









## ARTÍCULO ORIGINAL

# Variación en la expresión de CD20 en leucemias linfoblásticas agudas B en pacientes pediátricos y su impacto en el tratamiento

*Variation of CD20 expression in B Acute Lymphoblastic Leukemias in pediatric patients and its impact on treatment*

Ceres, Verónica Luján<sup>1</sup> \*; Vázquez, María Paula<sup>1</sup> ; Acosta, Daiana Andrea<sup>1</sup> ; González, María Isabel<sup>1</sup> ; Carrara, Carolina Alejandra<sup>1</sup> ; Tamburella, Florencia Raquel<sup>1</sup> ; Corominas, Ana<sup>1</sup> ; Venegas, María Belén<sup>1</sup> .

<sup>1</sup>Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas. El Palomar, Buenos Aires, Argentina.

\*Contacto: Ceres, Verónica Luján. Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas. Av. Presidente Arturo U. Illia s/n y Marconi Morón 386, B1684. El Palomar, Buenos Aires, Argentina; veronica\_ceres@hotmail.com

## Resumen

Introducción: El inmunofenotipo por citometría de flujo es útil al momento del diagnóstico de las leucemias linfoblásticas agudas, ya que permite definir la estirpe celular. La respuesta al tratamiento se monitorea al día 15 (D15) basándose en la cuantificación de blastos por citometría de flujo. Es importante evaluar la expresión de antígenos celulares, como el CD20, ya que su presencia permite la utilización de inmunoterapias en pacientes con leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B). Objetivo: Evaluar el efecto de la utilización de corticoides en la fase de inducción sobre la expresión del antígeno de superficie CD20 en pacientes con LLA-B al momento del diagnóstico y en el día 15 de su tratamiento. Materiales y métodos: Se reanalizaron los archivos al momento del diagnóstico y el día 15 del inmunofenotipo por citometría de flujo de 78 pacientes pediátricos. Se registraron los valores de expresión de CD20 en los blastos y en los linfocitos B normales. Se emplearon como pruebas estadísticas t de Student para distribuciones normales y test Mann-Whitney como método no paramétrico. Resultados: El 78 % de pacientes presentó aumento significativo del porcentaje de expresión de CD20 en blastos presentes al día 15 respecto del diagnóstico. El 37 % cambió su estatus de negativo a positivo para CD20 al día 15. Tanto la comparación de los parámetros *media* y *mediana de intensidad de fluorescencia* al diagnóstico y día 15 como sus valores normalizados demostraron diferencias estadísticamente significativas. Conclusión: Se observó que la expresión del CD20 al día 15 de tratamiento en los pacientes con LLA-B aumentó con respecto al diagnóstico, por lo que podrían convertirse en candidatos a inmunoterapia.

**Palabras clave:** citometría de flujo, leucemia, pediatría, oncohematología.

## Abstract

Introduction: Immunophenotyping by flow cytometry is useful to assign lineage to pathological cells in B acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). Monitoring of the therapeutic response on day 15 is based on the quantification of blasts by flow cytometry. The expression of cellular antigens, such as CD20, allows the possible use of immunotherapies in B-ALL patients. Objectives: To assess the effect of corticosteroids on the expression of CD20 surface antigen in B-ALL patients at diagnosis and on day 15 of the induction phase. Materials and methods: The immunophenotypic study by multiparametric flow cytometry was reanalyzed in 78 pediatric patients at diagnosis and on day 15. The expression of CD20 values were recorded both in blasts and normal B lymphocytes. A descriptive statistical approach was used and the comparisons were made using the Student's t test for normal distributions and the Mann-Whitney test as a non-parametric method. Results: In 78% of the patients, an increase in the percentage of expression in CD20 was observed in the blast cells present on day 15 compared to diagnosis. Besides, 37% of the patients changed their status from negative to positive for CD20 on day 15. Conclusions: The expression of CD20 on day 15 of the treatment in patients with B-ALL was increased versus its value at the moment of diagnosis and could thus become candidates for immunotherapy.

**Keywords:** flow cytometry, leukemia, pediatric, oncohematology.

## Introducción

Las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) son un grupo heterogéneo de enfermedades neoplásicas que resultan de la proliferación clonal de linfoblastos que pueden infiltrar médula ósea (MO), diferentes órganos y/o sistemas<sup>1</sup>. El diagnóstico de LLA se basa en la examinación citomorfológica de la MO, la sangre periférica (SP) y el líquido cefalorraquídeo (LCR), complementada con las técnicas de citometría de flujo y citogenética/biología molecular<sup>2</sup>.

El inmunofenotipo realizado por citometría de flujo multiparamétrica permite asignar linaje B o T a las células patológicas mediante el estudio de la expresión de antígenos de superficie e intracitoplasmáticos en el momento del diagnóstico.

El monitoreo de la respuesta al tratamiento se realiza al día 15 del inicio de la inducción y se basa en la cuantificación de los blastos por citometría de flujo<sup>2</sup>. A pesar de la mejora en los regímenes terapéuticos de niños y adolescentes con LLA-B, que han permitido alcanzar una sobrevida libre de eventos mayor del 90 %, aquellos pacientes que recaen o resultan refractarios a la quimioterapia constituyen un verdadero desafío<sup>3</sup>.

El avance en el conocimiento tanto de la biología de las neoplasias hematológicas como del rol que cumple el sistema inmune en el control de las mismas ha llevado al desarrollo y aprobación de terapias biológicas<sup>4</sup>. Probablemente, el ejemplo más destacable de éxito en el uso de inmunoterapias es el monoclonal anti-CD20 (rituximab) para el tratamiento de neoplasias linfoides B<sup>4</sup>.

El rituximab es un anticuerpo monoclonal humano/murino quimérico anti-CD20 que se une con alta afinidad y especificidad a dicha proteína transmembrana de los linfocitos B tanto normales como patológicos<sup>5</sup>.

El rituximab se une al CD20 expresado en las células B neoplásicas a través de la porción Fc e induce la eliminación de dichas células mediante cuatro mecanismos: citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente

de anticuerpos, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y efectos antitumorales directos mediante apoptosis u otra vía de muerte celular<sup>5</sup>. El CD20 se expresa en casi el 45 % de los blastos en el momento del diagnóstico y aumenta su expresión en aproximadamente el 74 % en el día 15<sup>6</sup>.

Las inmunoterapias tienen la ventaja de ser altamente específicas, ya que reducen la toxicidad producida a los tejidos normales, comparadas con las drogas quimioterápicas tradicionales<sup>4</sup>. Desde su aprobación hace 20 años, la administración intravenosa de rituximab ha revolucionado el tratamiento de las neoplasias linfoides B. Diversos ensayos clínicos han demostrado que el uso de inmunoterapias anti-CD20 no solo prolonga el tiempo de progresión de la enfermedad, sino también extiende la sobrevida global<sup>5</sup>.

Según el protocolo internacional de tratamiento ALLIC-BFM 2022, todos los pacientes pediátricos con LLA-B, independientemente de la categoría de riesgo a la que pertenezcan, reciben corticoides (prednisona/prednisolona) en la fase de inducción<sup>6</sup>. Marks y col. demostraron que la exposición *in vitro* de los blastos linfoides B a dexametasona generaba un incremento en la expresión de CD20 en 6 de 8 pacientes estudiados<sup>7</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar cómo la utilización de corticoides en la fase de inducción influye en la expresión del antígeno de superficie CD20 en pacientes con LLA-B al momento del diagnóstico (Dx) y en el día 15 (D15) de su tratamiento.

## Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio de tipo retrospectivo, observacional.

## Análisis de casos

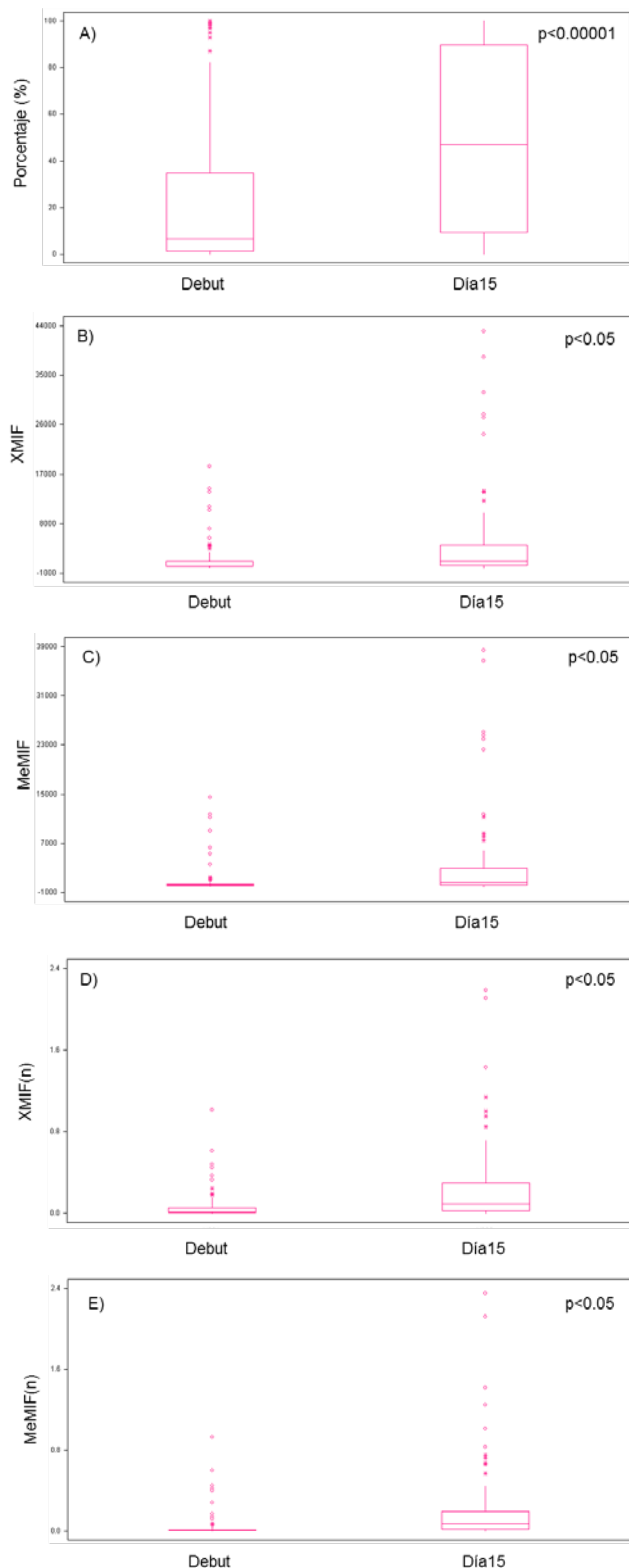
El estudio inmunofenotípico se realizó mediante la técnica de citometría de flujo multiparamétrica en médula ósea anticoagulada con EDTA de 78 pacientes pediátricos de en-

**Tabla I.** Panel de 8 colores para la inmunofenotipificación de leucemias linfoblásticas agudas B.

Leucemia linfoblástica aguda B					
Fluorocromo	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
FITC	CD81	CD58	cyIgM	nuTdT	CD15+CD65
PE	CD66c+CD123	CD73+CD304	CD33	CD13	NG2
PerCPCy5.5	CD34	CD34	CD34	CD34	CD34
PE-Cy7	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19
APC	CD10	CD10	IgM/CD117	CD22	CD123
APC-H7	CD38	CD71	Lambda	CD24	CD81
Horizon V450	CD20	CD20	Kappa		CD21
Horizon V500c	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45

► FITC, *fluorescein isothiocyanate*; PE, *phycoerythrin*; PerCPCy5.5, *peridinin-chlorophyll-protein.cyanin5.5*; PE-Cy7, *phycoerythrin-cyanin7*; APC, *Allophycocyanin*; APC-H7, *allophycocyanin H7*.

**Figura 1.** Variación en la expresión de CD20 en células patológicas al debut y D15.



► A) Porcentaje de positividad para CD20; B) Media de intensidad de fluorescencia de CD20; C) Mediana de intensidad de fluorescencia CD20; D) Media normalizada de intensidad de fluorescencia CD20; E) Mediana normalizada de intensidad de fluorescencia de CD20.

tre 0 y 19 años, (47 niños y 31 niñas) recibidos desde enero de 2017 a noviembre de 2022, tratados según pautas de ALLIC BFM/GATLA 2010.

Se utilizaron protocolos internacionales estandarizados con paneles de ocho fluorescencias (EuroFlow)<sup>8</sup>. En todos los casos, el clon utilizado para evaluar el antígeno CD20 fue L27 conjugado con fluorocromo V450 (Tabla 1). La adquisición y análisis de los resultados se realizó en un citómetro de flujo FACSCanto II haciendo uso de los *softwares* FACSDiva™ (Becton Dickinson) e Infinicyt™ (Cytognos).

Se reanalizaron los archivos del Dx y D15, se registraron los valores de expresión de CD20 en porcentaje (%), media de la intensidad de fluorescencia (XMIF) y mediana de la intensidad de fluorescencia (MeMIF) tanto en los blastos como en los linfocitos B normales (LB). Además, se calculó la relación entre MeMIF de blastos y LB y se estableció la MeMIF normalizada.

Se realizó un abordaje estadístico-descriptivo. Las comparaciones fueron realizadas utilizando t de Student para distribuciones normales y test de Mann-Whitney como método no paramétrico, estableciendo significancia estadística con  $p < 0.05$ , utilizando el programa SPSS Statistics 7.

## Resultados

Se compararon los resultados obtenidos al reanalizar los archivos del inmunofenotipo por citometría de flujo de 78 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA-B, en tratamiento bajo las pautas de ALLIC BFM/GATLA 2010, tanto al debut como al D15 de inicio del tratamiento. El 83 % de los casos correspondía a LLA-B común, 6 %, a LLA-B pro B y 9 %, a LLA-B pre B.

De los 78 pacientes evaluados, 11 fueron excluidos del análisis debido a la ausencia de células patológicas al D15. Por otra parte, 15 de los pacientes no tuvieron expresión de CD20 al momento del Dx ni al D15.

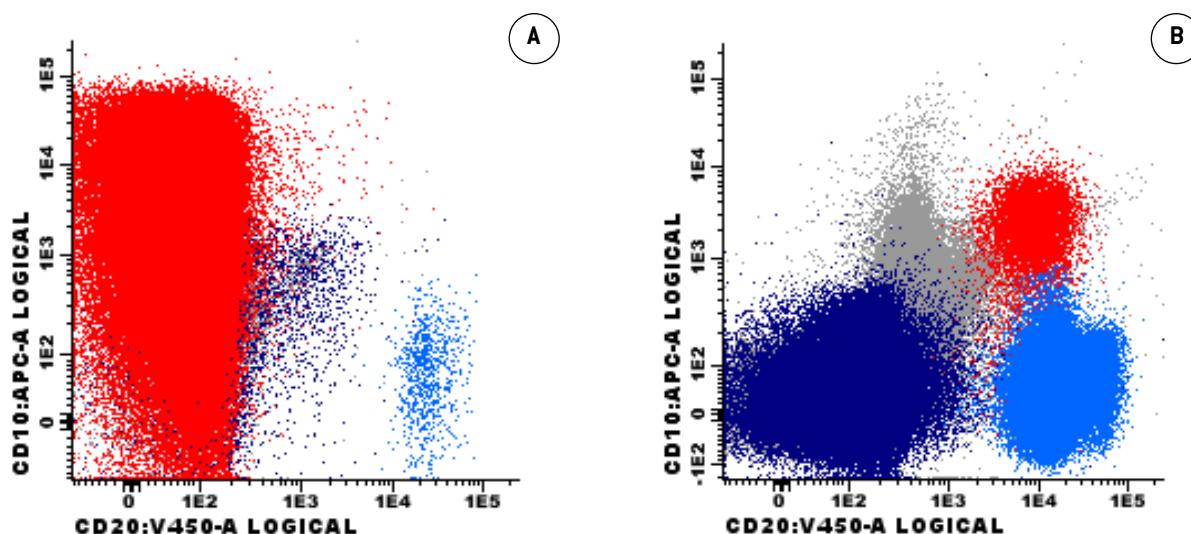
En el 75 % de los pacientes (39/52), se observó un aumento del porcentaje de expresión de CD20 en los blastos presentes en el D15 respecto del Dx, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,00001$ ) (Figura 1A).

Además, se realizó la comparación de los parámetros XMIF y MeMIF en ambos momentos de la enfermedad, así

**Tabla II.** Promedio de XMIF, MeMIF, XMIF(n) y MeMIF(n) de expresión de CD20 en las células patológicas al debut y día 15.

	XMIF	MeMIF	XMIF (n)	MeMIF (n)
Debut	1733	1040	0,07	0,06
D15	4721	3747	0,26	0,24
p	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

► XMIF, media de intensidad de fluorescencia; MeMIF, mediana de intensidad de fluorescencia; XMIF(n), media de intensidad de fluorescencia normalizada; MeMIF(n), mediana de intensidad de fluorescencia normalizada; D15, día 15.

**Figura 2.** Expresión de CD20 al Dx y D15 en LLA-B en blastos [rojo] y linfocitos B normales [celeste].

► A) Expresión de CD20+ al Dx: 0,2 % (IMF blastos: 83, IMF linfocitos B: 26700); B) Expresión de CD20+ D15: 98 %, (IMF blastos: 9911, IMF linfocitos B: 17071).

como también, la de sus valores normalizados, que demostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (Tabla II) (Figura 1 B-E).

Entre los pacientes que mostraron un incremento en el porcentaje de expresión de CD20 al D15, el 40% (21/52) cambió su estatus de negativo al momento del Dx (<10%) a positivo para CD20 al D15. En la figura 2, se muestra como ejemplo el cambio en el porcentaje de expresión de CD20 al Dx y al D15 de tratamiento observado en uno de los pacientes evaluados. (Figura 2 A-B).

### Discusión

En este estudio, se observó que la expresión de CD20 al D15 de tratamiento en los pacientes con LLA-B aumentó en un 75% de los casos con respecto al Dx. Esto se vio reflejado tanto en los valores de porcentaje de expresión como en la comparación de medias y medianas de intensidad de fluorescencia y en la relación normalizada de fluorescencia del CD20. No se observaron diferencias en la información obtenida al utilizar los distintos parámetros.

Además, se evidenció en la mencionada población que el 40% de los pacientes cuya expresión de CD20 al D15 se había incrementado respecto del porcentaje hallado al momento del diagnóstico modificó su estatus de negativo a positivo para CD20. Dicho cambio les permite a los pacientes convertirse en candidatos a inmunoterapia, como lo es el tratamiento con rituximab<sup>6</sup>.

Los ensayos clínicos que se han llevado a cabo durante los últimos 20 años han demostrado que el uso de rituximab no solo prolonga el tiempo de progresión de la enfermedad, sino también el de la supervivencia general del paciente

con neoplasias hematológicas de células B. Debido al éxito y eficacia de su uso, se han estado desarrollando otros anticuerpos monoclonales anti-CD20 (obinutuzumab, ofatumumab, veltuzumab y ocrelizumab)<sup>5</sup>.

Dworzak y col. estudiaron 306 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA-B tratados según el protocolo internacional AIEOP-BFM-ALL 2000, los cuales recibieron durante el período de inducción prednisolona oral durante los 7 días que dura dicha fase. Observaron un incremento en la expresión de CD20 al D15 respecto del Dx del 25% al 47%, respectivamente. Al evaluar la intensidad de fluorescencia de CD20 en las células patológicas, demostraron un aumento de 14 a 45 MFI posterior a la inducción<sup>9</sup>.

Por lo anteriormente descrito, es de suma importancia la evaluación de la intensidad de expresión de CD20 en las células patológicas y el reporte del porcentaje de expresión de CD20 al D15, ya que se ha demostrado que la utilización de corticoides durante el período de inducción incrementa la expresión de dicho antígeno en aproximadamente la mitad de los pacientes convirtiéndolos en candidatos para la utilización de inmunoterapia y mejorando su pronóstico.

Según el protocolo internacional de tratamiento ALLIC-BFM 2022, se considera positivo un valor de expresión de CD20  $\geq 10\%$  en los blastos residuales en una muestra de M0 al D15 con 300000 células nucleadas/eventos adquiridos. Aquellos pacientes que presenten un valor positivo de expresión para CD20 al D15 podrían convertirse en candidatos para el uso de rituximab<sup>6</sup>.

### Conflictos de interés

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

## Referencias bibliográficas

1. Sociedad Argentina de Hematología. Guías de diagnóstico y tratamiento. Buenos Aires: SAH; 2021.
2. Grupo Argentino de Tratamiento de la Leucemia Aguda (G.A.T.L.A.). Estudio del I-BFM-SG para el tratamiento de niños con leucemia linfoblástica aguda sin tratamiento previo. Buenos Aires. 2010.
3. Bonifant CL, Tasian SK. The future of cellular immunotherapy for childhood leukemia. *Curr Opin Pediatr* 2020;32(1):13-25. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000866
4. Boyiadzis M, Bishop MR, Abonour R, Anderson KC, Ansell SM, Avigan D, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of hematologic malignancies: multiple myeloma, lymphoma, and acute leukemia. *J Immunother Cancer*. 2016;4:90. DOI: 10.1186/s40425-016-0188-z
5. Salles G, Barrett M, Foà R, Maurer J, O'Brien S, Valente N, et al. Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Adv. Ther.* 2017; 34(10): 2232-73. DOI: 10.1007/s12325-017-0612-x
6. ALLIC-BFM 2022. Estudio Aleatorizado del I-BFM-SG para el Manejo y Tratamiento de Niños con Leucemia Linfoblástica Aguda no B-madura.
7. Marks DI, Kirkwood AA, Rowntree CJ, Aguiar M, Bailey KE, Beaton B, et al. Addition of four doses of rituximab to standard induction chemotherapy in adult patients with precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia (UKALL14): a phase 3, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Haematol.* 2022;9(4):e-262.75. DOI: 10.1016/S2352-3026(22)00038-2
8. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2017;129(3):347-57. DOI: 10.1182/blood-2016-07-726307
9. Dworzak MN, Schumich A, Printz D, Pötschger U, Husak Z, Attarbaschi A, et al. CD20 up-regulation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction treatment: setting the stage for anti-CD20 directed immunotherapy. *Blood* 2008;112(10):3982-8. DOI: 10.1182/blood-2008-06-164129



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución -No Comercia- Compartir Igual 4.0 Internacional - Permite compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (remezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que: se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.