

LEUCEMIA DE LINFOCITOS GRANDES GRANULARES

PRESENTACION DE UN CASO CON ESCASA EXPRESION EN SANGRE PERIFERICA

HECTOR D. DI PAOLO¹, MARIO C. AGGIO¹, VANESA FERNANDEZ¹, MARIA DEL CARMEN TAFETANI¹,
JORGE BLASCO², IRMA SLAVUTSKY³, GABRIELA ANDREOLI³, MARCELA GRONDA³,
CATALINA BIANCHI de DI RISIO³

¹ Servicio de Hematología y ² Servicio de Patología, Hospital Dr. José Penna, Bahía Blanca; ³ Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen Una paciente de 33 años consultó por infecciones bacterianas reiteradas y granulocitopenia severa. El recuento absoluto de neutrófilos era 270/uL y el linfocitario 3000/uL, con 35% de linfocitos grandes granulares. El mielograma por punción aspirativa fue hipocelular, con disminución de elementos maduros mieloides y 50% de linfocitos. En la biopsia de médula ósea se observó un infiltrado linfoide nodular e intersticial y fibrosis reticulínica. Mediante inmunohistoquímica se demostró fenotipo T supresor en la población linfoide de médula ósea, con lo cual se diagnosticó enfermedad linfoproliferativa de linfocitos grandes granulares. Un estudio citogenético a partir del aspirado medular mostró la presencia del marcador 7q- en bajo porcentaje de las células, confirmando el origen clonal del cuadro. No hubo evidencia de rearrreglo clonal en el estudio genético de cadena beta del receptor de linfocitos T. El suero de la paciente tuvo actividad inhibitoria sobre el crecimiento de colonias granulocito-macrofágicas autólogas y de donante normal. El tratamiento con pred-nisona en baja dosis permitió controlar la neutropenia.

Palabras clave: leucemia de linfocitos grandes granulares

Con el nombre de enfermedad linfoproliferativa de linfocitos grandes granulares (ELLGG) se ha intentado agrupar a un conjunto heterogéneo de procesos con espectro clínico variable: desde condiciones indolentes hasta enfermedad maligna agresiva¹. Los estudios genéticos de cadena beta del receptor T han hallado evidencia de monoclonalidad en muchos, pero no en todos los casos de ELLGG¹. Se reserva la denominación leucemia de linfocitos grandes granulares (LLGG) para aquellos casos de ELLGG en los que ha podido demostrarse rearrreglos clonales en el re-

ceptor T por biología molecular o un marcador cromosómico mediante estudio citogenético². Si bien se han descrito casos de evolución similar a una leucemia aguda², la mayoría de los pacientes exhiben sólo una linfocitosis moderada en sangre periférica, neutropenia crónica, ausencia de compromiso orgánico parenquimatoso severo y curso clínico benigno.

El criterio diagnóstico principal utilizado hasta hace poco tiempo para definir ELLGG ha sido la presencia de 2000 o más linfocitos grandes granulares (LGG)/uL en sangre periférica¹, pero actualmente se reconocen proliferaciones clonales con recuentos de LGG tan bajos como 700/uL² y se han comunicado casos con expresión de la enfermedad exclusivamente en médula ósea³.

Presentamos un caso con 1050 LGG/uL, cuyo diagnóstico se fundamentó en estudios immuno-

Recibido: 10-XII-1993

Aceptado: 22-IV-1997

Dirección postal: Dr. Héctor D. Di Paolo, Servicio de Hematología, Hospital Dr. José Penna, Lainez 2401, 8000 Bahía Blanca; Argentina

histoquímicos y citogenéticos de la médula ósea.

Caso clínico

La paciente S.B. de 33 años de edad se internó en Mayo de 1991 con una neumopatía infecciosa aguda. El recuento leucocitario fue de 3400/uL, con 8% de neutrófilos segmentados. El resto del hemograma fue normal y el examen detallado de la serie linfóide mostró un 35% de LGG.

Antecedentes: Negó haber recibido transfusiones. Su único embarazo fue interrumpido por una maniobra abortiva. Un año antes de su internación presentó neumopatía de evolución tórpida con leucopenia y neutropenia leves, y a partir de entonces reiteró cuadros febriles, faringitis y ulceraciones orales, recibiendo esporádicamente antibióticos beta lactámicos y antitérmicos pirazolónicos. El examen físico fue normal salvo lo correspondiente a su neumopatía. Los estudios de laboratorio para enfermedades del colágeno, infección por HIV y virus de hepatitis B, fueron todos negativos. Las inmunoglobulinas séricas fueron normales.

En repetidas *punciones aspirativas de médula ósea* se obtuvo un material marcadamente hipocelular, destacándose la disminución de elementos maduros mieloides y la presencia de un 50% de *linfocitos maduros*. En la biopsia de médula ósea se constató celularidad normal, acentuación de la trama de fibras reticulares, hipoplasia mielóide y un infiltrado linfóide nodular e intersticial que comprometía el 25% de la celularidad. El estudio de esta población linfóide por inmunohistoquímica de material incluido en parafina mostró expresión del fenotipo T, por positividad con anti CD45 RO en el infiltrado linfóide focal e intersticial y negatividad con anti CD20 y anti kappa lambda.

No se constató compromiso del sistema linfático por tomografía computada abdominal y radiografía de tórax. La gammagrafía ósea fue también normal.

El estudio del fenotipo linfocitario por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales en sangre periférica no mostró alteraciones significativas, pero en el aspirado medular se halló un predominio de T supresores (Tabla 1). Sin embargo, debido a la hipocelularidad del material aspirado y a la posibilidad de una considerable mezcla con sangre, se decidió corroborar este dato por inmunohistoquímica en biopsia de médula ósea procesada por congelación, confirmando el predominio de CD8 en el infiltrado linfóide.

Se realizó un estudio citogenético en médula ósea observándose un 76% de células con cariotipo normal (46, XX) y un clon de baja expresión portador del marcador 7q-: del (7) (q36) (9%); las células restantes mostraron aneuploidias inespecíficas.

TABLA 1.- *Inmunofenotipo linfocitario en sangre periférica y aspirado medular*

Antígenos linfocitarios	Porcentaje de Células positivas	
	Sangre	Médula ósea
CD8	25	31
CD4	40	15
CD2	60	40
CD19	—	24
Kappa	2,5	—
Lambda	2,5	—

No hubieron evidencias de rearreglo genético en el receptor de células T ni en el gen de inmunoglobulinas por Southern Blot. Por cultivo in vitro de médula ósea se demostró actividad inhibitoria del suero de la paciente sobre el desarrollo de colonias granulocito - macrofágicas, tanto autólogas como de donante normal, observándose una inhibición del 51% en la médula ósea de la paciente y del 62% en la médula normal.

La infección que motivó su internación evolucionó favorablemente pero la neutropenia persistió con igual severidad durante los siguientes 3 meses. Se la medicó con factor estimulante de colonias granulocítico-macrofágicas (3 ug/kg/día por vía subcutánea) durante 3 semanas, sin respuesta. Luego, con la presunción de neutropenia autoinmune, recibió ciclosporina A oral (5mg/kg/día), obteniéndose una respuesta parcial y (por separado y a continuación) prednisona 1 mg/kg/día lográndose en este caso una rápida normalización del recuento de neutrófilos.

El tratamiento definitivo fue prednisona (8 mg en días alternos) con lo cual se la mantuvo libre de infecciones y con un recuento de neutrófilos de por lo menos 600/uL. El agregado de clorambucil (15 mg/día durante 7 días en ciclos mensuales) no mejoró la respuesta obtenida, por lo cual se lo suspendió a los 6 meses de iniciado. No se evidenció progresión del síndrome linfoproliferativo en cuatro años de seguimiento.

Discusión

La ELLGG se caracteriza por un aumento, en sangre periférica y médula ósea, de linfocitos con apariencia madura, tamaño mayor que el normal, citoplasma claro abundante y numerosos gránulos azurófilos. Generalmente, se presenta también una neutropenia crónica de severidad variable. La mayoría de los pacientes exhiben una

linfocitosis moderada, pero hasta un 25% de los casos pueden presentarse sin linfocitosis absoluta circulante². En las series más numerosas de esta enfermedad publicadas hasta 1990 se tomó como criterio diagnóstico definitorio la presencia de por lo menos 2000 LGG/uL de sangre, estable durante 6 meses y en ausencia de infecciones causativas (Epstein Barr o Citomegalovirus)¹. Esto representa un incremento de 5 a 7 veces los valores normales (250 - 460/uL). Sin embargo, en una revisión más actual se admite que hasta un 8% de pacientes con proliferaciones clonales, probadas por citogenética o biología molecular, presentaron recuentos de LGG entre 600 y 1000/uL². En un estudio de inmunoarquitectura medular de 15 pacientes con neutropenia se describen 2 casos con infiltrados linfocitarios CD57/CD8 + en médula ósea, pero valores normales de LGG en circulación³. Nuestra paciente se caracteriza por la coexistencia de un aumento de LGG en sangre periférica (recuento absoluto 1050/uL), neutropenia y un infiltrado linfático medular con fenotipo T supresor: esta combinación de hallazgos permitió establecer el diagnóstico de ELLGG según los criterios antes revisados.

A partir del estudio de antígenos de diferenciación linfocitaria, se ha distinguido dos fenotipos mayores en ELLGG, de acuerdo a la expresión variable de: CD3 (receptor de linfocitos T), CD8 (T supresor citotóxico) y CD56/57 (marcadores de progenie natural killer). El de presentación más frecuente es el que muestra positividad para los antígenos CD3, CD8 y CD57; el fenotipo restante es positivo para CD56 y negativo para los otros tres². En nuestra paciente, el estudio del inmunofenotipo linfocitario se vio limitado por no poder determinar los antígenos CD3, CD56 y CD57, sin embargo creemos que la positividad hallada con anti CD8 en médula ósea tiene significación diagnóstica ya que los antígenos CD3 y CD8 se encuentran asociados en un 95% de los casos en esta patología².

La infiltración de médula ósea ocurre muy frecuentemente en la ELLGG, siendo el patrón de tipo difuso el más ampliamente reconocido², no obstante se han descrito algunos casos con infiltrados de tipo nodular⁴. Se ha sugerido que en estos casos los nódulos linfoides representan linfocitos B reactivos, mientras que los LLG patológicos infiltran predominantemente el intersti-

cio⁵. Nuestra paciente presentó infiltración nodular e intersticial con positividad para CD8 más acentuada en el intersticio pero también presente dentro de los nódulos. Asimismo, la fibrosis reticulínica medular, que causa punciones aspirativas «secas», ha sido descrita en algunos casos de esta enfermedad⁶. Los estudios citogenéticos efectuados en LLGG en los que se han encontrado anomalías cromosómicas clonales son escasos y no se han detectado alteraciones específicas⁴. Nuestro caso presentó una delección del brazo largo del cromosoma 7, a nivel de la banda q36, punto muy cercano al lugar donde mapean los genes de la cadena beta del receptor T (7q35). Asimismo anomalías en el brazo corto de este cromosoma han sido detectadas en pacientes con LLGG asociadas a virus de Epstein Barr^{7, 8}.

La ausencia de rearreglos clonales en los estudios genéticos de cadena beta del receptor T en pacientes de ELLGG se atribuye a: falta de expresión de CD3 en los linfocitos patológicos^{1, 2}, artificios técnicos⁹, presencia de rearreglos en la cadena gamma y no en la beta del receptor¹⁰, y a la posibilidad de que algunos casos sean verdaderas proliferaciones policlonales inicialmente y luego puedan evolucionar hacia una enfermedad clonal, dependiendo de un daño genético adicional o factores ambientales².

Aunque la neutropenia se presenta en el 84% de los casos de LLGG, su causa no es bien conocida. Se han hallado evidencias de procesos autoinmunes en algunos pacientes por: anticuerpos antineutrófilos⁴, inhibición del crecimiento de colonias granulocito - macrofágicas por inmunoglobulinas séricas¹¹, o por linfocitos T neoplásicos¹². Por los datos obtenidos *in vitro*, Pantel¹³ propone que las diferentes subpoblaciones linfocitarias que contactan a las células progenitoras hemopoyéticas en el microambiente medular regularían la proliferación y desarrollo de éstas a través de la liberación de citoquinas que podrían ejercer un efecto estimulante o depresor.

En nuestra paciente, la inhibición del crecimiento de colonias granulocito - macrofágicas por presencia de suero autólogo sugeriría la actividad de anticuerpos contra precursores mieloides como causa de la neutropenia^{14, 15} o bien la acción de citoquinas inhibitorias liberadas por las poblaciones linfoides alteradas por la enfermedad.

Summary

Large granular lymphocytic leukemia. Case report with scarce expression in peripheral blood

The case of a 33 year old woman with a large granular lymphocytic leukemia is presented. The main symptoms were neutropenia and recurrent respiratory bacterial infections. No enlargement of the liver, spleen or lymph nodes was noted. Circulating lymphocytes averaged 3000/ μ l with 35% of large granular cells. The bone marrow biopsy showed lymphatic infiltration with both nodular and interstitial pattern. Lymphocytes bore the T suppressor phenotype (CD8 +, CD45 RO +, CD20 -, kappa -, lambda -). Cytogenetic studies revealed a low expression clone with 7q -: del (7) (q36). Gene rearrangements for immunoglobulins or T - cell receptors could not be demonstrated by Southern Blot. Bone marrow cultures grew normally while both normal and patient bone marrow showed marked inhibition when incubated with patients serum.

Normalization of the peripheral granulocytic count was obtained with prednisone, while granulocytic-stimulating factors, chlorambucil, and cyclosporine A were partially active or inactive.

We suggest that this case represents a form of the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. To our knowledge, the deletion of the long arm of chromosome 7 has not been described in this disease.

Bibliografía

1. Semenzato G, Pandolfi F, Chisesi T, et al. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. A heterogeneous disorder ranging from indolent to aggressive conditions. *Cancer* 1987; 60: 2971-8.
2. Loughran TP. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood* 1993; 82(1): 1-14.
3. Picker LJ, Furst A, Robinson SH, Kadin ME. Immunoarchitecture of the bone marrow in neutropenia: Increased HNK - 1 + cells define a subset of neutropenic patients. *Am J Hematol*, 1987; 25: 29-41.
4. Loughran TP, Kadin ME, Starkbaum G, et al. Leukemia of large granular lymphocytes: Association with clonal chromosomal abnormalities and autoimmune neutropenia, thrombocytopenia and hemolytic anemia. *Ann Intern Med* 1985; 102: 169-75.
5. Merlio JP, De Mascarel A, Goussot JF. Bone marrow involvement in large granular lymphocyte leukemia. *Hum Pathol* 1990; 21: 458-9.
6. Chan WC, Chek I, Schick C, Brynes RK, Kateley J, Winton EF. A morphologic and immunologic study of the large granular lymphocyte in neutropenia with T lymphocytosis. *Blood* 1984; 63: 1133-40.
7. Gelb AB, Van De Rijn M, Regula DP, et al. Epstein Barr virus - associated natural killer - large granular lymphocyte leukemia. *Hum Pathol* 1994; 25: 953-60.
8. Tien HF, Su IJ, Chuang SM, et al. Cytogenetic characterization of Epstein Barr virus associated T cell malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 69: 25-30.
9. Minden MD, Mak TW. The structure of the T cell antigen receptor genes in normal and malignant T cells. *Blood* 1986; 68: 327-30.
10. Foroni L, Matutes E, Foldi J, et al. T cell leukemias with rearrangement of the gamma but not beta T cell receptor genes. *Blood* 1988; 71: 356-62.
11. Thomssen C, Nissen C, Gratwohl A, Tichelli A, Stern A. Agranulocytosis associated with T - Gamma - Lymphocytosis: No improvement of peripheral blood granulocyte count with human - recombinant granulocyte - macrophage colony stimulating factor (GM-GSF) *Br J Haematol* 1989; 71: 157-60.
12. Friedman HD, Goldeberg J, Kurec AS, Davey FR. Etiology of neutrophilic granulocytic hypoplasia in a case of large granular lymphocytic leukemia with paraproteinemia. *Med Pediatr Oncol* 1994; 23: 503-6.
13. Pantel K, Nakeff A. Lymphoid cell regulation of hematopoiesis. *Int J Cell Clon* 1989; 7: 2-12.
14. Levitt LJ, Ries CA, Greemberg PL. Pure white cell aplasia. *N Engl J Med* 1983; 308: 1141-6.
15. Van der Veen JPW, Hack CE, Engelfriet CP, Pegels JG, Kr Von Dem Borne AEG. Chronic idiopathic and secondary neutropenia: clinical and serological investigations. *Br J Haematol* 1986; 63: 161-71.