

LEUCEMIA DE CELULAS VELLOAS

UN METODO ALTERNATIVO PARA LA DETECCION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL POR CITOMETRIA DE FLUJO

RAQUEL BENGIO, MARINA NARBAITZ, FERNANDA PALACIOS, MARIANO SCOLNIK, MARCELA SARMIENTO

Departamentos de Clínica Hematológica, Anatomía Patológica e Inmunología Oncológica, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen La persistencia de enfermedad mínima residual (EMR) puede detectarse en pacientes con leucemia de células vellosas (LCV) en remisión hematológica completa (RHC) luego de tratamiento quimioterápico. Uno de los objetivos de investigar su presencia es establecer su relación con recaídas. Actualmente se detecta en biopsias de médula ósea (MO) por medio de inmunohistoquímica (IHQ). En este protocolo de investigación estudiamos EMR utilizando dos metodologías IHQ y citometría de flujo (CF) con el objeto de establecer si EMR⁺ predice recaída y evaluar la utilidad de la CF, técnica poco utilizada en LCV para este fin, comparando ambos métodos. MO (aspirado y biopsia) y sangre periférica (SP) de 15 pacientes con LCV en RHC fueron analizadas. Las muestras para CF fueron procesadas por triple marcación con los anticuerpos monoclonales CD20, CD22, CD11c, CD103, CD25, anti-cadenas livianas Kappa y Lambda; valores de referencia fueron obtenidos de controles normales. Por CF se detectó EMR en el 64% de los pacientes; las MO fueron de mayor valor informativo que las SP. La IHQ, realizada con anticuerpos monoclonales anti-CD20 y anti-DBA44 sobre biopsias de MO embebidas en parafina, reveló un 46% de pacientes con EMR. Si bien la diferencia de los porcentajes de EMR detectados por ambas técnicas no fue estadísticamente significativa, la CF parece ser más sensible. En nuestra experiencia EMR⁺ no predijo recaída hematológica hasta la fecha. La CF constituyó un método alternativo útil para detectar EMR.

Abstract *Hairy cell leukemia. An alternative method for the detection of minimal residual disease using flow cytometry.* In patients with hairy cell leukemia (HCL) who received chemotherapeutic treatment and achieved complete remission (CR), minimal residual disease (MRD) can be detected in bone marrow biopsies using immunohistochemical (IHC) techniques. In this study, we investigated the value of flow cytometry (FCM) and IHC to detect MRD and to establish whether MRD⁺ could predict relapse. A total of 15 HCL patients in CR were studied. Samples of bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) were processed by FCM with triple staining of the following monoclonal antibodies (mAbs): CD20, CD22, CD11c, CD103, CD25, anti-Kappa and anti-Lambda light chains. Reference values were obtained from normal samples of peripheral blood and bone marrow. FCM detected MRD in 64% of the patients. BM samples were more demonstrative than peripheral blood for MRD detection in HCL. IHC was performed in paraffin-embedded BM biopsies using CD20 and DBA44 mAbs. MRD⁺ was detected in 46% of patients. Although not statistically significant, FCM appeared more sensitive compared with IHC. Detection of MRD by either of these methods in our series did not predict hematological relapse. The results show that FCM is a useful alternative method to detect MRD in HCL and that a longer follow-up is required to establish the predictive outcome of MRD⁺ patients.

Key words: hairy cell leukemia, flow cytometry, immunohistochemistry, minimal residual disease

La leucemia de células vellosas (LCV) es un síndrome linfoproliferativo crónico con características clínicas y hematológicas específicas. Se define como enfermedad mínima residual (EMR) a la persistencia de células neoplásicas luego de un tratamiento quimioterápico, no evidenciables por métodos diagnósticos convencionales y detectadas por técnicas de alta sensibilidad. Se puede diagnosticar por varios métodos como *Southern Blot*,

reacción en cadena de polimerasa (PCR) y por inmunomarcación ya sea inmunohistoquímica (IHQ) uti-

Abreviaturas

2-cda: 2-clorodeoxiadensina
 AcMo: anticuerpo monoclonal
 α-IFN: α-interferón
 CF: citometría de flujo
 EMR: enfermedad residual mínima
 IHQ: inmunohistoquímica
 LCV: leucemia de células vellosas
 LLC: leucemia linfocítica crónica
 MO: médula ósea
 RC: remisión completa
 RHC: remisión hematológica completa
 SP: sangre periférica

Dirección postal: Dra. Raquel Bengio, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Pacheco de Melo 3181, 1425 Buenos Aires, Argentina
 Fax: (54-11) 4805-0712 e-mail: direccion@iihema.anm.edu.ar

lizando técnicas de peroxidasa anti-peroxidasa (APAAP) y CD20/DBA44, o bien por citometría de flujo (CF) que se vale de anticuerpos monoclonales (AcMo) marcados con fluorocromos específicos. Cabezudo et al¹ y Campana et al² utilizaron la CF en el estudio de EMR en leucemias agudas y LLC; sin embargo, EMR en LCV ha sido menos estudiada³.

El linfocito veloso presenta un inmonofenotipo característico, con expresión de los AcMo CD20, CD22, CD11c, CD25, HC2 y CD103 e intensa expresión de inmunoglobulinas de superficie. HC2 y CD103 son marcadores bastante específicos para el reconocimiento de las células velosas. El CD103 (clones Bly7 y HML1) presenta reactividad cruzada en un 15% de los linfomas esplénicos de células velosas y puede encontrarse en un 0.1 a 0.6% de linfocitos B normales en sangre periférica (SP) pero no en médula ósea (MO).

Por otra parte, la LCV muestra un perfil inmunofenotípico distintivo caracterizado por positividad para el CD103 y CD11c, siendo negativos el HC2 y CD25⁴.

Según varias series publicadas la presencia de EMR en LCV, investigada por IHQ en biopsias de MO, es del 13% al 43%^{5, 8}. Un 50% de los casos tratados con análogos de las purinas y en remisión completa (RC) pueden presentarla⁹.

El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de EMR en pacientes con LCV en RC post tratamiento con 2 clorodeoxiadenosina (2-CDA) o α interferón (α IFN), por medio de IHQ y CF y comparar la eficacia de ambos métodos de detección. En segundo lugar

determinar si la ERM⁺ resultó predictiva de recaída hematológica.

Materiales y métodos

Pacientes

Se estudiaron 15 pacientes con diagnóstico de LCV en RC luego del tratamiento, admitidos en nuestro Instituto entre 1993 y 1999. La RC fue documentada en todos los casos y definida por criterios clínicos, hematológicos e histológicos: hemograma normal, sin evidencia de células velosas en SP, MO (aspiración y biopsia) y ausencia de esplenomegalia¹⁰. La mediana de seguimiento fue de 26 meses (rango 6-96). Las características clínicas previas al tratamiento se muestran en la Tabla 1.

Tratamiento

12/15 pacientes recibieron un curso único de 2 CDA, dosis de 0.1 mg/kg/d, endovenoso, por 7 días. Tres pacientes fueron tratados con α IFN a dosis de 3-4.5 MU/día tres veces por semana, subcutáneo, durante un período de 12 a 30 meses.

Estudio de EMR por inmunohistoquímica (IHQ)

Se realizó en biopsias unilaterales de MO (≥ 200 mm) tomadas de cresta ilíaca en el mismo lado de la aspiración. Fijadas en Bouin y descalcificadas en EDTA-buffer, se incluyeron en parafina y se realizaron coloraciones de rutina con hematoxilina-eosina (H-E), Giemsa y técnica para reticulina.

Para el estudio de IHQ se utilizaron los AcMo CD20 (L-26-Dako) dilución 1/500 y DBA44 (Dako, Carpintería, USA) dilución de 1/500. Método de detección: avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain-Vector, Burlingame CA) y cromógeno: diaminobencidina (DAB). La contracoloración se efectuó con hematoxilina de Harris.

TABLA 1.- Características clínicas de los pacientes al diagnóstico

Paciente	Hemoglobina g/dL	Leucocitos x 10 ⁹ /L	Neutrófilos x 10 ⁹ /L	Plaquetas x 10 ⁹ /L	Bazo en cm BRC
1	7.2	3.3	0.4	52	10
2	8	2.5	0.5	40	5
3	7.2	0.4	0.2	32	8
4	12	29.0	4.0	125	0
5	9.6	2.9	0.7	66	3
6	8.9	2.5	0.4	70	15
7	10	2.1	0.9	110	4
8	7	3.8	1.9	90	10
9	3.9	3.2	0.09	24	0
10	8	1.6	0.2	15	5
11	8	35.0	3.5	60	15
12	11.5	4.0	0.8	65	8
13	12	2.8	0.5	83	5
14	13	3.4	1.1	63	6
15	11.6	1.9	0.3	92	10
16	6.9	1.2	0.1	32	10

BRC: bajo el reborde costal

La evaluación de EMR se realizó mediante una graduación semicuantitativa de la expresión de CD20/DBA44 en la MO, según el criterio establecido por Matutes et al⁶ para cortes de material congelado. Se contabilizó la presencia de agrupamientos celulares (*clusters*) constituidos como mínimo por cinco células con morfología de tricoleucocito y se dividió en categorías derivadas de la relación entre la celularidad total de la médula ósea evaluada, y las células que expresaron DBA 44.

EMR⁺ fue definida por la presencia de 1 al 10% de células vellosas identificadas por CD20 y DBA44, en patrón disperso o en grupos y morfología de tricoleucocito (criterio inmunomorfológico). La expresión de DBA44 en menos del 1% de células aisladas sin tendencia a la formación de grupos y sin morfología de tricoleucocitos, fue considerado negativo para EMR.

Controles negativos mostraron ocasionalmente células linfoides DBA44⁺ en forma dispersa, sin morfología de tricoleucocito. Los controles positivos fueron MO con LCV en actividad evidenciada por EH y expresión de CD20/DBA44.

Estudio de EMR por CF

Muestras de SP y MO obtenidas por aspiración fueron incubadas con un panel de Ac Mo: CD45, CD19, CD20, CD22, CD23, FMC7, CD5, CD10, CD25 (Immunotech, Marseille, France), CD11c (Becton Dickinson, CA, USA), CD103 (Bly 7 clone), Immuno Quality Products (Groninghem, The Netherlands), Kappa, Lambda (Dako, Carpinteria, USA) y conjugados con fluoresceína isotiocianato, ficoeritrina y ficoeritrina cianina 5 para obtener una triple marcación. Células CD20⁺ fueron utilizadas para definir un *gate* activo durante la adquisición en un citómetro de flujo FacScalibur (Becton Dickinson, CA, USA) para enriquecer la población celular B. Para el análisis se usó el programa informático Cell Quest (BD). Las células vellosas fueron identificadas de acuerdo al patrón de alta intensidad de fluorescencia de CD20, CD22, CD11c, CD25, CD103 y de las inmunoglobulinas de superficie.

EMR fue considerada positiva cuando la expresión de CD11c, CD25 y CD103 en las células B fue mayor de 0.3% en SP y por arriba de 0 en MO.

Se realizaron controles normales en SP (n = 7) y MO (n = 5): no se detectaron células con las características inmunofenotípicas de los tricoleucocitos en MO y sí en SP en menos del 0.3% (media 0.20%).

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó el test de Mac Neman Chi cuadrado y análisis de univarianza comparadas por log. rank test.

Resultados

EMR por Citometría de Flujo

14/15 pacientes fueron evaluados, 2-3 meses luego de alcanzada la RC y posteriormente, una vez por año.

EMR⁺ fue detectada en 9/14 pacientes (64%), 6 casos en el primer análisis y 3 en ulteriores. Siete casos

estudiados simultáneamente en SP y MO no mostraron correlación ente ambos tipos de muestras y la presencia de EMR: SP negativas se acompañaron de MO positivas pero SP positivas siempre mostraron MO positivas. El porcentaje de tricoleucocitos residuales fue 2.78% ± 3.2 en MO y 1.63% ± 2.13 en SP. Los pacientes con EMR⁺ permanecen en esta condición en la presente evaluación. En la Fig. 1 se ejemplifica EMR⁻ (panel A) y EMR⁺ (panel B).

EMR por Inmunohistoquímica

13/15 pacientes fueron estudiados, 6 de ellos tuvieron controles anuales. EMR⁺ fue detectada en 6/13 (46%). Un paciente se positivizó luego de 3 años y uno negativizó al año. Un paciente con EMR⁺ presentó recaída 36 meses después de alcanzada la RHC con IFN.

TABLA 2.- EMR por CF e IHQ

Paciente	Tratamiento	RC	Seguimiento (meses)	Citometría Flujo		IHQ MO
				SP	MO	
1	2 CDA	Sí	14	Negativa	ND	Negativa
2*	IFN	Sí	12	Positiva	ND	ND
3*	2CDA	Sí	6	ND	Negativa	ND
4	2CDA	Sí	15	ND	Positiva	Positiva
5	IFN	Sí	41	Positiva	Positiva	Positiva
6	2CDA	Sí	96	ND	Negativa	Negativa
7*	2CDA	Sí	14	ND	ND	Positiva
8	2CDA	Sí	51	Positiva	Positiva	Positiva
9*	IFN	Sí	36	ND	ND	Positiva
10	2CDA	Sí	32	Positiva	ND	Negativa
11	2CDA	Sí	35	Positiva	Positiva	Negativa
12	2CDA	Sí	26	Positiva	Positiva	Positiva
13	2CDA	Sí	6	Negativa	Negativa	Negativa
14	2CDA	Sí	6	Negativa	Positiva	Negativa
15	2CDA	Sí	6	Negativa	Positiva	Negativa

RC: remisión completa. SP: sangre periférica. MO: médula ósea. IHQ: inmunohistoquímica. ND: no determinada. *: no comparables. N° 10, 11, 14 y 15: pacientes comparables y discordantes

TABLA 3.- EMR por CF e IHQ y su relación con recaída hematológica

Condición clínica	CF		Total por CF	IHQ		Total por IHQ
	EMR ⁺	EMR ⁻		EMR ⁺	EMR ⁻	
Recaída	0/9	0/5	0/14	1/6	0/7	1/13
RC	9/9	5/5	14/14	5/6	7/7	12/13

CF: citometría de flujo. IHQ: inmunohistoquímica. RC: remisión completa

Comparación entre CF e IHQ

11/15 pacientes fueron comparables. Ocho estudios se realizaron al alcanzar RC más otros 6 en controles anuales. Se encontró que de 9 estudios negativos por IHQ, 4 fueron positivos por CF (nros. 10, 11, 14, 15): discordancia 29%; todos los casos positivos para EMR por IHQ fueron también positivos por CF. Estos hallazgos sugieren que la técnica de CF es más sensible para detectar EMR, aunque la diferencia entre ambos métodos no fue estadísticamente significativa. Los pacientes nros. 2, 3, 7 y 9 no fueron comparables debido a que los estudios por CF e IHQ no fueron realizados en forma simultánea. El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 2.

Variables clínicas y su valor predictivo de EMR

En el análisis de univarianza se constató que las variables pre-tratamiento: tamaño del bazo, recuento de leucocitos, neutrófilos y plaquetas y nivel de hemoglobina no estuvieron asociadas a EMR⁺. No hubo relación entre EMR⁺ evidenciada por alguno de los dos métodos utilizados, y la recaída de la enfermedad (Tabla 3).

Discusión

La 2-Clorodeoxiadenosina (2-CdA) constituye un avance terapéutico en tricoleucemia, permitiendo obtener altas tasas de RC (80-90%), con una tolerancia satisfactoria y un solo ciclo de tratamiento. No obstante RC prolongadas, un porcentaje de pacientes recaen^{6,9}. Un curso de 2-CdA no erradica la LCV en todos los casos de RC, en nuestra experiencia el 35.7% de los estudiados por CF y el 53.85% por IHQ presentaron EMR negativa.

En este estudio detectamos EMR por citometría de flujo e inmunohistoquímica. Por el primer método, se utilizó una técnica multiparamétrica de triple marcación, obteniendo activamente células CD20 incrementando el número de células B y la sensibilidad del estudio. Resultó un método rápido, de alta especificidad ya que utilizando 3 tubos con la combinación estratégica: Kappa/Lambda/CD20, cD103/CD11c/CD20 y CD25/CD22/CD20 se pudieron detectar fácilmente tricoleucocitos residuales. Evaluando simultáneamente SP y MO, la EMR se detectó más veces en MO, hecho que evidencia que la SP puede ser negativa y no descarta EMR. Cabe destacar que la intensidad de expresión de los anticuerpos fue la misma que al diagnóstico, reafirmando la identidad de las células. Los controles normales confirieron seguridad metodológica.

Hasta el momento, nuestros resultados muestran que la presencia de EMR⁺ detectada por CF, tanto en MO como SP, no predijo recaída hematológica.

La dificultad para evaluar EMR por IHQ se ha evidenciado en estudios previos^{5,6,7,11,12} y reside en la falta de consenso para definir positividad. Por tal motivo, la comparación de los distintos resultados de la literatura, se realiza en un plano de desigualdad de apreciaciones. En nuestra experiencia, por IHQ encontramos un 46% de EMR⁺ utilizando una metodología reproducible y de aceptable especificidad que contempla morfología y marcadores celulares. La diferencia entre los porcentajes de EMR detectados por CF e IHQ no fue estadísticamente significativa, posiblemente debido al reducido número de casos. Por otra parte, la biopsia de MO aporta información sustancial como la magnitud de la celularidad y fibrosis, que no pueden inferirse por CF. En nuestro estudio, la baja tasa de recaídas en EMR positivas se explicaría por diversos factores: la naturaleza indolente de la LCV, el reducido número de casos, por requerir un seguimiento mayor y/o por factores genéticos aún no determinados.

Concluimos que es útil estudiar EMR en LCV en protocolos de investigación clínica, con el propósito de evaluar si predice recaídas y considerar nuevas terapéuticas tendientes a erradicar la enfermedad. La CF es un método alternativo para el mencionado objetivo ya que en nuestra experiencia resultó de alta sensibilidad, aceptable especificidad y simplicidad. La extensión de esta acotada experiencia podrá confirmar los resultados.

Bibliografía

1. Cabezudo E, Matutes E, Ramrattan M, et al. Analysis of residual disease in chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry. *Leukemia* 1997; 11: 1909-14.
2. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999; 38: 139-52.
3. Konwalinka G, Schirmer M, Hilbe W, et al. Minimal residual disease in hairy-cell leukemia after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood Cells Mol Dis* 1995; 21: 142-51.
4. Matutes E, Morilla K, Owusu-Ankomah K, et al. The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a Scoring System to distinguish HCL from B-cell Disorders with hairy of villous lymphocytes. *Leukemia and Lymphoma* 1994; 14: 57-61.
5. Hakimian D, Tallman M, Kiley C, Peterson L. Detection of minimal residual disease by immunostaining of bone marrow biopsies after 2-Chlorodeoxyadenosine for hairy cell leukemia. *Blood* 1993; 82: 1798-802.
6. Matutes E, Meeus P, McLennan K, et al. The significance of minimal residual disease in hairy cell leukemia treated with deoxicoformycin: a long term follow-up study. *Br J Haematol* 1997; 98: 375-83.
7. Ellison D, Sharpe R, Robbins B, et al.: Immunomorphologic analysis of bone marrow biopsies after treatment with 2-Chlorodeoxyadenosine for hairy cell leukemia. *Blood* 1994; 84: 4310-5.
8. Wheaton S, Tallman MS, Hakimian D, LoAnn P. Minimal residual disease may predict bone marrow relapse in patients with hairy cell leukemia treated with 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood* 1996; 87: 1556-60.

9. Tallman MS, Hakimian D, Kopecky KJ, et al.: Minimal residual disease in patients with hairy cell leukemia in complete remission treated with 2-chlorodeoxyadenosine or 2-deoxycoformycin and prediction of early relapse. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1665-70.
10. Spiers AS, Moore D, Cassileth PA, et al.: Remissions in hairy cell leukemia with pentostatin (2-deoxycoformycin) *N Engl J Med* 1987; 316: 835-40.
11. Bastie JN, Cazals-Hatem D, Daniel MT, et al. Five years follow-up after 2-chlorodeoxyadenosine treatment in thirty patients with hairy cell leukemia: evaluation of minimal residual disease and CD4+ lymphocytopenia after treatment. *Leukemia Lymphoma* 1999; 35: 555-65.
12. Falini B, Pileri SA, Flenghi L, et al.: Selection of a panel of monoclonal antibodies for monitoring residual disease in peripheral blood and bone marrow of interferon-treated hairy cell leukaemia patients. *Br J Haem* 1990; 76: 460-8.

If I were magically put in charge of improving the status and image of science, I'd start using the media, instead of feeling victimized by them. ... Science is the most exciting and sustained enterprise of discovery in the history of our species. It is the great adventure of our time. In a stunningly short period of time, science has extended our knowledge all the way from the behavior of the galaxies to the behavior of particles in the subatomic world. Under the circumstances, for scientists to fret over their image seems absurd. This is a great field with great talents and great power. It's time to assume your power, and shoulder your responsibility to get your message to the waiting world. It's nobody's job but yours. And do it as well as you can.

Si yo estuviera a cargo de mejorar el status y la imagen de la ciencia, empezaría con los medios, en lugar de sentirme víctima del sistema. ... La ciencia es la empresa de descubrimiento más estimulante en la historia de nuestra especie. Es la gran aventura de nuestro tiempo. En un asombrosamente corto período de tiempo, la ciencia ha aumentado nuestro conocimiento desde el funcionamiento de las galaxias hasta el de las partículas en el mundo subatómico. Se trata de una gran empresa con grandes talentos y gran poder. Es tiempo que los científicos asuman su poder y tomen conciencia de sus responsabilidades para proyectar su mensaje al mundo expectante. No es trabajo de nadie sino suyo. Y nadie lo puede hacer mejor que ustedes.

Michael Crichton

Ritual Abuse, Hot Air, and Missed Opportunities. *Science* 1999; 283: 1461-3.