

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA DE ESPECIALIDAD ESTRUCTURA DE HEMATOLOGÍA



TRABAJO FINAL DE LA ESPECIALIDAD ESTRUCTURADA DE HEMATOLOGÍA

***“Relación entre el recuento de sombras de Gümprecht con la evolución del paciente con diagnóstico de Leucemia Linfática Crónica”***

**Postulante: Walter Sergio Saez, Bioquímico**

**Directora del Proyecto: María I. Balseiro de Minoldo, Bioquímica Especialista en Hematología**

***“Relación entre el recuento de  
sombras de Gümprrecht con la  
evolución del paciente con  
diagnóstico de Leucemia  
Linfática Crónica”***

***Relación entre el recuento de sombras de  
Gümprecht con la evolución del paciente  
con diagnóstico de Leucemia Linfática  
Crónica***

Autores

**Walter Sergio Saez, Bioquímico**

**María I. Balseiro de Minoldo, Bioquímica Especialista en Hematología**

**Servicio de Hematología y Oncología Clínica, Sanatorio Allende, Córdoba-  
Argentina**

**Servicio de Oncohematología y Hemostasia, Clínica Privada Velez Sarfield,  
Córdoba -Argentina**

**Walter Sergio Saez, email: [sergioalt@hotmail.com](mailto:sergioalt@hotmail.com)**

**Abreviaturas:**

**SG: Sombras de Gumprecht**

**SLT: Sobrevida libre de tratamiento**

**LDH: Lactato deshidrogenasa**

## **Resumen**

**Introducción:** La Leucemia Linfática Crónica(LLC) es una enfermedad caracterizada por la proliferación clonal de linfocitos pequeños inmunoincompetentes, aspecto maduro y fenotipo B. Se han identificado distintos factores pronósticos que permiten estratificar a los pacientes en categorías de riesgo, entre ellos el recuento de sombras de Gümprrecht(SG).

**Objetivo:** Evaluar el impacto del recuento de SG sobre la sobrevida libre de tratamiento(SLT), y su relación con factores pronósticos bien definidos para LLC

**Materiales y Métodos:** Se analizaron 41 pacientes con diagnóstico de LLC entre 1991 y 2011; mediana de seguimiento de 5.5 años. El recuento de SG se realizó en dos extendidos de sangre periférica sin anticoagulante confeccionados manualmente en el momento de la extracción, estableciéndose como valor de corte 30%. Los factores pronóstico analizados se recabaron de la historia clínica de cada paciente.

**Resultados:** El 58.5% de los pacientes correspondió al estadio 0 de Rai y 39 % al estadio I. El tiempo de duplicación linfocitaria y ZAP-70 fueron estadísticamente significativos, p: 0,0023 y 0,0032 respectivamente. La media del % de SG fue de 31% (0,5-132) y demostró que efectivamente puede ser utilizado como factor pronóstico en pacientes con LLC(p: 0,0052). La mediana de SLT fue de 10 años o más en el 90 % del grupo de pacientes con SG >30% (p: 0.006, Hazard ratio: 0.1598).

**Conclusión:** El % SG resultó un factor pronóstico sencillo de realizar y un % > 30% predijo un mejor pronóstico para los pacientes en estadios tempranos de la enfermedad impactando favorablemente en la SLT.

## **Abstract**

**Introduction:** Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a disease characterized by clonal proliferation of small lymphocytes immunoincompetent mature appearance and phenotype B. Have been identified prognostic factors that allow to stratify patients into risk categories, including Smudge cells counts(SC).

**Objective:** To evaluate the impact of SC count on treatment-free survival (SLT), and its relation to well-defined prognostic factors for CLL

**Materials and Methods:** We analyzed 41 patients with a diagnosis of CLL between 1991 and 2011, median follow-up of 5.5 years. SG count was performed on two peripheral blood smears without anticoagulant made manually at the time of extraction, setting a cut-off 30%. The prognostic factors analyzed were collected from each patient's medical history.

**Results:** 58.5% of patients corresponded to Rai stage 0 and 39% at stage I. Lymphocyte doubling time and ZAP-70 were statistically significant, p: 0.0023 and 0.0032 respectively. The mean% OS was 31% (0.5 to 132) and demonstrated that it can effectively be used as a prognostic factor in patients with CLL (p: 0.0052). The SLT median was 10 years or more in 90% of the group of patients with SG> 30% (p = 0.006, Hazard ratio: 0.1598).

**Conclusion:** The% SC was a prognostic factor easy to do and %> 30% predicted a better prognosis for patients in early stages of the disease impacting positively on the SLT.

## **Introducción**

La Leucemia Linfática Crónica (LLC) es una enfermedad caracterizada por la proliferación clonal de linfocitos inmunoincompetentes de tamaño pequeño, aspecto maduro y fenotipo B (CD5+, CD19+, CD23+, CD200+, y expresión débil de CD 20, CD79b, e inmunoglobulinas de superficie IgM, IgD, con restricción para cadenas livianas  $\kappa$  o  $\lambda$ )[1-2]. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad se deben a la infiltración progresiva de la Médula Ósea (MO), ganglios linfáticos y otros tejidos, así como a las alteraciones inmunológicas que acompañan a la enfermedad. La epidemiología de la LLC varía en todo el mundo. Es más frecuente en varones (2:1). La edad media al diagnóstico es de 65 años y su incidencia aumenta progresivamente con la edad [3].

La etiología y el origen de la célula LLC aún no se conoce, sin embargo el factor de riesgo más importante son los antecedentes familiares. Del 8 al 10% de pacientes diagnosticados tienen historia familiar de LLC y, aunque son raras, han sido descritas formas familiares[4]. En la gran mayoría de los pacientes no se conoce predisposición subyacente y la progresión de la enfermedad se produce por mutaciones genéticas adquiridas [5].

Dentro de los criterios diagnósticos actualizados en el Taller Internacional de LLC se incluye la presencia de linfocitos B clonales  $>5000/\mu\text{l}$  en sangre periférica por un período no menor a tres meses. En ausencia de citopenias, linfadenopatías, u organomegalia, la presencia de  $<5,000/\mu\text{l}$  linfocitos B clonales se define como Linfocitosis Monoclonal de células B, una entidad que puede progresar a LLC franca a un ritmo de aproximadamente 1 a 2% por año [6].

Al diagnóstico, aproximadamente el 25-50% de los pacientes son asintomáticos y éste se efectúa con frecuencia a partir de la presencia de linfocitosis en análisis de rutina. El curso clínico de esta enfermedad es muy variable, mientras algunos pacientes fallecen pocos meses después del diagnóstico, otros no ven modificada su expectativa de vida, siendo la mediana de supervivencia de 10 años [7]. Reconociendo esta heterogeneidad, Rai y col. y Binet y col. [8] establecieron sistemas de estadificación para la evaluación de la extensión de la enfermedad, estos sistemas son pilares importantes en las decisiones relativas al seguimiento y el tratamiento médico, pero no predicen el curso de la enfermedad en los pacientes diagnosticados en las primeras etapas de la misma.

Muchas investigaciones han identificado distintos factores pronóstico que permiten estratificar a los pacientes en categorías de riesgo, como por ejemplo, el grado de infiltración de la médula ósea, la cifra de linfocitos en sangre periférica, el tiempo de duplicación linfocitario, las alteraciones citogenéticas, la  $\beta$ 2-microglobulina, la timidina kinasa, CD23 soluble, el estado mutacional de IgHV, expresión de CD38 y ZAP70 y el recuento de Sombras de Gümprrecht (SG) en sangre periférica[7, 9-10].

En 1896 F. Gümprrecht describe la presencia de “sombras celulares” en extendidos de sangre periférica de pacientes con LLC. Inicialmente su formación fue considerada como un artefacto sin importancia en la preparación de los extendidos, sin embargo investigaciones recientes demostraron que se correlaciona inversamente con la expresión de vimentina. La vimentina es una proteína del citoesqueleto de los linfocitos cuya expresión aumentada estaría asociada a una reducción del tiempo al inicio del tratamiento, en las primeras

etapas de de la enfermedad. Esta proteína aumentaría la rigidez de la membrana de los linfocitos patológicos, otorgándole mayor resistencia a la ruptura cuando se realiza el extendido [10-11].

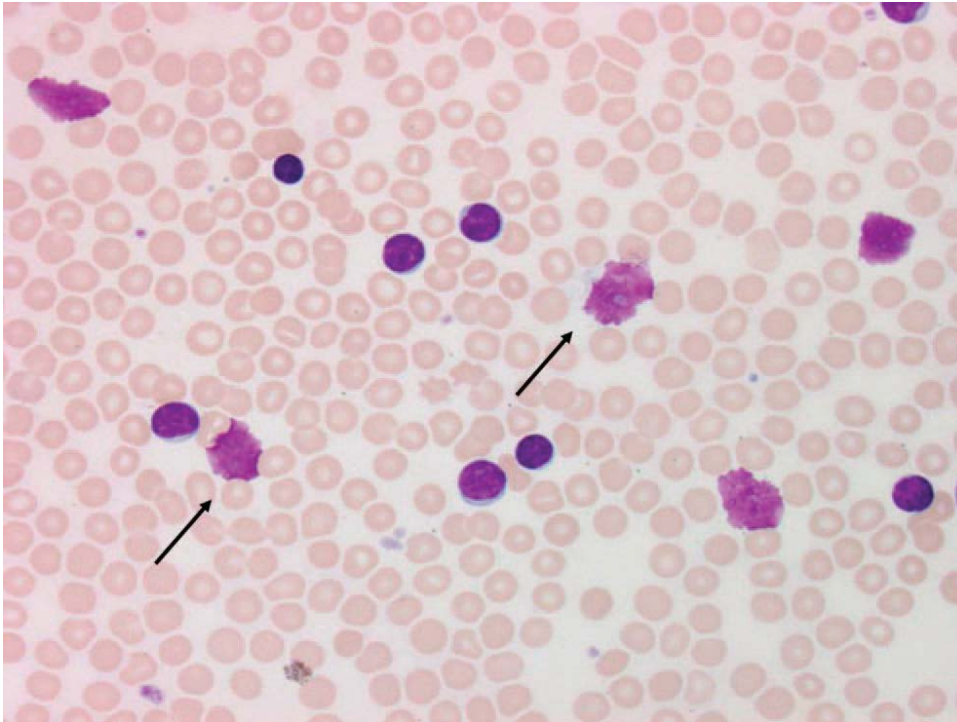
En este trabajo evaluamos el impacto del porcentaje de SG sobre la sobrevida libre de tratamiento (SLT) en un grupo de pacientes con estadios principalmente tempranos de la enfermedad e investigamos la relación entre el porcentaje de SG y otros factores pronóstico bien definidos en LLC.

### **Materiales y Métodos**

*Pacientes:* Se realizó un trabajo retrospectivo observacional, incluyendo 41 pacientes con diagnóstico de LLC en estadios clínicos tempranos e intermedios (0 y I, clasificación de Rai), 35 pertenecientes al Servicio de Hematología y Oncología Clínica del Sanatorio Allende y 6 pertenecientes al Servicio de Oncohematología y Hemostasia de la Clínica Privada Vélez Sarsfield, ambos de la ciudad de Córdoba, Argentina. Los pacientes fueron diagnosticados entre abril de 1991 y septiembre de 2011 y la mediana de seguimiento fue de 5,5 años (rango 0,3-18,5).

*Examen del Extendido de Sangre Periférica:* El recuento de SG, definidas como células rotas, sin citoplasma intacto y disgregación de la membrana nuclear (Figura 1), se realizó en extendidos de sangre periférica al diagnóstico o seguimiento. Los mismos fueron confeccionados manualmente sobre portaobjetos, utilizando sangre sin anticoagulante y se colorearon según la técnica de May-Grünwald Giemsa. El recuento, realizado siempre por el mismo operador, se efectuó sobre un total de 200 linfocitos y SG, utilizando un microscopio óptico y se expresó como porcentaje del total de linfocitos. Los recuentos celulares se realizaron en contadores hematológicos Coulter ST500 y CellDyn-3500.





**Figura 1: Sombras de Gümprecht (SG) en frotis de sangre periférica de paciente con LLC.** Las flechas muestran ejemplos de SG. El porcentaje de SG se estimó contando 200 linfocitos y / o SG; el número de SG se divide por el número total de células contadas (SG + linfocitos intactos) y se multiplica por 100%.

*Factores Pronósticos:* Fueron obtenidos de la historia clínica de cada paciente, se evaluó, edad, sexo, estadio de Rai, patrón de infiltración medular, morfología linfocitaria, linfocitos absolutos, tiempo de duplicación linfocitaria, niveles de lactato deshidrogenasa (LDH),  $\beta 2$  microglobulina, expresión de ZAP-70 (valor de corte 20%) y CD38 (valor de corte 30%), estos dos últimos parámetros estimados por citometría de flujo.

*Análisis Estadístico:* Se dividieron los pacientes en dos grupos de acuerdo al recuento de SG (grupo A:  $\geq 30\%$ , grupo B:  $< 30\%$ ) según lo establecido por Nowakowski y col.[10-11]. La SLT se estimó por el método de Kaplan-Meier y la diferencia entre los dos grupos por Log-rank test. El análisis univariado y

multivariado se realizó utilizando el modelo de Cox de regresión de riesgos proporcionales.

## **Resultados**

Se incluyeron 41 pacientes, 23 (56%) de sexo masculino, 18 (44%) de sexo femenino. La mediana de edad fue de 65 años (rango 44-84). La mayoría de los pacientes, 58.5% correspondían a estadio 0 de Rai y 39% a estadio I, un solo paciente no se estratificó por datos insuficientes en la historia clínica. Las características clínicas se detallan en la Tabla 1.

<b>Características Clínicas</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	23	56
Femenino	18	44
<b>Edad</b>		
Mediana	65 años (44-84)	
<b>Estadio de RAI *</b>		
E0	24	58.5
E1	16	39
<b>Patrón de Infiltración Difuso</b>	7/41	17
<b>Morfología Atípica</b>	1/41	2.4
<b>Leucocitos (n:39)</b>		
Mediana	24 x 10 <sup>9</sup> L (8-246,8)	
<b>Linfocitos (n:39)</b>		
Mediana	16929 x 10 <sup>9</sup> L (5100-244332)	
<b>Tpo. de duplicación linfocitaria &gt;6 meses</b>	9/35	25.7
<b>LDH (n:27)</b>		
Mediana	355,0 U/L(106-1003)	

**Tabla 1: Características Clínicas de los 41 pacientes**

\* Un paciente no se estratificó por datos insuficientes en la historia clínica

**LDH:** Láctico Deshidrogenasa

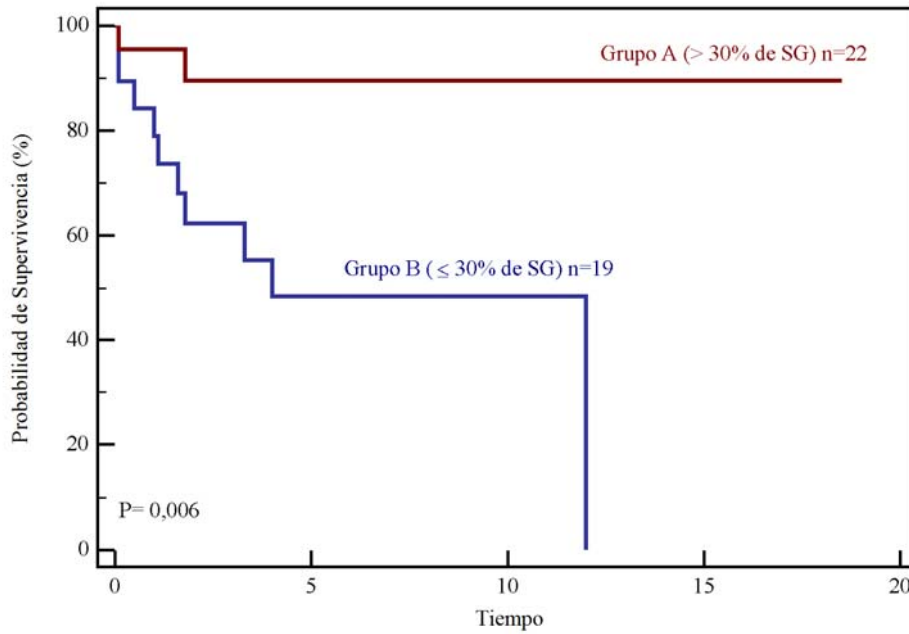
La mediana de seguimiento desde el diagnóstico fue de 5,5 años (rango 0,3-18,5), y surgió una sola muerte durante el seguimiento. Doce pacientes fueron tratados (29%) durante el seguimiento con una mediana libre de tratamiento de 1,3 años (rango 0,1-12).

En el total de pacientes (n=41) la mediana del porcentaje de SG fue de 31% (rango 0,5-132), mientras que en el grupo A (> 30% de SG), con 22 pacientes fue de 44,7% (rango 31-132), y en el grupo B ( $\leq$  30% de SG), con 19 pacientes fue de 12% (rango 0,5-26).

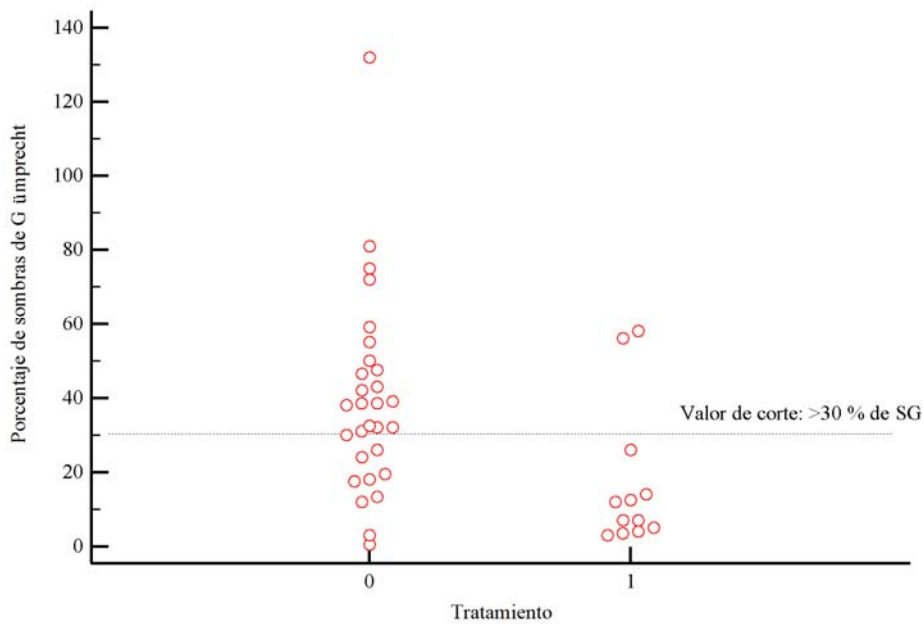
### ***Relación entre Sombras de Gümprecht y Sobrevida Libre de Tratamiento***

Con respecto al impacto del porcentaje de SG como factor pronóstico en pacientes que padecen LLC, cuando se analizó la SLT en los grupos ya definidos, A y B, estos presentaron una diferencia estadísticamente significativa (p: 0,006) (Figura 2). Siendo la SLT de 10 años o más en el 90% del grupo A, mientras que en el grupo B resultó significativamente menor, encontrando una mediana de 4 años. Cuando se analizó el grupo de pacientes que requirió tratamiento, se observó que presentaban una mediana de %SG de 9,5%, siendo ésta menor al 38% del grupo de pacientes que durante el tiempo de seguimiento no requirió (Figura 3).

Por lo tanto en nuestro grupo de pacientes el valor de corte 30% para las SG permitió separar 2 grupos con SLT muy diferentes y cuando se realizó el análisis univariado el % de SG demostró que efectivamente puede ser utilizado como factor pronóstico en esta enfermedad (p: 0,0052).



**Figura 2: SLT de acuerdo al porcentaje de SG.** kaplan-Meier que estima la SLT en base al porcentaje de SG, la SLT estimada en 10 años o más en el 90% del grupo A, mientras que el grupo B presentó una mediana 4 años (p: 0.006, Hazard ratio: 0.1598, IC 95%: 0.05117-0.4990).



**Figura 3: Distribución del % de SG en los 41 pacientes con y sin tratamiento.** Grupo A, 2 pacientes requirieron tratamiento, mientras que en el grupo B fueron 10.

(1): Realizó tratamiento n=12, mediana= 9.5 %. (0): No realizó tratamiento n=29, mediana=38%.

### ***Sobrevida Global y Sombras de Gümprrecht***

Al analizar la sobrevida global (SG) en cada grupo (A y B) de acuerdo con el %SG no se observó diferencia significativa entre ambos, siendo el valor de  $p > 0.05$  ( $p: 0,1517$ ) y el análisis univariado tampoco mostró un valor estadísticamente significativo.

### ***Análisis de otros factores pronósticos***

Cuando se estudiaron aquellos factores pronósticos tradicionales dentro de nuestro grupo de pacientes el análisis univariado para la expresión de CD38, niveles de LDH y  $\beta 2$  microglobulina resultaron no significativos ( $p: 0,1563$ ), ( $p: 0,1441$ ), ( $p: 0,9673$ ) respectivamente, en cambio la expresión de ZAP-70 y el tiempo de duplicación linfocitaria si lo fueron ( $p: 0,0032$ ), ( $p: 0,0023$ ) respectivamente.

### **Discusión**

En los pacientes con LLC la presencia de SG es inversamente proporcional a la expresión de vimentina. Esta proteína está involucrada en señales de traducción y activación celular a nivel fisiológico y patológico. La vimentina es una proteína que forma parte del citoesqueleto de los linfocitos, aumentando su expresión en los linfocitos patológicos, otorgándole mayor resistencia a la ruptura cuando se realiza el extendido [12-13]. Así mismo se demostró que la expresión de vimentina se condice con un pronóstico adverso en pacientes con tumores sólidos [14-15].

Dada la relación inversa entre el % de SG y la expresión de vimentina, Nowakowski y col demostraron que el % de SG es un factor pronóstico en pacientes con diagnóstico de LLC[10].

En nuestro estudio pudimos demostrar, también, que el porcentaje de SG es un factor pronóstico, donde un bajo porcentaje de SG se condice con una menor SLT. Pero, cuando se analizó la sobrevida global, el % de SG no influyó significativamente ( $p>0,05$ ), esto podría atribuirse al reducido número de pacientes evaluados, y que el período de seguimiento no fue lo suficientemente prolongado, habiendo fallecido solo uno de los pacientes.

En la evaluación de otros factores pronóstico, la expresión de ZAP-70 y el tiempo de duplicación linfocitaria fueron significativos en la población estudiada, tal como lo reportado en trabajos previos [6, 16-18]. En cambio, los marcadores séricos como la LDH,  $\beta 2$  microglobulina y la expresión de CD38 no fueron estadísticamente significativos; esto podría deberse al escaso número de pacientes en los que se pudo recabar estos parámetros de la historia clínica.

Debido a la reconocida heterogeneidad clínica dentro de cada estadio de la enfermedad, existe un continuo esfuerzo por encontrar nuevos factores pronóstico que permitan identificar aquellos pacientes que se beneficiarán con estrategias de tratamiento tempranas y/o más agresivas. A pesar del progreso en este campo, muchos pacientes tienen acceso limitado a muchas de las pruebas de laboratorio, dado que requieren instrumentos muy sofisticados, gran experiencia técnica y son costosos de realizar. Además, es necesario un esfuerzo considerable para garantizar reproducibilidad entre los distintos laboratorios. En cambio, la practicidad, el bajo costo y accesibilidad para realizar el recuento de SG, coloca a este factor pronóstico en una posición relevante. Además el % de SG puede ser determinado retrospectivamente en aquellos que cuenten con un preparado realizado al diagnóstico correctamente archivado, o determinado en el curso del

seguimiento [10-11]. Es de esperar que el estudio de nuevos factores pronóstico ofrezca al paciente con LLC una proyección individual sobre el curso clínico de su enfermedad.

En conclusión el % SG resultó un factor pronóstico sencillo de realizar y un % > 30% predijo un mejor pronóstico para los pacientes en estadios tempranos de la enfermedad impactando favorablemente en la SLT. Se correlacionó además con la expresión de ZAP-70 y el tiempo de duplicación linfocitaria.

Estudios futuros del citoesqueleto de las células LLC podrían esclarecer la biología de la enfermedad y hallar nuevos agentes terapéuticos.

## **Bibliografía**

1. Matutes, E., et al., *The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL*. *Leukemia*. 8(10): 1640-1645, 1994.
2. Ternynck, T., et al., *Comparison of Normal and CLL Lymphocyte Surface Ig Determinants Using Peroxidase-labeled Antibodies. I. Detection and Quantitation of Light Chain Determinants*. *Blood*. 43(6): 789-795, 1974.
3. Sans Sabrafen J., B.R.C., Vives Corrons J.L., *Leucemia Linfática Crónica, Hematología Clínica. Quinta ed. Madrid, Elsevier* 2006. p: 491 – 500.
4. Lanasa, M.C., *Novel Insights into the Biology of CLL*. *Hematology*. 2010(1):70-76, 2010.
5. Goldin, L., S. Slager, and N. Caporaso, *Familial chronic lymphocytic leukemia*. *Curr Opin Hematol*. 17(4): 350-355, 2010.
6. Hallek, M., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines*. *Blood*. 111(12): 5446-5456, 2008.
7. Damle, R.N., et al., *Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Blood*. 94(6): 1840-1847, 1999.
8. Binet, J., et al., *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*. *Cancer*. 48(1): 198-206, 1981.
9. Schroeder, H. and G. Dighiero, *The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire*. *Immunol Today*. 15(6): 288-94, 1994.
10. Nowakowski, G.S., et al., *Percentage of Smudge Cells on Routine Blood Smear Predicts Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia*. *J. Clin. Oncol.* 27(11): 1844-1849, 2009.
11. Nowakowski, G., et al., *Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a universally available prognostic test*. *Mayo Clin Proc*. 82(4): 449-53, 2007.
12. Brown, M.J., et al., *Rigidity of Circulating Lymphocytes Is Primarily Conferred by Vimentin Intermediate Filaments*. *J. Immunol.* 166(11): 6640-6646, 2001.
13. Ivaska, J., et al., *Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling*. *Exp Cell Res*. 313(10): 2050-2062, 2007.
14. Singh, S., et al., *Overexpression of Vimentin: Role in the Invasive Phenotype in an Androgen-independent Model of Prostate Cancer*. *Cancer Res.* 63(9): 2306-2311, 2003.
15. Thomas, P.A., et al., *Association between Keratin and Vimentin Expression, Malignant Phenotype, and Survival in Postmenopausal Breast Cancer Patients*. *Clin. Cancer Res.* 5(10): 2698-2703, 1999.
16. Rassenti, L.Z., et al., *Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*. 112(5): 1923-1930, 2008.
17. Sarmiento, M., et al., *[Evolution of chronic lymphocytic leukemia: predictive value of immunophenotype, soluble CD23 and morphology]*. *Medicina (B Aires)*. 62(4): 305-12, 2002.
18. Chiorazzi, N., K. Rai, and M. Ferrarini, *Chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*. 352(8): 804-15, 2005.