

ARTÍCULO ORIGINAL

Caracterización inmunofenotípica de pacientes con leucemia mieloide crónica en crisis blástica

Immunophenotypical characterization of patients with chronic myeloid leukemia in blast crisis

Gabriela Díaz Domínguez,^I Vianed Marsán Suárez,^I Carlos Hernández Padrón,^I Rosa María Lam Díaz,^I Yamilé Quintero Sierra,^I Orlando Olivera Morán^{II}

^I Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.

^{II} Hospital Provincial Docente Clínico Quirúrgico "Amalia Simoni", Camagüey, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la leucemia mieloide crónica es una enfermedad maligna que afecta la célula madre hematopoyética. Es causada por una mutación genética que consiste en la translocación recíproca entre el cromosoma 9 y el 22, denominado cromosoma Filadelfia. El curso clínico de la enfermedad se divide en tres fases: crónica, acelerada y crisis blástica. Los pacientes en la fase de crisis blástica presentan poca respuesta a los tratamientos y un pronóstico desfavorable.

Objetivos: caracterizar inmunofenotípicamente los blastos y sobre ellos, evaluar la expresión de los antígenos específicos de linaje linfóide y mieloide de pacientes con leucemia mieloide crónica en crisis blástica.

Métodos: se tomaron muestras de médula ósea y sangre periférica para citometría de flujo de siete pacientes con leucemia mieloide crónica en crisis blástica. El inmunofenotipaje celular se realizó en un citómetro GALLIOS, Beckman Coulter. Los datos obtenidos se analizaron con el empleo del programa informático Kaluza.

Resultados: seis pacientes desarrollaron una crisis blástica mieloide, lo cual representó el 85,72 % del total de las muestras y un solo paciente fue diagnosticado con una crisis blástica linfóide T cortical. Los antígenos que se expresaron con mayor frecuencia fueron los de linaje mieloide CD13 (85,7 %), CD15 (85,7 %), CD33 (71,4 %) y el marcador antigénico CD38 (57,1 %).

Conclusiones: se demostró que las crisis blásticas son mayoritariamente de estirpe mieloide y que, aunque muy poco frecuentes, pueden observarse crisis blásticas linfoides de tipo T. El inmunofenotipaje celular por citometría de flujo permitió definir el linaje de los blastos de los pacientes en la fase de crisis. Estos resultados fueron de gran importancia para el establecimiento de un tratamiento adecuado y eficaz en los enfermos.

Palabras clave: leucemia mieloide crónica; crisis blástica; inmunofenotipo; antígenos; anticuerpos monoclonales.

ABSTRACT

Introduction: Chronic myeloid leukemia is a malignant clonal disease affecting the hematopoietic stem cells. It is caused by a genetic mutation which consists in the reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, called Philadelphia chromosome. The clinical course of the disease is divided into three phases: chronic phase, accelerated phase and blast crisis. Patients in blast crisis respond poorly to the treatments and have a weak prognosis.

Objectives: To characterize the immunophenotype of blast and to evaluate the expression of the specific antigens of lymphoid and myeloid lineage of patients with chronic myeloid leukemia in blast crisis.

Methods: Bone marrow and peripheral blood samples were taken for flow cytometry of seven patients with chronic myeloid leukemia in blast crisis. Cell immunophenotyping was performed on a GALLIOS cytometer, Beckman Coulter. The data obtained were analyzed using the Kaluza software.

Results: The results showed that six patients developed a myeloid blast crisis, which represented 85.72 % of the total samples and a single patient was diagnosed with a cortical T lymphoid blast crisis. The most frequently expressed antigens were CD13 (85.7 %), CD15 (85.7 %), CD33 (71.4 %) and CD38 antigenic marker (57.1 %).

Conclusions: It was demonstrated that blast crisis are mostly of myeloid strain and that, although very rare, blast-type T lymphoid crisis can be observed. Cellular immunophenotyping by flow cytometry allowed to define the lineage of the blasts of the patients in the phase of crisis. These results were of great importance for the establishment of an adequate and effective treatment in the patients

Keywords: chronic myeloid leukemia; blast crisis; immunophenotype; antigens; monoclonal antibody.

INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un desorden neoplásico de la célula madre hematopoyética, caracterizado por una acumulación excesiva e incontrolada de células mieloides en sangre periférica y médula ósea.¹ Esta mieloproliferación es causada por una mutación genética que consiste en la translocación recíproca entre el cromosoma 9 y el 22. El cromosoma truncado que se origina se conoce como cromosoma Philadelphia (Ph) y se identificó por primera vez en 1960 en un paciente con LMC.² A nivel molecular, la fusión de los genes de estos cromosomas codifica una tirosina quinasa constitutivamente activa: la proteína Bcr-Abl1. La expresión de dicho gen es una condición necesaria y suficiente para inducir la LMC.³ La activación de forma aberrante de las quinasas entorpece diferentes rutas de señalización, lo que trae como consecuencias aumento en la proliferación celular, detención de los procesos de maduración y diferenciación celular y resistencia a la apoptosis.⁴⁻⁵

La LMC tiene una incidencia de 1-1,5 por cada 100 000 habitantes, lo que representa aproximadamente el 15-20 % de todas las leucemias diagnosticadas en el adulto, con una edad promedio de aparición entre los 40 y 60 años de edad.^{4,6}

El curso clínico de la LMC está caracterizado por distintos estadios hematológicos y temporales. En la etapa inicial, llamada fase crónica, la enfermedad es asintomática y las

células leucémicas se diferencian de los granulocitos maduros. Después de varios años en la fase crónica, la enfermedad se acelera de forma inevitable, esta etapa se conoce como fase acelerada. Posteriormente la LMC progresa a un estadio terminal llamado crisis blástica, la cual involucra una proliferación agresiva de células hematopoyéticas inmaduras detenidas en un estadio temprano de diferenciación.⁷ La presencia de una inestabilidad en los cromosomas y la adquisición de mutaciones adicionales son cruciales en la progresión de la fase crónica a la crisis blástica en las LMC.⁸ En esta fase los pacientes presentan poca respuesta a los tratamientos y son de mal pronóstico.^{6,9,10}

Clínicamente, la crisis blástica puede presentarse con la aparición de sudoraciones nocturnas, pérdida de peso, fiebre, dolores óseo-articulares y esplenomegalia. Además, se observa un incremento del riesgo de padecer infecciones. En el hemograma de estos pacientes se encuentran conteos de leucocitos y blastos elevados, disminución de los valores de hemoglobina y del número de plaquetas.¹¹

El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de antígenos específicos en los blastos de pacientes con LMC en crisis blástica y caracterizar inmunofenotípicamente estas células malignas de acuerdo con dicha expresión.

MÉTODOS

En un estudio de tipo retrospectivo, se analizaron muestras de médula ósea y sangre periférica provenientes de siete pacientes con diagnóstico morfológico de LMC en crisis blástica, en el periodo comprendido entre enero de 2013 y diciembre de 2015.

El inmunofenotipaje celular (IFC) se desarrolló por la técnica de citometría de flujo, con el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos de diferenciación linfoides B y T y mieloides.

<u>Anticuerpos monoclonales</u>	<u>Fluorocromos</u>
Anti- CD2	FITC*
Anti- CD3	R-PE*
Anti- CD5	R-PE*
Anti- CD4/CD8	FITC/R-PE*
Anti- CD10/CD19	FITC/R-PE*
Anti- CD13	R-PE*
Anti- CD14	FITC*
Anti- CD15	FITC*
Anti- CD79a	FITC*
Anti- CD33	R-PE*
Anti- CD34	R-PE*
Anti- CD38	FITC*
Anti- CD41	FITC*
Anti- CD45	APC*
Anti- CD57	R-PE*
Anti- CD117	R-PE*
Anti- HLA-DR	R-PE*

FITC: isotiocianato de fluoresceína, R-PE: R-ficoeritrina, APC: alofocianina, HLA-DR: antígeno leucocitario humano de tipo II, *: DAKO.

La determinación de la cantidad en μL de MO o SP a utilizar para cada determinación antigénica se realizó mediante la fórmula:

$$\text{Cantidad en } \mu\text{L} = \frac{500\,000 \text{ células}}{\text{Número total de leucocitos de la muestra}}$$

Las muestras se incubaron durante 20 a 30 min, protegidas de luz y a temperatura ambiente. Para la detección de los antígenos intracitoplasmáticos CD3 y CD79a se emplearon previamente 250 μL del reactivo permeabilizador-estabilizador BD Cytotfix/Cytoperm™, el cual se incubó por 30 min a temperatura ambiente. El lisado de los hematíes se llevó a cabo con cloruro de amonio durante 10 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con cloruro de sodio a 0,9 % y centrifugadas durante 10 min a 1 500 rpm. Las células se fijaron con 300 μL de formaldehído al 1 % para conservar su viabilidad y luego fueron guardadas a 4 °C hasta ser leídas en un citómetro *GALLIOS, Beckman Coulter*.

Los datos obtenidos se analizaron con el empleo del programa informático *Kaluza*, versión 1.2.

Se determinaron los niveles de expresión de cada antígeno específico para las líneas celulares linfóide y mieloide. Los pacientes fueron diagnosticados inmunológicamente de acuerdo a los diferentes antígenos expresados sobre los blastos (tabla 1). De esta forma se clasificaron en crisis blástica mieloide o linfóide y dentro de esta última, en linfóide de linaje B o T según la expresión de antígenos específicos para cada estirpe celular.

Se consideró positivo, si el porcentaje fue igual o mayor que 20 % de los blastos que expresaron el antígeno en la membrana celular e igual o mayor que 10 %, para los antígenos intracitoplasmáticos. Para validar el diagnóstico se siguieron los criterios del Grupo Europeo para la Caracterización Inmunológica de las LA (*EGIL*, por sus siglas en inglés), los cuales clasifican inmunológicamente las leucemias agudas, basados en los diferentes marcadores antigénicos expresados sobre los blastos.¹² El *gate* o ventana de las células blásticas fue realizado mediante un gráfico de puntos con la utilización del CD45, el cual permitió la separación de estas células de otras poblaciones celulares.¹³

El procesamiento de los datos se realizó en computadoras IBM-compatibles, con el empleo del programa estadístico *SPSS versión 15.0 para Windows*. Como medida de resumen para las variables cualitativas, se utilizaron las frecuencias absolutas y los porcentajes. Para validar los resultados en términos de significación estadística, se utilizó un nivel de confianza de 95 % y se consideró significativo, todo valor de $p < 0,05$ para el estadígrafo asociado a la prueba.

RESULTADOS

En el periodo comprendido entre enero de 2013 y diciembre de 2015 se analizaron muestras de MO y SP por citometría de flujo de siete pacientes con diagnóstico morfológico de LMC en crisis blástica. Todos los pacientes fueron de género masculino y una edad promedio de 34 años.

Los resultados obtenidos ([tabla 1](#)) mostraron que, de los siete pacientes estudiados, seis desarrollaron una crisis blástica de tipo mieloide, que representó el 85,7 % del total de las muestras analizadas. En el paciente 3 se observó que los antígenos mieloides CD13, CD14 y CD15 fueron negativos por lo que se evaluaron antígenos del linaje linfóide. Los blastos en este paciente expresaron CD3 intracitoplasmático, CD2, CD5 y se observó además una doble población CD4+/CD8+ con un valor de 73,5 % del total de blastos en la muestra, para un diagnóstico inmunológico final de LMC en crisis blástica linfóide T cortical

En el análisis de la frecuencia antigénica realizado ([tabla 2](#)), se encontró que los antígenos más frecuentes que se expresaron de forma positiva en los blastos de estos pacientes fueron el CD13, el CD15 y el CD33. Los dos primeros se encontraron expresados en 6 pacientes, lo que representó el 85,7 % del total de las muestras analizadas. El antígeno CD33 se expresó en el 71,4 % de los casos analizados. De los antígenos específicos de linaje mieloide, solo el CD14 y el CD41 se encontraron negativos en la totalidad de los casos estudiados. Por otra parte, se observó la expresión del CD38 en cuatro de las siete muestras analizadas y el antígeno HLA-DR solo fue positivo en un solo caso de cinco en los que se evaluó.

Adicionalmente, en el estudio realizado se observó un paciente que desarrolló la crisis blástica de fenotipo linfóide T cortical, con expresiones aberrantes de los antígenos CD33 y CD79a intracitoplasmático.

Tabla 1. Inmunofenotipo de los blastos en la LMC

Paciente	Sexo	Edad (años)	Inmunofenotipo	Linaje
1	M	5	+ : CD13, CD15, CD38, CD45 - : CD4, CD14, CD33, CD117, CD34	Mieloide
2	M	36	+ : CD13, CD15, CD33, CD45 - : CD4, CD14, CD117, HLA-DR, CD38, CD34, CD57	Mieloide
3	M	19	+ : CD33, CD38, CD3(c), CD2, CD5, CD4/CD8, CD79a(c), CD45 - : CD13, CD14, CD15, CD117, CD34, CD57, CD3	Linfóide T cortical
4	M	67	+ : CD13, CD15, CD33, CD45 - : CD4, CD14, CD117, HLA-DR, CD34, CD38, CD57	Mieloide
5	M	63	+ : CD13, CD15, CD33, CD38, CD45 - : CD4, CD14, CD41, CD117, HLA-DR, CD34	Mieloide
6	M	29	+ : CD13, CD15, CD33, HLA-DR, CD38, CD45 - : CD4, CD14, CD117, CD34	Mieloide
7	M	50	+ : CD13, CD15, CD45 - : CD4, CD14, CD33, CD41, HLA-DR, CD38, CD34, CD57	Mieloide

Tabla 2. Frecuencia absoluta de la expresión de antígenos en el total de las muestras

Antígeno	Frecuencia ^b (%)
CD3 intracitoplasmático ^a	1 (100)
CD79a intracitoplasmático ^a	1 (100)
CD2 ^a	1 (100)
CD4+/CD8+ ^a	1 (100)
CD5 ^a	1 (100)
CD13	6 (85,7)
CD14	0
CD15	6 (85,7)
CD33	5 (71,4)
CD34	0
CD38	4 (57,1)
CD41	0
CD57	0
CD117	0
HLA-DR	1 (20)

^aantígenos evaluados en un solo paciente; ^bse hace referencia a la frecuencia de los antígenos evaluados que resultaron positivos en cada muestra.

DISCUSIÓN

La progresión de la LMC a crisis blástica está caracterizada por un incremento en la proliferación celular, una detención en la diferenciación de las células y disminución de la muerte celular programada. El principal factor en la patogénesis de esta progresión es la expresión del oncogen BCR-ABL que codifica para una proteína con actividad tirosina quinasa.⁹

La fase de crisis está acompañada por un incremento en el porcentaje de células blásticas en sangre periférica y médula ósea.¹⁴ Aunque la mayoría de los pacientes presentan un fenotipo mieloblástico, aproximadamente el 25 % de los pacientes con LMC en crisis blástica muestra un fenotipo linfóide pre-B y en casos muy raros se ha identificado una transformación T linfoblástica.¹⁵

En el 70 % de los casos aproximadamente, el linaje de los blastos es mieloide. Los fenotipos más comunes corresponden a las poblaciones de granulocitos y monocitos.¹⁶ Estos datos son consistentes con los encontrados en esta investigación, en la cual, el 85,7 % del total de las muestras analizadas correspondió con un diagnóstico mieloblástico con expresión de CD15, antígeno que identifica la población granulocítica. En el estudio que se realizó, el antígeno de línea monocítica CD14 fue negativo en el 100 % de los casos. Este resultado pudiera ser consecuencia del tamaño de la muestra analizada (n= 7).

Otro dato interesante que se observó fue que no hubo expresión en ninguno de los casos de antígenos de inmadurez celular como el CD34 y el CD117, como se ha publicado en la literatura científica.^{10,17} Sin embargo, Wang y cols, demostraron el carácter heterogéneo en los fenotipos de las crisis mieloblásticas en cuanto a la expresión de estos antígenos.¹⁸ Esta heterogeneidad pudiera estar asociada a la inestabilidad cromosómica y

a la ocurrencia de nuevas mutaciones y aberraciones génicas, las cuales están directamente relacionadas con la progresión de las LMC a la fase de crisis blástica.⁸

Adicionalmente, Liu y otros, observaron que de 31 pacientes con LMC en crisis blástica, 24 fueron diagnosticados con crisis mieloblástica y 7 con crisis linfoblástica de linaje B. En este caso también el número de pacientes con LMC en crisis blástica mieloide fue mayor, en concordancia con los obtenidos en el presente trabajo.¹⁹ Ninguno de los pacientes estudiados para la realización de esta investigación desarrolló crisis blástica de linaje linfóide B; sin embargo, el paciente 3 fue diagnosticado con crisis blástica T cortical (tabla 1), dicho fenotipo es muy raro en este tipo de enfermedad y solo se han publicado unos pocos casos en la literatura.²⁰

Por otra parte, el análisis que se realizó de las frecuencias absolutas en la expresión antigénica dio como resultado que los antígenos mieloides que se expresaron con mayor frecuencia sobre los blastos fueron el CD13, CD33 y el CD15, además del CD38. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros investigadores.^{3,18,19}

El estudio y caracterización del inmunofenotipo de pacientes con LMC en crisis blástica demostró que las crisis blásticas son mayoritariamente de estirpe mieloide y que, aunque muy poco frecuentes, pueden observarse crisis linfoblástica de tipo T. Se evidenció además el predominio de un componente granulocítico en las crisis mieloides con la expresión del antígeno CD15. El inmunofenotipaje celular por citometría de flujo permitió definir el linaje de los blastos de los pacientes en la fase de crisis. Estos resultados fueron de gran importancia para el establecimiento de un tratamiento adecuado y eficaz en los enfermos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Honda H, Oda H, Suzuki T, Takahashi T, Witte ON, Osawa K, et al. Development of Acute Lymphoblastic Leukemia and Myeloproliferative Disorder in Transgenic Mice Expressing p210 bcr/abl: A Novel Transgenic Model for Human Ph1-Positive Leukemias. *Blood*. 1998;91(6):2067-75.
2. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leucocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960;25(1):85-109.
3. Xu Y, Wahner AE, Nguyen PL. Progression of Chronic Myeloid Leukemia to Blast Crisis During Treatment With Imatinib Mesylate. *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128:980-5.
4. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, Long ZJ, Huang D, Yang Y, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer* 2016;35(48):1-15.
5. Gustafsson K, Jamalpour M, Trinh C, Kharas MG, Welsh M. The Src homology-2 protein Shb modulates focal adhesion kinase signaling in a BCR-ABL myeloproliferative disorder causing accelerated progression of disease. *J Hematol Oncol*. 2014;7(45):1-13.
6. Rumjanek VM, Vidal RS and Maia RC. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR-CML cell lines? *Biosci Rep*. 2013;33:875-88.
7. Honda H, Ushijima T, Wakazono K, Oda H, Tanaka Y, Aizawa S, et al. Acquired loss of p53 induces blastic transformation in p210bcr/abl-expressing hematopoietic cells: a transgenic study for blast crisis of human CML. *Blood*. 2000;95(4):1144-50.
8. Kundranda MN, Tibes R and Mesa RA. Transformation of a Chronic Myeloproliferative Neoplasm to Acute Myelogenous Leukemia: Does Anything Work? *Curr Hematol Malig Rep*. 2012;7:78-86.

9. Jabbour EJ, Hughes TP, Cortés JE, Kantarjian HM and Hochhaus A. Potential mechanisms of disease progression and management of advanced-phase chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(7):1451-62.
10. Xu Z, Zheng M, Wu Ch, Ma Y, Meng L, et al. The overwhelmingly positive response to Dasatinib of a patient with multiple blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(1):1460-6.
11. Hehlmann R. How I treat CML blast crisis. *Blood*. 2012;120(4):737-47.
12. Garand R and Robillard N. Immunophenotypic characterization of acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders: practical recommendations and classifications. *Hematol Cell Ther*. 1996;38:471-86.
13. Gerardo CJ, Rodríguez C, Sastre D, Heller V, Fernández E. Utilización estratégica de CD45 en la identificación de células blásticas por citometría de flujo. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2006;40(2):173-80.
14. Zeng DF, Chang C, Li JP, Kong PY, Zhang X and Gao L. Extramedullary T-lymphoblastic blast crisis in chronic myelogenous leukemia: A case report of successful diagnosis and treatment. *Exp Therap Med*. 2015;9:850-2.
15. Perrotti D, Jamieson C, Goldman J and Skorski T. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2254-64.
16. Nagales-Nagamos R, Gentile T, Vajpayee N. Erythroid blast crisis in chronic myelogenous leukemia: Case report and review of literature. *Leukemia Res Rep*. 2016;5:18-22.
17. Ali R, Ozkalemkas F, Ozkocaman V, Yakut T, Nazlioglu HO, Budak F, et al. Sudden blastic crisis and additional chromosomal abnormalities during chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Int J Clin Oncol*. 2009;14:545-50.
18. Wang W, Tang G, Cortes JE, Liu H, Ai D, Yin CC, et al. Chromosomal rearrangement involving 11q23 locus in chronic myelogenous leukemia: a rare phenomenon frequently associated with disease progression and poor prognosis. *J Hematol Oncol*. 2015;8(32):1-8.
19. Liu YL, Wang XN and Liu HS. Differential analysis of BM cell morphology, immunophenotypic, cytogenetic characters and prognosis between myeloblastic and lymphoblastic crisis of CML. *J Exper Hematol*. 2014;22(3):629-33.
20. Dorfman DM, Longtine JA, Fox EA, Weinberg DS and Pinkus G. T-Cell Blast Crisis in Chronic Myelogenous Leukemia Immunophenotypic and Molecular Biologic Findings. *Hematopathol*. 1996;107(2):168-76.

Recibido: 9 de enero de 2017.

Aprobado: 3 de octubre de 2017.

Lic. Gabriela Díaz Domínguez. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, Cuba. Tel (537) 643 8695, 8268.
Correo electrónico: rchematologia@infomed.sld.cu
