

Caracterizarea epidemiologică și imunofenotipică a leucemiilor acute mieloide

Epidemiological and immunophenotypic characterization of acute myeloid leukemias

Dr. Tatiana Cristina ENACHE, Prof. Dr. Ana-Maria VLĂDĂREANU, Conf. Dr. Horia BUMBEA, Dr. Minodora ONISĂI, Dr. Ion DUMITRU

Clinica de Hematologie, Spitalul Universitar de Urgență, București

REZUMAT

Leuceemiile acute reprezintă un grup de afecțiuni maligne ale celulei stem hematopoietice caracterizate prin proliferarea și acumularea unor clone de celule imature (blastice) care asociază sindrom de insuficiență medulară (anemie, neutropenie, trombocitopenie). În funcție de originea clonei maligne, se disting 2 mari categorii de leuceemii acute: leuceemii acute limfoide (LAL) și leuceemii acute mieloide (LAM).

Studiile arată o incidență anuală a leuceemiilor acute la adulții europeni de 5-6 cazuri la 100.000 de persoane cu o creștere la persoanele peste 70 de ani ajungându-se la o incidență de aproximativ 15-20/100.000 de persoane. Din totalul leuceemiilor acute mieloide, 20% apar la copii și 80% sunt întâlnite în rândul adulților.

Diagnosticul leuceemiilor acute se bazează pe identificarea modificărilor morfologice, citochimice, imunofenotipice, citogenetice și de biologie moleculară. Imunofenotiparea are un rol major în diagnosticul și clasificarea leuceemiilor acute, în diferențierea leuceemiilor acute mieloide de cele limfoide, dar și în evidențierea bolii minime reziduale.

Cuvinte cheie: psoriazis, copil, diagnostic, comorbidități, calitatea vieții, tratament

ABSTRACT

Acute leukemias are a group of hematopoietic stem cell malignancies characterized by the proliferation and accumulation of immature cell (blasts) clones that associate medullary insufficiency syndrome (anemia, neutropenia, thrombocytopenia). Depending on the origin of the malignant clone, two major categories of acute leukemias are: acute lymphocytic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML).

Studies show an annual incidence of acute leukemias in European adults of 5-6 cases per 100,000 people with an increase in over 70 years of age, reaching an incidence of about 15-20 / 100,000 people. Of the total acute myeloid leukemias, 20% occur in children and 80% are among adults.

Diagnosis of acute leukemias is based on the recognition of morphological, cytochemical, immunophenotypic, cytogenetic and molecular biology changes. Immunophenotyping plays a major role in the diagnosis and classification of acute leukemias, in differentiation of acute myeloid and lymphocytic leukemias and in detection of minimal residual disease.

Keywords: acute myeloid leukemia, methods and diagnostic procedures, immunophenotyping

INTRODUCERE

Leuceemia acută mieloidă este o afecțiune a sistemului hematopoietic caracterizată prin

multiplicarea excesivă la nivelul măduvei osoase a celulelor mieloide maligne imature, fapt ce împiedică realizarea procesului de maturare și diferențiere celulară la care se asociază risc de

Adresă de corespondență:

Dr. Tatiana Cristina Enache, Clinica de Hematologie, Spitalul Universitar de Urgență, București, Splaiul Independenței nr. 169, București
e-mail: c.t.enache@gmail.com

anemie, trombocitopenie și sindrom infecțios din cauza insuficienței medulare. Este o afecțiune întâlnită la orice vârstă, dar mai frecvent la persoanele adulte.

Diagnosticul bolii presupune o serie de investigații morfologice, citochimice, imunofenotipice, citogenetice și examene biologice moleculare.

De mai bine de 2 decenii, imunofenotiparea furnizează o serie de informații relevante pentru diagnosticul și clasificarea leucemiilor acute mieloide. Împreună cu citomorfologia și citochimia, este crucială în determinarea și stabilirea linie de celule blastice în probele analizate.

De asemenea, flowcitometria în flux este utilă pentru detectarea nivelurilor scăzute ale celulelor blastice reziduale și în diferențierea lor față de celulele imature normale din măduva osoasă a pacienților cu leucemie acută mieloidă, din punct de vedere al răspunsului terapeutic pe parcursul tratamentului și la finalizarea acestuia.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-au analizat un total de 79 de cazuri de leucemie mieloidă acută confirmată prin imunofenotipare în laboratorul de flowcitometrie al Spitalului Universitar de Urgență București în perioada 2011-2015, iar citirea probelor s-a realizat pe un citometru FACS Canto II. Probele de sânge periferic și măduva osoasă au fost recoltate în vacutainere cu EDTA (5 ml). Toate probele au fost analizate inițial morfologic și citochimic.

Prelucrarea probelor/calibrare

Aparatul FACS Canto II a fost calibrat utilizându-se bile CS&T pentru verificarea liniarității și bile Rainbow 8 peack pentru setarea valorilor MFI a intensității fluorocromilor. Probele au fost prelucrate prin procedeul de marcare-lizare-spălare, citirea realizându-se în aproximativ o oră după marcare. Panelul de lucru utilizat a fost selectat conform protocolului Euroflow pentru leucemii acute mieloide (versiune finală 2012) (1) – în acest studiu, de interes semnificativ fiind markerii de suprafață: CD45, CD34, CD33, CD117, CD13, HLA-DR, CD56, CD7 și CD19, și markerii intracitoplasmatici: MPO, CD3, CD79a.

Datele sunt introduse în baza de date și prelucrate statistic utilizându-se Microsoft Office Excel pentru Windows 2007, SPSS versiunea 16.1.

REZULTATE

Lotul a fost format din 41 de bărbați și 38 de femei, raportul pe sexe fiind ușor favorabil sexu-

lui masculin 1,07:1, cu o medie de vârstă de 61 de ani, cea mai mică vârstă medie fiind întâlnită în LAM-M3 (51 ani) (Fig. 1).

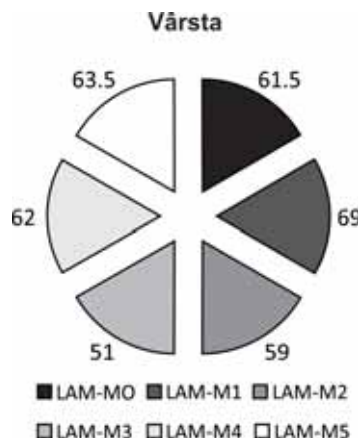


FIGURA 1. Tipurile de LAM în funcție de vârsta pacienților

Rezultatele hemoleucogramei evidențiază că valoarea medie a hemoglobinei este de 8,5 mg/dl, cea mai mică valoare fiind întâlnită în LAM-M0 (6 mg/dl); valoarea medie a leucocitelor este de 18,4x10³/ml, cea mai mare valoare fiind întâlnită în LAM-M2 (58x10³/ml) iar valoarea medie a trombocitelor de 67,5x 10³/ml cu o valoare minimă în LAM-M3 (17x10³/ml) (Tabelul 1).

TABELUL 1. Repartizarea tipurilor de LAM în funcție de nr. de leucocite, Hg și trombocite

Tipuri LAM	Leucocite 10 ³ /ul	Hg g/dl	Trombocite 10 ³ /ul
LAM-M0	14,85	6	82,5
LAM-M1	14,25	8	84
LAM-M2	5,90	9,8	100
LAM-M3	1,7	10	17
LAM-M4	15,40	7,6	55
LAM-M5	58,59	10	87,5

Dintre cele 72 de cazuri de leucemie acută mieloidă care au fost analizate prin flowcitometrie în laboratorul Clinicii de Hematologie SUUB, LAM-M1 a avut frecvență cea mai mare – 34 de cazuri (43%), urmată de LAM-M5 – 12 cazuri (5,1%), cea mai puțin frecvență fiind LAM-M0 – 6 cazuri (7,5%) (Fig. 2).

În urma analizei expresiei markerilor imunofenotipici se evidențiază următoarele patternuri de expresie a markerilor de suprafață:

CD45 – toate cazurile analizate au exprimat CD45 cu o pozitivitate medie de 70%, expresia cea mai înaltă fiind prezența în LAM-M4 (89%) (Fig. 3).

HLA-DR – este exprimat în 83% dintre cazurile de LAM de novo, cu o pozitivitate medie de

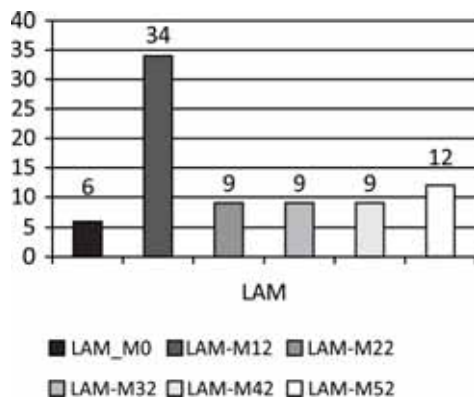


FIGURA 2. Reprezentarea grafică a tipurilor de LAM

31%, expresia cea mai mică apărând în LAM-M3 (22%).

CD34 – este pozitiv în 45% dintre cazurile de LAM analizate, expresia cea mai înaltă fiind întâlnită în LAM-M1 (74%), urmată de LAM-M2 (56%) și LAM-M4 (44%), LAM-M3 având expresia cea mai mică (33%).

CD13 și CD33-au fost evaluate, de asemenea, având pe celulele blastice o pozitivitate medie de 56%, respectiv de 91% în toate cazurile de LAM analizate. CD13 a fost pozitiv în 89% în LAM-M3, urmat de LAM-M5 (67%). CD33 a fost pozitiv în procent de 100% în LAM-M2, LAM-M3 și LAM-M4 și de doar 67% în LAM-M0.

CD117 – prezintă cea mai mare pozitivitate în LAM-M3 și LAM-M4 (100%) și cea mai mică expresie în LAM-M5 (33%).

CD56 – marker de prognostic nefavorabil, are o pozitivitate medie de 22,8%, cu variații între 33% în LAM-M2 și LAM-M3, respectiv 11% în LAM-M4.

CD7 și CD19 – pacienții cu LAM cu expresie aberantă au fost împărțiți în 2 grupuri în funcție de prezența și absența markerilor CD7 și CD19. Astfel, 8 pacienți (10%) au fost pozitivi pentru CD7, reprezentând 7,5%, cel mai frecvent subtip de leucemie fiind LAM-M0 (17%). Repartiția pe sexe este egală, neexistând un nivel semnificativ statistic precum în studiul lui Saxana și col. (2), unde expresia lui CD7 este mai frecventă la bărbați, pacienții având o vârstă medie de 59 de ani. 5 pacienți (6,3%) au fost pozitivi pentru

CD19, reprezentând 3,1% dintre cazuri, cel mai frecvent subtip fiind LAM-M3 (11%).

În ceea ce privește repartiția pe sexe, expresia lui CD19 a fost detectată mai ales la bărbați (3 pacienți, respective 3,79%), cu o vârstă medie de 48,4 ani. De asemenea, în studiul nostru au fost 2 pacienți care au prezentat co-expresie aberantă CD7+CD19+ în LAM-M1, respectiv LAM-M2.

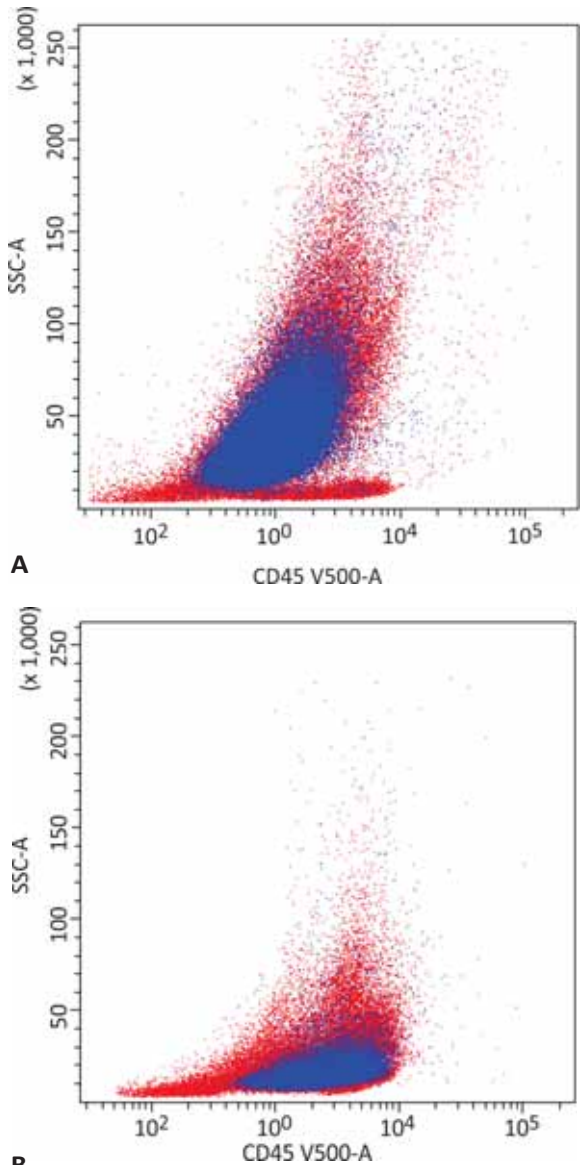


FIGURA 3. Diferite expresii CD45-de la CD45 med (A), CD45 high (B)

TABELUL 2. Expresia medie a markerilor antigenici în subtipurile de LAM

	CD45	CD33	CD34	CD117	HLA-DR	CD13	CD56	CD7	CD19
LAM0	50%	67%	33%	50%	0%	33%	17%	17%	0%
LAM1	74%	98%	74%	97%	35%	47%	18%	9%	0%
LAM2	67%	100%	86%	78%	56%	56%	33%	11%	0%
LAM3	70%	100%	22%	100%	22%	89%	33%	0%	11%
LAM4	89%	100%	44%	100%	44%	44%	11%	0%	0%
LAM5	58%	92%	33%	33%	33%	67%	25%	8%	8%

DISCUȚII

Epidemiologie

Leucemia acută mieloidă este cea mai frecventă leucemie la adulți, reprezentând 80% din totalul leucemiilor acute, incidența sa crește odată cu vârsta. În studiul realizat, rezultatele sunt aproximativ similare cu cele din Europa și SUA (3), media de vârstă fiind de 61 de ani. Într-un studiu realizat de Dores și col. pe un lot de 19.497 de pacienți diagnosticați cu LAM, media de vârstă raportată a fost de 66 de ani (4), respectiv 65 de ani, în studiul efectuat de Forman și col. pe un lot de pacienți englezi și scoțieni (5).

Majoritatea studiilor au dovedit o incidență mai mare la bărbați comparativ cu femeile. În studiul nostru nu există o preponderență masculină, raportul pe sexe fiind de 1,07:1, similar cu cel raportat de Sitelbanat și col. de 1:1 (6), spre deosebire de studiul Ghosh (7) unde raportul masculin/feminin este de 2,5:1.

Este important să menționăm că vârsta este un factor de prognostic nefavorabil în rândul pacienților adulți diagnosticați cu LAM acționând ca o variabilă continuă.

Această incidență crescută în raport cu vârsta poate fi parțial explicată de către 2 factori socio-economici: îmbătrânirea populației în țările dezvoltate și acuratețea scăzută a diagnosticului la pacienții vârstnici în țările în curs de dezvoltare. Nu se știe încă dacă și alți factori pot explica această creștere: expunerea la factorii de mediu, dietă, anomaliile genetice adiționale.

În ceea ce privește clasificarea tipurilor de LAM conform FAB, în studiul nostru, cel mai frecvent subtip de LAM este LAM-M1 (43%), urmat de LAM-M5 (15%), cel mai puțin frecvent fiind subtipul LAM-M0 (7,5%), subtipurile LAM-M2, LAM-M3 și LAM-M4 prezentând aceeași proporție 11,39%.

Arber și col. în studiul efectuat au raportat LAM-M2 ca fiind cel mai frecvent subtip, urmat de LAM-M5 (8), iar Nakase și col., în studiul efectuat, au raportat că, în populația australiană, LAM-M4 este subtipul cel mai comun, comparativ cu cea japoneză, unde predomină subtipurile LAM-M1 și LAM-M2 (9). Aceste diferențe dintre subtipuri se pot datora cel mai probabil unor factori etnici și geografici, dar și factorilor genetici responsabili pentru distribuția specifică a subtipurilor de LAM.

Markerii imonofenotipici

CD45 – Toate subtipurile de LAM au fost pozitive pentru CD45, cu o intensitate medie de

70%, variind între 89%, în cazul LAM-M5, și 50% în LAM-M0. Această constatare nu este surprinzătoare, deoarece precursorii au un grad redus de dispersie laterală (fiind slab granulari) și exprimă un CD45 dim +, putându-se diferenția astfel de celelalte celule: limfocitele CD45 +++, eritroblaștii CD45- (10).

CD13 – este un marker exprimat în mod normal pe toate celulele sistemului hematopoietic atât pe celulele mature, cât și pe cele imature și prezintă niveluri ridicate pe mieloblaști și pe promielocite, apărând înaintea lui CD33 și CD34 (11). CD13 este pozitiv în 56% dintre cazurile analizate în lotul de studiu, având o expresie înaltă în LAM-M3 (89%), urmat de LAM-M5 (67%), LAM-M2 (56%) expresia cea mai mică aflându-se în LAM-M0 (33%), comparativ cu un procent de 95% în studiul Olivera și col. (12).

CD33 – este un antigen mieloid prezent în mod frecvent pe monocite și mai puțin pe bazofile, neutrofile și eozinofile, este pozitiv în 91% dintre cazurile de LAM din studiu, comparativ cu 87% în studiul realizat de Brains și col. (13).

În studiul nostru, CD33 este pozitiv în 100% în LAM-M2, M3 și M4, fiind mai puțin exprimat în LAM-M0.

CD34 – este un marker exprimat pe diferite tipuri de celule prezente atât în sângele periferic, cât și în măduva osoasă. În studiul de față este pozitiv în 45% dintre cazuri, comparativ cu alte studii care au prezentat o valoare de 65% (13), 57% în studiul realizat de Petrovici și col. (14), dar în concordanță cu variațiile largi cuprinse între 26% și 64% ale studiului realizat de Basso și col. (15). Cauza acestei variații ar fi probabilitatea metodologiei diferite în detectarea expresiei receptorilor (porți diferite în analiza flowcitică în flux continuu, diferite clone CD34).

În studiul nostru, CD34 a avut cea mai mare expresie în LAM-M1 (74%), urmată de LAM-M2 (56%), iar cea mai mică expresie în LAM-M3 (22%).

CD117 – este un receptor proteic transmembranar care codifică protooncogenul c-kit, fiind prezent pe precursorii hematopoietici ai măduvei osoase. În lotul analizat CD117, este prezent în 76% dintre cazuri, cu o frecvență maximă în LAM-M3 (100%) și LAM-M4 (100%), urmată de LAM-M1 (97%), iar cea mai mică expresie este întâlnită în LAM-M5 (33%).

CD56 – este o moleculă de adeziune prezentă în celulele neurale, dar și în celulele NK; expresia sa pe celulele blastice a fost corelată cu o rată mai mare de recăderi și cu un prognostic

prost la pacienții tratați cu chimioterapie convențională. În studiul nostru, CD56 are o expresie mare în LAM-M2 și M3 (33%), urmată de LAM-M5 (25%), comparativ cu alt studiu unde prezintă o expresie de 21,7% (16). Antigenul CD56 este un factor de risc independent și prezența acestuia trebuie analizată în mod regulat pentru o mai bună evaluare a prognosticului la pacienții cu LAM.

CD7 și CD19 sunt markeri specifici seriei limfoide, dar pot prezenta expresii aberante în unele cazuri de LAM. CD7 este un marker care apare în timpul maturării limfocitelor T, iar prezența lui în LAM se corelează cu o rată scăzută a remisiunii complete. În studiul nostru, expresia lui CD7 (7,5%) este mai frecventă în cazurile de LAM decât CD19 (3,1%).

CD19 apare în timpul maturării limfocitelor B, având o frecvență de 11% în LAM-M3, comparativ cu CD7, care este mai frecvent în LAM-MO (17%), urmat de LAM-M2 (11%).

Studiile arată că CD19 este relativ frecvent asociat cu LAM-M2 cu t(8; 21) (17), CD7 fiind mai prezent în LAM-M3, Bain a concluzionat că expresia CD19, când este asociată cu LAM cu t(8:21), are un prognostic bun (18), iar când LAM este asociată cu t(9:22) are un prognostic slab (19). Astfel, impactul expresiei CD19 asupra prognosticului în LAM ar trebui să fie investigat și explorat în continuare.

De asemenea, un studiu realizat în 2014 de către Sinan și col. evidențiază prezența lui CD7, CD19 și a expresiei CD7/CD19 în rândul LAM în procent de 40%, 16% și respectiv 12%. (20). Tot în acest studiu, s-a constatat că CD7 a fost întâlnit mai frecvent la bărbați, în timp ce CD19 a avut o distribuție egală pe sexe.

CONCLUZII

Imunofenotiparea oferă o perspectivă asupra căilor de diferențiere, etapelor de maturare și caracteristicilor populațiilor celulare anormale, care sunt relevante pentru diagnosticarea malignităților hematologice. Prezența sau absența antigenelor pe/sau în populațiile celulare este recunoscută de diferiți anticorpi monoclonali, care oferă caracteristici imune definind liniile celulare, ajutând astfel la diagnosticul leucemiilor acute. Flowcitometria este utilă nu numai pentru diagnosticarea leucemiilor, ci și pentru a evalua prognosticul, luarea deciziilor pentru terapia vizată (în evaluarea bolii minime reziduale) și urmărirea ei. Deși studiul molecular și genetic a luat amploare în subclasificarea leucemiilor acute, aceste metode de diagnostic sunt disponibile numai în laboratoare de referință specializate și necesită un nivel ridicat de expertiză tehnică, dovedind de asemenea și un nivel scăzut de aplicabilitate, din cauza faptului că până la 20% dintre cazuri sunt cu anomalii genetice specificate. În schimb, citometria în flux se poate realiza într-un timp relativ scurt și uneori este suficient când se combină cu o analiză morfologică convențională pentru a stabili un diagnostic prezumtiv sau chiar definitiv. Prin urmare, morfologia și imunofenotiparea rămân principalele metode de diagnostic al bolilor maligne hematologice, imunofenotiparea având statut special prin eliminarea subiectivității din morfologie, așa cum s-a demonstrat și în studiul nostru.

BIBLIOGRAFIE

1. van Dongen J.J.M., Lhermitte L., Böttcher S., Almeida J., van der Velden V.H.J., Flores-Montero J. et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *EuroFlow TM antibody panels Handout at 14th EHA Congress*, Berlin, DE
2. Saxena A., Sheridan D.P., Card R.T. et al. Biologic and clinical significance of CD7 expression in acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology*, 1998, 58: 278–284
3. Gómez-Almaguer D., Marcos-Ramírez E.R., Montaño-Figueroa E.H., Ruiz-Argüelles G., Best-Aguilera C.R., López-Sánchez M.C. et al. Acute leukemia characteristics are different around the world: the mexican perspective. *Clinical-lymphoma-myeloma-leukemia Volume 17*, January 2017, Issue 1, p1-68.
4. Dorez M., Devesa S.S., Curtis R.E. et al. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States 2001-2007. *Blood* 2012, Volume 119, Issue 1, p34-43.
5. Forman D., Stockton D., Møller H., Quinn M., Babb P., De Angelis R., Micheli A. Cancer prevalence in the UK: results from the EUROPREVAL study. *Annals of Oncology*. 2003, Volume 14: p648–654.
6. Omer S., Kordofani A.A., Osman I.M., Musa O.H., Altayb H.N., Elamin B. Prevalence of the different FAB subtype of Acute Myeloid Leukemia related to hematological parameters in Sudanese. *Journal of Hematology and Blood Disorders*. 2017, 3(1): 102.
7. Ghosh S., Shinde S.C., Kumaran G.S., Sapre R.S., Dhond S.R., Badrinath Y. et al. Haematologic and immunophenotypic profile of acute myeloid leukemia: an experience of Tata Memorial Hospital. *Indian journal of cancer*. 2003, 40: 71-76.
8. Arber D.A., Stein A.S., Carter N.H., Ikke D., Forman S.J., Slovak M.L. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival.

- American Journal Clinical Pathology*. 2003 May; 119(5): 672-80.
9. **Nakase K., Bradstock K., Sartor M., Gottlieb D., Byth K., Kita K. et al.** Geographic heterogeneity of cellular characteristics of acute myeloid leukemia: a comparative study of Australia and Japan adult cases. *Leukemia* 2000, Volume14: 163-168.
 10. **Lacombe F., Durrieu F., Briais A., Dumain P., Belloc F., Bascans E. et al.** Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1997, Volume11. P 1878-86.
 11. **Chen L., Gao Z., Zhu J., Rodgers G.** Identification of CD13⁺CD36⁺ cells as a common progenitor for erythroid and myeloid lineages in human bone marrow. *Exp Hematol*. 2007, Volume 35(7), 91047-1055.
 12. **Ollivier L., Jean P., Marion B., Annie C., Regine L., Ghislaine S. et al.** The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood*. 2000, volume 96, number 3, 870-877.
 13. **Webber B., Cushing M., Li S.** Prognostic Significance of Flow Cytometric Immunophenotyping in Acute Myeloid Leukemia. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008; 1, 124-133.
 14. **Petrovici K., Graf M., Reif S., Hecht K., Schmetzer H.** Expression profile of the progenitor cell CD34, CD38 and CD90 in acute myeloid leukemia and their prognostic. *Life Science Journal*. 2011, Volume 8, p 680-686.
 15. **Basso G., Lanza F., Orfao A., Moretti S., Castaldi G.** Clinical and biological significance of CD34 expression in acute leukemia. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2015, p 68-78.
 16. **Di Bona E., Sartori R., Zambello R., Guercini N., Madeo D., Rodeghiero F.** Prognostic significance of CD56 antigen expression in patients with acute myeloid. *Haematologica*. 2002, vol. 87 no. 3, p 250-256.
 17. **Ortolani Wiley C.** Flow Cytometry of Hematological Malignancies. *Black Well publication*. 2011.
 18. **Ismaeel N.A.** Cytogenetic study on patients with acute and chronic leukemia. A thesis submitted to the Council of the College of Science for Women at the University of Baghdad in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biology. *Genetic*. 2010.
 19. **Bain B.** Leukaemia Diagnosis; fourth edition; 2010. Wiley-Blackwell.
 20. **Muhsin S., Al-Mudallal S.** Expression of aberrant antigens CD7 and CD19 in adult acute myeloid leukaemia by flow cytometry. *Iraqi Journal of Hematology*. 2014, Volume 3, Issue1, p 1-13.