

PARTICULARITĂȚILE DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR ÎN HAIRY CELL LEUKEMIA

Particularities of laboratory diagnosis in Hairy Cell Leukemia

Cercetător științific, medic primar medicină de laborator Violeta Carmen Moraru
Centrul de Hematologie și Transplant Medular, Institutul Clinic Fundeni, București

REZUMAT

Leucemia cu „celule păroase” – Hairy Cell Leukemia (HCL) – este o formă rară de limfoproliferare cronică a adultului, caracterizată prin splenomegalie, pancitopenie frecventă și prezența de celule mononucleare anormale în sânge, măduva osoasă și splină.

Termenul de Hairy Cell Leukemia a fost adoptat pentru a scoate în evidență prelungirile fine ale celulelor mononucleare anormale.

Celulele Hairy exprimă o mare varietate de molecule de adeziune și receptori de ghidare în traficul lor regulat în interiorul sistemului reticuloendotelial. Studii imunologice complexe arată că celulele Hairy au un fenotip complex, exprimând simultan, dar în proporții diferite, markeri specifici mai multor linii celulare.

Cuvinte cheie: celule Hairy, examen citomorfologic, imunohistochimie, imunofenotipare

ABSTRACT

Hairy Cell Leukemia is a rare form chronic lymphoproliferative of the adult, characterized by splenomegaly, frequent pancytopenia and presence of abnormal mononuclear cells in blood, marrow and spleen.

The term was adopted to point out fine cytoplasmic projections of mononuclear cells, Hairy Cells show a great variety of adhesion molecules and receptors conduct in their regular traffic inside reticuloendothelial system. Immunological complex studies show that Hairy Cells have a complex phenotype, they are expressing simultaneous, but in different proportions, specific markers for more cellular lines.

Key words: Hairy cells, cytomorphological exam, immunohistochemistry, immunphenotyping

Hairy Cell Leukemia (leucemia cu celule „păroase”) este o formă rară de limfoproliferare cronică a adultului, caracterizată prin splenomegalie, pancitopenie frecventă și prezența de celule mononucleare anormale în sânge, măduvă osoasă și splină. (1)

Ea reprezintă 2% din totalul leucemiilor și 1% din totalul limfoamelor maligne. Boala survine la grupuri etnice diferite, are o distribuție geografică extinsă, fiind semnalată pe toate continentele, dar inegal; HCL este foarte rară în Japonia.

Predomina net la sexul masculin, raportul bărbați/femei = 3-5/1. Vârsta medie generală în momentul diagnosticului este de 52 de ani, aproximativ jumătate dintre cazuri apar între 40 și 60 de ani, nu au fost semnalate cazuri de HCL la copii și adolescenți.

Celula de origine: în prezent este unanim acceptat că celulele Hairy sunt limfocite B neoplazice, care au rearanjări clonale ale genelor pentru imunoglobuline și exprimă pe suprafață antigene de diferențiere pan B: CD19, CD 20, CD 22, imunoglobuline de suprafață – adesea cu multiple izotipuri ale lanțurilor grele, predominând izotipurile α . (3)

Totdeauna lipsesc: determinantul Ki 67 nuclear și determinanții membranari: CD5, CD2, CD23.

Celulele imunoglobuline G pozitive exprimă preferențial IG3. Exprimarea frecventă a Ig3 și IgA, a determinanților HLA-DR și FMC7, absența Ag. CD21 și exprimarea markerului plasmocitar precoce: PCA – 1 demonstrează că celula Hairy este o celulă aflată într-un stadiu tardiv în diferențierea

Adresa de corespondență:

Dr. Violeta Carmen Moraru, Centrul de Hematologie și Transplant Medular, Institutul Clinic Fundeni, București
 e-mail: violeta.moraru@gmail.com

celulelor B, un stadiu de preplasmocit. Mutația somatică a genelor pentru regiunea variabilă a imunoglobulinelor în Hairy Cell Leukemia sugerează că celulele neoplazice se găsesc într-un stadiu post-folicular al diferențierii, posibil la nivelul unei celule B cu memorie. Celulele Hairy exprimă și alte antigene de suprafață, care nu se găsesc de obicei pe limfocitele B, acestea fiind:

1. CD11c – care este exprimat de obicei pe monocite și neutrofile, el fiind de obicei prezent pe celulele leucemice ale tuturor pacienților cu HCL și rareori pe celulele leucemice din alte boli limfoproliferative.

2. CD25: cu mare afinitate pt. IL – 2, exprimat de altfel de celulele T activate.

3. CD103: cunoscut ca antigen limfocitar mucos uman, deoarece este exprimat în primul rând de limfocitele T intraepiteliade.

De obicei, fiecare din aceste antigene este exprimat de mai puțin de 3% din limfocitele B sanguine normale. Limfocitul B CD103 pozitiv poate fi echivalentul „normal” al celulelor Hairy leucemice.(3)

Studiile imunologice arată că celulele Hairy au un fenotip complex, exprimând simultan, dar în proporții diferite, markerii specifici mai multor linii celulare.

Labilitatea fenotipică, particularitatea imunologică de bază a celulelor Hairy, poate fi legată de o mobilitate extremă a structurii de membrană, printr-un fenomen de „capping” (rearanjarea antigenelor pe suprafața celulei) foarte rapid, care se petrece spontan sau provocat în cursul evoluției.

O altă explicație a diversității fenotipice ar fi aceea că procesul de malignizare se petrece în compartimentul celulelor stem într-un stadiu precoce al diferențierii celulelor limfoide pluripotente, inducând emergența unei linii neoplazice hibride, cu punct de plecare splenic. (2)

ROLUL CITOKINELOR ÎN PATOGENEZA HCL

A fost de mare interes rolul citokinelor în patogeniza HCL. (7)

IL-2 (Interleukina 2): o trăsătură a HCL subtipului clasic este reactivitatea CH (celule Hairy) cu antiTAC (CD25), care detectează lanțurile α ale receptorului IL2. Prin imunofluorescență, aceste celule pot să exprime și lanțurile β ale receptorului IL2, deși acestea nu au fost confirmate utilizând alte tehnici.

În contrast, celulele Hairy din HCL subtipul Variantă exprimă lanțurile β (dar nu exprimă lanțurile α).

Creșterea nivelului seric de receptori IL2 a fost găsit la pacienții de HCL netratați (fiind evident că celulele leucemice eliberează receptorul IL-2).

Nivelul seric de receptori IL2 este corelat cu extensia bolii când se constată creșterea acestuia. După terapia efectivă cu IFN α se constată descreșterea nivelului seric de receptori IL-2.

TNF α (Factorul de Necroză Tumorală α): (4) s-a demonstrat că stimulează creșterea celulelor Hairy; CH pot, de asemenea, produce TNF α și nivelul seric al acestuia este în creștere în leucemia cu celule Hairy, nivel corelat cu masa celulelor tumorale.

Receptorul TNF α poate fi detectat în serul acestor pacienți, iar nivelul acestuia descrește după tratamentul cu IFN (Interferon α).

Aceste date sugerează că producția de TNF α de către CH poate juca un rol important în patogeniza acestei boli: stimulează creșterea CH și produce pancitopenia prin inhibiția funcției normale a măduvei.

IL6 (Interleukina 6): nivelul seric al acestor citokine este în creștere în HCL. Secreția de IL6 este marcat crescută de celulele Hairy incubate cu TNF. (8)

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN HCL

Sânge periferic: peste două treimi dintre pacienți prezintă pancitopenie moderată sau severă.

Anemia se găsește la 70-80% dintre cazuri, cel mai frecvent fiind moderată, normocitară și normocromă. Foarte rar poate avea caracter hemolitic.

Trombocitopenia ușoară sau moderată (mai mică de 100.000/ μ l) apare la 70-80% dintre pacienți. Pot exista și alterări funcționale plachetare, constând în deficit de agregare sau eliberare redusă de factor 3 trombocitar.

Majoritatea cazurilor de HCL au la debut leucopenie, puține cazuri au un număr normal sau ușor creșcut de leucocite, numai 10-15% dintre pacienți având mai mult de 100.000/ μ l. Excepțional, s-au raportat cazuri cu leucocitoză marcată, de peste 200.000/ μ l, deși astfel de cifre se întâlnesc de obicei la așa numita HCL „Varianta”.

***HCL – Varianta:** Este în prezent o entitate distinctă de boală intermediară, între HCL și leucemia prolimfocitară B. (5)

Particularități:

1. Morfologic: este diferită de HCL tipic, celulele au cromatina diferită, cu aspect de rețea/ plasă; nucleoli vizibili;
2. Leucocitoza: > 40.000/ μ l;
3. Imunofenotiparea (vezi diagnosticul diferențial prin imunofenotipare).

Neutropenia este trăsătura hematologică majoră prin frecvența și intensitatea sa, fiind severă (sub 1000/ μ l) la 60% dintre cazuri și foarte severă (sub 500/ μ l) la 25% dintre cazuri.

Monocitopenia este prezentă atât în sângele periferic, cât și în măduva osoasă. Frecvent apare o limfocitoză relativă și anomalii ale subpopulațiilor de limfocite B și T.

Examenul citomorfologic al frotiului de sânge periferic evidențiază celulele Hairy (acestea variind între 3 și 90%). La colorația panoptică apar ca celule mononucleare: cu formă: rotundă, ovalară, poligonală, cu diametrul de 10-20 μ m, mai mari decât limfocitele, cu margini dantelate sau estompate. Nucleul este mare: rotund/indentat/ovoid. Rareori poate apărea polilobat (putând fi confundat cu celulele din cursul unor limfoame T sau leucemii).

Cromatina nucleară este fină, cu aspect spongios, uniform dispersată, ca o sticlă mată; nucleolii sunt absenți sau slab evidențiați pe frotiurile obișnuite.

Postsplenectomie, apar celule Hairy (CH), cu nucleu ondulat, biconcav sau cu aspect de halteră.

Celulele Hairy (CH) sunt mai ușor de pus în evidență pe frotiurile efectuate din concentrat leucocitar. Când numărul și morfologia CH sunt necaracteristice pe frotiul de sânge, este absolut necesar examenul în contrast de fază pe preparate proaspete, efectuate din concentrat leucocitar.

La examenul în contrast de fază CH apar cu numeroase prelungiri citoplasmice fine, asemănătoare firelor de păr, care au sugerat, de fapt, denumirea dată celulelor.

Examenul citomorfologic al măduvei osoase, puncția aspiratorie: la 50% dintre pacienți măduva osoasă este inaspirabilă sau prezintă material hipocelular nesatisfăcător pentru diagnostic.

Când se extrage suc medular, celularitatea este frecvent redusă și rareori normală. Procentul de CH variază pe frotiuri între 5-90%. Cel mai bine păstrate sunt megakariocitele și eritroblastii, în schimb granulocitele sunt de obicei rare sau chiar absente. Deseori apar frecvente limfocite, plasmocite și mai rar, mastocite.

Izoenzima 5 a Fosfatazei Acide: caracteristica specifică citochimică a CH este reacția pozitivă pentru izoenzima 5 a Fosfatazei Acide rezistentă la denaturarea cu acid tartric (TRAP). Enzima lizozomală și ribozomală – deși nu este absolut patogenomică pentru CH, în 5% dintre cazuri fiind negativă, totuși TRAP are specificitate mare și este valoroasă pentru diagnosticul de HCL.

După terapia cu Interferon, pozitivitatea reacției pentru TRAP scade sau chiar se negativează.

Această reacție este indicată pentru confirmarea diagnosticului de HCL și diferențierea CH față de celulele din alte leucemii sau limfoame prin evidențierea unei activități puternice, difuze, rezistente la inhibiția cu TARTRAT. (7)

Fosfataza Alcalină Leucocitară (FAL): este o enzimă lizozomală prezentă exclusiv în neutrofilele mature. Este utilizată în identificarea formelor stabile de HCL unde activitatea FAL este normală, față de formele active de boală cu neutropenie severă, în care activitatea FAL este foarte crescută (valori normale între 10 și 100 unități Kaplow).

Examenul Histopatologic al măduvei osoase: biopsia de os este obligatorie pentru diagnosticul de HCL, deseori aspectul histopatologic al măduvei osoase, fiind primul sau singurul examen care permite stabilirea diagnosticului. Aspectul histopatologic al măduvei osoase reprezintă diagnosticul de certitudine. (8)

Leziunile medulare din HCL prezintă două caracteristici:

- a) Infiltrație medulară cu celule Hairy;
- b) Mielofibroză;

a) Infiltrația medulară: se datorează proliferării CH, dar natura „hairy“ (prelungirile citoplasmice) nu apare pe secțiunile histologice.

Această infiltrație este recunoscută după aspectul rarefiat, monoton, de „fagure de miere“, constituit din celule de talie medie, uniforme, cu nuclei ovalari, bine conturați, distanțați unii de alții, înconjurați de un halou clar, perinuclear, la examenul cu obiectiv mic.

Mai rar, nucleii pot fi rotunzi sau ușor incizați, neregulați ori cu aspect fuziform.

La data diagnosticului, măduva este cel mai frecvent hiper celulară, cu infiltrație completă, cu aspect monomorf, cu vacuole de grăsime reduse sau absente. La o treime dintre cazuri, infiltrația cu CH e mai redusă, parțial păstrându-se zone cu hematopoieză normală, constituită predominant din insule eritroide (ce conțin precursori imaturi) și megakariocite. Granulocitele sunt reduse sau absente.

Extrem de puțini pacienți au măduvă osoasă hipocelulară, foarte grasă, cu CH izolate dispuse printre celulele adipoase, sau o măduvă care mimează aspectul de anemie aplastică, cu care se poate confunda.

b) Mielofibroza, al doilea caracter lezional medular, este constantă și apare evidentă în zonele de proliferare a CH. Mielofibroza constă în densificarea marcată a fibrelor de reticulină stromale, fibroza colagenă clară fiind de obicei absentă.

Examenul imunohistochimic: colorațiile imunohistochimice ale secțiunilor de măduvă osoasă sunt utile atât pentru diagnostic, cât și pentru urmărirea postterapeutică. Majoritatea anticorpilor folosiți pentru detectarea markerilor asociați HCL (de exemplu: anticorpii anti CD103 ca și B-ly) necesită prelucrarea măduvei prin congelare, deoarece antigenele, pe care ei le recunosc, sunt distruse prin fixarea și prelucrarea standard. În schimb, anticorpii anti CD20 poate fi folosit pe secțiunile prelucrate obișnuit (prin includere în parafină) pentru evidențierea celulelor B, care apoi pot fi evaluate pentru morfologia caracteristică CH. (6)

De asemenea, anticorpii monoclonali numiți DBA.44 poate fi folosit pe preparate de măduvă obișnuite, pentru CH reziduale. De aceea, imunohistochimia este mult mai sensibilă comparativ cu morfologia convențională în depistarea celulelor neoplazice reziduale din măduvă, după tratament. (5,6)

Imunofenotiparea: utilizarea anticorpilor monoclonali a adus progrese remarcabile în definirea originii și naturii CH. Nu există un singur anticorp care să poată identifica un antigen unic pentru CH. Există însă modele cu o anumită expresie a markerilor de suprafață, care pot fi utilizate pentru a deosebi CH leucemice de cele ale altor boli limfoproliferative de tip B. (9)

Configurația antigenică cea mai caracteristică a CH cuprinde antigene de suprafață: CD11c, CD22, CD25, CD103, HLA-DR, care au fost găsite pe celule leucemice B ale tuturor pacienților cu HCL.

TABELUL 1. Diagnosticul diferențial fenotipic în HCL

	HCL	HCL - V	B - PLL	SLVL	LLC TIPIC
Slg	+++	++	+++	+++	+
Ag. celule - B					
CD19	++	++	++		+
CD20	++	++	++	++	+
CD22	++	++	++	++	+
CD79a	++	?	++	++	++
CD79b	-	-/+	++	++	-
CD5	-	-	+/-	-	++
CD10	-/+	-	?	-	-
CD23	-	-	-	-/+	++
CD11c	+++	++	+/-	++	+
CD25	+++	-	-	+/-	-
CD103	+++	-/+	-	-	-
FMC7	++	++	++	++	-/+
HC2	+++	-/+	-	+/-	-
TRAP	++	-/+	-	+/-	-

Legenda:

HCL: Hairy Cell Leukemia

HCL-V: Hairy Cell Leukemia - Varianta

B-PLL: Leucemia Prolimfocitară - B

SLVL: Limfomul Splenic cu Limfocite vilozose

LLC: Leucemia Limfatică Cronică

TRAP: Fosfataza Acidă Rezistentă la Denaturarea cu Acid Tartric

Dacă și alte leucemii și limfoame B pot exprima CD11c și CD25, totuși, CH se caracterizează prin intensitatea și uniformitatea absolută, cu care ele își exprimă aceste antigene.

Expresia antigenului CD103 este foarte rar întâlnită și în alte boli limfoproliferative B. Citometria în flux multiparametric este capabilă să detecteze CH când acestea reprezintă sub 1% dintre limfocitele prezente în sânge sau măduva osoasă.

Diagnosticul molecular: utilizat în monitorizarea tratamentului și diagnosticul bolii minime reziduale. (10,11)

Boala minimă reziduală poate fi cuantificată în prezent prin tehnica RQ-PCR (Reacția în Lanț cu Polimeraza – Relativ cantitativ), aceasta fiind mult mai sensibilă comparativ cu flow-citometria și imunohistochimia, în detectarea bolii minime reziduale.

PCR reprezintă o tehnologie de mare putere pentru amplificarea selectivă a unor secvențe specifice ARN sau ADN. Tehnica este ingenioasă și simplă conceptual.

Analiza moleculară a confirmat originea celulelor leucemice, stabilită anterior prin studiile imunofenotipice. Ambele gene Ig. (H și L) sunt rearanjate practic în toate cazurile de HCL.

MUTAȚIA BRAF V600E

BRAF este cea mai frecventă genă mutantă ce codifică o proteinkinază în cancerul uman, aceasta fiind o componentă a familiei de serin – threonin kinase RAF.

În structura proteinei BRAF în poziția 600 a fost identificată substituția aminoacidului acid glutamic cu valina. Frecvența acestei mutații BRAF-V600E la pacienții cu HCL este de 100% fiind mult mai înaltă comparativ cu alte neoplasme: cancerul tiroidian 40%, histiocitoza cu celule Langerhans 55%.

Analiza mutației BRAF ca un nou instrument de diagnostic are potențialul să distingă HCL de alte limfoproliferări cronice sau limfoame cu celule B, cu trăsături clinice asemănătoare, ca de exemplu: HCL-Varianta, Limfomul de zona marginală splenic.

Detectarea mutației BRAF-V600E în probele conținând proporții scăzute de celule Hairy necesită tehnici moleculare cu sensibilitate înaltă și reproductibilitate.

BIBLIOGRAFIE

1. **Bouroncle B.A.** – Hairy cell leukemia, *Lymphoma (Switzerland)*, 1994, 14, supl.1,1
2. **Cannon T., Mobarek D., Wegge J., Tabbara I.A.** – Hairy cell leukemia, current concepts, *Cancer Invest.* 2008; 26:860-865
3. **Venkataraman G., Aguhar C., Kreitman R.J., Yuan C.M., Stetler-Stevenson M.** – Characteristic CD103 and CD123 expression pattern defines hairy cell leukemia: usefulness of CD123 and CD103 in the diagnosis of mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* Oct 2011; 136(4):625-30
4. **Tretin I., Pizzolo G., Zambello R., et al.** – Leukemic cells in hairy cell leukemia and B cell chronic lymphocytic leukemia release soluble TNF receptors. *Leukemia* 1995, 9:1051-1055
5. **Matutes E., Wotherspoon A., Brito-Papule V., Cathovsky D.** – The natural history and clinicopathological features of the variant form of Hairy cell leukaemia, *Leukemia*, 2001, 15:184-186
6. **Sherman M.J., Hanson C.A., Hoyer J.D.** – An assessment of the usefulness of immunohistochemical stains in the diagnosis of hairy cell leukemia. *Am J Clin Pathol.* Sep 2011; 136(3):390-9
7. **Poliak A.** – Hary cell leukemia, biology, clinical diagnosis, unusual manifestations and associated disorders, *Rev. Clin. Hemathol.*, 2002 June; 6:366-88
8. **Bethel K.J., Sharpe R.W.** – Pathology of hairy cell leukemia. *Best Pract Res. Clin Haematol* 2003; 16:15-31
9. **Marylalice Stetler-Stevenson, Prashant R. Tembhare** – Diagnosis of HCL by Flow Cytometry, *NIH, NCI, 9000 Rockville*, June 2011, vol. 52, no. 82, pages 11-13
10. **Michael Grewer** – How I treat Hairy cell leukemia, *Blood*, January 2010, Vol. 115, No.1
11. **Enrico Tiacci M.D., Vladimir Trifonov Ph.D, Gianluca, Schavoni, Ph.D, et al.** – Molecular diagnosis, *The NEW England Journal of Medicine*, 2011 June, 16, 364:2305-2315