

Catlab Informa 19

Juliol 2011

Determinació de ZAP-70

La Leucèmia Limfàtica Crònica (LLC) és la leucèmia més freqüent a la població adulta occidental i es caracteritza per una gran diversitat clínica i biològica. La mitjana de supervivència global és de 10 anys i tot i què no és diferent en pacients amb una edat superior o inferior als 50 anys, els joves tenen un risc superior de morir a causa de la malaltia. És per aquest motiu, molt important, la valoració de factors pronòstics i de tractaments que permetin remissions de bona qualitat i de llarga duració particularment en els pacients joves.

Diagnòstic

El diagnòstic de la LLC es basa fonamentalment en les dades clíniques (limfocitosi sense o amb organomegàlia), morfologia dels limfòcits circulants i l'immunofenotipus. En alguns casos on la morfologia i/o l'immunofenotipus són atípics, es requerirà d'hibridació "in situ" (FISH) per establir el diagnòstic diferencial de LLC i descartar un limfoma leucemitzat.

El perfil immunofenotípic del limfòcit de la LLC és el d'una cèl·lula clonal B amb expressió dèbil de la immunoglobulina (Ig) a la seva superfície, CD5 i CD23 positiva, FMC7 negativa i manifesta una expressió dèbil o negativa pels anticossos monoclonals (AcMo) CD22 i CD79b. S'ha de considerar què amb certa freqüència, existeixen desviacions d'aquest fenotipus típic (per exemple, expressió de FMC7 o expressió moderada o forta de la Ig). És per això, que a l'avaluar l'immunofenotipus s'han de conjuntar els resultats en un sistema de puntuació o "scores" que ens permetrà distingir a la LLC d'altres síndromes limfoproliferatives B.

En una proporció de pacients l'immunofenotipus i/o la morfologia no són els característics de LLC plantejant-ne de que es pot tractar d'un altra síndrome

limfoproliferativa B. El problema més freqüent de diagnòstic diferencial és el d'un limfoma de mantell leucemitzat i en particular, el limfoma del mantell. En aquesta situació estudis de FISH amb sondes per a la t(11;14) que descartin la presència d'aquesta mutació o bé les tincions histològiques per a la ciclina D1 són de gran ajut diagnòstic. La LLC també haurà de distingir-se d'altres processos com la leucèmia prolimfocítica B i d'altres limfomes leucemitzats.

Factors pronòstic

Actualment es disposa d'una varietat de paràmetres que permeten avaluar o predir amb més precisió el pronòstic de la LLC. Entre aquests factors, hi ha paràmetres clínics i serològics i més recentment, s'han descrit altres factors citogenètics i moleculars (alguns d'ells s'han d'avaluar al llarg del curs clínic perquè poden manifestar variacions bàsicament en relació a la progressió de la malaltia o refractarietat al tractament), així com determinades molècules en els limfòcits de la LLC que proporcionen una notable informació pronòstic addicional.

Expressió de ZAP-70

Aquesta proteïna es troba expressada amb una intensitat marcada als limfòcits normals T i cèl·lules NK on juga un important paper funcional.

Estudis de microarrays varen demostrar a l'any 2002 que el perfil gènic de la LLC és uniforme i no és diferent en pacients que tenen mutacions de la IgVH d'aquells que manifesten una línia germinal de la mateixa. Per contra, es va demostrar una expressió diferencial en certs gens en aquests dos grups de LLC. Entre aquests gens va destacar el que codifica per a la proteïna ZAP-70, el qual es trobava present en els casos de LLC amb IgVH no mutada (línia germinal) mentre era absent en aquells casos amb la IgVH mutada. Això va ser la base que va suggerir que l'expressió d'aquesta proteïna o bé el seu ARN missatger podria correlacionar-se amb un mal pronòstic a la LLC així com ser un marcador substitut i més assequible que el estimar l'estat mutacional de la IgVH i, representar un factor pronòstic independent.

Des de fa uns anys s'han anat desenvolupant i millorant tècniques de laboratori per a la quantificació de la proteïna del ZAP-70, primer amb tècniques d'immunofluorescència indirecta i actualment per citometria de flux (immunofluorescència directa) que ens permet veure l'expressió d'aquesta proteïna al citoplasma dels limfòcits B neoplàsics (CD19+CD5+).

Indicacions

A CatLab vàrem incorporar aquesta prova fa uns mesos i per a la seva determinació necessitem sang perifèrica amb EDTA K₃. Està indicat sol·licitar la prova a les LLC diagnosticades prèviament per citometria i el termini d'entrega del resultat és de 3 dies.

Metodologia

La tinció intracel·lular del ZAP-70 es realitza per un procediment manual amb el qual, un AcMo marcat amb un fluorocrom ens permet quantificar l'expressió antigènica del mateix i la seva lectura es fa per citometria de flux sempre comparant i tenint de referència una sang control sana a la qual li fem el mateix procediment en paral·lel fixant el llindar de negativitat a les cèl·lules B normals tenyides i discriminant l'expressió positiva de ZAP-70 als limfòcits T i cèls. NK.

Limitacions

Durant bastant temps s'ha pensat que els valors de ZAP-70 eren un factor pronòstic independent de la LLC i què eren estables i invariables en el temps. Ara hi ha publicacions que desmenteixen això i confirmen que alguns pacients pateixen variacions d'expressió de ZAP-70 al llarg de la malaltia. En qualsevol cas, aquestes dades s'han de tenir i sempre ens serviran per a conèixer millor la fisiologia de la malaltia.

Per altra banda, els resultats d'aquesta prova sempre s'han de relacionar amb la clínica i la citogenètica del cas. No tots els pacients amb un resultat elevat de ZAP-70 tenen un pronòstic més agressiu i no tots els valors de ZAP-70 baixos estan associats a bon pronòstic.

Bibliografia

1. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davies Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002, 99:1023-1029.
2. Hamblin AD, Hamblin TJ. Functional and prognostic role of ZAP-70 in CLL. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2005; 9:1165-1178.

3. Marti G, Orfao A, Goolsby C. ZAP-70 in CLL: Towards standardization of a biomarker for patient management: History of Clinical Cytometry Special Issue. *Cytometry Part B Clin Cytometry* 2006; 70B:197-200.
4. Poulain S, Benard C, Daudignon A, Le Baron F, Morel P, Duthilleul P. Is ZAP-70 expression stable over time in B chronic lymphocytic leukaemia? *Leukemia and Lymphoma*, 2007; 48: 1219-21.
5. Boelens J, Philippe J, Offner F. B-CLL cells from lymph nodes express higher ZAP-70 levels than B cells from peripheral blood. *Leuk Res* 2007; 31:719-20.
6. Cutrona G, Colombo M, Matis S, Reverberi D, Dono M, Tarantino V, Chiorazzi N, Ferrarini M. B lymphocytes in humans express ZAP-70 when activated in vivo. *Eur J Immunol*. 2006; 36:558-69.
7. Eva Giné, Antoni Martinez, Neus Villamor, Armando López-Guillermo, Mireia Camos, Daniel Martinez, Jordi Esteve, Xavier Calvo, Ana Muntañola, Pau Abrisqueta, Maria Rozman, Ciril Rozman, Francesc Bosch, Elias Campo and Emili Montserrat. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia (“accelerated” chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica*. 2010 September; 95(9): 1526–1533.

Judith Vidal

Responsable Citometria de flux

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 5041 / 616.26.48.91

jvidal@catlab.cat