

DETECCION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN LEUCEMIAS AGUDAS POR CITOMETRIA DE FLUJO

MARIANO P. SCOLNIK*

Inmunología Oncológica, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

Resumen La citometría de flujo multiparamétrica ha sido incorporada en la actualidad como una herramienta de interés para el análisis de enfermedad mínima residual (EMR) en leucemias agudas. Algunos métodos complementarios pueden ser utilizados para tal fin como lo son el estudio citogenético convencional, la hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) y la biología molecular (PCR y *Southern Blot*). El estudio por citometría de flujo permite detectar pequeños porcentajes de células blásticas en pacientes con diagnóstico de leucemias agudas que se encuentran en remisión completa hematológica de acuerdo a los criterios morfológicos (<5% de células blásticas en la muestra de aspirado de médula ósea). Este método permite reconocer 1 célula blástica en 10^{-4} células mononucleares totales de médula ósea básicamente considerando las características inmunofenotípicas al diagnóstico (fenotipos aberrantes, asincrónicos y sobreexpresión antigénica) o evaluando la maduración de las células para identificar patrones normales y anormales. Estas diferencias pueden ser distinguidas cuando existe ocupación de los 'espacios vacíos' en donde células con un patrón de maduración normal no son detectadas. El principal objetivo de la detección de mínimos niveles de células tumorales es obtener mayor información acerca de la eficacia del tratamiento implementado para: 1) diseñar protocolos en los pacientes de alto riesgo una vez alcanzada la remisión; 2) predecir recaídas previamente a las manifestaciones clínicas; 3) para el estudio de la calidad del producto de recolección de *stem cells* en el trasplante autólogo de médula ósea.

Abstract *Detection of minimal residual disease in acute leukemias by flow cytometry.* Detection of minimal residual disease in acute leukemias by flow cytometry has become an interesting tool for the analysis of minimal residual disease in acute leukemias. Some complementary studies can be used for this purpose such as conventional cytogenetics, FISH and molecular biology (PCR and Southern Blot). Flow cytometry study can detect smoldering blast cells in patients with acute leukemias who appear to be in complete remission by conventional morphologic criteria (<5% of blast cells in bone marrow aspirate sample). This method can recognize 1 blast in 10^{-4} mononuclear bone marrow cells considering the characteristics of immunophenotype at diagnosis (aberrant, asynchronous and overexpressed phenotypes) or using the analysis cell maturation to identify normal and abnormal patterns. These differences can be distinguished when the cells occupy the 'empty spaces' where no normal cells are evident. The principal objective of detecting low levels of tumor cells is to obtain more information about the efficacy of the treatment in order to: 1) design adapted post-remission protocols for high risk patients, 2) predict relapses previous to the clinical manifestations, 3) study the quality of stem cells harvested for autologous bone marrow transplantation.

Key words: flow cytometry, minimal residual disease, acute leukemias

La citometría de flujo es una tecnología recientemente aplicada a la práctica clínica en nuestro país. Los primeros citómetros datan de fines de los 80 y principios de los 90, totalizando en la actualidad alrededor de 30. Muchos de ellos son destinados a la práctica asistencial y algunos a la investigación clínica y básica. Una de las

áreas diagnósticas donde potencialmente es útil la citometría de flujo es en el diagnóstico oncohematológico, y fundamentalmente en el diagnóstico inmunofenotípico de las leucemias y de los procesos linfoproliferativos. Una de las utilidades dentro del área de oncohematología es

* Becario del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

Dirección postal: Dr. Mariano P. Scolnik, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina
 FAX: (54-11)4803-9475 e-mail: mscolnik@interlink.com.ar

Abreviaturas:

EMR: enfermedad mínima residual
 FISH: hibridación *in situ* de fluorescencia
 LLA: leucemia linfoblástica aguda
 LMA: leucemia mieloblástica aguda
 MD: médula ósea
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa
 TCR: receptor del linfocito T

la detección de enfermedad mínima residual (EMR), con el objetivo de resolver el interrogante de cual es su implicancia clínica en los distintos tipos de neoplasias oncohematológicas. Esta tecnología está siendo ampliamente difundida en los servicios de citometría de los diversos centros del mundo vinculados al diagnóstico oncohematológico.

Para poder realizar el estudio de EMR, hay que tener en cuenta una serie de consideraciones que son fundamentales para programar su aplicación en un paciente, por cualquiera de las metodologías que mencionaremos posteriormente.

La primer condición limitante, es 1) que el paciente debe hallarse en remisión completa hematológica (presencia de menos del 5% de células blásticas en médula ósea (MO) y 2) que la muestra debe ser remitida siempre cuando la MO se encuentra reconstituida, ya sea posteriormente a un ciclo quimioterápico o posterior al trasplante de MO. Básicamente el concepto de enfermedad mínima residual es el estudio de niveles mínimos de células tumorales por métodos de mayor sensibilidad del que aporta la microscopía óptica, teniendo en cuenta que la sensibilidad de la microscopía óptica es la detección de 1 a 5 células blásticas en 100 células totales de MO.

Diversas metodologías son utilizadas para tal fin, como lo son la biología molecular, la hibridización *in situ* de fluorescencia y la citometría de flujo. En la Figura 1 observamos la comparación entre la sensibilidad de los distintos métodos aplicados en la actualidad. En primer lugar en cuanto a la sensibilidad se hallan los métodos de biología molecular y entre ellos el más usado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), básicamente para la detección de los rearrreglos de la cadena pesada

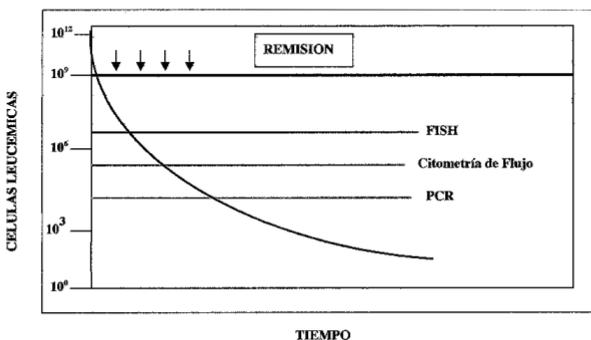


Fig. 1.- Al diagnóstico se observa un número mayor de 10^{12} células leucémicas. Las flechas representan el tratamiento efectuado hasta lograr la remisión completa. Al momento de la remisión completa 10^9 células leucémicas pueden persistir. Los niveles de sensibilidad en la detección de células leucémicas por los distintos métodos pueden observarse en las líneas horizontales.

de los genes de inmunoglobulinas, traslocaciones cromosómicas y oncogenes y en menor uso el *Southern Blot* para la detección del re-arreglo del β TCR. En segundo lugar en cuanto a sensibilidad se hallan las técnicas de hibridización *in situ*, de fluorescencia (FISH) y la citometría de flujo, teniendo ambas una sensibilidad aproximada de 1×10^{-4} o 1×10^{-5} de acuerdo a los datos de la literatura^{1, 2}; en otras palabras la citometría de flujo permite identificar una célula blanco en 100 000 células totales de MO, este nivel de corte fue determinado mediante técnicas de dilución de MO normal y blastos de leucemia mieloblástica aguda (LMA) y leucemia linfoblástica aguda (LLA).

El estudio inmunofenotípico debe reunir una serie de requisitos que son fundamentales para lograr un buen diagnóstico. Los mismos son: a) debe ser un estudio multiparamétrico utilizando 3 o 4 colores, b) debe contemplar un panel amplio de anticuerpos monoclonales, c) debe ser realizado por una persona entrenada en este área, d) debe tenerse conocimiento de inmunofenotipo al diagnóstico del paciente a estudiar.

A continuación se enumeran cuales son los objetivos de la detección de EMR:

a) Evaluar la presencia de mínimos porcentajes de carga tumoral (para monitorear la respuesta al tratamiento)

b) Investigar el valor predictivo de recaída hematológica en los pacientes EMR+ (establecer en cada entidad a estudiar, si la presencia de EMR se asocia con recaída hematológica)

c) Identificar grupos de alto riesgo en las patologías en las que ya está establecido el valor predictivo de recaída hematológica. (un ejemplo es el comunicado por San Miguel *et al*³, en el que dividen a los pacientes con LMA en 2 grupos de acuerdo a la carga de EMR detectada: $>5 \times 10^{-3}$ y $<5 \times 10^{-3}$, asociándose el primer grupo con una alta incidencia de recaída hematológica).

d) Obtener información acerca de la biología de las leucemias agudas en respuesta al tratamiento (siguiendo con el ejemplo mencionado en el punto anterior, el mismo grupo de investigadores observó que en los pacientes que presentaban una carga tumoral mayor de $>5 \times 10^{-3}$, ella se asociaba a una alta incidencia de actividad de la bomba de eflujo de drogas estudiada con rhodamina 123)³

e) Establecer la calidad del producto de recolección en el trasplante autólogo de MO.

Considerando las estrategias a utilizar para la detección de EMR, el estudio por citometría de flujo puede realizarse en forma convencional (evaluando fenotipos aberrantes, sobreexpresión antigénica, patrones de maduración que ocurren durante la ontogenia normal, o identificando fenotipos ectópicos) o realizando citometría cuantitativa evaluando la densidad de los receptores de membrana.

Con respecto a la citometría convencional, los distintos ejemplos y su incidencia pueden observarse en las Tablas 1 y 2. Como se observa en la Tabla 1, considerando los fenotipos ectópicos, existen 2 anticuerpos monoclonales que recientemente han sido utilizados. El primero de ellos es el 7.1 que reconoce al homólogo humano del receptor de proteoglican-condroitin-sulfato y puede verse expresado en células blásticas que presentan la alteración citogenética 11q23⁴, este antígeno no es expresado en células de MO normal⁵. Con respecto al segundo anticuerpo, el KOR-SA3544, reconoce a las células leucémicas que presentan el transcritto bcr/abl⁶.

Los estudios para investigar EMR deben ser realizados como fue mencionado anteriormente en la MO reconstituida y pueden realizarse luego de la inducción, las consolidaciones o el mantenimiento, con los distintos protocolos quimioterápicos. También pueden realizarse durante el seguimiento cada 6 meses o en forma anual una vez alcanzada la remisión completa hematológica, teniendo en cuenta que no hay protocolos establecidos que aclaren con exactitud los tiempos de seguimiento una vez que el paciente cumplimentó todo el esquema terapéutico. El estudio es también sumamente útil para establecer la calidad del producto de recolección previo al trasplante autólogo de MO.

Las combinaciones antigénicas que utilizamos en nuestro laboratorio son similares a las utilizadas por Campana *et al*⁷ y por el Grupo BIOMED-1 representado en el artículo publicado por Lucio *et al*⁸. Las marcaciones siempre se realizan con un tercer color, para poder enriquecer la población a estudiar. En la Tabla 3, se observan las combinaciones recomendadas para el estudio de EMR en LLA de linaje B y T.

Una estrategia mencionada para el estudio de EMR en LLA-B es la del estudio de los patrones de maduración que ocurren en la ontogenia linfocito B normal y establecer la ocupación de "espacios vacíos", en los casos

TABLA 1: Tipos de alteraciones fenotípicas que son útiles para la búsqueda de EMR

a) Aberración antigénica con linaje cruzado: Ej: CD13 o CD33 en LLA (LLA-My) CD19 o CD2 en LMA (LMA-Ly)
b) Expresión asincrónica Ej: CD34+/CD20-/CD22+
c) Sobreexpresión antigénica Ej: CD10 en LLA
d) Fenotipos ectópicos Ej: 7.1 (reacciona contra el NG2 en la alteración cromosómica 11q 23). KOR-SA3544 (reconoce células leucémicas con presencia del transcritto bcr/abl).

TABLA 2. Incidencia de fenotipos asociados a leucemia en leucemias agudas²

	LLA-B (%)	LLA-T (%)	LMA (%)
Aberración antigénica con linaje cruzado	75	60	27
Expresión asincrónica	39	38	80
Sobre-expresión antigénica	35	0	9
Fenotipos ectópicos	5	90	0
TOTAL	85	100	88

Tabla 3. Combinaciones antigénicas útiles para la detección de EMR en LLA.

LLA-B	LLA-T
TdT/CD10/CD19	TdT/CD3
CD34/CD10/CD19	CD34/CD3
CD34/CD38/CD19	
CD20/CD10/CD19	
CD20/CD22/CD19	

de LLA-B (esto quiere decir que los espacios que normalmente no son ocupados por células en la maduración normal son ocupados cuando existe un bloqueo en la maduración como es el caso de la LLA-B). En LLA de linaje T, una combinación de anticuerpos monoclonales útil es la enzima TdT y el CD3, que permite identificar poblaciones celulares que normalmente no deben hallarse en MO.

En nuestro laboratorio estudiamos los patrones de maduración antigénica básicamente aplicados a las leucemias linfoblásticas de linaje B y T, utilizando los paneles de anticuerpos recientemente mencionados, siendo una estrategia relativamente sencilla y rápida.

Con respecto a la detección de EMR en LMA, la experiencia relatada en la literatura es más escasa, considerando la heterogeneidad que existe en las células blásticas mieloides en cuanto a los patrones de maduración, no siguiendo un patrón de maduración normal como puede observarse en LLA. Por lo mencionado anteriormente, la estrategia en la detección esta basada fundamentalmente en la detección de fenotipos aberrantes. Las combinaciones de anticuerpos que son útiles son : a) CD34/CD56: esta coexpresión puede observarse en el 20% de las LMA pediátricas y se encuentra asociada a la t (8; 21); b) CD34/CD87: esta coexpresión puede observarse en el 70-80% de las LMA, el CD87 es el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa y se encuentra solamente en el 0.2% de las células CD34+ de MO normal⁹; c) CD15/CD117: esta coexpresión puede

observarse en el 31% de las LMA y en menos del 0.08% de las células de MO⁸⁻¹⁰.

Como hemos observado, la experiencia no es muy amplia, lo que nos llevó a preguntarnos como era la densidad de expresión de antígenos mieloides como el CD13, CD33, CD117 y el antígeno CD34 en leucemias mieloblásticas y en células mieloides de MO normal. Para tal fin, hemos realizado un proyecto cooperativo con la Dra. Matutes del *Academic Department of Haematology and Cytogenetics* del *Royal Marsden Hospital* de Londres, observando que los blastos de LMA presentan un aumento significativo del número de moléculas por célula de los antígenos CD34 y CD117, por lo que pensamos que esta combinación antigénica puede ser útil para el seguimiento de EMR en LMA.

Una pregunta que se formulará el hematólogo clínico luego de leer esta recopilación es: ¿Cuál es la implicancia clínica de la presencia de EMR?. Para contestar esta pregunta, los distintos trabajos publicados vinculados a LLA¹¹⁻¹⁶ y LMA^{10, 11, 17-19}, establecieron que los pacientes con la presencia de EMR ya sea luego del tratamiento quimioterápico o posterior al trasplante de MO, presentaron un alto índice de recaídas hematológicas y sobrevida libre de recaída.

Por lo tanto, como conclusión, creo que la citometría de flujo es un método sumamente útil, es de rápido diagnóstico, presenta un alto índice de sensibilidad equiparable al FISH, y tiene que estar en manos de un operador entrenado para evitar los falsos positivos. Como reflexión final, creo que esta técnica aporta cierta información en el conocimiento de la biología de las leucemias, pudiendo en un futuro decidir ciertas conductas terapéuticas (quimioterapia, infusión de linfocitos del donante, agregado de moduladores de la bomba de eflujo de drogas) de acuerdo a los resultados obtenidos en cada paciente.

Bibliografía:

1. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry (Comm Clin Cytometry)* 1999; 38:139-52.
2. San Miguel JF, Ciudad J, Vidriales Mb, et al. Immunophenotypical detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 1999; 32:175-85.
3. San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, et al. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute leukemia patients. *Blood* 1997; 90:2465-70.
4. Behm FG, Smith FO, Raimondi SC, Pui CH, Bernstein ID. Human homologue of the rat chondroitin sulfate proteoglycan, NG2, detected by monoclonal antibody 7.1, identifies childhood acute lymphoblastic leukemias with t(4;11)(q21;q23) or t(11;19)(q23;p13) and MLL gene rearrangements. *Blood* 1996; 87:1134-9.
5. Smith FO, Ranch C, Williams DE, et al. The human homologue of rat NG2, a chondroitin sulfate proteoglycan, is not expressed on the cell surface of normal hematopoietic cells but is expressed by acute myeloid leukemia blast from poor prognosis patients with abnormalities of chromosome band 11q23. *Blood* 1996;87:1123-33.
6. Mori T, Sugita K, Suzuki T, et al. A novel monoclonal antibody, KOR-SA3544 which reacts to Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells with high sensitivity. *Leukemia* 1995; 9:1233-9.
7. Lúcio 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.
8. Hurwitz CA, Raimondi SC, Head D, et al. Distinctive immunophenotypic features of t(8;21)(q22;q22) acute myeloblastic leukemia in children. *Blood* 1992; 80:3182-8.
9. Lanza F, Castoldi GL, Castagnari B, et al. Expression and functional role of urokinase-type plasminogen activator receptor in normal and acute leukaemic cells. *Brit J Haematol* 1998; 103:110-23.
10. Nakamura K, Ogata K, An E, Dan K. Flow cytometric assessment of CD15+CD117+ cells for detection of minimal residual disease in adult acute myeloid leukaemia. *Brit J Haematol* 2000; 108:710-6.
11. Campana D, Coustan-Smith E, Janossy G. The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1990;76:163-71.
12. van Dongen JJ, Breit TM, Adriaansen HJ, Beishuizen A, Hooijkaas H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction. *Leukemia* 1992; 6:47-59.
13. Griesinger F, Piro-Noack M, Falk M, et al. High predictive value for relapse by three-color-flow-cytometric detection of leukemia-associated immunophenotype (LAIP) positive cells in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 1997; 88:478a.
14. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1998; 351:550-4.
15. Ciudad J, San Miguel JF, López-Berges MC, et al. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease (MRD) in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1999;16:3774-81.
16. Farahat N, Morilla A, Owusu-Ankomah K, et al. Detection of minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia by quantitative flow cytometry. *Brit J Haematol* 1998; 101:158-64.
17. Adriaansen HJ, Jacobs BC, Kappers-Klunne MC, Hählen K, Hooijkaas H, van Dongen JJM. Detection of residual disease in AML patients by use of double immunological markers analysis for terminal deoxynucleotidyl transferase and myeloid markers. *Leukemia* 1993; 7:742-81.
18. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995; 85:1416-34.
19. Reading CL, Estey EH, Huh YO, et al. Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1993; 81:3083-90.