

LEUCEMIA PROMIELOCITICA AGUDA: UTILIDAD DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL DIAGNÓSTICO

EVANGELINA AGRIELLO, ALEJANDRO LOPEZ ROMERO, VANESA FERNÁNDEZ, PABLO MARTÍNEZ, DANIEL DI PAOLO, MARTÍN BRANDT, PABLO POMBO, HORACIO CAFERRI, MÓNICA HERNÁNDEZ, LAURA RE, SUSANA GARBIERO.

Servicio de Hematología del H.I.G. "Dr. José Penna". Láinez 2401. (8000) Bahía Blanca. Argentina.

RESUMEN

La Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) requiere una rápida identificación ya que deben tomarse decisiones terapéuticas tempranas. Habitualmente el estudio morfológico es suficiente, pero la existencia de falsos positivos y negativos hace necesario buscar métodos más objetivos y rápidos que la confirmación molecular de la t(15;17) (PMLRAR α) patognomónica. **Objetivo:** Evaluar la utilidad del inmunofenotipo por Citometría de Flujo (CF) como método diagnóstico temprano a LPA ya que presenta un patrón fenotípico aberrante característico. **Materiales y Métodos:** Se evaluaron 85 pacientes con diagnóstico presuntivo de Leucemia Mieloi-de Aguda, de los cuales 10 presentaron perfil inmunofenotipi-

co de LPA. Procedimientos diagnósticos en el aspirado medular: 1) observación microscópica e histoquímica para mieloperoxidasa; 2) análisis multiparamétrico con anticuerpos monoclonales por CF, que cubrió el espectro de los distintos linajes. Los datos se adquirieron y analizaron en un FACScalibur (Becton Dickinson). Los parámetros hemostáticos evaluados fueron: Tiempo de Protrombina y Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado, Fibrinógeno, Dímero D y Productos de Degradación del Fibrinógeno. **Resultados:** Las características fenotípicas de probable LPA M3 t(15,17) la presentaron 10 de los pacientes. El perfil inmunofenotípico tuvo correlación con la morfología en 6 casos; en 2 pacientes, la morfología no fue suficiente para clasificarlos como portadores de

LMA M2 o M3. Pacientes (n=2), que presentaban inicialmente morfología monocítica, el diagnóstico definitivo fue M3v hipogranular. Patrón inmunofenotípico: única población de blastos, autofluorescencia, CD33++ homogéneo, expresión heterogénea de CD13, ausencia de expresión de HLA DR, patrón CD15/CD34 definido. **Conclusiones:** el inmunofenotipo aporta gran valor para un screening rápido de LPA con rearrreglo PML/RAR α .

Palabras claves: leucemia promielocítica aguda, inmunofenotipo, citometría de flujo, reordenamiento molecular PML/RAR α .

ABSTRACT

Acute Promyelocytic Leukemia (APL) requires rapid identification since early therapeutic decisions should be made. In general, morphological screening is enough. However, the existence of false positive and false negative results requires a search for methods that are more

Correspondencia:
Dra. Evangelina Agriello.
E-mail: evafre@infovia.com.ar
Láinez 2041 (8000) Bahía Blanca. Argentina.

Recibido: Agosto de 2003
Aceptado: Septiembre de 2003

objective and rapid than molecular confirmation of pathognomonic t(15;17) (PMLRARA+). The objective of this study was to assess the usefulness of immunophenotype by means of Flow Cytometry (FC) as an early diagnosis method for APL since it presents a characteristically aberrant phenotypical pattern. The study consisted in the assessment of 85 patients presumably with a diagnosis for Acute Myeloid Leukemia (AML). Among these patients, 10 presented an APL immunophenotypical profile. The diagnostic procedures performed in the medullar aspiration were the following: 1) microscopic and histochemical observation for myeloperoxidase; 2) multi-parameter analysis with monoclonal antibodies by means of FC, that covered the spectrum for the different strains. Data were acquired and analyzed in a FACScalibur (Becton Dickinson). The hemostatic parameters assessed were the following: Prothrombine Time and Partially Activated Thromboplastine Time, Fibrinogen, D Dimer, and Fibrinogen Degradation Products. The following results were obtained: 10 of the patients showed phenotypical characteristics of probable APL M3 t(15,17). The immunophenotypical profile showed correlation with the morphology in 6 cases; in 2 patients, the morphology was not enough to classify them as AML M2 or M3 carriers. For those patients (n=2), presenting monocytic morphology at the onset, the final diagnosis was hypogranular M3v. The immunophenotypical pattern found was only one blast population, autofluorescence, homogeneous CD33++, heterogeneous CD13 expression, lack of expression of

HLA DR, defined CD15/CD34 pattern. In conclusion, the immunophenotype is very useful for rapid screening of APL with PML/RAR α rearrangement.

Key words: acute promyelocytic leukemia, immunophenotype, flow cytometry, PML/RAR α molecular rearrangement.

INTRODUCCIÓN

La Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), constituye un 5-15% de los casos de Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Esta variedad está caracterizada por una translocación recíproca entre los cromosomas 15 y 17, presente en más del 95% de los pacientes (1). Los genes involucrados en esta translocación son el gen del receptor alfa del ácido retinoico (RAR α) en el cromosoma 17q21 y el gen PML en el cromosoma 15q24. Como consecuencia, se forman dos genes de fusión PML/RAR α en el 15q+ y su recíproco RAR α en el 17q-. El 5% restante de LPA presenta mutaciones diferentes tales como la t(11;17) o la t(5;17) entre otras (2). La clasificación FAB reconoce 2 tipos de LPA: M3 (forma hipergranular) y M3v (forma hipogranular) (3). Clínicamente la LAP se asocia a una diátesis hemorrágica atribuida a la coagulación intravascular diseminada (CID) que resulta de la liberación de sustancias procoagulantes liberadas por los gránulos azurófilos de los promielocitos anormales.

Hasta mediados de los años 80, el tratamiento de la LPA no difería del administrado en el resto de las variedades de LMA. La mortalidad durante el tratamiento de inducción era más elevada en la LPA que en otras LMA, debido al muy frecuente

desarrollo de CID con complicaciones hemorrágicas fatales. A partir del año 1986 se introdujo el ATRA (Ácido transretinoico) como tratamiento en esta variedad de LMA. Este agente administrado por vía oral induce la remisión celular y molecular de la enfermedad, con menores complicaciones hemorrágicas (4). Una vez arribado al diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda (LMA), es importante determinar si el reordenamiento molecular está presente en las células blásticas leucémicas. La detección se realiza por técnicas citogenéticas y moleculares. Sin embargo, estas técnicas son limitadas principalmente por el tiempo de procesamiento que requieren. Por técnicas de biología molecular se determinan distintas isoformas del bcr: 1, 2 y 3 (5).

Habitualmente, el tratamiento con ATRA se inicia sin tener la confirmación molecular, sólo con el cuadro clínico compatible y el inmunofenotipo característico.

La morfología tiene una buena correlación entre M3 y t(15;17). Sin embargo, la subjetividad del análisis morfológico no permite un diagnóstico de certeza. La disponibilidad de otros métodos de estudio es de gran utilidad diagnóstica.

El objetivo de este estudio fue evaluar las características inmunofenotípicas de pacientes con LMA M3 basado en marcaciones multiparamétricas analizados por citometría de flujo.

MATERIALES Y METODOS

Se evaluaron 85 pacientes con diagnóstico presuntivo de Leucemia Mieloide Aguda *de novo* por morfología e histoquímica

para mieloperoxidasa, durante el periodo comprendido entre marzo de 2001 hasta junio de 2003, en el Servicio de Hematología del H.I.G. Dr. José Penna de Bahía Blanca. Se estudiaron 30 mujeres y 55 hombres, con edades comprendidas entre 8 y 70 años. Al ingreso, fueron evaluados clínicamente y se determinaron los análisis hematológicos de rutina: análisis morfológico de sangre periférica, parámetros hematimétricos en contador hematológico Sysmex 4500. El estudio de la hemostasia se efectuó en coagulómetro BCT Dade Berhing.

Estudios inmunofenotípicos: las muestras de médulas óseas y/o sangre periférica se lisaron con cloruro de amonio previa marcación con un panel de anticuerpos monoclonales conjugados directos:

IgG1/IgG2a/IgG1; CD71/CD33/CD45; CD15/CD11b/CD45; CD34/CD117/CD45; HLADR/CD13/CD45; CD15/CD34/CD45; CD2/CD56/CD45; CD4/CD14/CD45; CD64/CD14My4/CD45; CD61/GLIA/CD45; CD10/CD20/CD19; D34/CD38/CD45.

Los marcadores intracitoplasmáticos que se evaluaron fueron: Mieloperoxidasa (MPO), CD3, CD79a. Los datos se adquirieron (20.000 células/tubo) en un citómetro de flujo FACScalibur de Becton Dickinson y se analizaron con software PAINT A GATE PRO.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los datos hematológicos de ingreso de los pacientes (n=10). Se presenta la distribución M3 típica (8/10) y variante (2/10) y el re-

Casos	Edad (años)	Sexo	L x10 ³ /μL	Hb (g/L)	PL x10 ³ /μL
1	32	F	2,8	8,9	22
2	13	M	9,3	6,1	30
3	55	M	24,6	7,9	26
4	57	F	3,7	10	20
5	42	M	1,2	11,4	70
6	28	M	1,6	5	20
7	11	F	12	6,8	5
8	63	M	43,2	6,2	41
9	46	M	11,9	7,5	40
10	8	M	20	9,1	11

M= masculino, F= femenino, L= leucocitos, PL= plaquetas

Tabla 1. **Datos hematológicos.** Los análisis hematológicos de los pacientes estudiados (n=10) se realizaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

Caso	Presentación clínica	Subtipo FAB	PML/RARα
1	Hematomas	M3	+
2	Hemorragia, astenia, CID	M3	+
3	Hematomas y CID	M3	nd
4	Hematomas y CID	M3v	+
5	Pancitopenia y hematoma en MS	M3	-
6	Astenia y hematomas	M3	nd
7	Hemorragias espontáneas	M3	+
8	Dolor lumbar	M3	+
9	Astenia, adinamia	M3	-
10	Hematomas y CID	M3v	+

CID:coagulación intravascular diseminada; nd: no determinado; MS: miembro superior

Tabla 2. **Clasificación de la Leucemia Promielocítica Aguda.** La clasificación en M3 típica (n=8) y variante (n=2) (FAB) y el reordenamiento molecular, se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

sultado del reordenamiento molecular en todos los casos estudiados (Tabla 2).

De los 85 pacientes estudiados, 10 presentaron características fenotípicas de probable LPA M3 t(15,17). El perfil inmunofenotípico tuvo correlación con la morfología en 6 de 10 pacientes. En 2 pacientes, el examen morfológico no fue suficiente para clasificarlos como portadores de

LMA M2 o M3. En otros pacientes (n=2), que inicialmente presentaban morfología monocítica, el diagnóstico definitivo fue una M3v hipogranular.

Las características del perfil inmunofenotípico de los casos estudiados fueron:1) autofluorescencia aumentada en las M3 típicas, a diferencia de las M3v;2) CD33 positivo en el 100% de los casos;3) patrón definido CD15/

CD34 en el 100% de los casos;4) CD13 heterogéneo en el 100% de los casos; 5) el 100% de los pacientes no mostró expresión del HLA DR (Tabla 3, Figura 1).

Todos los pacientes comenzaron su tratamiento con ATRA inmediatamente después del diagnóstico y mostraron una respuesta favorable a pesar de la alta tasa de complicaciones que se observan en este tipo de leucemias (Figura 2).

El análisis del PML-RAR α por técnicas moleculares se efectuó en 8 de los 10 pacientes con LPA, confirmándose en 6 de los casos. Dos de los pacientes mostraron un resultado negativo para el reordenamiento molecular, sugiriendo otro tipo de translocación, con buena respuesta al tratamiento con ATRA.

CONCLUSIONES

En la actualidad, la morfología de la médula ósea es la herramienta más utilizada para el diagnóstico de LPA. Se conoce que los estudios morfológicos pueden resultar insuficientes y poco precisos en el momento de tomar decisiones diagnósticas o terapéuticas. Habitualmente se comienza el tratamiento de estos pacientes con ATRA sin tener

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CD33	++hom	+hom	++hom	++hom	++hom	++hom	++hom	+hom	+hom	+hom
CD71	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD13	+ heter	+lev heter	+heter	+heter	+heter	+ heter	+ heter	+ heter	+ heter	+ heter
HLA DR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD34	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-
CD15	+	-	+	-/+	+	+	-	-/+	-/+	-/+
CD117	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
CD11b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD2	-	-	-/+	+	nd	-	-	-	-	-
CD19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD56	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-
CD7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mpo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 3: Perfil Inmunofenotípico de la Leucemia Promielocítica Aguda.

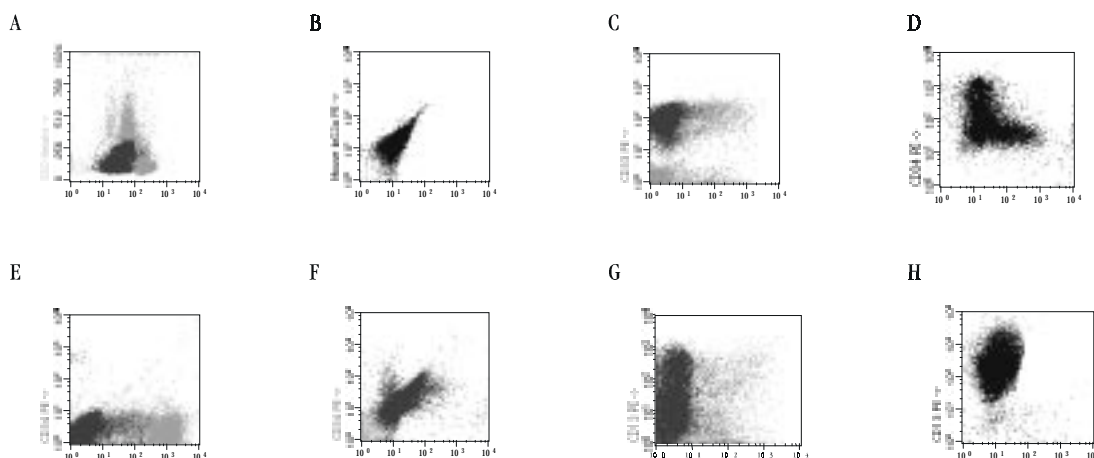
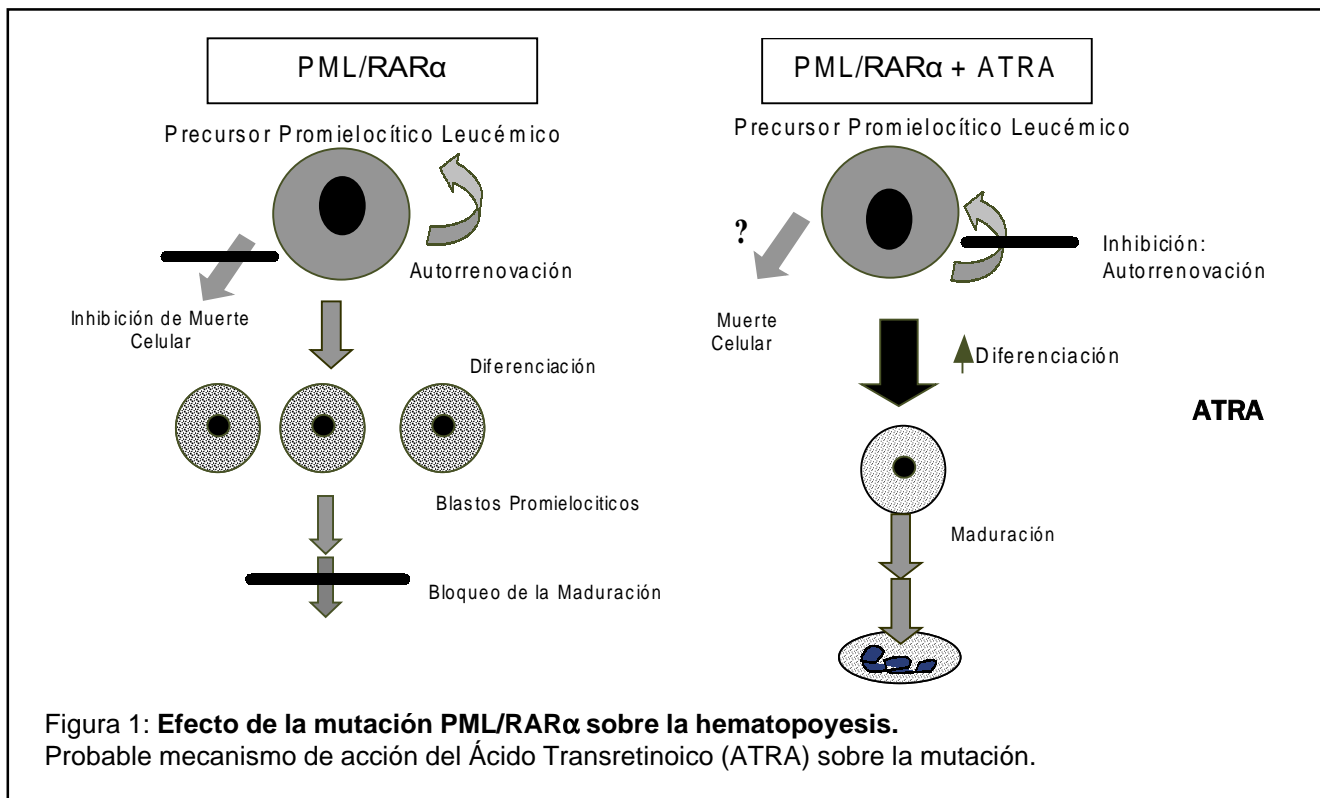


Figura 1. Perfil inmunofenotípico de la Leucemia Promielocítica Aguda.

Características de las LPA en distintas combinaciones: a) complejidad citoplasmática vs. CD45; b) autofluorescencia; c) CD33 vs. HLA-DR; d-f) CD15 vs. CD34; g-h) CD13 vs. HLA-DR. Las muestras de médula ósea y/o sangre periférica se lisaron con cloruro de amonio, previa marcación con anticuerpos monoclonales conjugados directos. Los datos se adquirieron (20.000 células/tubo) en un citómetro de flujo FACScalibur de Becton Dickinson y se analizaron con software PAINT A GATE PRO.



la confirmación diagnóstica por estudios moleculares. Nuestros resultados muestran que dos pacientes con estudios moleculares no detectables para el reordenamiento PML/RAR α , respondieron al tratamiento con este fármaco. En coincidencia con otros autores, esta observación sugiere que otro reordenamiento molecular estaría involucrando al gen RAR α (6). Habitualmente, la morfología, el cuadro clínico y la citometría de flujo son concordantes. Sin embargo, cuando la coagulopatía todavía no se ha presentado con variaciones detectables por el laboratorio hemostático, el inmunofenotipo aporta datos muy útiles para el screening de LPA con reordenamiento PML/RAR α , colaborando con la conducta terapéutica a seguir.

BIBLIOGRAFIA

1. Tallman MS, Rowe JM. Acute promyelocytic leukemia: A paradigm for differentiation therapy with retinoic acid. *Blood Rev* 1994;8:70-8.
2. Sainty D, Liso V, Biondi A et al. A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. *Blood* 2000;96:1287-96.
3. Rovelli A, Biondi A, Cantu-Rajnoldi A et al. Microgranular variant of acute promyelocytic leukemia in children. *Journal of Clinical Oncology* 1992;10:1413-8.
4. Degos L, Dombret H, Chomienne C et al. JM. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1995;85:2643-53.
5. Guglielmi C, Diverio D, Fenu S et al. Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. A cooperative Italian study on 196 cases. *Br J of Haematol* 1998;102:1035-41.
6. Orfao A, Chillon MC, Bortolucci AM et al. The flow cytometry pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of presence of PML/RAR α gene rearrangements. *Haematologica* 1999;84:405-12.