

INMUNOFENOTIPOS ABERRANTES EN LEUCEMIAS AGUDAS EN UNA POBLACIÓN HOSPITALARIA DE BUENOS AIRES

VIVIANA NOVOA, NERI A. NÚÑEZ, ORLANDO G. CARBALLO, CARMEN F. LESSA

*Laboratorio de Inmunología, Unidad de Inmunología e Histocompatibilidad,
Hospital de Agudos Dr. Carlos G. Durand, Buenos Aires, Argentina*

Resumen La citometría de flujo multiparamétrica es el método de elección para la caracterización inmunofenotípica de las células hematopoyéticas clonales presentes en los distintos procesos leucémicos agudos. El objetivo fue analizar la expresión de antígenos de membrana y evaluar la presencia de fenotipos aberrantes en los blastos de pacientes con diagnóstico de leucemia aguda, que permiten el monitoreo de la respuesta al tratamiento. Se revisaron los inmunofenotipos de 364 muestras de pacientes adultos derivadas a nuestro laboratorio en un período de 7 años. El inmunofenotipo se realizó por citometría de flujo con un amplio panel de anticuerpos monoclonales con el que se evaluó la expresión de antígenos de linaje linfóide, mielóide y también antígenos de maduración. De las 364 muestras estudiadas, 60.2% presentaron un fenotipo compatible con leucemia mielóide aguda (LMA), 28.8% con leucemia linfoblástica B (LLA-B), 6.6% con leucemia linfoblástica T (LLA-T) y 4.4% con leucemias agudas poco frecuentes. La presencia de fenotipos aberrantes se observó en 89% de los casos, los fenotipos aberrantes identificados fueron: 1) infidelidad de linaje: LMA (54%), LLA-B (40%), LLA-T (29%); 2) ausencia de expresión antigénica: LMA (21%), LLA-B (35%), LLA-T (70%); 3) alteración de la expresión antigénica: LMA (67%), LLA-B (66%), LLA-T (84%); 4) asincronismo madurativo: LMA (26%), LLA-B (37%) y 5) fenotipo ectópico: LLA-T 96%. El análisis por citometría de flujo multiparamétrica de las leucemias agudas permitió la identificación de fenotipos aberrantes en la mayoría de nuestros pacientes, que son de utilidad para el monitoreo de la respuesta al tratamiento.

Palabras clave: inmunofenotipo, leucemia aguda, fenotipos aberrantes

Abstract *Aberrant immunophenotypes in acute leukemia in a Buenos Aires' hospital population.* Multiparameter flow cytometry (MFC) has become the preferred method for the lineage assignment and maturational analysis of malignant cells in acute leukemias. Multiparametric immunophenotyping analysis allows the detection of aberrant antigen expression and the analysis of heterogeneity and clonality of malignant cells in leukemias. Our objectives were to analyze the membrane antigen expression and to evaluate if the aberrant phenotypes occurrence in blasts cells of patients with acute leukemia is useful in monitoring the response to the treatment. We have retrospectively analyzed the MFC data of 364 samples sent to our laboratory in a 7 years period. For this purpose we have used a large panel of monoclonal antibodies against lymphoid, myeloid and precursors antigens. From the 364 analyzed samples, 60.2% showed a phenotype compatible with acute myeloid leukemia (AML), 28.8% with B lymphoblastic leukemia (B-LLA), 6.6% with T lymphoblastic leukemia (T-LLA) and 4.4% with rare leukemias. Aberrant phenotypes were found in 86% of the samples. The aberrant phenotypes identified were: 1) lineage infidelity AML (54%), B-ALL (40%), T-ALL (29%); 2) absence of antigen expression: AML (21%), B-ALL (35%), T-ALL (70%); 3) altered antigen expression: AML (67%), B-ALL (66%), T-ALL (84%); 4) asynchronous expression: AML (26%), B-ALL (37%) and 5) ectopic phenotype: T-ALL (96%). Multiparameter flow cytometry of acute leukemias allowed identification of aberrant phenotypes in the majority of our patients, that are helpful for monitoring treatment response.

Key words: immunophenotype, acute leukemia, aberrant phenotypes

Las leucemias agudas son un grupo heterogéneo de enfermedades hematológicas caracterizadas por la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas

clonales. La detección de esta población celular y la identificación de su linaje hematopoyético son de relevante importancia para el diagnóstico y tratamiento de estas patologías¹. 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)² y la Clasificación de Tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides de la *World Health Organization* (WHO)³⁻⁵. Actualmente la cito-

Recibido: 3-V-2012

Aceptado: 21-IX-2012

Dirección Postal: Dra. Viviana Novoa, Alvarez Jonte 1647 13° A, 1416 Buenos Aires, Argentina

Fax: (54-11) 4982-0625

e-mail: novoaviviana@yahoo.com.ar

metría de flujo multiparamétrica es el método diagnóstico de elección para la caracterización inmunofenotípica de los blastos leucémicos y permite detectar alteraciones en la expresión de antígenos capaces de diferenciar células hematopoyéticas normales de células neoplásicas, siendo esto de gran utilidad para el monitoreo de enfermedad mínima residual (EMR)⁶⁻¹⁰. En general, estos inmunofenotipos aberrantes pueden ser: 1) Infidelidad de linaje o coexpresión de antígenos asociados a otro linaje. 2) Ausencia de expresión de antígenos específicos de linaje. 3) Alteración de la expresión de antígeno, ya sea por sobreexpresión, menor expresión o expresión parcial de cierto antígeno por célula. 4) Asincronismo madurativo en el cual antígenos de estadios inmaduros son coexpresados con antígenos presentes en estadios más maduros. 5) Fenotipo ectópico o presencia de células con fenotipo no presente en ese tipo de muestra en condiciones normales. 6) Características anormales de tamaño y complejidad interna de la población celular^{11,12}.

En los últimos años se ha visto que algunos patrones inmunofenotípicos aberrantes podrían reflejar alteraciones citogenéticas de las células neoplásicas¹³. Por lo tanto, la identificación de estos inmunofenotipos presentes en la célula leucémica no solo permite el monitoreo de la respuesta al tratamiento quimioterápico y detección de EMR¹⁴⁻¹⁷ sino también puede utilizarse en algunos casos para la identificación de alteraciones citogenéticas concretas y sugerir los estudios moleculares que confirmen la presencia de dichas alteraciones^{18,19}.

En el presente estudio analizamos retrospectivamente los resultados obtenidos por citometría de flujo de 364 muestras de pacientes con leucemias agudas, para determinar las características de expresión de los distintos antígenos de membrana y evaluar la ocurrencia de fenotipos aberrantes que son de utilidad para el posterior monitoreo de la respuesta al tratamiento y detección de EMR.

Materiales y métodos

Se analizó retrospectivamente el inmunofenotipo de un total de 364 pacientes adultos consecutivos con diagnóstico de leucemia aguda, cuyas muestras de médula ósea o sangre periférica fueron enviadas desde los servicios de Hematología de los diferentes hospitales de adultos del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires al Laboratorio de Inmunología de la Unidad de Inmunología e Histocompatibilidad del Hospital General de Agudos Dr. Carlos G. Durand, para su inmunotipificación por citometría de flujo durante el período abril 2002- diciembre 2009. Al ser muestras derivadas, no fue posible obtener consentimiento informado ni datos clínicos completos. Doscientos (55%) fueron hombres y 164 (45%) mujeres con una edad promedio de 45 años (rango: 16- 89 años).

Se estudiaron 196 muestras de médula ósea, 167 muestras de sangre periférica, 1 de líquido pleural y 1 biopsia de masa mediastinal. Las muestras de médula ósea y sangre periférica fueron previamente tratadas con una solución de CI NH4 para la lisis de eritrocitos, el líquido pleural fue lavado con solución salina *buffer* (PBS) y centrifugado. La obtención

de células de la masa mediastinal se realizó por disgregación mecánica. Para la inmunomarcación se utilizó un amplio panel de anticuerpos monoclonales conjugados con *fluorescein isothiocyanate* (FITC), *phycoerythrin* (PE) y *phycoerythrin-cyanin 5* (PE-Cy5) o *peridinin-chlorophyll protein* (PerCP) para identificar todos los linajes hematopoyéticos²⁰⁻²³: CD45 PerCP, CD45 PE-Cy5, DR FITC, CD34 FITC, CD34 PE, CD1a PE, CD2 PE, CD3 PerCP, CD4 FITC, CD5 PE, CD7 FITC, CD8 PE, CD10 PE, CD11b FITC, CD13 PE, CD14 PE, CD15 FITC, CD19 PE-Cy5, CD20 FITC, CD22 PE, CD33 PE, CD38 PE, CD56 PE, CD61 FITC, CD64 FITC, CD71 FITC, CD79a PE, CD117 PE, TdT FITC, MPO PE, anti Kappa FITC, anti Lambda FITC. A las distintas combinaciones de anticuerpos monoclonales se agregó 50 µl de una suspensión de aproximadamente 1×10^6 células y se incubó en oscuridad durante 20 minutos a 4 °C. Luego se realizó un lavado con 1ml de PBS/azida y se resuspendieron las células en 0.5 ml de una solución de formol al 0.5%. Para el estudio de antígenos intracitoplasmáticos (MPO, TdT, CD3ic, CD79a), luego de la marcación de superficie las células fueron tratadas con la solución permeabilizante de *Becton Dickinson* durante 10 minutos, se lavaron con 2 ml de PBS/azida y finalmente se realizó la marcación intracitoplasmática. La adquisición de los datos se realizó en un citómetro de flujo FACSsort (*Becton Dickinson, San José, CA, USA*) equipado con laser de argón 15nW (excitación a 488 nm) utilizando el programa *Cell-Quest*. La calibración y compensación de fluorescencia fue realizada usando esferas Calibrite (*Becton Dickinson*). Se adquirieron al menos 20 000 eventos por tubo en modo lineal para tamaño celular (*forward scatter, FSC*) y complejidad interna (*side scatter, SSC*) y en modo logarítmico para la señal de fluorescencia. Para el análisis multiparamétrico basado en propiedades físicas como FSC y SSC y de intensidad de fluorescencia, se utilizó el programa *Paint-A-Gate*. Los blastos fueron definidos usando los *dot plot* CD45 vs. SSC y FSC vs. SSC como CD45 débil o moderado y SSC bajo o moderado^{18,24,25}. Los antígenos de superficie fueron considerados positivos cuando $\geq 20\%$ de los blastos lo expresaban.

Resultados

La mejor estrategia para identificar y cuantificar los blastos patológicos en la mayoría de las muestras fue utilizando la combinación CD45/SSC en cada tubo del panel. Otras combinaciones útiles fueron CD34/SSC en el caso de blastos CD34 (+) y CD19/SSC en el caso de linfoblastos de linaje B. De menor utilidad fue el uso de la combinación FSC/SSC, especialmente en las muestras con menor recuento de blastos. De las 364 muestras estudiadas 219 (60.2%) presentaron un fenotipo de linaje mieloide compatible con leucemia mieloide aguda (LMA), 105 (28.8%) fenotipo linfóide B compatible con leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B), 24 (6.5%) fenotipo linfóide T compatible con leucemia linfoblástica aguda T (LLA-T) y 16 (4.5%) fenotipo de leucemias agudas poco frecuentes como 5 leucemias agudas indiferenciadas (1.4%), 5 leucemias agudas bifenotípicas (1.4%), 4 leucemias de células plasmáticas (1.1%), 1 leucemia aguda biclonal (0.3%) y una leucemia aguda de células dendríticas (0.3%). Las características de edad, sexo y antecedentes clínicos informados al laboratorio de cada uno de los tipos de leucemias se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1.— Antecedentes de los pacientes informados al laboratorio por los médicos tratantes

	LMA Total: 219	LLA-B Total: 105	LLA-T Total: 24	LA poco frecuentes Total: 16
Edad (años)	51 (17-89)	38 (16-73)	31 (17-68)	50 (18-80)
Sexo M/F	122/97	52/56	19/5	7/9
Antecedentes				
Leucopenia	33	27	4	3
Anemia	43	27	4	3
Plaquetopenia	35	25	4	3
Leucocitosis	61	33	10	3
Organomegalia	3	2	5	-
Coagulopatías	13	2	-	-
Mielodisplasia	24	1	1	2
Leucemia mieloide crónica	19	2	-	1
Mielofibrosis	7	-	-	-
Recaída	7	12	4	-
Otros carcinomas	9	-	1	-

La expresión de CD45 fue variable, expresándose en la mayoría de los casos con intensidad de fluorescencia intermedia. La ausencia de expresión de CD45 se observó en los blastos de 29/105 (28%) LLA-B, en su mayoría CD34 (+). En cambio, 10/24 (42%) de las LLA-T y la población con inmunofenotipo monocítico en las leucemias mielomonocíticas (LMMA) presentaron la mayor intensidad de fluorescencia de este antígeno.

Las células patológicas de LMA expresaron CD13 en el 93% de los casos, CD33 en el 92%, CD117 en el 68% y mieloperoxidasa en el 70%. La expresión de un marcador de inmadurez no específico para linaje, como el CD34, se dio en el 55% de los casos. De las 219 LMA, 57 (26%) presentaron un patrón inmunofenotípico mielomonocítico con presencia de dos poblaciones celulares: una de blastos mieloides CD34 (+) y otra monocítica CD64 y CD14 positivos. Treinta y ocho pacientes (17%) mostraron un fenotipo característico de leucemia aguda promielocítica con expresión de mieloperoxidasa, CD33 y CD13 y ausencia de DR y CD15. El CD34 fue negativo en el 68% de los casos y la presencia de autofluorescencia se observó en el 55% de las muestras. La frecuencia de fenotipos compatibles con eritroleucemia y leucemia aguda megaloblástica fue muy baja: 3% y 1% respectivamente.

En las LLA-B, la presencia de CD19 se observó en todos los casos, mientras que el CD79a fue expresado en el 94% y el CD22 en el 86%. La expresión de CD20 fue variada, desde negativa en el 47% de los casos hasta positiva en todos los blastos en el 32%. Un 83% de las LLA-B expresaron CD10, un 79% fueron positivas para CD34 y un 64% para TdT. Según los patrones inmu-

nofenotípicos 10/105 (9.5%) fueron caracterizadas como LLA-proB, 88/105 (83.4%) como LLA-B común y 5/105 (4.5%) como LLA-B madura con presencia de clonalidad para cadenas livianas de inmunoglobulinas.

De las LLA-T 3/24 (13%) fueron clasificadas como LLA-proT, 15/24 (63%) como LLA-T cortical y 6/24 (25%) como LLA-T madura. Todas expresaron CD7 y CD3 ic, observándose expresión de CD2 y CD5 en el 91% de los casos, CD1a en el 65% y CD34 en el 29%. Un 7% presentó fenotipo CD4(-)CD8(-), 54% CD4(+)CD8(+), 8% CD4(+)CD8(-) y 8% CD4(-) CD8(+).

Las leucemias bifenotípicas fueron definidas según la clasificación del EGIL y el *score* del Matutes³⁷. Tres de ellas expresaron marcadores mieloides y linfoides T y las otras dos marcadores mieloides y linfoides B. Todas expresaron CD34. El fenotipo de las leucemias agudas poco frecuentes se muestra en la Tabla 2.

La presencia de fenotipos aberrantes se observó en 326 de los 364 (89%) casos estudiados (Tabla 3). En la mayoría de los cuales 266 (82%) se identificaron más de una aberración fenotípica. Un 54% (119/219) de las LMA presentaron infidelidad de linaje coexpresando uno o más de los siguientes antígenos linfoides: CD56 (22%), CD7 (17%), CD2 (14%), CD4 (9%), CD19 (5%), CD10 (4%) y CD20 y CD22 (< 1%). Un 36% de las cuales expresaron dos o más antígenos linfoides en los mismos blastos. El 73% de las células patológicas mieloides con coexpresión de antígenos linfoides expresaron el antígeno de inmadurez CD34. En las LLA-B el 40% (42/105) presentó infidelidad de linaje. Los antígenos coexpresados fueron: CD13 (20%), CD33 (15%), CD15 (6%), CD2 (6%), CD56

TABLA 2.- Inmunofenotipo de las leucemias agudas poco frecuentes

Leucemia aguda	Inmunofenotipo
Indiferenciada	CD34(+) DR(+) CD38(+) CD45 variable, ausencia de antígenos específicos de linaje
Bifenotípicas	
Mieloide-Linfoide T	CD34(+)DR(+)CD13(+)CD33(+)CD117(+)MPO(+)/CD3ic(+)/CD7(+)
Mieloide- Linfoide B	CD34(+)DR(+)CD13(+)CD33(+)CD117(+)MPO(+)/CD19(+) CD79a(+)
Biclonal	CD45(+) CD34(+) DR(+) CD38(+) CD13(+) CD117(+) CD7(+) CD4(+) CD5(+)
Células plasmáticas	CD38(+++) CD45(-) CD34(-) DR(-) cadenas livianas intracitoplasmáticas (+), ausencia de antígenos específicos de linaje.
Células dendríticas	CD45(++) DR(+++) CD38(+++) CD2(+) CD123(+) CD34(-), ausencia de antígenos específicos de linaje

TABLA 3.- Frecuencia de los fenotipos aberrantes en leucemias agudas

	LMA	LLA-B	LLA-T
Fenotipos aberrantes	86%	89%	100%
1. Infidelidad de linaje	54%	40%	29%
	CD56(22%), CD7(17%) CD2(14%), CD4(9%), CD19(5%), CD10(4%), CD20 y CD22(<1%).	CD13(20%), CD33(15%), CD15(6%), CD2(6%), CD56(3%),CD11b(1%)	CD10(17%), CD13(12%), DR(8%), CD117(4%), CD33(4%)
2. Ausencia de expresión de Ag.	21%	35%	70%
	DR(8%), CD117(6%), CD33(4%),CD13(3%) CD4(5%),CD14(5%)	CD45(28%) CD79a(5%), CD38(2%), DR(1%), CD20(1%), CD22(1%)	CD3s(67%), CD4(37%), CD8(37%) CD2(8%), CD5(8%)
3. Alteración de la expresión de Ag	67%	66%	84%
4. Asincronismo madurativo	26%	37%	
	CD34(+)CD15(+):6% CD34(+)CD117(-):5% CD13(-) CD33(+):4.6% CD13(+)CD33(-): 3% CD117(+)CD15(+): 2.7% DR(+)CD15(+): 2% CD34(+)DR(-): 2%	CD34(+)CD20(+): 24% CD34(+)CD10(-): 13%	
5. Fenotipo ectópico			96%

LMA: Leucemia mieloide aguda; LLA-B: Leucemia linfoblástica aguda B; LLA-T: Leucemia linfoblástica aguda-T.

(3%) y CD11b (1%). Solo el 10% expresaron más de un antígeno no linfocitario B y todas menos 3 expresaron CD34 (93%). El 29% (7/24) de las LLA-T coexpresaron antígenos mieloides: CD13 (12%), CD117 (4%), CD33 (4%) como también CD10 (17%) y DR (8%). Solo 3 casos expresaron CD34. La ausencia de expresión de antígeno se observó con mayor frecuencia en las LLA-T (70%)

siendo CD3 de superficie (67%), CD4 (37%), CD8 (37%), CD2 (8%) y CD5 (8%) los antígenos más involucrados. El 35% de las LLA-B presentaron pérdida de expresión de uno o más antígenos siendo más común la ausencia de CD45 (28%). También se identificaron casos con pérdida de CD79a (5%), CD38 (2%), DR (1%), CD20 (1%) o CD22 (1%). En el 21% de las LMA se observó ausencia de DR

(8%), CD117 (6%), CD33 (4%), CD13 (3%), CD45 (0.5%) o CD14 (5%). Una variedad de antígenos de linaje y de maduración presentaron una expresión alterada con respecto al patrón de expresión de la célula normal. Sobreexpresión de CD34, CD10 y CD19 fueron los fenotipos más frecuentemente observados en LLA-B, mientras que la mayoría de las LLA-T sobre-expresaron el CD7. En las LMA se observaron alteraciones en la expresión de CD13, CD33, DR y CD14 principalmente. La expresión de antígenos asincrónicos fue detectada en el 37% de las LLA-B y en el 26% de las LMA. No se observaron casos de asincronismo madurativo en las LLA-T. En las LLA-B la combinación más frecuente fue: CD34(+)/CD20(+) (24%) seguida por CD34(+)/CD10(-) (13%). En las LMA se detectaron los siguientes asincronismos madurativos: CD34(+)/CD15(+) (6%), CD34(+)/CD117(-) (5%), CD13(-)/CD33(+) (4.6%), CD13(+)/CD33(-) (3%), CD117(+)/CD15(+) (2.7%), DR(+)/CD15(+) (2%) y CD34(+)/DR(-) (2%). El 96% de las LLA-T (23/24) presentaron fenotipo ectópico considerando que la maduración de las células linfoides T ocurre en el timo y no se observa normalmente presencia de células inmaduras en médula ósea.

Discusión

Para el diagnóstico de las leucemias agudas se deben tener en cuenta tanto las características clínicas de la enfermedad como los estudios de laboratorio que incluyen la morfología, citoquímica, inmunofenotipo y citogenética de las células neoplásicas involucradas³. El estudio del inmunofenotipo es de gran importancia, no sólo para asignar el linaje de las células patológicas sino también para identificar aberrancias fenotípicas que diferencian a las células leucémicas de los precursores normales^{26, 27}. En nuestro estudio evaluamos el inmunofenotipo de 364 leucemias agudas consecutivas para determinar cuáles eran los fenotipos más frecuentemente encontrados, evaluar la expresión antigénica de los mismos e identificar las aberraciones fenotípicas presentes con nuestro panel de anticuerpos monoclonales utilizados. Por ser un centro de referencia no contamos con los datos clínicos, de tratamiento y evolución de los pacientes, por lo que el inmunofenotipo y las alteraciones halladas en nuestras muestras no pudieron ser evaluadas en cuanto a correlación con el cuadro clínico, respuesta al tratamiento, evolución clínica e importancia pronóstica.

Más de la mitad de las leucemias agudas (60.2%) presentaron un fenotipo de linaje mielóide, un 28.8% presentaron fenotipo linfóide B y un 6.5% tuvieron un fenotipo linfóide T; estos datos son coincidentes con los reportados en la bibliografía²⁸⁻³⁰.

Los antígenos más frecuentemente expresados en las LMA de nuestra serie fueron el CD13 y el CD33, con el 93% y el 92% respectivamente. Legrand y col.³¹ y Weber y

col.³² describen niveles de expresión similares a los nuestros aunque con una mayor frecuencia de expresión de CD34 (68% y 71% vs. 55%). Todas las LLA-B expresaron el antígeno linfóide B CD19, 94% expresaron CD79a, 86% el CD22 con débil intensidad de fluorescencia y 83% el CD10. El 53% de nuestras LLA-B expresaron CD20 de variada intensidad de fluorescencia y un 24% coexpresaron CD20 y CD34. La expresión de CD20 estaría relacionada a un pronóstico desfavorable en este tipo de leucemias^{33, 34}. Solamente en las LLA-B se observó ausencia de CD45 en las células patológicas^{35, 36}. En las LLA-T los antígenos más frecuentemente expresados fueron: CD3ic (100%), CD7 (100%), CD2 (91%) y CD5 (91%); el CD3 en superficie sólo se expresó en el 29% de las leucemias. Los fenotipos más comúnmente identificados fueron CD4CD8 doble positivo (54%), CD1a(+) (65%) y CD34(-) (71%). Con mucha menor frecuencia (< 5%) se identificaron por inmunofenotipo leucemias bifenotípicas³⁷⁻⁴², leucemias indiferenciadas^{8, 10}, leucemias de células plasmáticas^{10, 43} y leucemias de células dendríticas⁴⁴⁻⁴⁷.

Los estudios iniciales de citometría de flujo en médula ósea normal permitieron caracterizar los patrones inmunofenotípicos de las poblaciones hematopoyéticas medulares e identificar y diferenciar las células progenitoras normales de los blastos patológicos presentes en una leucemia aguda⁴⁸⁻⁵¹. La literatura demuestra una gran variedad de patrones fenotípicos aberrantes en las LA⁵²⁻⁵⁴. Las anomalías fenotípicas incluyen la expresión de antígenos de un linaje diferente, la ausencia o sobreexpresión de un antígeno comúnmente expresado, la coexpresión de antígenos presentes en diferentes estadios de maduración y la presencia de fenotipos nunca presentes en médula ósea^{11, 12}. Actualmente la identificación de estos fenotipos aberrantes al momento del diagnóstico de una leucemia aguda es de gran valor para la detección de enfermedad mínima residual y el seguimiento del paciente durante su tratamiento⁵⁵⁻⁵⁸.

En los últimos años varios trabajos han demostrado que algunos inmunofenotipos aberrantes estarían asociados a alteraciones moleculares específicas^{13, 19, 59, 60} y con el pronóstico⁶¹⁻⁶⁴ lo que ha sido reflejado en la clasificación de la WHO del año 2008³.

El análisis de los fenotipos aberrantes en nuestra serie de pacientes demostró su presencia en la mayoría de los casos (100% en las LLA-T, 89% en las LLA-B y 86% en las LMA). Esta alta frecuencia es concordante con datos recientes de la literatura^{9, 12, 65}. La infidelidad de linaje se vio con mayor frecuencia en las LMA, seguido por las LLA-B y en menor frecuencia por las LLA-T. En las LMA, el CD56 fue el antígeno linfóide más frecuentemente expresado y su presencia fue descrita como de pronóstico desfavorable por varios autores⁶⁶. Los antígenos linfoides T más comúnmente expresados fueron el CD7 (17%) y el CD2 (14%), este último con mayor incidencia en las leucemias agudas promielocíticas y mielomonocíticas. El CD19 fue

el antígeno linfocitoide B más frecuentemente identificado; su hallazgo es de importancia por su asociación con LMA con translocación t (8,21) de mejor pronóstico^{21, 67}. En las LLA-B fueron mayormente expresados los antígenos mieloides CD13 y CD33 siempre con intensidad de fluorescencia débil y frecuentemente expresados ambos antígenos en la misma célula. La presencia de estos antígenos mieloides junto con características de expresión de CD38 débil, CD34 y CD10 es altamente sugerente de presencia de translocación t (9; 22)^{8, 68}. La presencia de antígenos de linaje linfocitoide T fue mucho menor, entre ellos fueron identificados el CD2 (6%) y CD56 (3%). En las LLA-T solamente se observó expresión de antígenos mieloides CD13 (12%), CD33 (4%) y CD117 (4%) como expresión de CD10 (17%) y DR (8%); estos valores son mucho menores a los descriptos por Marks y col. en una serie de 356 pacientes⁶⁹. Un 92% de las LLA-B y un 73% de las LMA con infidelidad de linaje expresaron también CD34, lo que indicaría una mayor inmadurez de estas células patológicas.

El asincronismo madurativo fue observado en las LLA-B y en las LMA, siendo los más frecuentes CD34(+) CD20(+) y CD34(+)CD10(-) para las LLA-B y CD34(+) CD15(+) y CD34(+) CD117(-) para las LMA.

Un patrón fenotípico atípico CD33 intenso y homogéneo, CD13 de expresión heterogénea, DR, CD34 y CD15 negativos y frecuente autofluorescencia fue identificado en el 17% de las LMA⁷⁰. Este patrón está reportado como altamente predictivo de LMA-M3 con t (15,17)^{8, 21}. Las alteraciones en la hemostasia son manifestaciones clínicas muy frecuentes en estas leucemias agudas, en nuestra serie 8/13 pacientes con antecedentes clínicos de coagulopatías reportados en la solicitud de estudio presentaron este fenotipo.

En conclusión, el presente estudio muestra que la citometría de flujo realizada con un amplio panel de anticuerpos monoclonales es de importancia clínica para caracterizar el linaje de las leucemias agudas, clasificarlas e identificar fenotipos aberrantes presentes en la mayoría de los casos y que son una vital herramienta para evaluar pronóstico, sugerir estudios citogenéticos específicos y control de tratamiento con la evaluación de enfermedad mínima residual.

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés

Bibliografía

1. Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; 115: 453-74.
2. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9: 1783-6.
3. Swerdlow Sampo E, Harris NL, Jaffe ES, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon, France: IARC Press, 2008.
4. Harris NL, Jaffe ES, Diebol J, et al. World Health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the clinical advisory committee meeting- airlie house, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3835-49.
5. Vandiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937-51.
6. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997; 90: 2863-92.
7. Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia. *Journal of Immunological Methods* 2000; 243: 59-75.
8. Ortuño Giner FJ, Orfao A. Aplicación de la citometría de flujo al diagnóstico y seguimiento inmunofenotípico de las leucemias agudas. *Med Clin (Barc)* 2002; 118: 423-36.
9. Orfao A, Ramundo L, López A, et al. Inmunofenotipaje de hemopatías malignas: de la investigación básica a la práctica asistencial. *Haematologica* 2008; 93: 79-86.
10. Craig FE, Foon KA. Flow cytometry immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111: 3941-67.
11. Bahia DMM, Yamamoto M, Chauffaille ML, et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and clinical significance. *Haematologica* 2001; 86: 801:6.
12. Al-Mawali A, Gillis D, Hissaria P, Lewis I. Incidence, sensitivity and specificity of leukemia associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 934-45.
13. Hrusák O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002. 16: 1233-58.
14. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995; 85: 1416-34.
15. Campana D, Coustan-Smith E, Janossy G. The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1990; 76: 163-71.
16. Vidriales B, Pérez JJ, López-Berges C, et al. Análisis de la enfermedad mínima residual mediante citometría de flujo en la leucemia mieloide aguda. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2004; 26: 1-5.
17. Farahat N, Morilla A, Owusu-Ankomah K, et al. Detection of minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia by quantitative flow cytometry. *British Journal of Haematology* 1998; 101: 158-64.
18. Orfao A, Schmitz G, Brando B, et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: Current status and future directions. *Clinical Chemistry* 1999; 45: 1708-17.
19. Peters JM, Qasim Ansari M. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 44-54.
20. Wood BL, Arroz M, Barnett D, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B* 2007; 72: S14-S22.
21. Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica* 2001; 86: 675-92.

22. van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, Marvelde JG, Westerdaal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease induced shifts. *Cytometry Part B* 2004; 60: 1-13.
23. Ruiz-Arguelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Duque R E, Orfao A. on behalf of the participants of the Latin American Consensus Conference. Report on the Latin American Consensus Conference for cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Cytometry Part B* 2005; 70: 39-44.
24. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis: use of CD45 and right-angle light scatter on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 534-40.
25. Nicholson J, Hubbard M, Jones B. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry* 1996; 26: 16-21.
26. Orfao A, De Santiago M, Vidriales B, Tabertero MD, López-Berges MC, Bortoluci A. Immunofenotipo del mieloblasto normal y patológico. *Haematologica* 2001; 86: 339-43.
27. Farrahat N, Lens D, Zomas A, Morilla R, Matutes E, Catovsky D. Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and leukemic B-cell precursors. *British Journal of Haematology* 1995; 91: 640-6.
28. Gujral S, Badrinath Y, Kumar A, et al. Immunophenotypic Profile of Acute Leukemia: Critical Analysis and Insights Gained at a Tertiary Care Center in India. *Cytometry Part B* 2009; 76: 199-205.
29. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al. Early T-cell precursor leukemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukemia identified in two independent cohorts. *Lancet Oncol* 2009; 10: 147-56.
30. Landau H, Lamanna N. Clinical Manifestations and Treatment of Newly Diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Current Hematologic Malignancy Reports* 2006; 1: 171-9.
31. Legrand O, Perrot JY, Baudard M, et al. The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood* 2000; 96: 870-7.
32. Webber BA, Cushing MM, Li S. Prognostic Significance of Flow Cytometric Immunophenotyping in Acute Myeloid Leukemia. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; 1: 124-30.
33. Maury S, Hugué F, Leguay T, et al. Adverse prognostic significance of CD20 expression in adults with Philadelphia chromosome-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010; 95: 324-8.
34. Thomas DA, O'Brien S, Jorgensen JL, et al. Prognostic significance of CD20 expression in adults with *de novo* precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009; 113: 6330-7.
35. Ratei R, Sperling C, Karawajew L, Schott G, Schrappe M, Harbott J. Immunophenotype and clinical characteristic of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 1998; 77: 107-14.
36. Behm FG, Raimondi SC, Schell MJ, Look AT, Rivera GK, Pui CH. Lack of CD45 antigen on blast cells in childhood acute lymphoblastic is associated with chromosomal hyperdiploidy and other favorable prognostic features. *Blood* 1992; 1011-6.
37. Matutes E, Morilla R, Harahat N, et al. Definition of acute biphenotypic leukemia. *Haematologica* 1997; 82: 64-6.
38. Béné MC. Biphenotypic, bilineal, ambiguous or mixed lineage: strange leukemias! *Haematologica* 2009; 94: 891-3.
39. Xiao-Qian Xu, Jian-Min Wang, Shu-Qing Lü, et al. Clinical and biological characteristics of adult biphenotypic acute leukemia in comparison with that of acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a case series of a Chinese population. *Haematologica* 2009; 94: 919-27.
40. Zhao XF, Gojo I, York T, Ning Y, Baer MR. Diagnosis of biphenotypic acute leukemia: a paradigmatic approach. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; 3: 75-86.
41. Bagg A. Lineage ambiguity, infidelity, and promiscuity in immunophenotypically complex acute leukemias. Genetic and morphologic correlates. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 545-8.
42. Aribi A, Bueso-Ramos C, Estey E, et al. Biphenotypic acute leukaemia: a case series. *British Journal of Haematology* 2007; 138, 213-6.
43. García-Sanz R, Orfao A, González M, et al. Primary plasma cell leukemia: Clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 1999; 93: 1032-7.
44. MacDonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DNJ. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002; 100: 4512-20.
45. Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, et al. Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies. *Blood* 2002; 99: 1556-63.
46. Combariza JF, Londoño M, Cardona AF. Leucemia de células dendríticas: reporte de un caso. *Rev Colomb Cancerol* 2008; 12: 161-5.
47. Lichtman MA, Segel GB. Uncommon phenotypes of acute myelogenous leukemia: basophilic, mast cell, eosinophilic and myeloid dendritic cell subtypes: a review. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 35: 370-83.
48. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometry analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987; 70: 1316-24.
49. Lucio 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.
50. Macedo A, Orfao A, Ciudad J, et al. Phenotypic analysis of CD34 subpopulations in normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1995; 9: 1896-901.
51. McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, Picker LJ, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood* 2001; 98: 2498-507.
52. Olaru D, Campos L, Flandrin P, et al. Multiparametric analysis of normal and postchemotherapy bone marrow: implication for the detection of leukemia associated immunophenotypes. *Cytometry Part B* 2008; 74: 17-24.
53. Weir EG, Cowan K, LeBeau P, Borowitz MJ. A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for residual disease detection. *Leukemia* 1999; 13: 558-67.
54. Macedo A, Orfao A, Vidriales B, Lopez-Berges MC, Valverde B, Gonzalez M. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol* 1995; 70: 189-94.
55. Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, et al. Detection of abnormalities in B-cell differentiation pattern is a useful tool to predict relapse in precursor B-ALL. *British Journal of Haematology* 1999; 104: 695-705.
56. Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry Part B* 2008; 74: 331-40.

57. Wells DA, Sale GE, Shulman HM, et al. Multidimensional flow cytometry of marrow can differentiate leukemic from normal lymphoblasts and myeloblasts after chemotherapy an bone marrow transplantation. *Am J Clin Pathol* 1998; 110: 84-94.
58. Syrjälä M, Anttila VJ, Ruutu T, Jansson SE. Flow cytometric detection of residual disease in acute leukemia by assaying blasts co-expressing myeloid and lymphatic antigens. *Leukemia* 1994; 8: 1564-70.
59. Muñoz L, Nomdedéu JF, Villamor N, et al. Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. *Leukemia* 2003; 17: 76-82.
60. Sun X, Zhang W, Ramdas L, et al. Comparative analysis of genes regulated in acute myelomonocytic leukemia with and without inv(16)(p13q22) using microarray techniques, real-time PCR, immunohistochemistry, and flow cytometry immunophenotyping. *Modern Pathology* 2007; 20: 811-20.
61. Plesa C, Chelghoum Y, Plesa A, et al. Prognostic value of immunophenotyping in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008; 112: 572-80.
62. Rausei-Mills V, Chang KL, Gaal KK, Weiss LM, Huang Q. Aberrant expression of CD7 in myeloblasts is highly associated with de novo acute myeloid leukemias with FLT3/ITD mutation. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 624-9.
63. Repp R, Schaekel U, Helm G, et al. Immunophenotyping Is an Independent Factor for Risk Stratification in AML. *Cytometry Part B* 2003; 53: 11-9.
64. Vitale A, Guarini A, Ariola C, et al. Absence of prognostic impact of CD13 and/or CD33 antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. Results of the GIMEMA ALL 0496 trial. *Haematologica* 2007; 92: 342-8.
65. Seegmiller AC, Kroft SH, Karandikar NJ, Mc Kenna RW. Characterization of immunophenotypic aberrancies in 200 cases of B acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009; 132: 940-9.
66. Raspadori D, Damiani D, Lenoci M, Rondelli D, Testoni N, Nardi G. CD56 antigenic expression in acute myeloid leukemia identifies patients with clinical prognosis. *Leukemia* 2001; 15: 1161-4.
67. Ferrara F, Di Noto R, Annunziata M, et al. Immunophenotypic analysis enables the correct prediction of t(8;21) in acute myeloid leukemia. *British Journal of Haematology* 1998; 102: 444-8.
68. Tabernero MD, Bortoluci AM, Alaejos I, et al. Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotype base on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. *Leukemia* 2001; 15: 406-14.
69. Marks DI, Paietta EM, Moorman AV, et al. T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). *Blood* 2009; 114: 5136-45.
70. Hayden PJ, O'Connell NM, O'Brien DA, O'Rourke P, Lawlor E, Browne PV. The value of autofluorescence as a diagnostic feature of acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2006; 91:417-8.

LA TAPA

Rosinés Monner Sans. No, de la serie "Después de El grito", 1990

Acrílico sobre tela. 205 × 158 cm. Cortesía de la Comisión Nacional de Energía Atómica, Predio TANDAR, Centro Atómico Constituyentes. Presidente de la Comisión Organizadora de la Exposición Permanente: Dr. A.J.G.Maroto.

Artista plástica y docente. Egresó de la Escuela de Bellas Artes Prilidiano Pueyrredón. Ha expuesto diversos géneros y técnicas: pintura, objetos, instalaciones. Participó en numerosas muestras colectivas e individuales en el país (notablemente en el Centro Cultural Recoleta) y en el extranjero. Sus trabajos se encuentran en colecciones privadas en la Argentina, Los Ángeles, Boston, París, Bonn, entre otros. Enseña arte en Los Ángeles, (EE.UU.) y en diversas instituciones en nuestro país.

¹Comisión Nacional de Energía Atómica. *Artistas Plásticos con la CIENCIA*, 103. Centro Atómico Constituyentes, Predio TANDAR, Buenos Aires, 1999; p 107