

APLICACION DE TECNICAS INMUNOCITOQUIMICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS

NORMA B. DIAZ de DOMINGO, MARTA M. LARDO, JORGE ROMERO ARTAZA, AMALIA MERELLI, CLAUDIO D. CARBIA, JULIO C. SANCHEZ AVALOS

Departamento de Bioquímica Clínica y Servicio de Hematología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen Se estudiaron 22 pacientes con neoplasias hematológicas que incluían: 12 pacientes con diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) de novo, según criterio morfológico y citoquímico establecido por la FAB (Comité Francés, Americano, Británico), una LMA secundaria a Síndrome mielodisplásico (SMD), y una leucemia aguda bifenotípica, donde se correlacionó la reacción citoquímica de peroxidadas con la metodología de anti-mieloperoxidasa (MPO) por fosfatasa alcalina anti-fosfatasa (AFAAF). Los estudios fueron completados con la reacción citoquímica de esterasas inespecíficas y el fenotipo inmunológico se estableció por citometría de flujo para definir la estirpe celular mieloide o linfoide. La misma técnica fue utilizada para el análisis celular de restricción de cadenas livianas κ y λ en 8 pacientes con desórdenes linfoproliferativos malignos de origen B que comprendían 3 casos de Leucemia a células vellosas (HCL), 1 caso de Linfoma leucemizado y 4 casos de neoplasias de células plasmáticas vs una plasmocitosis reactiva. Se concluye que las reacciones inmunocitoquímicas aplicadas a las patologías estudiadas y otras enfermedades hematopoyéticas son útiles cuando la morfología y la citoquímica no han sido concluyentes para establecer un correcto diagnóstico y para distinguir un linaje celular, por ej. linfoma tipo B y T. Sin embargo, se debe enfatizar que su uso diagnóstico es útil como técnica complementaria de los estudios histopatológicos, morfológicos, citoquímicos y fenotípicos celulares, siendo aún discutida su importancia pronóstica.

Abstract *Immunocytochemistry techniques for the diagnosis of hematological neoplasias.* We studied 22 patients with hematological neoplasias which included: 12 patients with a diagnosis of Acute Myeloblastic Leukemia (AML) following the morphology and cytochemistry criteria established by FAB (French, American and British Committee), a Myeloblastic Leukemia secondary to MDS (Myelodysplastic Syndromes) and a biphenotypic acute leukemia where we established the relationship between the traditional peroxidase reaction with the anti-MPO by APAAP. We also carried out the nonspecific esterase reaction and determined the immunologic phenotype by FACS technology. The same procedure was used for the cellular analysis of the light chains κ (kappa) and λ (lambda) in 3 cases of hairy cell leukemia, one lymphoma and 4 cases of plasma cell neoplasia and reactive plasma cell disease. We conclude that immunocytochemical reactions must be used when morphology and traditional cytochemical reactions need to be confirmed in order to establish a correct diagnosis and this is specially important for B and T lymphomas. Their prognostic value is restricted and the results are useful as a complement to morphology, cytochemistry and immunological determinations.

Key words: monoclonal antibodies, immunoenzymatic labeling, immuno-alkaline phosphatase technique

Las leucemias y linfomas son procesos neoplásicos del tejido hematopoyético cuyas células presentan generalmente una expresión característica de antígenos tanto citoplasmáticos como de superficie. La identificación de un antígeno es importante para establecer un correcto diagnóstico en muchas de estas enfermedades. El grupo de estudio en Leucemias Agudas, Franco-Americano-Británico (FAB) basa la clasificación de las mismas en las características morfológicas y reacciones citoquímicas tales como mieloperoxidasa (MPO), Sudán Black y esterasas

citoplasmáticas^{1,2}. El uso de anticuerpos monoclonales ha hecho posible clasificar más objetivamente a las células indiferenciadas mediante las técnicas de citometría de flujo, a las cuales se les suma actualmente estudios de otros marcadores celulares con técnicas inmunocitoquímicas, estudios de reordenamiento genético^{3,4} y citogenéticos^{5,6}, que han permitido una mayor identificación de subtipos de leucemias, algunas con importancia pronóstica. Las técnicas inmunocitoquímicas permiten el análisis de una población homogénea obtenidas por aislamiento en gradiente de Ficoll-Hipaque, donde es evaluado el antígeno específico que se desea investigar a fin de determinar el fenotipo madurativo de la célula y su compromiso clonal. Se dispone de dos complejos inmunoenzimáticos como Peroxidasa anti-Peroxidasa (PAP) y Fosfatasa alcalina-anti-fosfatasa

Recibido: 2-VI-1998

Aceptado: 5-XI-1998

Dirección postal: Dra. Norma B. Díaz de Domingo, Palpa 3387, 1426 Buenos Aires, Argentina
Fax: 54-1-4508-3889; E.mail: diaz@dbc.ffyb.uba.ar

alcalina (FAAF) que pueden ser aplicados en células de sangre periférica, médula ósea (MO) y también en otros tejidos como ganglio, bazo, piel, etc. La selección de una de ellas depende de la versatilidad de la muestra y del grado de infiltración que presente el tejido a estudiar. La técnica de FAAF es ampliamente usada en células de sangre periférica en el diagnóstico de Leucemias Agudas y Linfomas leucemizados, permitiendo una rápida visualización "in situ" por microscopía óptica, mientras que en otros tejidos es similarmente útil la técnica de PAP.

Material y métodos

Se estudiaron 22 pacientes con neoplasias hematológicas que se dividieron en 2 grupos:

Grupo 1: 14 pacientes con leucemias mieloides agudas según la clasificación FAB.

Grupo 2: 8 pacientes con desórdenes linfoproliferativos malignos de origen celular B, neoplasias con compromiso de células plasmáticas y un caso de plasmocitosis reactiva. Se trabajó con muestras de sangre periférica y médula ósea anticoaguladas con EDTA y heparina. Las células fueron obtenidas por separación en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque o Percoll. A las células mononucleares así aisladas, se las lavó con RPMI 1640, luego se resuspendieron en 2 ml de PBS, se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer y se llevó a una concentración final de células igual a 5.10^5 cel/ml. Se probó la viabilidad celular usando como colorante azul tripan debiendo ser la misma aproximadamente de un 80-90%. Luego se sometieron a una citocentrifugación de manera tal de obtener una monocapa celular usando una citocentrífuga Shandon 3, se sembró 100 μ l de una suspensión celular en una concentración aproximada de 5.10^5 cel/ml y se centrifugó 10 minutos a 600 rpm. Los citopreparados fueron secados al aire por 1 a 2 hs, se conservaron en papel absorbente y papel de aluminio a -20°C . (Se debe tener en cuenta que los preparadas tienen que tomar temperatura ambiente antes de su procesamiento).

Técnica de fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina

Se realizó la técnica inmunoenzimática de fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina, según método de Cordell et al⁷, que incluye las siguientes etapas:

Fijación

Se escogió el fijador según el antígeno a determinar. Se usó acetona durante 10 min para línea mieloides (detección de mieloperoxidasa) y una mezcla de acetona-metanol-formol (19:19:2) durante 30"-1 min para línea linfoides (detección de κ , λ y CD23).

Se incubó con el anticuerpo (Ac) primario, posteriormente previo lavado se aplicó el Ac. secundario o puente y el complejo APAAP (fosfatasa alcalina-anti fosfatasa alcalina). La visualización de la reacción se realizó usando como sustrato fosfato de naftol AS-MX y se reveló con fast red TR.

Preparación de anticuerpos monoclonales primarios

Como anticuerpos monoclonales primarios se usó anticuerpos de ratón:

a) Ig G₁, kappa anti-mieloperoxidasa humana de ratón = DAKO-MPO-7 dilución óptima: 1/100 en TBS.

b) Ig G₁, kappa anti-cadenas livianas lambda humana = DAKO-Kappa A8B5 dilución óptima 1/50 en TBS.

c) Ig G₁, kappa anti-cadenas livianas kappa humana = DAKO-Kappa A8B5 dilución óptima: 1/50 en TBS.

d) Ig G₁, kappa anti CD23 humana = DAKO-Cloné MHM6 dilución óptima: 1/50 en TBS.

Preparación del anticuerpo secundario

Como anticuerpo secundario (anticuerpo puente) se usó: anticuerpo de conejo antiinmunoglobulinas de ratón (DAKO), dilución óptima: 1/25 on TBS.

Preparación del complejo APAAP (Fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina)

Consiste en un complejo soluble de fosfatasa alcalina de intestino delgado vacuno y anticuerpo monoclonal de ratón antifosfatasa alcalina (DAKO), dilución óptima 1/50 en TBS.

Controles celulares para anti-MPO

Se usó una suspensión celular de 1 por 10^6 cel/ml, de línea monoblástica U-937 de un paciente portador de un linfoma no Hodgkin histiocítico difuso⁸ como modelo de diferenciación monocitaria (control negativo) y una suspensión celular de línea promielocítica HL-60⁹ como control positivo.

Controles celulares para CD 23, κ , λ

Para el resto de los anticuerpos monoclonales testeados se usó una suspensión de 1 por 10^6 cel/ml obtenidas de pacientes bien clasificados con neoplasias de células malignas de línea diferente no reactivas para κ , λ o CD 23.

Resultados

Se estudiaron 22 pacientes con neoplasias hematológicas que se dividieron en 2 grupos: El primer grupo

TABLA 1.- Porcentaje de células positivas para peroxidasa y anti- MPO en Leucemias agudas

| Caso | Clasificación FAB | Peroxidasa mieloides % | anti-MPO % |
|------|-------------------|------------------------|------------|
| 1 | M2 | 33 | 45 |
| 2 | M2 | 63 | 85 |
| 3 | M1 | 20 | 30 |
| 4 | M4 | 26 | 50 |
| 5 | M4 | 5 | 10 |
| 6 | M2 | 16 | 30 |
| 7 | 4 | 16 | 28 |
| 8 | M4 | 14 | 15 |
| 9 | M1 | 50 | 80 |
| 10 | M0 | 2 | 12 |
| 11 | M1 | 4 | 22 |
| 12 | M2 | 20 | 60 |
| 13 | M1 | 4 | 25 |
| 14 | L. Bifenotípica | 18 | 60 |

TABLA 2.- Porcentajes de células positivas por el método FAAF para κ , λ y CD 23, su correlación con fosfatasa ácida leucocitaria en desórdenes linfoproliferativos malignos de origen B, neoplasias con compromiso de células plasmáticas y plasmocitosis reactiva

| Caso | Diagnóstico | % CD23 | % λ | % κ | Fosfatasa ácida leucocitaria | TRAP* |
|------|-----------------------------------|--------|-------------|-------------|------------------------------|-------|
| 1 | Leucemia a células vellosas | 5 | 70 (fuerte) | 2 | 77 | 37 |
| 2 | Leucemia a células vellosas | 0 | 80 (fuerte) | 0 | 80 | 65 |
| 3 | Leucemia a células vellosas | 0 | 0 | 55 | 55 | 20 |
| 4 | Linfoma leucemizado de bajo grado | 0 | 60 | 10 | - | - |
| 5 | Macroglobulinemia de Waldenström | 0 | 37 | 67 | - | - |
| 6 | Plasmocitosis reactiva | 0 | 15 | 20 | - | - |
| 7 | Mieloma micromolecular | 0 | 0 | 70 (fuerte) | - | - |
| 8 | Mieloma múltiple | - | 0 | 52 | - | - |

* Fosfatasa ácida tartrato resistente

comprendía 14 pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA) de novo y una LMA secundaria a síndrome Mielodisplásico. Se clasificaron según FAB en: 4 de tipo M1, 4 de tipo M2, 4 de tipo M4, 1 de tipo M0 y una Leucemia aguda Bifenotípica de acuerdo a los antígenos celulares presentes.

En la Tabla 1 se muestra el % de células positivas para la reacción de peroxididasas y el % de células anti-MPO por APAAP en sangre periférica.

Para el diagnóstico de leucemia mieloide aguda se completó el estudio con la reacción citoquímica de PAS (periodic acid Schiff) que indica presencia de glucógeno citoplasmático como marcador linfoide y la reacción de esterasas inespecíficas utilizando como sustrato el α -naftil acetato/FNa inhibible, para células monoblástica-monocíticas como compromiso de línea pura o mixta.

El fenotipo inmunológico por citometría de flujo fue CD 33+, CD 13+, para los casos analizados correspondientes a M0, M1 y M2; en los pacientes 4, 5, 7 y 8 clasificados como M4 el fenotipo fue CD 33+, CD 13+ y CD 14+ en más del 20% de las células (componente monoblástico). El paciente 14 expresaba además de los antígenos pan mieloides CD 33 y CD 13, los antígenos linfoides: CD 10+, CD 19+ y CD 22+, lo que permitió clasificarlo como una leucemia bifenotípica por la expresión de los antígenos mieloide y linfoide simultáneamente. La reacción citoquímica de PAS fue negativa en todos los pacientes. Las reacciones de esterasas inespecíficas fueron positivas intensas en los casos 4, 5, 7 y 8 con más del 80% de células inhibibles por FNa.

El caso 11 fue una leucemia mieloide aguda secundaria a un síndrome mielodisplásico, no difiriendo en sus marcadores citoquímicos e inmunológicos de las leucemias mieloides agudas de novo.

El patrón de reacción de peroxididasas (Tabla 1), mostró un amplio rango de variación en el porcentaje de células positivas (2 al 63%), lo cual fue corroborado con la técnica de FAAF, si bien con esta técnica se obtuvo un mayor porcentaje de células positivas que con la reacción citoquímica.

El segundo grupo estudiado estaba formado por 8 pacientes con desórdenes linfoproliferativos malignos de origen celular B, neoplasias con compromiso de células plasmáticas y 1 caso de plasmocitosis reactiva (Tabla 2). En estos últimos pacientes se determinó el porcentaje de células positivas para cadenas livianas κ y λ , intracitoplasmáticas por el método de FAAF. Además se usó el anticuerpo monoclonal CD 23 como marcador que se expresa fuertemente en células B activas y débilmente en células B maduras.

En 3 pacientes con HCL (leucemia a células vellosas) (Tabla 2), diagnosticadas por sus características clínicas y por la presencia en sangre periférica de más del 45% (45-73) de células de aspecto veloso, infiltración de MO por más del 30% de esas mismas células e intensa fibrosis medular. El estudio inmunológico mostró los antígenos: CD 25+, CD 11c+ y CD5⁻¹⁰. La reacción de Fosfatasa ácida leucocitaria (AS Bifosfato) fue positiva en más del 40% de las células (48-80), siendo el 37-65% de ellas tartrato resistentes (TRAP).

El caso 4 correspondió a un linfoma de bajo grado leucemizado con infiltración linfoide en MO mayor al 30%, siendo el fenotipo obtenido por citometría de flujo: CD 19+, CD 20+ y CD 23-. Por el método FAAF para el estudio de cadenas livianas λ se encontró positividad en 60% de las células aisladas en médula ósea y sólo en el 10% para cadenas livianas κ . (Tabla 2). Además en sue-ro

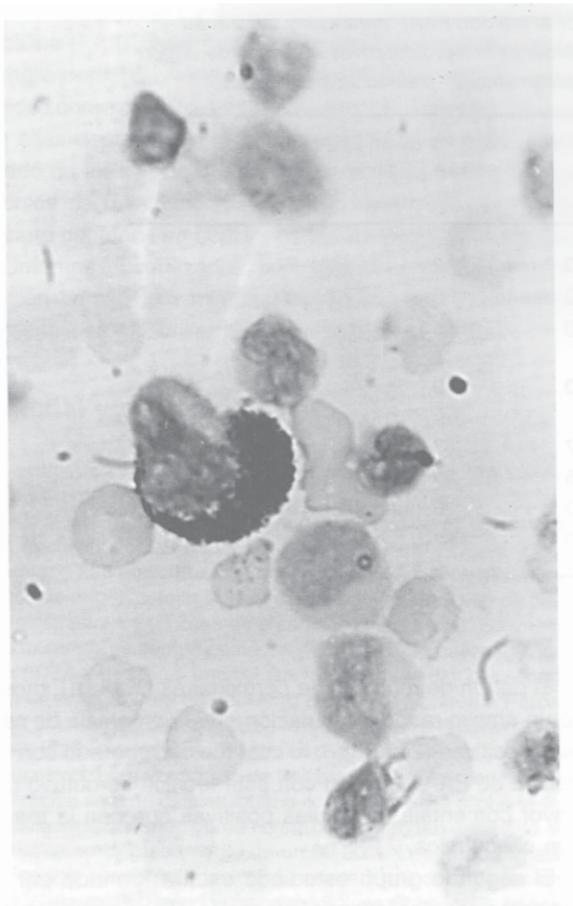


Fig. 1.- Reacción de anti-MPO por AFAAF en L. mieloide aguda. Se observa en 100 X una célula fuertemente positiva y el resto negativas.

presentaba una banda monoclonal de tipo IgG de tipo λ .

El estudio por inmunocitoquímica para cadenas livianas κ y λ intracitoplasmáticas fue también efectuado en las células plasmáticas presentes en estas patologías (Tabla 2). El caso 5 correspondió a una macroglobulinemia de Wäldeström, con infiltración de elementos linfoides en MO mayor del 40% y un 10% de células plasmáticas, con banda monoclonal en suero de clase IgM- κ . Por el método FAAF los resultados fueron: λ : 37% y κ : 67%. El caso 6 presentaba una infiltración del 30% de células plasmáticas en MO sin atipias morfológicas y sin cuadro clínico de osteolisis, con absceso testicular cuya biopsia mostró infiltración por células plasmáticas policlonales de acuerdo a las cadenas livianas de superficie estudiadas por inmunohistoquímica lo cual se correlacionó con similar hallazgo en las células plasmáticas de médula ósea por el método inmunocitoquímico de FAAF (λ : 15% y κ : 20%). El caso 7 correspondió a un mieloma de tipo micromoleculador, con infiltración de células plasmáticas y plasmoblastos ma-

yor del 30% en MO, siendo los resultados por la técnica de FAAF: λ : 0%; κ : 70%. El caso 8 se trataba de un Mieloma múltiple con células plasmáticas en sangre periférica mayor al 70% e infiltración masiva de médula ósea (Leucemia de células plasmáticas), cuyas células mostraron un fenotipo CD 38+, fuerte reacción a la fosfatasa ácida leucocitaria, tartrato sensible y estudio inmunocitoquímico para cadenas livianas λ : 0% y κ : 52%. En todos estos pacientes⁵⁻⁸ la existencia o no de un exceso clonal de cadenas livianas fue de una importante ayuda diagnóstica.

Discusión

Las técnicas usadas para establecer el inmunofenotipo celular sea por inmunocitoquímica, citometría de flujo e inmunohistoquímica resultan útiles como complemento de los hallazgos morfológicos, citoquímicos e histológicos para definir los diferentes subgrupos de neoplasias hematológicas así como para establecer criterios pronósticos en algunos de ellos.

La reacción inmunoenzimática de anti-mieloperoxidasa, es una técnica sensible para detectar pequeñas cantidades de enzima por microscopía común y permite caracterizar leucemias mieloides agudas con blastos indiferenciados (M0).

El mayor porcentaje de células positivas encontrado con esta técnica con respecto a la reacción citoquímica convencional en los pacientes aquí estudiados, creemos que ocurre porque el anticuerpo reconoce la enzima en su estado de proenzima ya expresada en estadios tempranos de diferenciación celular (M0) y en mayor cantidad en los blastos más diferenciados^{11, 12}.

Actualmente el único criterio firme para establecer el diagnóstico de leucemias bifenotípicas¹³ y mixtas es el estudio del inmunofenotipo de los elementos blásticos, al encontrar co-expresión en los blastos de antígenos de diferentes estirpes celulares (bifenotípicas) o la co-existencia de blastos de diferentes líneas celulares (mixtas).

La detección de mieloperoxidasa que establece fehacientemente una diferenciación celular mieloide es una de las pruebas con mayor valor en el puntaje para la clasificación de leucemias bifenotípicas¹⁴.

Los desórdenes linfoproliferativos crónicos son un grupo heterogéneo tanto de enfermedades de linfocitos B como T siendo a veces difícil su clasificación solamente por los estudios morfológicos, citoquímicos o histológicos¹⁵.

La expresión de ciertos marcadores inmunológicos (CD 5, CD 23 y FMC 7) y la intensidad de expresión de la inmunoglobulina de superficie κ y λ han sido la base de un sistema de puntaje para su clasificación y/o distinción entre algunos de ellos.

En los pacientes aquí estudiados hemos podido observar la clara diferencia en la expresión antigénica en casos de leucemia a células vellosas y linfoma de bajo grado¹⁶ con la posibilidad de determinar los antígenos cuando la cantidad o muestra celular es escasa (fibrosis medular con preparados secos).

El estudio de la expresión de las cadenas livianas de superficie y/o intracitoplasmáticas permitió establecer la existencia de un exceso clonal de una de ellas y separar claramente procesos de plasmocitosis reactiva de enfermedades clonales de células plasmáticas difíciles de distinguir por otros criterios. En estos casos es importante la aplicación de estas técnicas para diferenciar las marcadas plasmocitosis en médula ósea descritas en diversas enfermedades inflamatorias, neoplasias y especialmente HIV de procesos monoclonales.

Las observaciones aquí presentadas y experiencias en la literatura confirman que las técnicas inmunocitoquímicas son útiles: Para revelar la presencia de precursores de peroxidasas en células blásticas cuando la reacción citoquímica de peroxidasas resulta negativa, lo que permite identificarlas como de la línea mieloide (LMA, subtipo MO)¹⁷ y cuando se quieren estudiar antígenos citoplasmáticos que anteceden en su aparición a los de superficie como por ej: CD13_c como marcador de la línea mieloide¹⁸, CD 3_c para línea linfocítica T, CD22_c para línea linfocítica B; o bien cuando la célula neoplásica hematológica presenta aberración en la expresión de antígenos de superficie, hallándose éstos a nivel citoplasmático. Igualmente estas técnicas, si bien de menor aplicación que la citometría de flujo para el estudio de diferentes antígenos, constituyen sin embargo un método alternativo y complementario de esta última técnica. Adquieren importancia porque:

1) permiten realizar un estudio retrospectivo, dado que las preparaciones celulares o citopreparados pueden ser conservados en condiciones apropiadas por largos períodos de tiempo, esto es una ventaja importante no sólo para reclasificar neoplasias hematológicas sino también para estudiar un nuevo antígeno celular;

2) pueden ser aplicadas en preparados de MO obtenidos por punción o biopsia con un número de células escaso como ocurre en ciertos aspirados medulares, por ejemplo en la fibrosis medular (aspirados secos);

3) evalúan el predominio celular en cortes histológicos mediante un análisis in situ con conservación de la arquitectura del tejido, aplicable en la subclasificación de Linfomas^{19, 20} así como también para el diagnóstico de diversos carcinomas;

4) permiten efectuar una efectiva correlación entre la morfología celular y la expresión para determinados antígenos;

5) sirven para diferenciar los desórdenes linfoproliferativos T de los B²¹.

Se concluye que estas técnicas nos pueden ayudar a definir el tipo de neoplasia hematológica, pero debe tenerse en cuenta que siempre deberán ser evaluadas en conjunción con la clínica y otros estudios (citogenéticos, citometría de flujo, etc) y no en forma aislada.

Bibliografía

1. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick RH, et al. Proposal for the classification of the acute leukaemias. *British Journal of Haematology* 1976; 33: 451-8.
2. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick RH, et al. Proposed Revised for the classification of acute myeloid leukaemia. *Annals of Internal medicine* 1985; 103: 626-9.
3. Sawyers CL. Molecular Genetics of acute leukaemia. *Lancet* 1997; 349, 196-200.
4. Aisenberg AC, Wilkes BM, Jacobson JO. Different T-cell receptor gene configuration in T-cell neoplasm and acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1991; 51: 6103-9.
5. MIC First MIC Cooperative Study Group. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemias. *Can Gen Cytogen* 1986; 23: 189-97.
6. MIC Second MIC Cooperative Study Group. Morphologic, immunologic and Cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 1988; 68: 487-94.
7. Cordell JL, Brunangelo F, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, Macdonald S, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP Complexes). *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1984; 32: 219-29.
8. Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976; 7: 565-77.
9. Collins SJ, Rusceeti FW, Callagher RE, Gallo RC. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethylsulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 2458-62.
10. Jansen J, Schuit HR, Meijer CJ, van Nieuwkoop JA, Hijmans W. Cell markers in hairy cell leukemia studied in cells from 51 patients. *Blood* 1982; 59: 52-60.
11. Lubbert M, Herrmann F, Koeffler P. Expression and regulation of myeloid-specific genes in normal and leukemic myeloid cells. *Blood* 1991; 77: 909-24.
12. Urbano-Ispizua A, Matutes E, Villamor N, Sierra J, Pujades A, Reverter JC, Feliu E, et al. The value of detecting surface and cytoplasmic antigens in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1992; 81: 178-83.
13. Buccheri V, Matutes E, Dyer MJ, Catovsky D. Lineage commitment in biphenotypic acute leukemia. *Leukemia* 1993; 7: 919-27.
14. Matutes E, Morilla R, Farahat N, Carbonell F, Swansbury J, Dyer M, et al. Definition of acute biphenotypic leukemia. *Haematologica* 1997; 82: 64-6.
15. García-Marco J, Matutes E, Morrilla R, Ellis J, Oscier D, Fantes J, et al. Trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: assessment of lineage restriction by simultaneous analysis of immunophenotype and genotype in interphase cells by fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol* 1994; 87: 44-50.
16. Schwonzen M, Pohl C, Steinmetz T, Vetten W, Thiele J,

- Wickramanayake D, et al. Immunophenotyping of low-grade B-cell lymphoma in blood and bone marrow: poor correlation between immunophenotype and cytological/histological classification. *Br J Haematol* 1993; 83: 233-9.
17. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Granick HR, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). *Br J Haematol* 1991; 78: 325-9.
 18. Pombo de Oliveira MS, Matutes E, Rani S, Morilla R, Catovsky D. Early expression of MCS2 (CD 13) in the cytoplasm of blast cell from acute leukaemia. *Act Haemat* 1988; 80: 61-4.
 19. Stansfeld AG, Diebold J, Kapanci Y, Kelenyi G, Lennert K, Mioduszewska O, et al. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* 1988; 1: 292.
 20. Lee Harris N, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Cham JK, Cleary ML, et al. A revised European-American Classification of lymphoid neoplasm. A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-92.
 21. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia MJ, Houhian A, Quet H, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of LLC. *Leukemia* 1994; 8: 1640-5.