

# PARTICULARITĂȚILE DIAGNOSTICULUI ȘI ALE TRATAMENTULUI ÎN HAIRY CELL LEUKEMIA

## *Diagnosis and treatment particularities in Hairy Cell Leukemia*

**Dr. Violeta Moraru, Dr. Iulia Ursuleac, Dr. Camelia Dobra, Dr. Didona Vasilache**  
*Centrul de Hematologie și Transplant Medular, Institutul Clinic Fundeni, București*

### REZUMAT

Hairy Cell Leukemia (HCL) este o formă rară de limfoproliferare cronică a adultului, caracterizată de prezența celulelor Hairy (C.H.) tipice în sângele periferic și măduva osoasă, pancitopenie și un grad variabil de splenomegalie. Terapia standard este reprezentată de analogii de nucleozide dCF (2'-deoxycoformicyn) și CdA (2-chlorodeoxyadenosine), care produc remisiuni complete și durabile la majoritatea pacienților. Splenectomia poate fi încă folosită în HCL în anumite circumstanțe. Diagnosticul molecular-PCR (Polimerase Chain Reaction) este un test mult mai sensibil comparativ cu flowcytometria în detectarea bolii minime reziduale în HCL.

**Cuvinte cheie:** Celule Hairy (C.H.), analogi de nucleozide, Remisiune Completă (R.C.)

### ABSTRACT

Hairy Cell Leukemia is a chronic B cell disorder, it is characterized by the presence of typical Hairy cells in the peripheral blood and marrow, pancitopenia and a variable degree of splenomegaly. The standard therapy consists of the nucleosides analogs dCF (2'-deoxycoformicyn) and CdA (2-chlorodeoxy-adenosine), which produce complete and durable remissions in the majority of patients. Splenectomy may still be used for HCL in the under specific circumstances. Molecular diagnosis-PCR (Polimerase Chain Reaction) is more sensitive than Flowcytometry in detecting the Minimal residual disease.

**Key words:** Hairy Cells, Nucleoside Analogs, Complete Remission

### INTRODUCERE

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.

Caracteristica acestor celule constă în prezența de numeroase prelungiri citoplasmice fine pe suprafața lor, celule Hairy.

Celulele Hairy sunt limfocite B neoplazice, ce prezintă rearanjări clonale ale genelor pentru imunoglobuline și exprimă pe suprafața lor antigene de diferențiere pan B:CD19, CD20, CD22, ca și imunoglobulina monoclonală de suprafață, adesea cu multiple izotipuri ale lanțurilor grele, predominând

izotipurile  $\alpha$ .; lipsesc însă determinanții membrana-ri: CD5, CD21 și determinantul k1-67 nuclear. (1)

C.H. exprimă și alte antigene de suprafață, care nu se găsesc de obicei pe limfocitele B, acestea fiind: CD11c, CD25, CD103.

Majoritatea manifestărilor clinice ale HCL sunt datorate infiltrației cu CH a măduvei osoase (ce reduce) hematopoieza normală, provocând citopeniile și a pulpei splenice, care produce hipersplenism. (2)

Insuficiența medulară este accentuată, pe lângă dislocarea produsă de proliferarea C.H., de faptul că aceste celule elaborează citokine, care alterează hematopoieza. (3) Astfel, la pacienții cu HCL celulele medulare produc cifre reduse de unități formatoare de colonii eritroide (CFU-E), iar în aceste

Adresa de corespondență:

Dr. Violeta Moraru, Centrul de Hematologie și Transplant Medular, Institutul Clinic Fundeni, Șos. Fundeni Nr. 258, București

culturi de celule se găsesc niveluri mari ale factorului de necroză tumorală- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), produs probabil de C.H. leucemice in vitro. Anticorpii anti-TNF- $\alpha$  care cresc numărul de CFU-E din celulele medulare provenite de la acești pacienți confirmă pe deplin aceste fapte.

Din studiile de eritrocinetică efectuate rezultă că rolul major în producerea anemiei îl au în egală măsură insuficiența medulară și sechestrarea splenică, la care se adaugă și un grad variabil de hemodiluție, existent în HCL. Datorită pseudosinusurilor, staza splenică este mult mai mare în HCL decât în alte hemopatii cu același grad de splenomegalie.

De-a lungul timpului, în tratamentul HCL au existat mai multe atitudini terapeutice, în ordine cronologică:

1. **SPLENECTOMIA** a fost prima și singura metodă de tratament folosită timp îndelungat.

Beneficiul a fost evident la pacienții cu:

- splenomegalie tumorală;
- citopenii datorate mai ales hipersplenismului.

2. Următoarea metodă terapeutică care a revoluționat tratamentul în HCL a fost **INTERFERON $\alpha$**  (*IFN $\alpha$* ). Acesta a constituit agentul biologic capabil să inducă remisiune îndelungată și de bună calitate chiar fără necesitatea splenectomiei.

3. Cele mai eficiente, tratamentele cu **ANALOGI PURINICI** (Cladribina și Pentostatin) pot induce o remisiune completă (R.C.) cu o durată medie mai mare de cinci ani: (4)

– 2' Clorodeoxiadenozina – 2CDA (*Cladribina*): este un analog purinic rezistent la adenzin deaminază. Ea se acumulează sub formă de clorodeoxiadenozin trifosfat în celulele care exprimă deoxicitidin kinaza. Această enzimă fosforilează cladribina, generând metaboliții, care scad NAD și ATP intracelulare, împiedicând sinteza de ARN și stânjenesc repararea rupturilor, care apar spontan în ADN, ducând în cele din urmă la moartea celulei.

– 2' Deoxicoformicina (*Pentostatin*): este un analog purinic sintetizat de streptomyces antibiotic, înrudit structural cu adenzina. El inhibă adenzin deaminaza, enzima de conversie a adenzinei și a deoxiadenozinei în inozină și respectiv deoxiinozină, cu rol în metabolismul purinic limfocitar.

În ciuda ratei de remisiune completă și a durabilității răspunsului la noii agenți terapeutici, HCL nu este încă o boală curabilă.

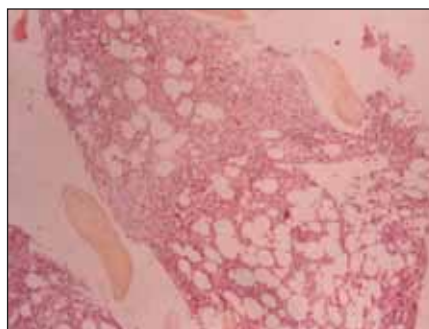
Detectarea bolii minime reziduale impune un test cu sensibilitate mai înaltă comparativ cu flowcitolmetria și imunohistochimia folosite anterior. Un asemenea test este RQ-PCR (Relative Quantitative Polymerase Chain Reaction), care prezintă sensibilitate înaltă și reproductibilitate, astfel încât

ar putea fi folosit în determinarea răspunsului maximal obținut cu cicluri multiple de agenți biologici terapeutici nonmielotoxici pentru această boală. (5,6)

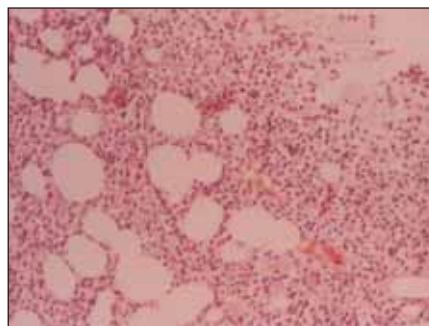
**HCL-VARIANTA:** este o formă intermediară între HCL forma tipică și LLP-B (Leucemia prolimfocitară B).

Morfologic, C.H. au un aspect diferit de C.H. prezente în HCL-Clasic: diferă aspectul cromatinei care este mai condensată și prezintă nucleoli mai evidenți, iar raportul nucleu/citoplasmă este mai mare în HCL-Variantă.

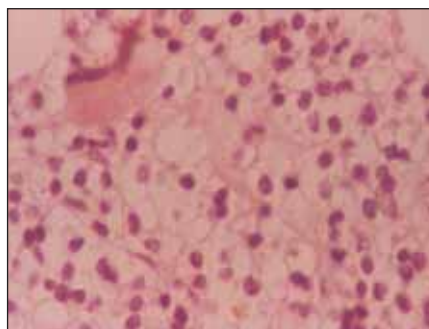
Hemograma evidențiază o leucocitoză cu cifre mari (cu o valoare medie de ~100.000/ $\mu$ l.).



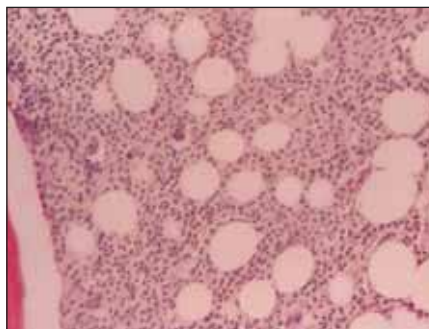
**FIGURA 1.**  
HCL-PBO-1-HE,  
ob 40x



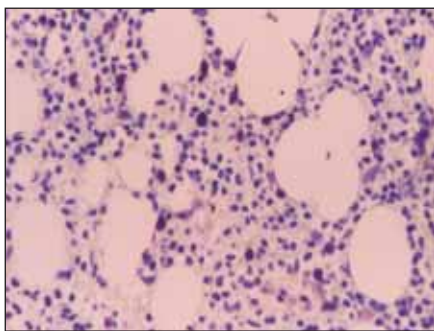
**FIGURA 2.**  
HCL-PBO-2-HE,  
ob 10x



**FIGURA 3.**  
HCL-PBO-3-HE,  
ob 10x



**FIGURA 4.**  
HCL-PBO-4-HE,  
ob 40x



**FIGURA 5.**  
HCL-PBO-  
mastocite,  
Giemsa, ob 20x

Nu se asociază cu neutropenie și monocitopenie.

Măduva osoasă este hiper celulară și prezintă un grad variabil de mielofibroză.

Colorația TRAP (Fosfatază Acidă Rezistentă la Denaturarea cu acid tartric) este negativă.

Imunofenotiparea este diferită de HCL-Clasic și anume celulele în HCL-Varianta sunt întotdeauna CD25 –negative, iar CD11c (+/-) și CD103( +/-).

Există deosebiri privind sensibilitatea la tratament, astfel încât HCL-V este rezistentă atât la IFN $\alpha$  cât și la 2-DEOXICOFORMICIN (PENTOSTATIN).

## MATERIAL ȘI METODĂ

Lotul de studiu a fost alcătuit din 50 de pacienți (39 bărbați și 11 femei, cu vârste cuprinse între 25 și 78 ani) internați și diagnosticați cu HCL în Clinica de Hematologie, Institutul Clinic Fundeni, București, în perioada 2005-2011.

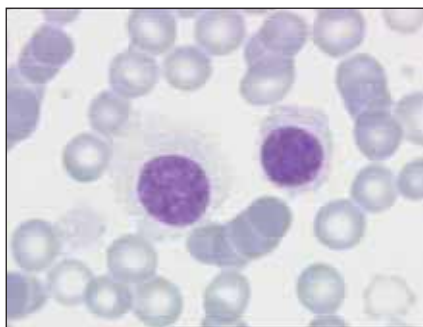
*Criterii de includere în studiu:*

- examenul citomorfologic: al frotiului de sânge periferic (Fig. 6, 7) și al aspiratului de măduvă osoasă;
- examenul citochimic: fosfataza acidă rezistentă la denaturarea cu acid tartric (Fig. 8, 9); fosfataza alcalină leucocitară;
- examenul histopatologic al măduvei osoase (Fig. 1, 2, 3, 4, 5);
- examenul imunohistochimic;
- flowcymetria.

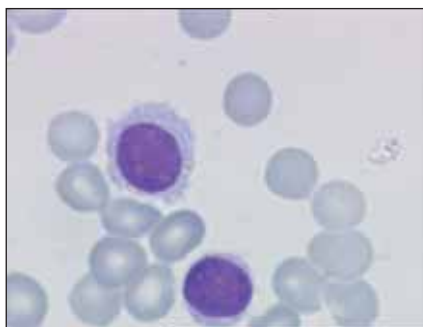
*Parametrii hematologici standard* pentru inițierea terapiei:

- anemia (hemoglobină < 8-10 g/dl);
- trombocitopenia (trombocite < 50-100x10<sup>9</sup>/l.);
- neutropenia absolută (< 0,5-1x10<sup>9</sup>/l), în special asociată cu infecții recurente.

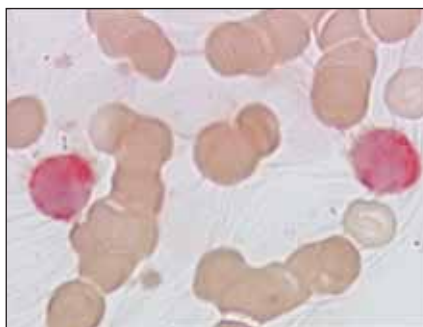
Alte indicații mai puțin comune sunt: splenomegalia simptomatică, leucocitoza > 20x10<sup>9</sup>, cu o proporție înaltă de CH, limfadenopatii voluminoase sau dureroase, vasculite și implicare osoasă.



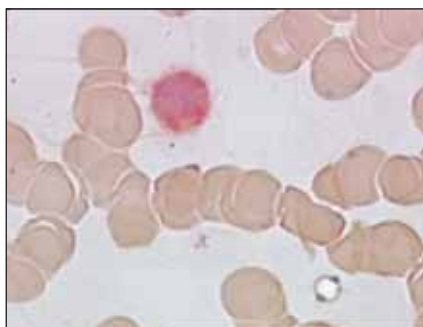
**FIGURA 6.**  
Sânge periferic,  
M.G. Giemsa,  
ob.100x-C.H.



**FIGURA 7.**  
Sânge periferic,  
M.G. Giemsa,  
ob.100x-C.H.



**FIGURA 8.**  
Sânge periferic,  
Fosfataza acidă  
(TRAP),  
ob.100x-C.H.



**FIGURA 9.**  
Sânge periferic,  
fosfataza acidă  
(TRAP),  
ob.100x-C.H.

## REZULTATE

*Clinic:*

- 90% dintre pacienții incluși în studiu au prezentat *splenomegalie* palpabilă și 20% dintre aceștia au avut splenomegalie masivă;
- *hepatomegalia* moderată a fost prezentă la 40% dintre pacienți;
- *adenopatii* superficiale minime la 25% dintre bolnavi.

*Investigații de laborator:*

80% dintre pacienți au avut *pancitopenie* la prezentare:

- anemie, aceasta fiind cel mai frecvent normocitară, normocromă;
- trombocitopenie, de tipul ușoară sau moderată (< 100.000/μl.) la 80% dintre cazuri;
- leucopenie, prezentă la 80% dintre pacienți.

*Formula leucocitară* a prezentat următoarele particularități:

- neutropenie (severă, mai mică de 1.000/μl. – la 60% dintre pacienți);
- limfocitoza relativă.

*Examenul citomorfologic* al măduvei osoase: 50% dintre pacienți au prezentat hipocelularitate. Procentul de celule Hairy variază pe frotiuri între 10 și 80%, iar dintre elementele mieloidice cel mai bine păstrate sunt megacariocitele și eritroblaștii, în schimb granulocitele sunt de obicei rare sau chiar absente. Deseori apar frecvente limfocite, plasmocite și mai rar mastocite.

*Fosfatza acidă rezistentă la denaturarea cu acid tartric* a fost pozitivă în 96% dintre cazuri, fiind utilizată pentru confirmarea diagnosticului de HCL și diferențierea C.H. față de celulele din alte leucemii sau limfoame, prin evidențierea unei activități puternice, difuze, rezistente la inhibiția cu tartrat.

*Fosfataza alcalină leucocitară (FAL)*: au prezentat valori crescute la diagnostic (> 100 U. Kaplow) aproximativ 85% dintre pacienți. Această reacție citochimică a fost efectuată atât la diagnostic, cât și pe parcursul evoluției bolii pentru depistarea formelor active de boală.

De asemenea, am analizat statistic *corelația între gradul neutropeniei și valoarea FAL la diagnostic*: pentru lotul analizat această ipoteză este nulă, întrucât nu se confirmă existența unei corelații între cele două ipoteze.

*Corelația între gradul de infiltrare cu celule HAIRY la examenul histopatologic al măduvei osoase și valoarea FAL la diagnostic*: rezultatele obținute din analiza statistică indică următoarele valori:  $r = 0,393$  și  $p = 0,0002$ , ceea ce demonstrează existența unui grad de asociere acceptabil; în concluzie, există o corelație între gradul de infiltrare cu celule Hairy la examenul histopatologic al măduvei osoase și valoarea FAL la diagnostic.

*Examenul histopatologic al măduvei osoase* este patognomonic, măduva osoasă fiind întotdeauna implicată în HCL, cu două aspecte caracteristice:

a) Infiltrația medulară: cu un aspect monoton, rarefiat în „fagure de miere“; infiltrația cu celule Hairy din măduva osoasă este totdeauna difuză sau parcellară, cu păstrarea parțială a unor zone de mielopoieză normale.

b) Mielofibroza: constă în densificarea marcată a fibrelor de reticulină stromale.

**TABELUL 1.** Examen histopatologic al măduvei osoase la diagnostic

1	<b>Gradul de infiltrare al măduvei osoase cu C.H.</b>		
	5-10%	0	0,00%
	10-50%	10	20,00%
	> 50-75%	15	30,00%
	> 75%	25	50,00%
	Total	50	100,00%
2	<b>Gradul de celularitate al măduvei osoase</b>		
	< 40%	5	10,00%
	40-60%	16	32%
	> 60%	29	58%
	Total	50	100,00%
3	<b>Dismielopoeza asociată</b>	22	44,00%
4	<b>Hematopoeza scăzută</b>	35	70,00%
5	<b>Mielofibroza gradul I / II</b>	40	80,00%
6	<b>Imunohistochimie la diagnostic</b>		
	Anti CD20	50	100,00%
	DBA.44	10	20,00%
	Anti CD103	0	0,00%

*Imunohistochimia*: (anticorpii: antiCD103, anti CD20 și anticorpii monoclonali DBA44) utilizată atât pentru diagnostic, cât și pentru urmărirea post-terapeutică. (7)

*Examenul histopatologic* al măduvei osoase efectuat la diagnostic pentru cei 50 de pacienți incluși în studiu evidențiază următoarele aspecte: 40 de pacienți prezintă infiltrat medular cu celule Hairy > 50%; 22 de pacienți au prezentat dismielopoieză asociată și 35 de pacienți au avut mielofibroză gradul I/II.

*Imunofenotiparea*: prin citometrie în flux este, de asemenea, utilă în discriminarea limfoproliferărilor reactive față de cele maligne.

Configurația antigenică cea mai caracteristică a C.H. cuprinde antigenele de suprafață: CD11c, CD22, CD25, CD103 și HLA-DR, care au fost găsite pe celulele leucemice ale tuturor pacienților diagnosticați cu HCL (clasic) și incluși în acest studiu.

**TRATAMENTUL**: agenții terapeutici activi administrați pacienților incluși în studiu au fost:

A. *CLADRIBINA (2'-CLORODEOXIADENOSINA-2CDA)*, administrată în perfuzie iv. continuă, în doze de 0,09 mg/kg. corp/zi, în cură de 7 zile. (Medicamentul este eficient și prin administrare subcutanată).

CLADRIBINA a fost administrată ca primă linie terapeutică la 11 bolnavi din lotul studiat și aproximativ 80% dintre aceștia au prezentat remisiune completă și durabilă.

Pentru 6 bolnavi din lotul studiat a reprezentat a doua linie terapeutică (dintre aceștia 66% au avut

remisiune completă), toți succedând tratamentului cu Interferon  $\alpha$  ca prima linie terapeutică.

**Remisiunea completă** este definită prin:

- hemoglobina > 12 g/ dl.;
- număr de granulocite > 1.500/ $\mu$ l.;
- număr de trombocite > 100.000/ $\mu$ l.;
- absența celulelor Hairy din măduva osoasă la examenul citomorfologic standard.

În lotul studiat rata de răspuns la Cladribină ca primă linie terapeutică a fost semnificativ mai înaltă comparativ cu IFN  $\alpha$ . ( $p < 0,0001$ )

**B. INTERFERON $\alpha$ :** administrat în doze de  $2-4 \times 10^6$  unități/ $m^2$ , subcutanat de trei ori pe săptămână, timp de minimum 12 luni.

IFN  $\alpha$  a fost administrat ca primă linie terapeutică la 35 pacienți din lotul studiat: aproximativ 12% dintre pacienții tratați cu IFN $\alpha$  au prezentat remisiune completă și 65% au prezentat remisiune parțială.

Astfel, IFN $\alpha$  ca prima linie terapeutică joacă un rol esențial în atingerea *remisiunii parțiale*. Pentru cei care nu au ca primă linie terapeutică Interferonul, riscul de a nu ajunge la remisiune parțială este de 1,5 ori mai mare (pentru un interval de încredere de 95%) decât pentru cei cu Interferon, riscul este semnificativ statistic  $p = 0,007$ .

Dacă pacienții recad în timpul tratamentului cu IFN  $\alpha$  este necesară identificarea anticorpilor neutralizanți. În condițiile în care pacientul este rezistent la terapia cu IFN  $\alpha$  sau boala devine progresivă după tratamentul cu IFN $\alpha$  pacienții au avut indicație pentru a doua linie terapeutică cu analogi de nucleozide 2-CDA (CLADRIBINA). (9)

**C. SPLENECTOMIA:** a fost luată în considerare la pacienții care au prezentat:

- splenomegalie masivă, dureroasă și/ sau ruptură splenică;
- pancitopenie și o infecție cu germeni oportuniști, ce exclude utilizarea imediată a chimioterapiei sistemice.

La un număr de 8 pacienți din lotul analizat s-a efectuat splenectomie, acești pacienți după un interval mediu de două luni au urmat a doua linie terapeutică cu Interferon  $\alpha$ , iar șase pacienți au prezentat remisiune parțială.

## CONCLUZII

În lotul analizat boala predomină la sexul masculin; vârsta medie a lotului studiat a fost de 55 ani.

Neutropenia este trăsătura hematologică majoră prin frecvența și intensitatea sa.

Fosfataza acidă rezistentă la denaturarea cu acid tartric este valoroasă, dar nu patognomonică pentru diagnosticul de HCL.

În lotul analizat există o corelație semnificativă statistic între gradul de infiltrare cu celule Hairy la examenul histopatologic al măduvei osoase și valoarea fosfatazei alcaline la diagnostic.

Imunohistochimia este mult mai sensibilă decât morfologia convențională în depistarea celulelor neoplazice reziduale din măduvă osoasă postterapeutic.

Cel mai sensibil test raportat anterior, flowcytometria, nu este adecvat în detectarea bolii minime reziduale, deoarece mulți pacienți recad după tratamentul cu analogi purinici sau Imunotoxin, iar flowcytometria nu evidențiază recăderea. (beneficiul flowcytometriei este evident mai ales în formele clinice de HCL-VARIANTA).

Biologia moleculară (tehnica RQ-PCR) și-a dovedit superioritatea comparativ cu metodele anterioare (flowcytometrie și imunohistochimie) în detectarea bolii minime reziduale.

Splenectomia și Interferon  $\alpha$  pot fi încă utilizate în HCL, dar terapia standard în prezent constă în administrarea de analogi de nucleozide (Pentostatin sau Cladribina), care produc remisiune completă și durabilă la majoritatea pacienților.

## BIBLIOGRAFIE

1. Cannon T., Mobarek D., Wegge J., Tabbara I.A. – Hairy cell leukemia: current concept. *Cancer Invest*, 2008 Oct.; 26(8):860-5
2. Poliak A. – Hairy cell leukemia, biology, clinical diagnosis, unusual manifestations and associated disorders. *Rev. Clin. Hematol.*; 2002 Jun. (6):366-88
3. Bethel K.J., Sharpe R.W. – Pathology of Hairy cell leukemia, *Best pract. Clin. Haematol.* 2003; 16:15-31
4. Michael Grever – How I treat Hairy cell leukemia, *Blood*, 2010 January, Vol. 115, No.1
5. Enrico Tiacci, Vladimir Trifonov, Gianluca Schavoni et.al. – Molecular Diagnosis *The New England Journal of Medicine*, 2001 June, 16:2305-2315.
6. Ravandi F., Jorgensen J., O'Briens – Eradication of MRD in HCL, *Blood*, 2006, 107:4658-4662
7. Miranda R.N., Briggs R.C., Kinney M.C., et. al. – Immunohistochemical detection of Cyclin D1 using optimized conditions is highly specific for mantle cell lymphoma and HCL, *Mod Pathol.* 2000; 13:1308-1314.
8. Damasa E., Clavio M., Masondi B. –  $\alpha$  IFN (INTERFERON) as induction and maintenance therapy in HCL a long follow-up analysis, *Eur. J. Haematol*, 2000, 64:47-52.
9. Baker P.K., Pettit A.R., Slupsky J.R. – Response of HCL to IFN $\alpha$  involves induction of apoptosis through autocrine TNF  $\alpha$  and protection by adhesion, *Blood*, 2002,100:647-653.