

# MARCADORES DE SUPERFÍCIE NOS PROCESSOS NEOPLÁSICOS B. I — AS NEOPLASIAS COM BAIXA DENSIDADE DE IMUNOGLOBULINA DE SUPERFÍCIE

ISABEL CORDEIRO, CARLOS MENDES NOVO, VÍTOR HUGO SOARES,  
MARIA FELICIDADE GRAÇA, BENEDITA ROCHA

Departamento de Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa. Serviço de Hematologia. Hospital dos Capuchos. Lisboa. Portugal

## RESUMO

Descrevem-se nove casos de processos neoplásicos de células B, com baixa densidade de Ig da membrana. Em todos estes casos se observa uma alta percentagem de MRFC e a presença de antígenos da classe II do MHC. Dos nove doentes apresentados, oito têm um quadro clínico e laboratorial típico de LLC e um tem um quadro compatível com uma LLC na sua fase inicial. A identificação dos isotipos da Ig de membrana sugere que a transformação neoplásica na LLC pode ocorrer em diferentes estádios de diferenciação do linfócito B. A expressão simultânea de três marcadores de superfície (baixa densidade de Ig, MRFC e Ia) e a sua estreita correlação com a LLC — B, evidencia a sua utilidade no diagnóstico da doença.

## SUMMARY

**Surface markers of B cells. I — the cells with low density surface immunoglobuline.**

In the present paper, nine cases of B-cell leukaemia with low density membrane Ig are described. In all these cases a high percentage of MRFC and the presence of class II MHC antigens are observed. Among the nine patients observed, eight of them have a clinical and laboratorial presentation typical of CLL and one has a presentation suggesting CLL in an early stage. The characterization of membrane Ig isotypes suggests that neoplastic transformation in CLL can occur at different stages of B cell differentiation. The simultaneous expression of three markers (low density Ig, MRFC and Ia) and its close relationship with B — CLL, shows they are useful to the diagnosis of this disease.

## INTRODUÇÃO

A leucemia linfática crónica (LLC) é uma doença linfoproliferativa na maioria dos casos de células da linhagem B<sup>1, 2</sup> e a monoclonalidade da população celular afectada pode ser demonstrada pela presença de moléculas de Ig de superfície com o mesmo idiotipo<sup>3</sup> e a mesma cadeia leve.<sup>2</sup> Embora com características morfológicas de células bem diferenciadas, as células de LLC têm sido consideradas células imaturas, num estádio de maturação intermédio entre o linfócito pré B e o linfócito B maduro.<sup>4</sup> Clinicamente estes doentes apresentam um número excessivo de linfócitos no sangue periférico e medula óssea, e na maioria dos casos o processo neoplásico atinge outros órgãos, nomeadamente os gânglios linfáticos, baço e fígado.<sup>5</sup> O nível exacto de linfocitose absoluta a partir do qual se deve considerar o diagnóstico de LLC é difícil de estabelecer, sendo geralmente superior a  $5 \times 10^{10}/l$ <sup>5</sup> podendo muito raramente ser inferior a  $1 \times 10^{10}/l$ <sup>5</sup> É principalmente nestes casos que podem surgir

problemas de diagnóstico diferencial entre linfocitose reaccional, LLC, e linfoma.

No presente trabalho descrevem-se os marcadores de superfície de nove doentes com processos neoplásicos de células B, que não foram submetidos a qualquer terapêutica prévia e cuja imunoglobulina de membrana apresenta as características previamente descritas na LLC — baixa densidade<sup>6</sup> e ausência de migração polar (capping) após incubação com antisoro anti-Ig.<sup>7</sup> Os resultados obtidos indicam que o estudo simultâneo de vários marcadores de superfície é necessário para a caracterização destes processos neoplásicos, e que a presença simultânea de três marcadores (Ia, MRFC e baixa densidade de Ig) têm uma associação clínica estreita com a LLC. A identificação dos isotipos da Ig de membrana sugere também que a transformação neoplásica da LLC pode ocorrer em diferentes estádios de diferenciação da célula B, contrariamente ao conceito clássico, que considera esta célula numa fase maturativa intermédia entre o linfócito pré-B e o linfócito B maduro.<sup>4</sup>

QUADRO 1 Marcadores de superfície em indivíduos normais

	SRFC	MRFC	OKIa1	OKM1	Sig <sup>+</sup>
n	30	30	30	18	30
média (%) ± D.P.	68,3 ± 7,7	2,3 ± 3,2	12,7 ± 8,2	14,9 ± 10,6	7,4 ± 4,2
valores limite (%)	54-83	0-12	3-40	2-37	2-21

Os marcadores de superfície linfocitários foram determinados conforme descrito em materiais e métodos.

n — número de indivíduos numa amostra aleatória, considerados para o presente quadro.

SRFC — células formadoras de rosetas com eritrócitos de carneiro.

MRFC — células formadoras de rosetas com eritrócitos de murganho.

OKIa1 — anticorpo monoclonal que reconhece Ag da classe II do MHC.

OKM1 — anticorpo monoclonal que reconhece monocitos e granulócitos.

Sig<sup>+</sup> — imunoglobulina de superfície.

## MATERIAL E MÉTODOS

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas a partir de sangue venoso heparinizado, por centrifugação em gradientes de Ficoll-Hypaque (d-1,070), sendo incubadas com partículas de poliestireno para distinção entre linfócitos e células fagocíticas. A viabilidade celular, determinada pela exclusão de azul de tripan, foi sempre superior a 98 %.

A determinação de células formadoras de rosetas expon-tâneas com eritrócitos de carneiro — SRFC<sup>8</sup> e de murganho — MRFC<sup>9</sup> foi efectuada segundo os métodos previamente descritos.

A presença de imunoglobulina de membrana foi visuali-zada por imunofluorescência directa, usando antisoros mo-noespecíficos para as cadeias pesadas  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ , e para as cadeias leves K e  $\lambda$  (Dako). Foram utilizadas em simultâneo antisoros marcados com rodamina e fluoresceína com o objectivo de se poder detectar a presença de diferentes cadeias pesadas ou leves à superfície da mesma célula.

Os anticorpos monoclonais OKIa1 e OKM1 (Ortho Phar-maceutical Corporation) foram utilizados para identificar respectivamente os Antígenos da Classe II do Complexo Major de Histocompatibilidade (Ia) e um antígeno de su-perfície descrito como específico de monocitos e granulo-citos<sup>10</sup> usando técnicas de imunofluorescência indirecta.

Todas as suspensões celulares usadas em técnicas de imu-nofluorescência de membrana foram incubadas a 37 °C du-rante 45 minutos em meio de cultura, na ausência de soro, seguindo-se três lavagens à mesma temperatura, para indu-zir o *shedding* dos receptores Fc<sup>11</sup> antes da incubação com os antisoros marcados. Após marcação, as células foram observadas ao microscópio equipado com iluminação fluo-rescente vertical, e cada campo examinado alternadamente com luz visível e ultravioleta, sendo contadas 200 células por lâmina.

## RESULTADOS

### Marcadores de superfície em indivíduos normais

No Quadro 1 apresentam-se os valores obtidos no nosso laboratório, para o conjunto de marcadores empregues neste estudo, numa amostra aleatória de 30 indivíduos saudá-veis. Estes resultados são semelhantes aos obtidos em mais de 100 indivíduos normais por nós já estudados. Todos os doentes foram testados simultaneamente com um indivíduo saudável.

### Marcadores de superfície dos doentes

Os marcadores de superfície dos linfócitos do sangue perifé-rico em doentes com proliferações de células B com baixa den-sidade de Ig de superfície estão representados no Quadro 2.

Como anteriormente descrito<sup>6</sup> a baixa densidade de Ig de membrana que em alguns casos não é detectável (casos 5 e 8) e a heterogeneidade de marcação de célula para célula, torna difícil a avaliação do número de células neoplásicas presente no sangue periférico por inspecção visual directa das células marcadas com antisoros anti Ig.

Dos sete doentes com Ig de superfície detectável, a ca-deia pesada mais frequentemente expressa (6 casos em 7) é a  $\mu$ . No entanto, em quatro destes doentes a IgM de membra-na encontra-se associada a outros isotipos, nomeadamente IgA, IgD ou IgG. Em todos os casos a monoclonalidade da população celular foi confirmada pela presença de uma única cadeia leve (Quadro 2).

Ao contrário do que sucede com a Ig de superfície, a densidade em antígeno Ia das células linfocitárias destes doentes é geralmente normal e permite a determinação do número de células neoplásicas na maioria dos doentes (Qua-dro 2). Contudo, os doentes 1, 4 e 5 apresentam baixa den-sidade de Ia, com um tipo de fluorescência idêntico ao observado na Ig de membrana das LLC.

Em todos os casos verifica-se um aumento acentuado de células que formam rosetas com eritrócitos de murganho, que em <sup>2</sup>/<sub>3</sub> dos doentes é superior a 50 % (Quadro 2). Nos casos em que foi testado o anticorpo monoclonal OKM1 o número de células marcadas encontrava-se dentro dos limi-tes da normalidade.

## DISCUSSÃO

A evolução ontogénica da célula B acompanha-se de rearranjos ao nível do DNA, com deleção de genes que codificam para certos isotipos, estando a ordem destas dele-ções bem estabelecida. Daqui resulta a expressão de diferen-tes classes de imunoglobulina à superfície das células B do mesmo clone, consoante os genes expressos num dado mo-mento ao nível do DNA.<sup>12</sup> Assim, o linfócito B começa por exprimir IgM, depois IgM + IgD, IgG ou IgA.<sup>12</sup> A expressão de IgM de superfície, na ausência de IgD, tem sido conside-rada uma característica da célula B imatura,<sup>13</sup> isto é, incapaz de responder a estímulos antigénicos e facilmente tolerizável.<sup>13</sup> A expressão de IgD de superfície associar-se-ia à aquisição de capacidade funcional e sendo o *switch* para IgG ou IgA consi-derado uma propriedade das células B memória.<sup>13</sup>

QUADRO 2 Parâmetros referentes aos nove casos estudados

Caso N.º	Idade	Sexo	N.º absoluto de linfócitos (cél/mm <sup>3</sup> )	SRFC (%)	MRFC (%)	OKIa	OKM1 (%)	SIg
1	67	M	126 000	11	76	35 *	NT	uλ
2	64	F	233 000	3	73	73	NT	uδλ
3	76	M	63 500	7	21	91	NT	uδλ
4	62	F	30 000	22	14	34 *	NT	uαk
5	50	M	62 000	19	53	50 *	3	Neg.
6	60	M	43 000	4	63	92	11	uλ
7	50	F	31 000	20	71	NT	NT	γK
8	57	F	15 000	27	80	63	NT	Neg.
9	54	F	8 034	30	40	82	1 %	uγk

SRFC — células formadoras de rosetas com eritrócitos de carneiro.

MRFC — células formadoras de rosetas com eritrócitos de murganho.

OKIa — anticorpo monoclonal que reconhece Ag da classe II do MHC.

OKM1 — anticorpo monoclonal que reconhece monocitos e granulócitos.

SIg — imunoglobulina de superfície.

NT — não testado.

\* — fluorescência de membrana tênue e variável de célula a célula.

Classicamente, as células da LLC são consideradas funcionalmente imaturas. Para este conceito contribui a baixa densidade de imunoglobulina de membrana.<sup>2</sup> Esta característica não pode no entanto considerar-se patognomônica de imaturidade visto observar-se nas células dos centros germinativos dos gânglios linfáticos<sup>14</sup> que podem ser consideradas células B memória por se desenvolverem após estimulação antigênica.

Como se pode observar no Quadro 2, num dos casos estudados (caso n.º 7) as células do doente exprimem apenas IgG de superfície. Podemos excluir neste caso a possibilidade desta IgG ser de origem citofílica visto que a incubação prévia das células a 37 °C seguida de 3 lavagens à mesma temperatura, antes da incubação com os antisoros anti-imunoglobulina, leva ao *shedding* da Ig extrínseca e dos receptores Fc<sup>11</sup> e a presença de uma única cadeia leve associada à IgG demonstra tratar-se de uma Ig intrínseca e monoclonal. Neste caso pelo menos, poderíamos pensar que as células B envolvidas seriam células de memória. Além disso, na maioria dos casos apresentados a IgM de superfície associa-se a outros isotipos (Quadro 2).

A alta incidência de fenotipos mixtos (IgM+IgG e IgM+IgA), pouco frequentes no sangue periférico de indivíduos normais, sugere que nestes casos a transformação neoplásica se deu numa célula em processo de *switch*, e não numa célula B imatura.

A capacidade de formar rosetas com hemácias de murganho tem sido apontada como indicador de imaturidade desde que Gupta e col. verificaram que as células linfóides do fígado fetal, bem como a maioria dos linfócitos B do sangue periférico que exprimem IgM de membrana, também tinham a mesma propriedade.<sup>15, 16</sup> Como já foi referido previamente por outros autores<sup>17</sup> também nós não encontramos qualquer correlação entre o isotipo da Ig de membrana da célula neoplásica e a presença de receptores para eritrócitos de murganho. É de notar a este respeito que o caso n.º 7 expressa IgG de superfície e apesar disso 71 % das células formam rosetas com eritrócitos de murganho o que indica que este marcador não é propriedade exclusiva de células B imaturas.

A ausência de Ig de superfície nas células da LLC-B (casos n.º 5 e n.º 8) é relativamente frequente<sup>17</sup> sendo controverso se na verdade a população leucêmica em causa não possui realmente Ig de membrana ou se o número de moléculas presente é tão pequeno que não permite a sua identificação por imunofluorescência. Nestes casos a alta percentagem de MRFC e a presença de antígenos da classe II do MHC (Ag Ia), permitem estabelecer inequivocamente a linhagem B destas células. Com efeito, embora as células T activadas possam exprimir Ag Ia, nos casos 5 e 8 a percentagem de células T (determinada por SRFC e pelo anticorpo monoclonal OKT3) é muito baixa. Estes dados reforçam a importância da execução simultânea destes três marcadores para a identificação da população leucêmica.

Dos nove doentes apresentados, oito tinham linfocitoses absolutas acentuadas e em todos eles o envolvimento medular, bem como o restante quadro clínico era típico de LLC. A doente n.º 9 tinha uma linfocitose de 8034 mm<sup>3</sup>, sem leucocitose (G.B.-10 300/mm<sup>3</sup>), o mielograma revelava uma série linfóide aumentada (40 %) e não apresentava adenopatias nem hepatoesplenomegália. Os marcadores de superfície neste caso são idênticos aos da LLC-B, o que sugere estarmos em presença de uma LLC numa fase muito precoce, anterior ao estadio O de Rai. É de notar que nos outros doentes com processos neoplásicos B que estudámos e em que tivemos acesso aos dados clínicos, estes não eram sugestivos de LLC e os marcadores de superfície observados eram diferentes. (Isabel Cordeiro — Manuscrito em preparação). Estes resultados indicam pois uma correlação estreita entre a presença de três marcadores de superfície (ausência ou baixa densidade de Ig de membrana, MRFC e Ag Ia) e a leucémia linfática crônica, podendo portanto ser utilizados para o diagnóstico diferencial de situações clínicas de caracterização difícil.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. R. Valadas Preto o seu constante apoio e entusiasmo. Ao Prof. Dr. A. Freitas agradecemos a revisão do manuscrito.

## BIBLIOGRAFIA

1. AISENBERG, A. C.; BLOCH, K. J.: Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes. *N. Engl. J. Med.* 1972; 287: 272.
2. PREUD'HOMME, J. L.; SELIGMANN, M.: Surface bound immunoglobulins as a cell marker in human lymphoproliferative diseases. *Blood* 1972; 40: 777.
3. SALSANO, F.; FROLAND, S.; NATVIG, J. B.; MICHAELSON, T. E.: Same idiotype of B lymphocytes membrane IgD and IgM. Formal evidence for monoclonality of CLL cells. *Scand J. Immunol* 1974; 3: 841.
4. JOHNSTONE, A. P.: Chronic lymphocytic leukaemia and its relationship to normal B lymphopoiesis. *Immunol Today* 1982; 3: 343.
5. WINTROBE, M. M.: Clinical Hematology. 8.<sup>a</sup> Ed., Philadelphia, Lea & Febiger, 1981.
6. KOZINER, B.; FILIPPA, D. A.; MERTELSMANN, R. et al: Characterization of malignant lymphomas in leukemic phase by multiple differentiation markers of mononuclear cells. *Am. J. Med.* 1977; 63: 556.
7. COHEN, H. J.: B cell lymphosarcoma cell leukemia: dynamics of surface membrane immunoglobulin. Value for differentiation from C11. *Ann Intern. Med.* 1978; 88: 317.
8. JONDAL, M.; HOLM, G.; WIGZELL, H.: Surface markers on human T and B lymphocytes. A large population of Lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.* 1972; 136: 207.
9. STATHOPOULOS, G.; ELLIOT, E. V.: Formation of mouse or sheep red blood cells rosettes by lymphocytes from normal and leukaemic individuals. *Lancet* 1974; April 6: 600.
10. BREARD, J.; REINHERZ, E. L.; KUNG, P. C.; GOLDSTEIN, G.; SCHLOSSMAN, S. F.: A monoclonal antibody reactive with human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 1980; 124: 1943.
11. NEUPORT-SAUTES, C.; DUPUIS, D.; FRIDMAN, W. H.: Specificity of activated T cells. Relation with released immunoglobulin binding factor. *Eur. J. Immunol.* 1975; 5: 849.
12. ADAMS, J. M.: The organization and expression of immunoglobulin genes. *Immunol Today* 1980; 1: 10.
13. BLACK, S. J.; TOKUHISA, T.; HERZENBERG, L. A.: Memory B cells at successive stages of differentiation: expression of surface IgD and capacity for self renewal. *Eur J. Immunol* 1980; 10: 846.
14. BUTCHER, E. C.; ROUSE, R. V.; COFFMAN, R. L.; NOTTENBURG, C. N.; HARDY, R. R.; WEISSMAN, I. L.: Surface phenotype of Peyer's patch germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B cell differentiation. *J. Immunol* 1982; 129: 2698.
15. GUPTA, S.; PHAWA, R.; O'REILLY, R.; GOOD, R. A.; SIEGAL, F.: Ontogeny of lymphocyte subpopulations in human fetal liver. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1976; 73: 919.
16. GUPTA, S.; GOOD, R. A.; SIEGAL, F. P.: Rosette formation with mouse erythrocytes. *Clin. Exp. Immunol* 1976; 25: 319.
17. KUHLEIN, E.; LAURENT, G.; RIGAL, F.; DELSOL, G.; PRIS, J.; DUCOS, J.: Spontaneous mouse erythrocyte rosette formation in chronic lymphocytic leukaemia. *Clin. Exp. Immunol.* 1982; 47: 389.

Pedido de separatas: Benedita Rocha  
 Departamento de Imunologia  
 Faculdade de Ciências Médicas  
 Campo de Santana 130  
 1198 Lisboa. Portugal