

Importancia del estudio inmunológico para el diagnóstico y tratamiento de las leucemias agudas

García-Caraballosa MB¹, Cedré-Hernández T¹, Marsán-Suárez V², Martínez-Cárdenas L¹, García-Sánchez D³.

¹Hospital Pediátrico Provincial Universitario “José Luis Miranda”, Villa Clara; ²Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana; ³Hospital Pediátrico Paquito González, Cienfuegos, Cuba.

Email: martabeatrizgc@infomed.sld.cu

RESUMEN

Las leucemias agudas constituyen el cáncer más frecuente en la infancia y la adolescencia. En sus inicios, el diagnóstico y clasificación se fundamentó en los rasgos morfológicos pero en la actualidad se necesitan herramientas especializadas que incluyen el inmunofenotipo, la citogenética y la biología molecular. Se realizó un estudio descriptivo transversal de 49 pacientes diagnosticados con leucemia aguda en el Hospital Pediátrico Universitario José Luis Miranda de Villa Clara, 30 tenían diagnóstico morfológico de Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), 14 de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) y 5 de Leucemia aguda (LA) sin clasificación morfológica. El inmunofenotipaje celular de la médula ósea fue realizado por Citometría de Flujo (CMF) en el Instituto de Hematología e Inmunología entre Enero 2013 y Diciembre 2016. Se analizaron los resultados de la morfología y la CMF, con el objetivo de corresponder los criterios morfológicos e inmunológicos en pacientes con leucemia aguda. **Resultados:** por inmunofenotipo se diagnosticaron 25 LLA, 19 LMA y 5 LA Híbridas. De las LLA el 80 % fue de estirpe B y el 20 % T. De las LMA se logró definir por CMF 3 M0 y una M7. Hubo correlación entre el diagnóstico morfológico y el inmunofenotipo en el 83.3 % en el caso de las LLA y de un 85.7 % en las LMA. En los casos de LA sin clasificación morfológica la CMF definió 2 como LMA y 3 como LA Híbrida. El inmunofenotipaje celular demostró ser un procedimiento útil por su

sensibilidad y especificidad, para confirmar el diagnóstico morfológico de las leucemias agudas, además permitió individualizar la terapéutica para cada fenotipo leucémico.



Palabras clave: leucemias agudas, inmunofenotipaje celular, citometría de flujo.

INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas constituyen el cáncer más frecuente en la infancia y la adolescencia. La leucemia linfocítica aguda (LLA) representa el 80 % y la leucemia mieloide aguda (LMA) el 20 % en los pacientes pediátricos.^{1,2}

En sus inicios, el diagnóstico y clasificación se fundamentó en los rasgos morfológicos pero en la actualidad se necesitan herramientas especializadas que incluyen el inmunofenotipo, la citogenética y la biología molecular.¹

La inmunofenotipificación por medio de citometría de flujo es la única técnica que cumple los requisitos de alta velocidad, amplia aplicabilidad en el diagnóstico y el seguimiento, además de dar un enfoque preciso sobre la población de células malignas presentes, usando proteínas unidas a membrana y proteínas intracelulares como blanco de medición.²⁻⁵

Por estas razones permite, entre otros, un diagnóstico rápido y preciso, lo cual posibilita un tratamiento individualizado, el seguimiento objetivo de la enfermedad según cada caso y una evaluación precisa de la efectividad del tratamiento de los pacientes. Este tipo de monitoreo es fundamental porque de acuerdo con la clasificación de la enfermedad se elige un tratamiento específico, tema de vital importancia dado que la quimioterapia es costosa y produce intensos efectos adversos. Todas estas razones aumentan la calidad de vida del paciente, además de contribuir positivamente a la supervivencia de estos.²⁻⁵

Estas características han posicionado a la citometría de flujo para clasificación inmunológica de leucemias y linfomas como un proceso costo-eficiente, y además han permitido su establecimiento como una estrategia de seguimiento clínicamente efectiva.²⁻⁵

En las últimas décadas la caracterización inmunofenotípica ha sido incorporada en distintas clasificaciones de leucemias agudas, como la clasificación inmunológica del *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL) y la Clasificación de Tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides de la *World Health Organization* (WHO).²⁻⁵

Las LA se clasifican inmunofenotípicamente en:

1. Leucemias linfoides agudas (LLA)
2. Leucemias mieloides agudas (LMA)
3. Leucemias agudas de linaje ambiguo (LALA)

Las LALA incluyen a las LLA con expresión aberrante de antígenos mieloides (LLA-Mi+), las LMA asociadas a marcadores linfoides (LMA-Li+), las LA indiferenciadas (LAI) y aquellas de linaje mixto o híbridas (LAH).³

OBJETIVO

Corresponder los criterios morfológicos e inmunológicos en pacientes con leucemia aguda diagnosticados en el Hospital Provincial Pediátrico Universitario José Luis Miranda de Villa Clara.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo transversal en 49 pacientes diagnosticados con leucemia aguda en el Hospital Pediátrico Provincial Universitario José Luis Miranda de Villa Clara. De ellos 30 con diagnóstico morfológico de LLA, 14 con LMA y cinco de leucemia aguda, en el período enero 2013- diciembre del 2016. Las variables analizadas fueron: diagnóstico citomorfológico e inmunofenotipo.

El inmunofenotipaje celular (IFC) se desarrolló por la técnica de CMF, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Hematología e Inmunología, con el empleo de anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos contra los antígenos de diferenciación: linfoides y mieloides.

Panel de anticuerpos monoclonales empleados en el diagnóstico por citometría de flujo.



<u>Anticuerpos monoclonales</u>	<u>Fluorocromos</u>	<u>Clones</u>
Anti- CD2	FITC*	MT910
Anti- CD3	PE*	UCHT1
Anti- CD5	PE*	DK23
Anti- CD7	FITC*	CBC.37
Anti- CD4/CD8	FITC/PE*	Multi Mix™
Anti- CD10/CD19	FITC/PE*	Multi Mix™
Anti- CD20	PE*	B- Ly1
Anti- CD79a	FITC*	SN8
Anti- CD13	PE*	WM- 47
Anti- CD14	FITC*	TÜK4
Anti- CD15	FITC*	C3D- 1
Anti- CD33	FITC*	WM- 54
Anti- CD34	PE*	BIRMA- K3
Anti- CD38	FITC*	AT13/5
Anti- CD45	APC*	T29/33
Anti- CD117	PE*	104D2
Anti- HLA-DR	PE*	AB3
Anti- MPO	FITC*	- 7

MPO: mieloperoxidasa, FITC: isotiocianato de fluoresceína, PE: ficoeritrina, PC: alofocianina, HLA- DR: antígeno leucocitario humano de tipo II, *: DAKO, **: Beckman Coulter.

En todos los casos, los AcMo conjugados directamente a los fluorocromos: FITC, PE y APC, fueron previamente titulados. Se utilizó la dilución óptima de fluorescencia del reconocimiento de la reacción antígeno-anticuerpo no solo con fines económicos sino también, para evitar la sobresaturación del antígeno.

Para determinar la cantidad en μL de médula ósea (MO) a utilizar para cada determinación antigénica, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad en } \mu\text{L} = \frac{500\,000 \text{ células}}{\text{Número total de leucocitos de la muestra}}$$

Las muestras se incubaron durante 20 a 30 minutos, oscuro y a temperatura ambiente. Para la detección de los antígenos intra-citoplasmáticos (CD3, CD79a y MPO), se empleó previamente 250 μL del reactivo permeabilizador-estabilizador *BD Cytotfix/CytopermTM*, el cual se incubó por 30 min, oscuro, a temperatura ambiente. El lisado de los hematíes se llevó a cabo con cloruro de amonio, durante 10 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas en dos ocasiones con cloruro de sodio a 0,9 % y centrifugadas durante 10 min a 1500 rpm. Las células se fijaron con 300 μL de formaldehído a 1 % para conservar su viabilidad y luego, fueron guardadas a 4 °C hasta ser leídas en un citómetro *GALLIOS, Beckman Coulter*.

Los datos obtenidos se analizaron con el empleo del programa informático *Kaluza*, versión 1.2.

Se consideró positivo, si el porcentaje fue igual o mayor que 20 % de los blastos que expresaron el antígeno en la membrana celular e igual o mayor que 10 %, para los antígenos intracitoplasmáticos.

Las Leucemias Agudas se clasificaron inmunológicamente, según los criterios del Grupo EGIL^{2,5} basados en los diferentes marcadores antigénicos expresados sobre los blastos.

Con los datos obtenidos se confeccionó una base de datos y el análisis estadístico se realizó con el programa *SSPS* versión 15.0.

RESULTADOS

Del total de pacientes estudiados (49) por inmunofenotipo se diagnosticaron 25 LLA, 19 LMA y 5 LA Híbridas.

De las LLA el 80 % (20) fue de estirpe B y el 20 % (5) T. La variedad B común predominó (70 %) en relación con el resto de los subtipos inmunológicos. Los pacientes con LLA- T temprana (80 %) prevalecieron sobre aquellos con la variedad T madura.

De las LMA se logró definir por CMF 3 M0 y una M7.

El fenotipo más frecuente en las leucemias híbridas fue el B/Mieloide (80 %) y un paciente con fenotipo B-T/Mieloide.

En 37 enfermos (84 %) hubo correspondencia entre la morfología y el diagnóstico inmunológico. Hubo correlación entre el diagnóstico morfológico y el inmunofenotipo en el 83,3% en el caso de las LLA y de un 85,7 % en las LMA (Tabla).

En los casos que la morfología no logró identificar el linaje de los blastos la CMF definió 2 como LMA y 3 como LA híbrida.

CONCLUSIONES

El inmunofenotipaje celular demostró ser un procedimiento útil por su sensibilidad y especificidad, para confirmar el diagnóstico morfológico de las leucemias agudas, además permitió individualizar la terapéutica para cada fenotipo leucémico.

Tabla. Relación entre diagnóstico morfológico e inmunofenotipo



Inmunofenotipo	Morfología						Total	
	LLA		LMA		LA			
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
LLA	25	83,3	0	0	0	0	25	51,0
LMA	5	16,7	12	85,7	2	40	19	38,7
LAH	0		2	14,3	3	60	5	10,3
Total	30	100	14	100	5	100	49	100

LLA: leucemia linfoide aguda, LMA: leucemia mieloide aguda; LAH: Leucemia aguda híbrida

BIBLIOGRAFÍA

1. Generalidades. En: Programa integral para el control de cáncer en Cuba. Protocolos de diagnóstico y tratamiento de hemopatías malignas en pediatría. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2012. p. 13-6.
2. Marsán- Suárez V, del Valle Pérez LO, Díaz- Domínguez G, Macías Abraham C, Machín – García S, Lam- Díaz RM, et al. Correlación entre morfología y citometría de flujo en la Leucemia Linfoide Aguda Infantil. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter [Internet]. 2016 [citado marzo 2017]; 32(4): [aprox. 9p.]. Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/445/260>
3. Marsán- Suárez V, del Valle Pérez LO, Díaz- Domínguez G, Macías Abraham C. Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter [Internet]. 2015 [citado marzo 2017]; 31(3): [aprox. 11p.]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892015000300003
4. Pino Blanco D, Macías Abraham C, Lahera Sánchez T, Marsán Suárez V, Sánchez Segura M, Valle Pérez L, et al. Caracterización inmunofenotípica de pacientes con leucemia mieloide aguda. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter [Internet]. 2014 [citado marzo 2017]; 30(1): [aprox. 9p.]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892014000100005

5. Dorantes-Acosta E, Medina-Sansona A, Dávila-Ornelasb K, López-Martínez B. Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia). GAMO [Internet]. 2013 [citado marzo 2017]; 12(3): [aprox. 6p.]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-clasificacion-inmunologica-las-leucemias-agudas-X1665920113270088>

