

## Aspecte imunofenotipice în limfoproliferări cronice maligne cu celule B - semnificații prognostice

### Immunophenotyping aspects of chronic B-cell lymphoproliferative malignancies - prognostic significance

Bogdana Dorcioman<sup>1\*</sup>, Anca Bacârea<sup>2</sup>, Galafteon Oltean<sup>3</sup>, Minodora Dobreanu<sup>2</sup>

1. Spitalul Clinic Județean de Urgență Tg. Mureș – Laborator Analize Medicale, Departament Hematologie

2. U.M.F. Tg. Mureș, Disciplina Laborator-Biochimie Clinică

3. Spitalul Clinic Județean de Urgență Tg. Mureș, Clinica Medicală I, Compartimentul de Hematologie, U.M.F. Tg. Mureș

#### Rezumat

*Evaluarea fenotipului celular prin flowcitometrie sau imunohistochimie este o latură importantă în domeniul cercetării neoplasmelor limfoide. S-a constatat faptul că o serie de antigene exprimate de populația neoplazică pot avea semnificație prognostică. În această lucrare sunt prezentate aspecte imunofenotipice din cadrul limfoproliferărilor cronice maligne cu celule B, importanța imunofenotipării în diagnosticul acestor boli, precum și acele antigene care ar putea influența evoluția bolii și răspunsul la tratament.*

**Cuvinte cheie:** imunofenotipare, antigene, limfoproliferări cronice maligne.

#### Abstract

*The evaluation of cellular phenotype by flow cytometry or immunohistochemistry is an important branch in the research of hematolymphoid malignancies. It has been found out that antigen expression patterns of neoplastic population may have prognostic significance. This article presents immunophenotyping aspects of chronic B-cell lymphoproliferative malignancies, its role in diagnosis of these diseases and those antigens that can also influence on behavior and response to therapy.*

**Keywords:** immunophenotyping, antigen, chronic lymphoproliferative malignancies.

---

\***Adresa pentru corespondență:** Bogdana Dorcioman, Tg.Mureș, str. V.Babeș, nr.13, ap.2  
Tel.0722527024, E-mail: bogdanarodica@rdslink.ro

**Adresa instituției:** Spitalul Clinic Județean de Urgență Tg.Mureș, str. Gheorghe Marinescu nr.50, Laborator Analize Medicale, Departamentul de Hematologie

## Introducere

Limfoproliferările cronice maligne prezintă un grup heterogen de neoplazii ale celulelor sistemului imunitar. Importanța acestor neoplazii este determinată de creșterea incidenței lor în ultimele decenii, precum și de faptul că, diagnosticate timpuriu, permit un control terapeutic eficient.

Varietatea mare a aspectelor clinice și prognostice ale acestor boli rezultă din diversitatea funcțională, de distribuție și de diferențiere a celulelor sistemului imun<sup>3</sup>.

Evaluarea fenotipului celulelor tumorale prin imunofenotipare a devenit o parte integrantă a diagnosticului în hemopatologie. Metoda permite identificarea antigenelor grupate în sistemul de clasificare CD (cluster differentiation), utilizând anticorpi monoclonali care se fixează pe antigenele corespunzătoare<sup>13</sup>. Celulele neoplazice pot prezenta fenotipuri aberante, exprimând antigene asociate altor linii celulare.

Clasificarea actuală a neoplaziilor limfoide sistematizează neoplasmele limfoide în primul rând după celula proliferantă și aspectul morfologic, în neoplasme cu celule B, T/NK și boala Hodgkin. În această clasificare sunt incluse atât limfoamele cât și leucemiile.

Identificarea markerilor predictivi ai

răspunsului la tratament și duratei acestuia constituie o parte importantă a cercetării în domeniul prognosticului acestor boli.

## Imunofenotipul celulelor în leucemia limfatică cronică B

Leucemia limfatică cronică B (LLC-B) este cea mai frecventă formă de leucemie la adulți în țările vestice. Boala se caracterizează prin acumularea de limfocite aparent mature CD5+ în sânge, măduvă osoasă și țesut limfoid<sup>10</sup>.

*Pattern-ul* caracteristic al celulelor LLC-B este: expresia concomitentă a antigenelor CD19 și CD5, CD23 pozitiv (*Figura 1*), nivel scăzut de imunoglobuline de suprafață, CD79b slab exprimat sau absent, FMC-7 negativ<sup>3</sup>, monoclonalitate la expresia tipului de lanț ușor (*Figura 2*). Nivelul de expresie al CD20 este substanțial mai scăzut față de cel exprimat de limfocitele B circulante normale, ceea ce explică rata scăzută de răspuns la tratamentul cu anticorpi monoclonali anti-CD20<sup>8</sup>.

Aceste caracteristici imunofenotipice reprezintă un test sensibil pentru monitorizarea bolii minime reziduale după tratament.

Antigenul CD23 este un element puternic pentru diagnosticul pozitiv în LLC-B. Insta-

**Tabel 1. Caracteristici imunofenotipice în limfoproliferări cronice maligne cu celule B<sup>1,14</sup>**

TIPUL DE LIMFOPROLIFERARE	IMUNOFENOTIP
LLC B /Limfom limfocitic cu celulă mică B	CD19+, CD20+, CD5+, CD23+, CD10-, FMC7-, CD3-, CD79b-, SIg-
Limfom folicular	CD19+, CD20+, CD5-, CD23-, CD10+, CD3-, SIg+
Limfom splenic de zonă marginală	CD19+, CD20+, CD5-, CD23-, CD10-, CD3-, SIg+
Limfom difuz cu celule mari B	CD19+, CD20+, CD5-/+ , CD10-/+ , SIg+/- , CD3-
Limfom MALT	CD19+, CD20+, CD5-, CD10-, CD23-, SIg+, CD3-
Limfomul celulelor mantalei	CD19+, CD20+, CD5+, CD10-, CD23-, SIg+, CD43+, PRAD1+
Limfom Burkitt	CD19+, CD20+, CD5-, CD10+, CD23-, SIg+, CD3-
Leucemie cu celule păroase	CD19+, CD20+, CD5-, CD10-, CD23-, SIg+, FMC7+, CD11c+, CD25+, CD103+

+ =>90% pozitiv; +/- =>50% pozitiv; -/+ = <50% pozitiv; - = <10% pozitiv

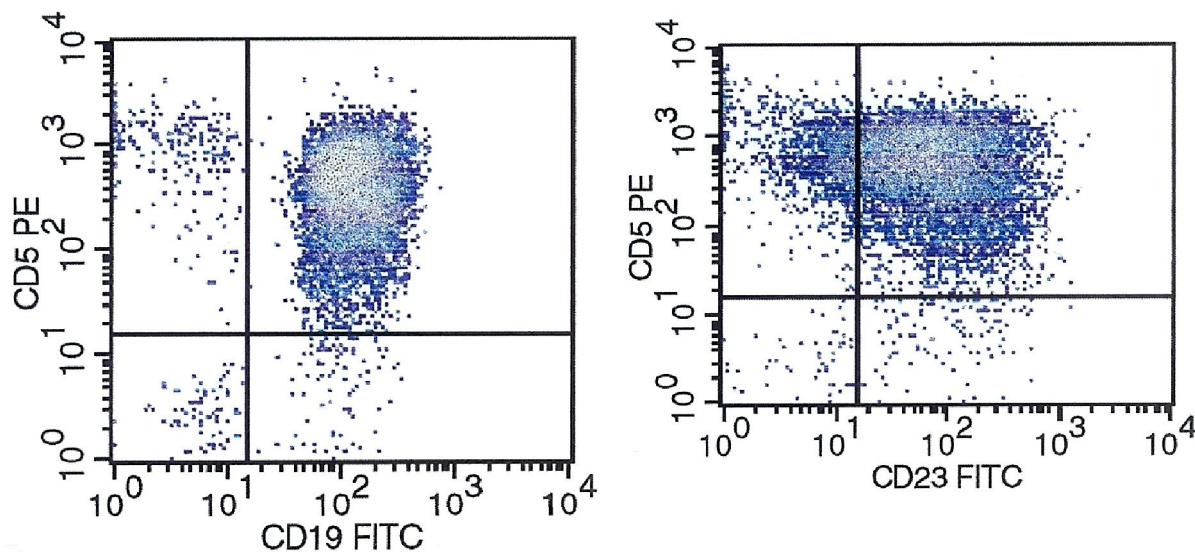


Figura 1. Fenotipuri caracteristice în LLC tip B

bilitatea membranară a CD23, desprins de pe suprafața celulei și eliberat în ser într-o formă stabilă (CD23s), are o importantă semnificație clinico-prognostică<sup>11</sup>. Nivelele crescute de CD23s se corelează cu factori de prognostic nefavorabil, cum ar fi: infiltrația măduvei osoase, timp rapid de dublare a numărului limfocitelor

și progresia bolii, mai ales la pacienții aflați în stadii incipiente de boală<sup>7</sup>.

Formele de LLC-B cu nivel crescut de expresie a FMC-7 sunt clinic mai agresive, fiind corelate cu scurtarea duratei de supraviețuire<sup>13</sup>.

Există o corelație între expresia antigenului CD38, statusul mutațional al genelor care codifică porțiunea variabilă a lanțului greu al imunoglobulinelor (IgVH), ZAP-70 la nivelul celulelor LLC-B și răspunsul la tratament, precum și durata acestuia. Cazurile de LLC-B cu clona leucemică fără mutații sau cu mutații minime IgVH, cu număr crescut de celule CD38+ și ZAP-70+ au un risc mult mai mare de decompensare clinică decât cazurile cu un număr semnificativ de mutații IgVH și puține celule CD38+ și ZAP-70+. Expresia CD38 pe celulele leucemice a fost primul marker ce a putut fi corelat cu statusul mutațional al IgVH. Cu toate acestea, unele studii au concluzionat că această relație nu este reală, cei doi markeri fiind considerați factori de prognostic independenți. Analizele kinetice, fenotipice și funcționale indică faptul că fracțiunea CD38+ este mai activă decât componenta CD38-, celulele CD38+ coexprimând markeri de activare și proliferare

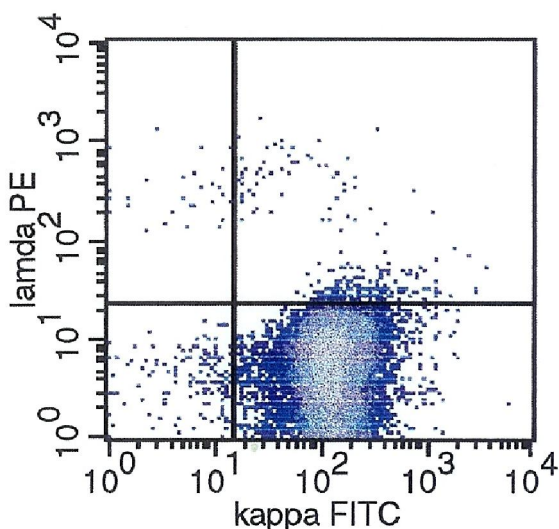


Figura 2. Monoclonalitate kappa într-un caz de LLC tip B

(CD69, CD62L, KI-67). De asemenea, acestea răspund mai bine la „BCR-crosslinking” față de celulele CD38- de la același pacient. Întrucât celulele CD38+ reprezintă componenta majoră proliferativă, acestea sunt mai susceptibile de a dezvolta anomalii cromozomiale cu prognostic nefavorabil (deleția 11q,17p). Pragul care definește pozitivitatea CD38 este controversat, nivelurile cut-off propuse fiind 5%, 7%, 20% și 30%. S-a sugerat că evaluarea CD38 prin determinarea densității antigenului măsurată prin capacitatea de legare a anticorpului este mai adecvată decât luarea în considerare a unui nivel cut-off predeterminat<sup>7,3</sup>.

O serie de studii au analizat implicația prognostică a expresiei pe suprafața celulelor LLC-B a unor antigene neaparținând liniei limfoide B. Prezența de antigene mielomonocitare (CD13, CD33) a fost asociată cu un prognostic nefavorabil. S-a evidențiat și o asociere între *pattern-ul* difuz de infiltrație a măduvei osoase și expresia acestor antigene<sup>2</sup>.

CD36 este o glicoproteină membranară prezentă pe o varietate de celule hematopoietice. Nivelul crescut de expresie a acestui antigen pe celulele LLC-B a fost asociat cu caracteristici clinico-hematologice de boală agresivă (stadiu clinic avansat, aspect histologic difuz la puncția biopsie osoasă), ceea ce sugerează faptul că CD36 ar putea fi un factor favorizant al răspândirii celulelor tumorale<sup>2</sup>.

### Aspecte imunofenotipice în limfoame maligne non-Hodgkin

Majoritatea limfoamelor maligne non-Hodgkin (80-90%) sunt de tip celular B. Cito-metria în flux și colorațiile imunohistochimice ale biopsiilor sunt examinări necesare ori de câte ori se suspectează un limfom, atât pentru confirmarea diagnosticului, cât și pentru stabilirea cu precizie a subtipului de limfom<sup>1</sup>.

Cele mai frecvente tipuri de limfoame maligne non-Hodgkin (LMNH) sunt limfomul difuz cu celule mari B (DLBCL) și limfoamele

foliculare (LF). DLBCL reprezintă 30% din cazurile nou diagnosticate și mai mult de 80% din limfoamele agresive, iar LF 22% din cazurile noi de LMNH și 70% din limfoamele indolente<sup>6</sup>.

O serie de studii au evaluat valoarea prognostică a mai multor tipuri de antigene prezente pe suprafața celulelor tumorale.

CD5 este un antigen exprimat de celulele T și un subset de celule B (B1-cells). Acesta este prezent pe celulele tumorale din LLC-B, limfomul celulelor mantalei precum și la aproximativ 10% din pacienții cu DLBCL. Celulele DLBCL CD5+ au fost observate la persoane în vârstă, mai ales în stadii avansate de boală, cu nivel ridicat de LDH și scor IPI (indice prognostic internațional) crescut. Unele studii au demonstrat o scurtare marcată a duratei de supraviețuire la pacienții cu DLBCL cu celule CD5+<sup>1</sup>.

CD10 este o endopeptidază asociată membranei celulare. În cursul diferențierii celulare, apare prima dată pe celulele proB și se pierde în cursul maturăției la celulele B naive. Reapare pe suprafața celulară în timpul maturăției antigen dependente, la nivelul centrului germinal. Expresia CD10, marker al originii CG (centru germinal), este detectată în 10-20% din DLBCL. Analiza expresiei CD10 ca factor de prognostic în DLBCL a condus la rezultate contradictorii, supraviețuirea globală la pacienții cu nivel crescut de expresie fiind crescută în unele studii și neinfluențată în altele<sup>1</sup>. În LF, antigenul CD10 alături de alți markeri ai centrului germinal (BCL-6, PU1) a fost corelat cu o evoluție favorabilă<sup>12</sup>.

Antigenul CD21 este exprimat pe celulele B și celulele dendritice foliculare. CD21 are 2 isoforme: CD21S (short form) specifică celulelor B și CD21L (long form) specifică celulelor foliculare dendritice. Într-un studiu recent, evaluarea expresiei CD21 pe celulele tumorale la pacienții cu DLBCL a relevat faptul că tumorile CD21S pozitive au o rată de remisie completă și de supraviețuire globală la 5 ani

mai bună, independent de IPI<sup>9</sup>.

CD30 a fost considerat inițial un antigen tumoral specific. Ulterior s-a demonstrat prezența lui pe limfocitele B, limfocitele T activate precum și pe macrofagele activate. Gena care codifică CD30 aparține familiei receptorilor TNF/NGF. Unii cercetători au identificat prezența lui CD30 în LMNH ca fiind asociată cu un prognostic mai bun raportat la cazurile CD30-, rata de supraviețuire pe termen lung, rata remisiunii complete și perioada de remisie fiind mult superioare. Se pare că pozitivitatea lui are importanță prognostică numai în limfoamele cu malignitate crescută<sup>13</sup>.

CD44 este o glicoproteină de suprafață, larg distribuită pe diferite tipuri de celule și țesuturi. CD44 are mai multe variante isoforme. Limfocitele normale exprimă varianta standard (CD44s), în timp ce variantele isoforme sunt prezente pe celulele epiteliale, limfocitele activate și celulele tumorale din unele tipuri de limfoame. Expresia CD44v6 în DLBCL este un factor de prognostic nefavorabil, nivelurile mari fiind corelate direct cu extinderea tumorală, stadiul clinic și agresivitatea evolutivă<sup>4</sup>.

Prognosticul individual al pacienților cu limfoproliferări cronice maligne variază foarte mult. Deși gradul de malignitate și stadiul clinic stau la baza stabilirii prognosticului, o serie de parametri, printre care și expresia anumitor antigene de suprafață pe celulele tumorale pot oferi informații prognostice independente.

## Bibliografie

1. Ajeet Gajra, Neerja Vajpayee, Grethlein Sara – Lymphoma, B-cell, emedicine, 2005, 1-52.
2. Cheson Bruce D.– Chronic Lymphoid Leukemias, Sec. Edition, National Cancer Institute, 2001, 240-253.
3. Chiorazzi Nicholas and Ferrarini Manlio – Evolving View of the in-vivo Kinetics of Chronic Lymphocytic Leukemia B cells, Hematology, 2006, 273-278.
4. Iganayi H., Banno S., Wakita A. et all – Prognostic signifiacnce of CD44v6 in diffuse large B-cell lymphoma, Med. Pathol, 1999, 12, 546-553.
5. Kai Neil E., Hamblin Terri J., Diane F. et all – Chronic Lymphocytic Leukemia, The Am. Soc. of Hematology, 2002, 193, 1-33.
6. Lossos Izidore S., Morgensztern Daniel – Prognostic Biomarkers in Diffuse Large B-cell Lymphoma, Journal of Clinical Oncology, 2006, 24, 995-1007.
7. Montserat Emili – New Prognostic Markers in CLL, Hematology, 2006, 279-284.
8. Munci Yagci, Irem Akar, Guslan Turkoz et all – GM-CSF does not increase CD20 antigen expression on chronic lymphocytic leukemia lymphocytes, Leukemia Research, 2005, 29, 735-73812.
9. Ogava S., Yanaguki M., Oka K. et all – CD21 antigen expression in tumor cells of diffuse large B-cell lymphomas is an independent prognostic factor indicating better overall survival, Br. J. Hematol, 2004, 125, 180-186.
10. Păun Radu – Tratat de medicină internă, Hematologie partea II, Ed. Medicală București, 1999, 330-463.
11. Sarfati M., Chervet S., Chastang C. et all – Prognostic importance of serum levels of CD23 in chronic lymphocytic leukemia, Blood, 1998, 88, 4259-4264.
12. Sehn Laurie H. – Optimal Use of Prognostic Factors in Non Hodgkin Lymphoma, Hematology, 2006, 295-302.
13. Vlădăreanu Ana-Maria – Actualități în limfoamele maligne nonhodgkiniene, Ed. Medicală Amaltea, 2002, 118-127, 138-145.
14. Williams Hematology, Sixth Edition, Mc. Grauw-Hill, Medical Publishing Division, 2001, 228-230, 1166-1170, 1217-1219.