla 6. Paneles para la Determinación de Inmunofenotipo

BASE:	FL1	FL2	FL3	FL4
Tubo 1:	Control autofluorescencia			
Tubo 2:	CD45	CD34	CD20	CD19
Tubo 3:	Cy IgM	CD22		
Tubo 4:	HLA-DR	CD10		
Tubo 5:	CD5	CD13		
Tubo 6:	CD3	MPO	CD79a	

MIELOIDE:	FL1	FL2	FL3	FL4
Tubo 7:	CD15	CD11b	CD45	Maduración
Tubo 8:	CD14	CD33	CD34	Inmaduros

LINFOIDE T/NK	FL1	FL2	FL3	FL4
Tubo 7:	CD8	CD4	CD3	Monoclonalidad
Tubo 8:	CD7	CD34		T+NK+mieloide inmaduro
Tubo 9:	CD5	CD34		Expresión subpoblaciones T

LINFOMA	FL1	FL2	FL3	FL4
Tubo 7:	CD5	CD34		
Tubo 8:	Cy Kappa	CD56		
Tubo 9:	Cy Lamda	CD56		
Tubo 10:	FMC7	CD38		

Paneles para la Determinación de Inmunofenotipo con presunción de leucemia

BASE:	FL1	FL2	FL3	FL4
Tubo 1:	Control autofluorescencia			
Tubo 2:	CD45	CD10	CD34	CD19
Tubo 3:	Cy IgM	CD22		
Tubo 4:	CD33	CD13	CD45	
Tubo 5:	TdT	CD2		
Tubo 6:	CD3	MPO	CD79a	

Paneles para la Determinación de Inmunofenotipo con presunción de linfoma

BASE:	FL1	FL2	FL3	FL4
Tubo 1:	Control autofluorescencia			
Tubo 2:	CD45	CD10	CD34	CD19
Tubo 3:	Cy IgM	CD22		
Tubo 5:	TdT	CD2		
Tubo 8:	CD8	CD4	CD3	Monoclonalidad
Tubo 9:	CD7	CD34		T+NK+
Tubo 10:	CD5	CD34		Expresión T
Tubo 6:	Cy Kappa	CD56		
Tubo 7:	Cy Lamda	CD56		
Tubo 7:	FMC7	CD38	CD45	

Rotulación

1. Rotular dos tubos Falcom de 15ml

Lizado Celular

1. Adicionar de la sangre total (o muestra 106 cel/ul) a un tubo madre.
2. Adicionar FACS Lysing solution diluido a 1X (Cat 349202)
3. Vortex

4. Lizar
5. Centrifugar
6. Retirar el sobrenadante.

Segundo Tubo

1. Colocar mitad de la muestra del tubo madre.
2. Adicionar Permeabilising solution
3. Vortex
4. Lizar
5. Centrifugar
6. Retirar el sobrenadante.

Lavado

1. Lavar adicionando FACSFlow o PBS que contiene 0.5% de suero albúmina bovina (BSA)
2. Vortex
3. Centrifugar
4. Retirar sobrenadante
5. Repetir el proceso de lavado dos veces al tubo madre y al segundo tubo.

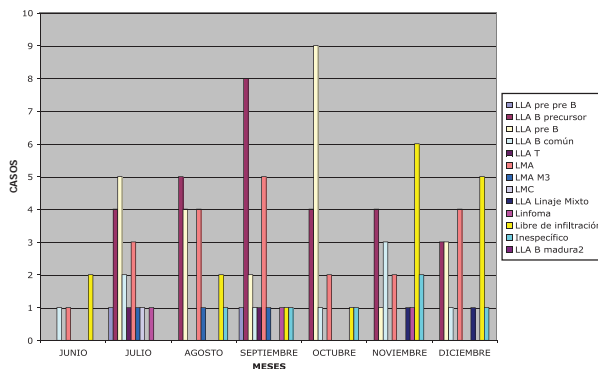
Marcación de Superficie e Intracelular

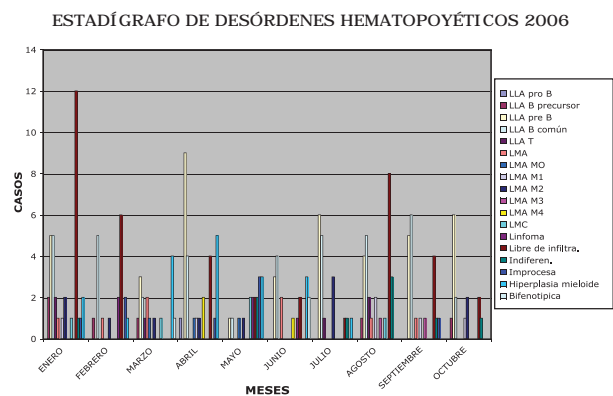
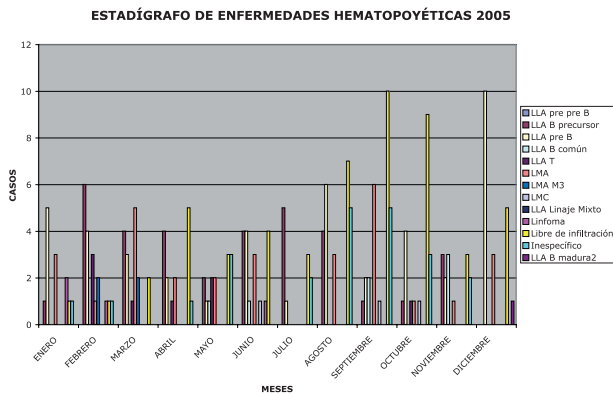
1. Colocar muestra del tubo madre a un set de tubos previamente rotulados.
2. Adicionar marcadores monoclonales considerando panel seleccionado.
3. Adicionar marcadores monoclonales en caso de considerar necesario un segundo panel de subclasificación (Tabla 6)

Resultados y Discusión

La población estudiada obtenida en ION-SOLCA en el periodo comprendido de Junio del 2004 a Octubre del 2006 fue realizada a un grupo etéreo nacional, de pacientes con presunción diagnóstica de patologías hematopoyéticas las hemos presentado en los siguientes estadígrafos:

ESTADÍGRAFO DE DESÓRDENES HEMATOPOYÉTICOS 2004





- La incidencia de la leucemia aguda linfoblástica (LLA) fue la neoplasia maligna más frecuente en nuestra población pediátrica, que correspondió al 80% de los pacientes estudiados, mientras que el 25% correspondieron a las leucemias mieloides agudas (LMA) lo cual coincide con la literatura mundial.

De las LMA observadas el 7% mostró coexpresión de Ags asociados a la línea linfóide siendo estos los más frecuentes CD10 y CD19.

- La incidencia de la leucemia mieloide aguda (LMA) en adultos fue del 60% mientras que el 35% correspondió a las leucemias linfoides agudas (LLA).

En cambio en las LLA se observó coexpresión de Ags asociados a la línea mieloide en un 4%, siendo los marcadores más frecuentemente encontrados: MPO, CD33 Y CD13.

En nuestra experiencia, utilizando sistemáticamente dobles marcajes creemos que la puntuación asignada a algunos de los marcadores puede ser discutible y, en general, cualquier grupo experimentado es capaz de definir el origen de la leucemia basándose en la especificidad de marcadores como CD3, CD79a, CD22 o MPO. Además basándonos con la experiencia de otros grupos de citometristas coincidimos

en no ser partidarios del empleo de los clásicos puntos de corte para considerar la positividad de un Ag (ej:20%), ya que los actuales sistemas de análisis de citometría de flujo pueden mostrar que esos bajos porcentajes corresponden a subpoblaciones claramente identificables y quizás con relevancia pronóstica, como es el caso de la determinación de la presencia de blastos en EMR.

En conclusión del total de nuestra población hospitalaria estudiada durante este tiempo presentó una mayor incidencia en la leucemia linfóide aguda (LLA) (60%), mientras que la leucemia mieloide aguda (LMA) sigue siendo la de menor incidencia (35%).

Bibliografía

1. Grogan TM, Van Camp B, Kyle RA, Müller-Hermelink HK, Harris NL. Pathology and genetics of tumors of haemato-poietic and lymphoid tissues. In: Grogan TM, et al (eds). World Health Organization Classification of Tumors (WHO): Plasma cell neoplasm, Lyon: IARC Press, 2001, pp 142-56.
2. Knowles DM. B-cell Immunoproliferative disorders, including multiple myeloma and amyloidosis. In: Knowles DM (eds). Neoplastic Hematology. 2nd ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp 1557-72.
3. Creixentí J, Rozman C. Gammopatías monoclonales. En: Farreras P; Rozman C. Medicina interna. 13º ed. Madrid: Mosby-Doyma, 1995, pp 1753-60.
4. Salmon SE, Cassady JR. Plasma cell neoplasm. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg S, (eds.) Cancer, Principles and Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1988, p 1854.
5. Barlogie B, Epstein J, Selvanayagam P, Alexanian R. Plasma cell myeloma-new biological insights and advances in therapy. Blood 1989; 73: 865-79. Kyle RA. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. Natural history in 241 cases. Am J Med 1978; 64: 814-26.
7. Kyle RA. "Benign" Monoclonal gammopathy- After 20 to 35 years of follow-up. Mayo Clin Proc 1993; 68: 26-36.
8. Regis-Bataille, Harousseau JL. Multiple Myelo



- ma. *N Engl J Med* 1997; 23: 1657-64.
9. Wijdenes J, Clement C, Klein B, Dore JM. New B-cell CD antigens. BC29: CD138 (syndecan-1) workshop panel report. In: Kishimoto T, et al (eds). *White cell differentiation antigens*. 6th ed. London: Garland Publishing Inc, 1997, pp 149-52.
 10. Sahara N, Ihara M, Ono T, et al. Multiple myeloma expressing CD19+ CD56- phenotype. *Am J Hematol* 2000; 64: 311-3.
 11. Sioutos N, Bagg A, Michaud G, et al. Polymerase chain reaction versus Southern Blot hybridization. *Diag Mol Pathol* 1995, 4: 8-13.
 12. Bagg A, Braziel RM, Arber DA, Bijwaard KE, Chu AY. Immunoglobulin heavy chain gene analysis in lymphomas: a multi-center study demonstrating the heterogeneity of performance of polymerase chain reaction assays. *J Mol Diagn*. 2002; 4: 81-9.
 13. Saiki R, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.
 14. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica* 2001; 86: 837-43.
 15. Bayer-Garner I, Sanderson R, Dhodapkar M, Owens R, Wilson C. Syndecan-1 (CD138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma: Shed syndecan-1 accumulates in fibrotic regions. *Mod Pathol* 2001; 14: 1052-8.
 16. Gattei V, Godeas C, Degan M, Rossi FM, Aldinucci D, Pinto A. Characterization of anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *Br J Haematol* 1999; 104: 152-62.
 17. Sebstyen A, Berczi L; Mihalik R, Paku S, Malo losy A, Kopper L. Syndecan-1 (CD138) expression in human non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol* 1999; 104: 412-9.
 18. Costes V, Magen V, Legouffe E, et al. The MI15 monoclonal antibody (antisyndecan-1) is a reliable marker for quantifying plasma cells in paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Human Pathol* 1999; 30: 1405-11.
 19. Harada H, Kawano MM, Hung N, et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993; 81: 2658-63.
 20. Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol* 1997; 97: 46-55.
 21. Swedin A, Lenhoff S, Olfsson T, Thuresson B, Westin J. Clinical utility of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement identification for tumor cell detection in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1998; 103: 1145-51.
 22. Jacquy C, Delapaut B, van Daele S, et al. A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. *Br J Haematol* 1997; 98: 140-6.
 23. Goulden NJ, Knechtli CJ, Garland RJ, et al. Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1998; 100: 235-44.
 24. Perea Alicia, et al. Resultados del tratamiento a largo plazo de 200 niños con leucemia linfoblástica aguda. *St. Jude N Engl J Med* 1995, 332:618

