

CONTRIBUCION DE LA INMUNOCITOENZIMOLOGIA AL DIAGNOSTICO HEMATOLOGICO

S. Woessner

Unidad de Hematología y Oncología.
Hospital de la Creu Roja.
Barcelona.

Contribución de la inmunocitoenzimología al diagnóstico hematológico.

La inmunocitoenzimología (ICE) es una metodología cuyo objetivo es detectar diversos antígenos y componentes celulares mediante su reacción con anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra ellos; la unión antígeno-anticuerpo se visualiza posteriormente mediante una reacción enzimática.

Se trata de una tecnología en pleno auge, utilizada con frecuencia creciente en los laboratorios de Citología y de Histología, gracias a la cada vez más amplia disponibilidad de anticuerpos monoclonales. Surgió como método alternativo a la inmunofluorescencia; al anticuerpo no se le acopla un fluorocromo sino un enzima que al actuar sobre el sustrato correspondiente, da lugar a un producto final coloreado visible con el microscopio de luz (1).

Una de las múltiples ventajas de la ICE es que permite la valoración simultánea de los marcadores inmunológicos con un aceptable detalle morfológico al que tenemos que renunciar con la inmunofluorescencia. Permite además elaborar la muestra un cierto tiempo después de su confección, lo que posibilita su envío a laboratorios de referencia. Debido a la estabilidad del marcaje es posible reevaluar la muestra por distintos observadores. Se facilita también el inmunofenotipaje de muestras que tengan escasa proporción de células patológicas y se detectan tanto antígenos de superficie como intracitoplásmicos; algunos

de estos últimos aparecen precozmente en la línea de diferenciación celular y no serían detectados por inmunofluorescencia.

Hace ya más de 20 años se empleó con éxito la peroxidasa de rábano, iniciándose con ella la era de la inmunocitoquímica (2). Otros enzimas, especialmente la fosfatasa alcalina, cuenta con gran número de adeptos, sobre todo en el campo de la Hematología, ya que sólo presenta actividad enzimática la granulopoyesis neutrófila madura y es fácilmente bloqueable por diversas sustancias.

La conjugación de la fosfatasa alcalina al anticuerpo y la detección de la unión antígeno-anticuerpo mediante la reacción enzimática de la fosfatasa alcalina se conoce como la técnica FAAFA (fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina). La glucosaoxidasa es otra enzima que goza de gran prestigio, pues, el no estar presente en células humanas, no precisa de bloqueo endógeno; además la alcohol resistencia de los reactivos permite el contraste con la tinción de May Grünwald-Giemsa, con la que el hematólogo está tan familiarizado.

Existen múltiples métodos muy ingeniosos encaminados a amplificar la señal que indica la unión antígeno-anticuerpo. Algunas modalidades técnicas utilizan el sistema avidina-biotina, estreptavidina-biotina, que resultan especialmente adecuadas para localizar antígenos presentes en escasa cantidad o deteriorados por las maniobras de fijación o inclusión (3).

El acoplamiento de partículas de oro coloidal a los diversos anticuerpos, aunque

en sentido estricto no sea un método inmunoenzimático, ha alcanzado una enorme popularidad, ya que son técnicas que se pueden utilizar tanto con microscopio de luz como con el microscopio electrónico (4). Es posible marcar dos o más antígenos distintos al acoplar a los correspondientes anticuerpos partículas de oro de tamaños diversos. Aquí también es factible amplificar la reacción mediante la reducción de las partículas de oro con lactato de plata. Una mayor sofisticación se consigue al realizar la técnica del oro coloidal seguida de una reacción citoquímica para determinar la ubicación de un determinado enzima en una célula previamente inmunofenotipada (Fig. 1).

La experiencia ha demostrado que las técnicas inmunocitológicas representan una herramienta de primer orden en el diagnóstico hematológico. Vamos a referir aquellas áreas en que tal metodología adquiere la máxima relevancia práctica:

1. Inmunofenotipaje de las células blásticas de las leucemias agudas y de los brotes blásticos de los síndromes mieloproliferativos crónicos y mielodisplásticos.

Cuando no existen estigmas seguros de diferenciación mieloide en una célula blástica como pueden ser los bastones de Auer, las astillas o una granulación azurófila mieloperoxidasa positiva, conviene proceder el inmunofenotipaje de la población blástica para determinar adecuadamente su filiación. (Fig. 2) Dicha catalogación puede crear una problemática en ocasiones insoslayable incluso con la ayuda de técnicas citoquímicas; surge sobretodo ante células blásticas de aspecto muy indiferenciado, de citoplasma con intensa apetencia tintorial basófila, indicativa de abundancia de ribosomas y, por tanto, de juventud celular. Tal grado de indiferenciación blástica es especialmente en los brotes blásticos precedidos de un síndrome

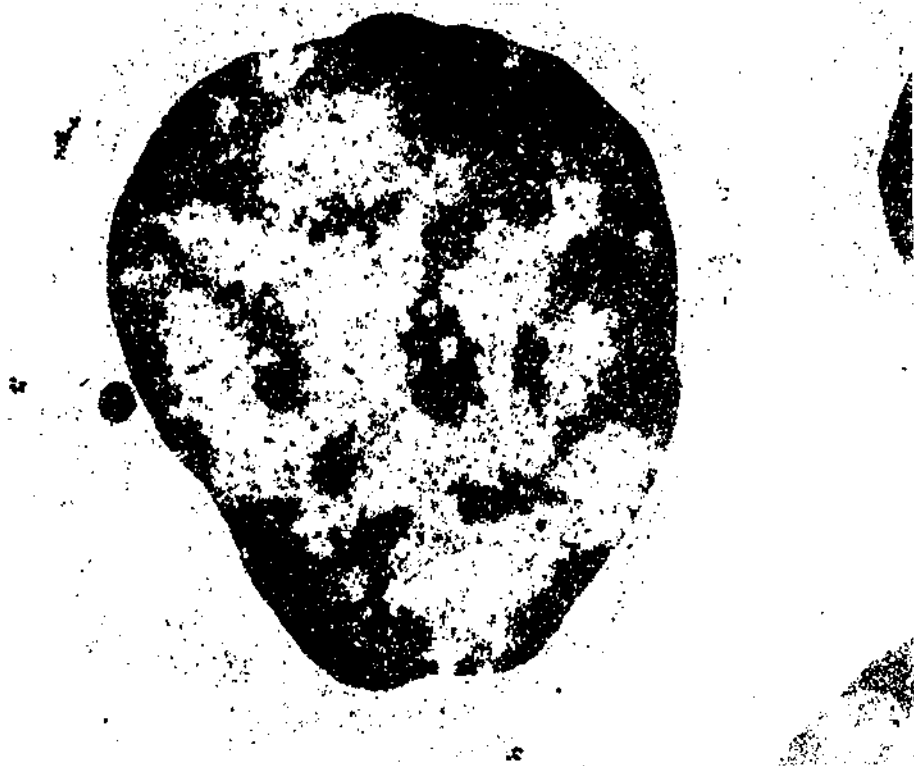


Figura 1
Linfocito CD8 positivo (marcaje con oro coloidal) que muestra un gránulo fosfatasa ácida positivo.
(Aumento original $\times 11.500$).

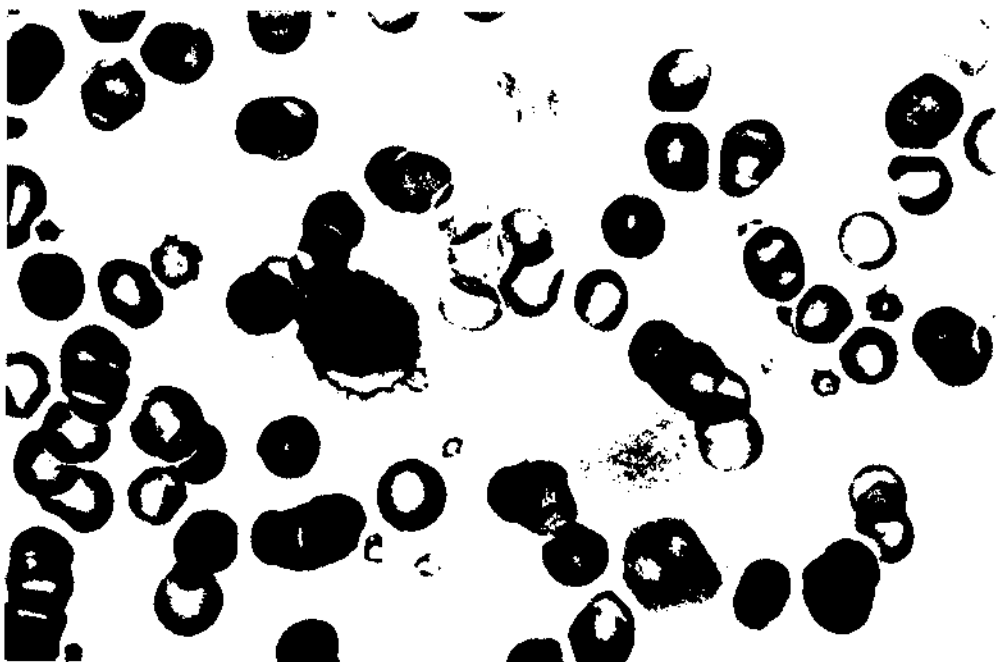


Figura 2
Célula blástica glicoproteína IIb/IIIa positiva. Advuértase también la positividad plaquetar. (Técnica FAAFA $\times 1000$).

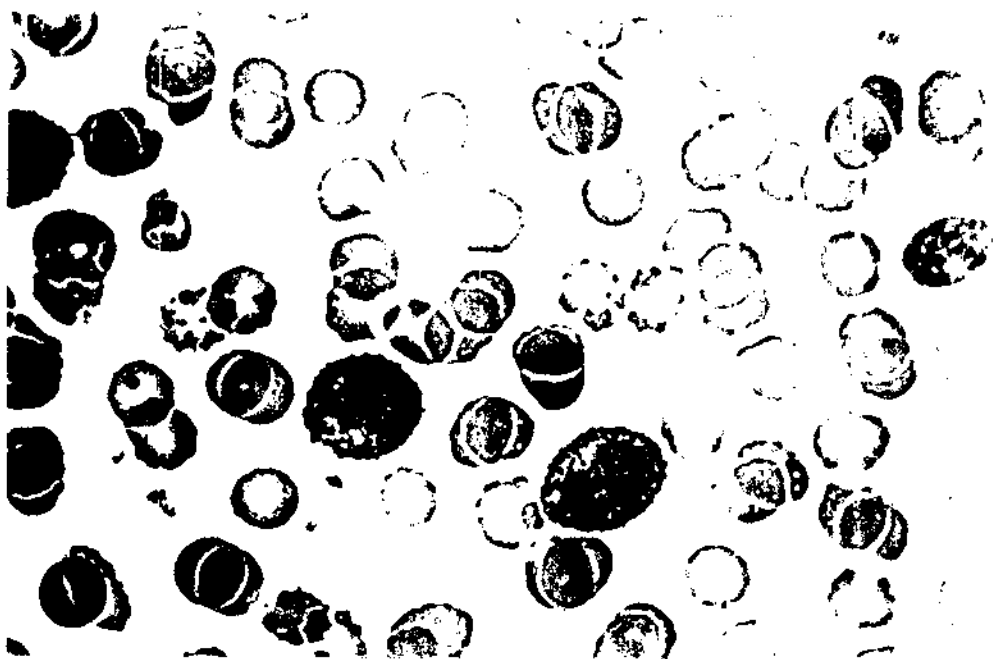


Figura 3
Extensión de sangre periférica en que se advierten tres linfocitos CD8 positivos y otro negativo. Técnica FAAFA $\times 1000$).

mieloproliferativo crónico o mielodisplástico. El estudio simultáneo con, a ser posible, dos anticuerpos monoclonales representativos de cada línea hematopoyética, permite la tipificación en la mayoría de los casos. Es además, el procedimiento idóneo para diagnosticar leucemias híbridas (bifenotípicas o bilineales), conocer expresiones antigénicas aberrantes —“crazy combinations” en expresión de Janossy— que confieren a las leucemias un especial mal pronóstico o poder precisar, mediante anticuerpos dirigidos contra determinados antígenos de diferenciación, el estadio evolutivo sobre el que incide el fenómeno maligno (5).

2. Inmunofenotipaje de células linfoides.

El inmunofenotipaje de las células linfomatosas asociado al estudio morfológico convencional afronta el reto taxonómico de los linfomas no hodgkinianos. Permite la separación entre linfoproliferaciones de naturaleza B y T y la observación de la posible expresión monoclonal de las cadenas ligeras (6) (Fig. 3). También se puede precisar de qué punto de la evolución ontogénica arranca el proceso neoplásico y valorar, por procedimientos más sensibles que el índice mitótico, la actividad proliferativa de la población patológica. El empleo del anticuerpo Ki-67 dirigido contra un antígeno nuclear resulta especialmente útil en dicha evaluación (7).

Como consecuencia de todos estos logros, se han revalorizado enormemente las posibilidades diagnósticas de la Citología obtenida por punción ganglionar aspirativa (8). La biopsia es insustituible en cuanto al diagnóstico inicial, pero no sería necesariamente requerida si el conocimiento de la textura nodular o difusa no fuese información prioritaria.

En el paciente ya diagnosticada la punción, ayudada por la ICE, facilita el estadiaje, confirma recurrencias o detecta la evolución a alguna variedad más agresiva. Así, en opinión de Liliemark, el 91% de los linfomas no hodgkinianos pueden ser diagnosticados por citología

aspirativa conjugada con la ICE (9).

3. Diferenciación entre linfomas de alto grado de malignidad y tumores anaplásicos con tropismos para metastatizar los órganos hematopoyéticos.

La ICE se utiliza para determinar el origen de tumores pobremente diferenciados, mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra los diversos filamentos intermedios del citoesqueleto (10). La diferenciación entre linfomas polimorfos y carcinomas anaplásicos es una problemática muchas veces insoslayable con la morfología, e incluso con la histología convencional. Resulta adecuado trabajar con un lote de anticuerpos dirigidos contra citoqueratinas de diverso peso molecular, contra el antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de membrana de la célula grasa de la leche (EMA), proteína S-100, vimentina, desmina, proteína fibrilar glial, neurofilamentos y el anticuerpo monoclonal CD45 o leucocitario común. En la experiencia de Hales y cols. (10), nada menos que el 56% de los tumores anaplásicos se clasificaron incorrectamente en base a meros criterios morfológicos, rescatando del grupo de los “carcinomas” casos correspondientes a linfomas de alto grado de malignidad y a melanomas con el consiguiente cambio en la actitud terapéutica. A título de ejemplo, citemos un paciente afecto de rhabdomyosarcoma cuyas células blásticas indujeron al diagnóstico de linfoma anaplásico Ki-1 positivo que, al sufrir un avance con afectación de la médula ósea y moderado paso hemoperiférico, ofreció un cuadro clínicocitológico compatible con una leucosis aguda (11) (Fig. 4).

4. Diferenciación entre leucosis aguda y tumores de células pequeñas y redondas de la infancia.

Ante todas blastosis medular infantil de aspecto indiferenciado, que se acompañe en sangre periférica de un síndrome leucoeritroblástico en ausencia de blastosis valorable, es obligado estudiar la inmunoreactividad de las células blás-

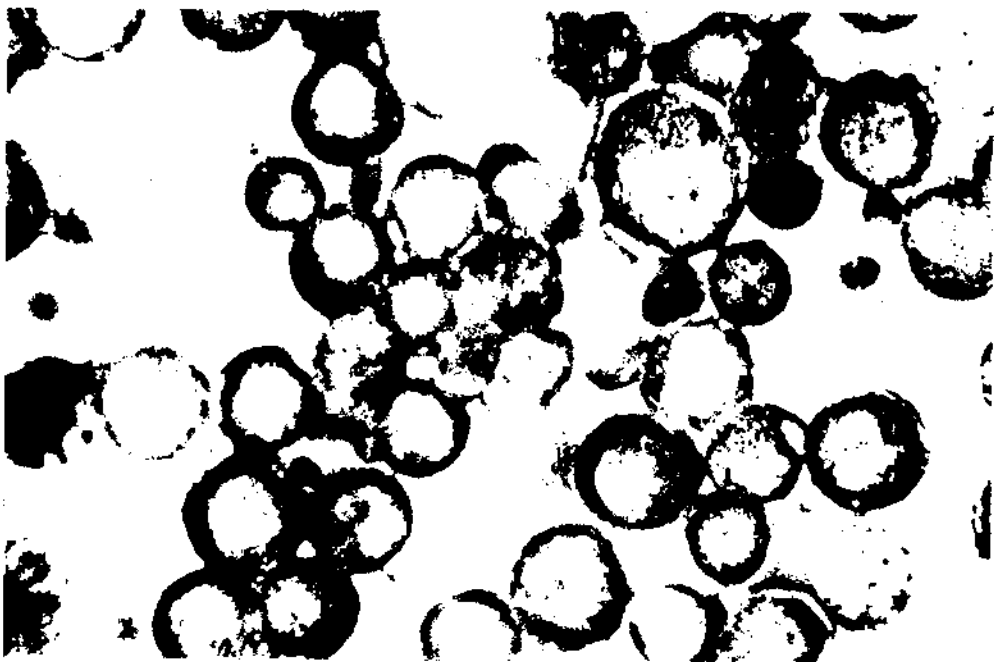


Figura 4
Células anti-desmina positivas en un caso de rhabdomyosarcoma. (Técnica FAAFA $\times 1000$).

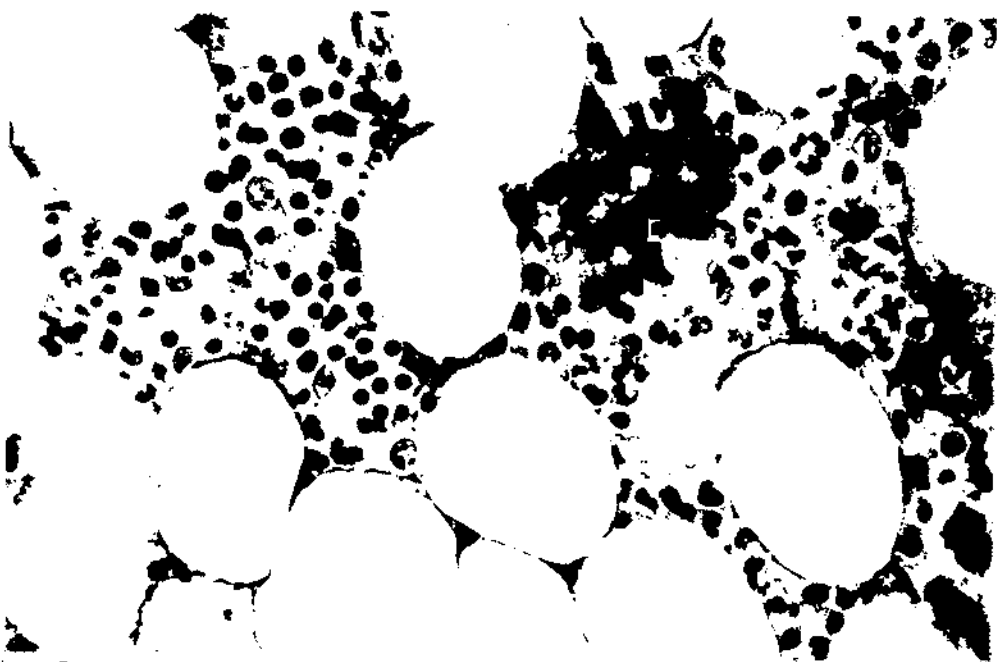


Figura 5
Células mielomasas kappa positivas en un corte histológico medular. (Técnica de la inmunoperoxidasa $\times 250$).

ticas frente al anticuerpo dirigido contra el antígeno leucocitario común (CD45). En caso de negatividad, se debe proceder inmediatamente al estudio de los filamentos intermedios, empezando con los dirigidos contra los neurofilamentos, a fin de descubrir un posible neuroblastoma. En los adultos, las metástasis medulares masivas de determinado tipo de neoplasia pulmonar pueden igualmente simular una infiltración leucémica (12).

5. Ayuda a la ICE en el estudio de las discrasias plasmocelulares.

La monoclonalidad de una gamapatía no sólo puede demostrarse bioquímicamente, sino también mediante ICE. (Fig. 5) En base a las modernas consideraciones biológicas del plasmocitoma, diversos investigadores se han esforzado en la identificación de células linfoides precursoras de la celularidad plasmática, no sólo en la medula ósea sino también en la sangre circulante. La expresión de determinados antígenos en la célula plasmática, como el de la leucemia aguda

linfoblástica común (CALLA o CD10), que suele tener correspondencia morfológica con el tipo plasmoblástico, comporta un pronóstico peyorativo (13). Asimismo, auguran un curso muy desfavorable expresiones aberrantes de antígenos mielomonocíticos o de antígenos T. Una elevada reactividad con el anticuerpo Ki-67 detecta todas las células en fase de síntesis y guarda muy buena correlación con el índice de marcaje con timidina triada. La simplicidad técnica de esta reacción ICE y su inocuidad al no usar radioisótopos resulta evidente. Porcentajes elevados de células plasmáticas Ki-67 positivas se observan en plasmocitomas especialmente agresivos (14) (Fig. 6).

6. Identificación de precursores megacariocíticos muy inmaduros (promegacariocitos).

Es a partir del empleo de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las glicoproteínas de superficie de la serie megacariocítica plaquetar (glicoproteína



Figura 6
Célula plasmática Ki-67 positiva en un mieloma. (Técnica FFAFA \times 500).

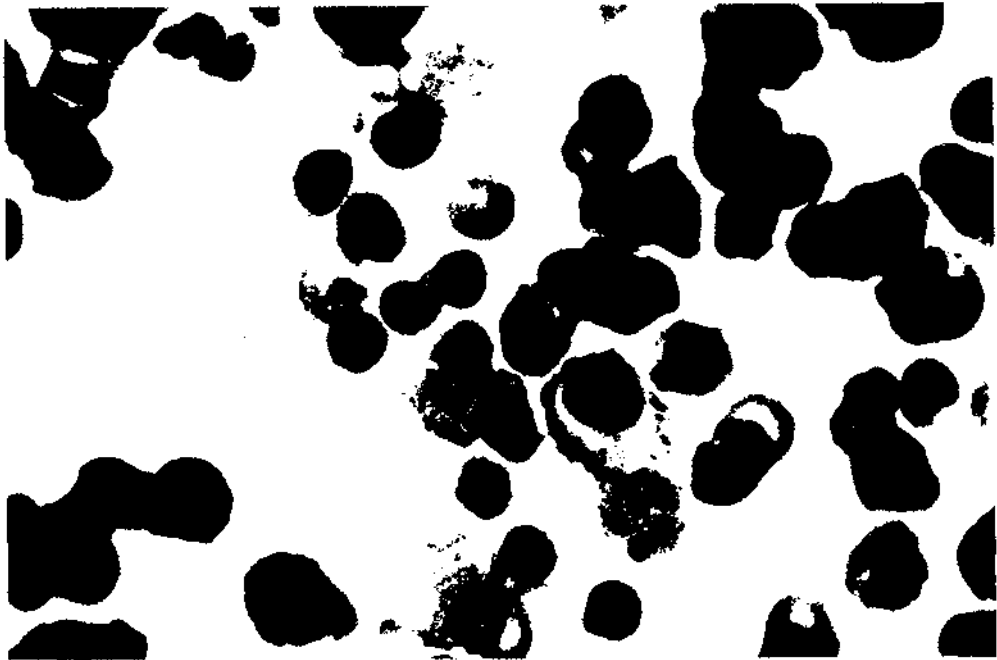


Figura 7
 Microformas megacariocíticas de apariencia linfoide en un frotis medular de un síndrome mielodisplástico. (Técnica FAAFA $\times 500$).

IIIa, IIb-IIIa y Ib), en que ha sido posible identificar con seguridad a nivel óptico precursores megacariocíticos sin tener que ser tributario de la citoquímica ultraestructural. Consecuentemente, se ha podido individualizar entre el grupo de las leucemias mieloides la forma a megacarioblastos, que en la clasificación FAB ha recibido la designación de M7. Asimismo, en diversos síndromes mielodisplásticos y mieloproliferativos crónicos se observan agudizaciones promegacarioblásticas o micromegacariocitos circulares, que al menos experto pueden inducir a confusión con elementos de hábito linfoide (Fig. 7). Con la técnica de la FAAFA, se facilita asimismo la visualización de microformas del sistema megacariocítico que pasan fácilmente inadvertidas entre una abundante celularidad medular (15). La existencia de una doble población plaquetar, una CD41 o

CD61 positiva y la otra negativa, se constituye en un importante signo dismórfico propio de situaciones mielodisplásticas (16).

7. Detección de micrometástasis neoplásicas en órganos hematopoyéticos.

Cuando las células metastásicas epiteliales se constituyen en extensas placas en medio de una celularidad hematopoyética global escasa, su reconocimiento resulta fácil, pero pueden pasar inadvertidas cuando se trata de metástasis de células aisladas que se entremezclan con una abundante celularidad hematopoyética.

Con la aplicación de los anticuerpos antifilamentos intermedios y debido a que la célula tumoral continúa expresando el mismo filamento intermedio que la célula de origen, se dispone de un buen método para localizar las células patoló-

gicas y para establecer su filogenia (17). Cuando exista la sospecha de metastatización medular, sobretodo en neoplasias con gran tropismo para metastatizar en la médula ósea, como por ejemplo en los carcinomas de mama o próstata y no se confirma por los criterios citológicos o histológicos convencionales, se debe apelar a la ICE con anticuerpos antifilamentos intermedios, ya que se cifra que su frecuencia de detección en la médula ósea aumenta en casi un 30% (18).

Sin embargo, con la ICE pueden darse reacciones cruzadas y así existen plas-

mocitos que presentan inmunoreactividad frente a diversas citoqueratinas y siendo frecuente la plasmocitosis reactivas en procesos neoplásicos, se comprende que la interpretación de células aisladas citoqueratina positivas deba ser cautelosa.

Sirva este ejemplo de botón de muestra de que toda metodología, y la ICE no escapa a la regla, tiene sus limitaciones pero ello no resta interés si la valoración se hace en un contexto de equilibrio valorativo y de conocimiento clínico-citológico.

BIBLIOGRAFIA

1. Woessner S, Lafuente R, Florensa L, Marill MR, Almarcha J, Vila RM. Métodos inmunocitoenzimáticos: fundamentos, técnicas y aplicaciones en el diagnóstico hematológico. *Sangre* 1987; 32: 53-66.
2. Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme-labelled antibodies. Preparation and application for the localization of antigen. *J Histochem Cytochem* 1966; 14: 929-31.
3. Scopsi L, Larsson LI. Increased sensitivity in immunocytochemistry. Effects of double application of antibodies and of silver intensification on immunogold and peroxidase-antiperoxidase staining techniques. *Histochemistry* 1985; 82: 321-9.
4. Faulk WR, Taylor GM. An immunocolloidal method for the electron microscope. *Immunochemistry* 1971; 8: 1081-3.
5. Erber WN, Mynheer LC, Mason DY. APAAP labellings of blood and bone marrow samples for phenotyping leukaemia. *Lancet* 1986; 1: 761-5.
6. Pangalis GA, Nathwani BN, Rappaport H. An immunocytochemical study of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 1981; 48: 915-22.
7. Falini B, Canino S, Sacchi S, et al. Immunocytochemical evaluation of the percentage of proliferating cells in pathological bone marrow and peripheral blood samples with the Ki-67 and antibromo-deoxyuridine antibodies. *Br J Haematol* 1988; 69: 311-20.
8. Woessner S, Lafuente F, Florensa L. Punción ganglionar: pasado, presente y futuro. *Med Clin (Barc)* 1988; 90: 422-5.
9. Liliemark J, Tani E, Christensson B, Svedmyr E, Skoog L. Fine-needle aspiration cytology and immunocytochemistry of abdominal non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia and Lymphoma* 1989; 1: 65-9.
10. Hales SA, Gatter KC, Heryet A, Mason DY. The value of immunocytochemistry in differentiating high-grade lymphoma from other anaplastic tumours. *Leukemia and Lymphoma* 1989; 1: 59-63.
11. Woessner S, Sans Sabrafen J, Buxó J, et al. Pseudohepatoma por rabdomiosarcoma. *Med Clin (Barc)* 1989; 92: 738-41.
12. Altmannberger M, Osborn M, Droese M, Weber K, Schauer A. Diagnostic value of intermediate filament antibodies in clinical cytology. *Klin Wochenschr* 1984; 62: 114-23.
13. Durie BGM, Grogan TM. CALLA-positive myeloma: an aggressive subtype with poor survival. *Blood* 1985; 66: 229-32.

14. Lokhorst H, Boom SE, Terpstra W, Roholl P, Gerdes J, Bast BJE. Determination of the growth fraction in monoclonal gammopathy with the monoclonal antibody Ki-67. *Br J Haematol* 1988; 69: 477-81.
15. Sato T, Shichishima T, Kimura H, et al. Immunocytochemical detection of normal and abnormal megakaryocytes using monoclonal antibody to glycoprotein IIb/IIIa (TP80). The quantitative assay in normal and leukaemic patients. *Scand J Haematol* 1986; 36: 415-23.
16. Woessner S, Lafuente F, Florensa L. Platelet peroxidase of circulating thrombocytes in acquired refractory anaemias. *Scand J Haematol* 1986; 36: 194-7.
17. Gown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins III. Analysis of tumours. *Am J Clin Pathol* 1985; 84: 413-23.
18. Chosh AK, Erber WN, Hatton CSR, et al. Detection of metastatic tumour cells in routine bone marrow smears by immunoalkaline phosphatase labelling with monoclonal antibodies. *Br. J. Haematol* 1985; 61: 21-30.