

Leucemia agresiva de células *natural killer*

Aggressive natural killer cell leukaemia

Auat M¹, Verdie J³, Halperin N¹, Cabral C², Altube A¹

¹ Laboratorio de Citometría de Flujo.

² Departamento de Patología.

^{1,3} División Hematología. Hospital de Clínicas "José de San Martín".

Universidad de Buenos Aires.

amaltube@hotmail.com

Fecha recepción: 25/8/2021

Fecha aprobación: 15/12/2021



CASO CLÍNICO

HEMATOLOGÍA

Volumen 25 n° 3: 72-78

Septiembre - Diciembre 2021

Palabras claves: células NK, citometría de flujo, inmunofenotipo, leucemia agresiva de células NK.

Keywords: NK cells, flow cytometry, immunophenotype, aggressive NK cell leukemia.

Resumen

Las células citotóxicas naturales (*natural killer*, NK) son células linfoides del sistema inmune innato. La persistencia de un estímulo antigénico puede llevarlas a un estado de célula exhausta y la acumulación de mutaciones puede transformarlas en células malignas. La "leucemia agresiva de células NK" (*aggressive NK cell leukaemia*, ANKL) es una entidad originada por estas células transformadas. Presentamos aquí un caso clínico de ANKL y una revisión sobre el inmunofenotipo de las células NK.

Abstract

Natural cytotoxic cells (*natural killer*, NK) are lymphoid cells of the innate immune system. The persistence of an antigenic stimulus can lead to an ex-

hausted cell state and the accumulation of mutations can transform them into malignant cells. Aggressive NK cell leukemia (ANKL) is an entity caused by these transformed cells. We present here a clinical case of ANKL and a review on the immunophenotype of NK cells.

Introducción

La ANKL es un desorden linfoproliferativo maligno de células NK maduras, asociada al virus Epstein-Barr (EBV), de curso clínico agresivo, de mal pronóstico y con una sobrevida media menor a un año⁽¹⁾.

Los pacientes con ANKL frecuentemente presentan hepatoesplenomegalia, pancitopenia, función hepática alterada, LDH elevada y generalmente

desarrollan síndrome hemofagocítico, coagulación intravascular diseminada y falla multiorgánica⁽²⁾.

Las células NK tumorales usualmente expresan de manera intensa la molécula de adhesión CD56 y el receptor tipo lectina CD94 y tienen un fenotipo relacionado con activación (CD7^{-/+dim}, CD45RO⁺, HLA-DR⁺). En contraste CD16 y CD57 son frecuentemente negativos⁽²⁾.

Debido a estas características fenotípicas se postula a las células NK maduras CD56^{bright} como la célula de origen de la ANKL, que luego de la infección por el EBV se activan y pueden transformarse hacia células malignas⁽²⁾.

El presente artículo tiene como objetivo compartir el abordaje de un paciente cuyo diagnóstico final fue ANKL y presentar una revisión del inmunofenotipo de las células NK.

Caso clínico

Paciente de sexo masculino, de 19 años que comenzó su enfermedad tres meses previos a la consulta, con registros febriles diarios, y agregó en el último

mes tricitopenia. Por progresión de sus síntomas consultó a nuestra institución.

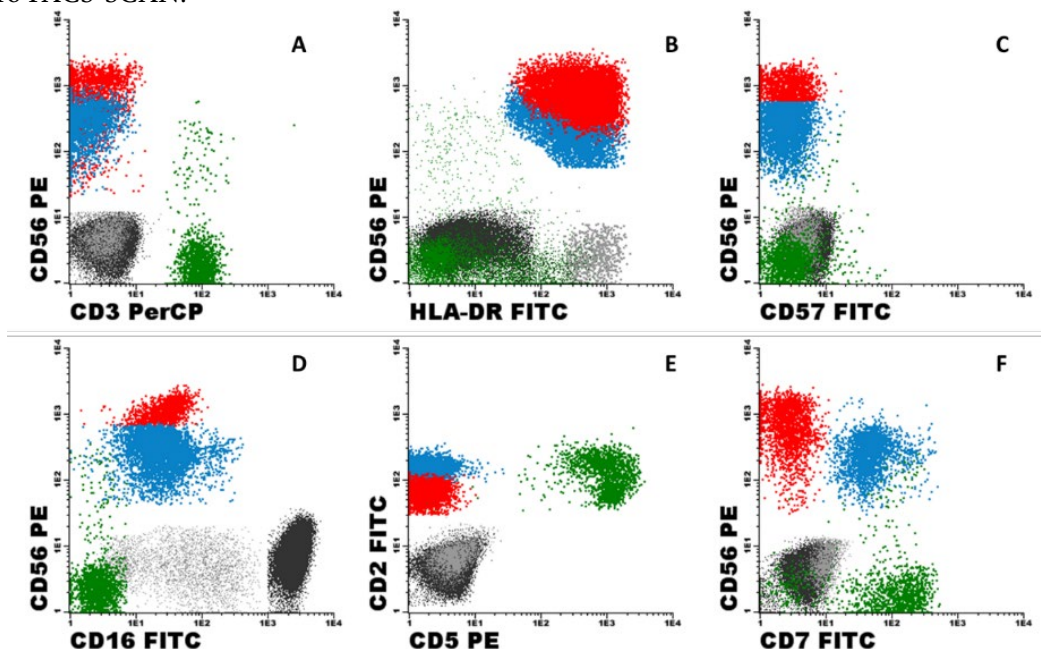
Como antecedentes de relevancia, el paciente había cursado una meningitis viral a la edad de 11 años y neurocisticercosis diagnosticada a los 4 años.

Ingresó estable, febril, sin adenopatías periféricas, hepatoesplenomegalia, glóbulos blancos 1980 células/μL (24% linfocitos, 61% neutrófilos, 11% monocitos), plaquetas 70.000 células/μL, hemoglobina 10,9 g/dL, ESD 7 mm/h; TGP 165 UI/L, TGO 177 UI/L, FAL 1043 UI/L, LDH 1554 UI/L, ferritina 680 ng/mL.

Se realizó PAMO que evidenció imágenes de hemofagocitosis.

Se solicitó estudio por citometría de flujo multiparamétrica (CFM) para descartar proceso linfoproliferativo. La CFM de médula ósea (MO) y sangre periférica (SP) informó células NK aumentadas (16% y 9% respectivamente): 47% de las mismas con fenotipo aberrante: CD56⁺⁺⁺, CD16^(+débil) variable, CD7^(-/+débil), CD2^(+débil/+), CD57⁽⁻⁾, HLA-DR^{(+)homogéneo}, CD94⁺, mCD3⁽⁻⁾ (Figuras 1 y 2).

Figura 1. Nubes de puntos que muestran el inmunofenotipo de las células NK patológicas (población roja) y las células NK normales residuales (población celeste) presentes en la muestra del paciente. También se muestran linfocitos T y B normales (verde), monocitos (gris) y neutrófilos (negro) presentes en la muestra de SP del paciente. Nótese que las células NK neoplásicas expresan CD56⁺⁺ (A), presentan positividad homogénea para HLA-DR (B) y son negativas para CD3, CD57, CD16 y CD5 (A-E). Además, muestran disminución de expresión de CD2 (E) y pérdida de expresión de CD7 (F) respecto a las células NK normales residuales. La caracterización fenotípica fue realizada usando paneles de 3 colores (FITC, PE y PerCP) y citómetro FACS-SCAN.



El informe anatomopatológico de MO describió signos de hemofagocitosis e infiltración por células linfoides de estirpe NK asociada a EBV (EBER1 positivo) (Figuras 3, 4 y 5).

El paciente evolucionó con deterioro de la función hepática, ferritinas mayores a 1650 ng/mL y fibrinógeno en descenso.

La carga viral en SP para EBV fue de 520560 copias/mL.

Se interpretó como leucemia agresiva de células NK y se inició tratamiento quimioterápico SMILE con L-asparaginasa.

Presentó una evolución tórpida y tres meses después de su ingreso falleció por progresión de la enfermedad.

Discusión

Las células NK son células linfoides del sistema inmune innato que ejercen su función efectora mediante su capacidad citolítica y mediante la síntesis y liberación, principalmente, de interferón- γ .

Por definición, las células NK no expresan CD3 en su superficie, ni el receptor de células T (TCR), son positivas para CD56 y expresan cantidades variables de CD16; son CD2⁺ (unas pocas son CD2⁻), CD7^{+bright}, CD5⁻, CD4⁻ y CD8^{-/+dim}.

Las células NK maduras comprenden al menos dos poblaciones: CD56^{+bright} CD16^{-/+dim} y CD56^{+dim} CD16⁺ y probablemente correspondan a estadios secuenciales de diferenciación⁽²⁾. En condiciones normales, en sangre periférica (SP) y medula ósea

Figura 2. CD94 positivo en células NK totales. Inmunofenotipo realizado por el Dr. Norberto Zwirner, director del laboratorio IBYME.

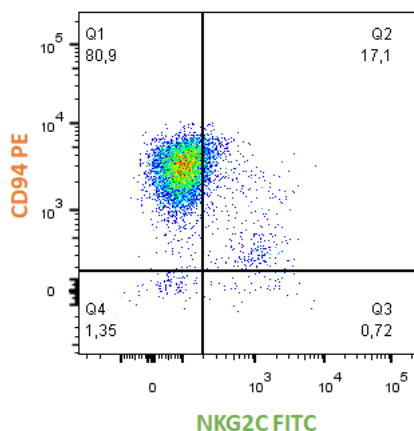


Figura 3. Células linfoides de tamaño mediano con núcleos irregulares, dispersas y en pequeños grupos (flechas verdes, H&E, 600X).

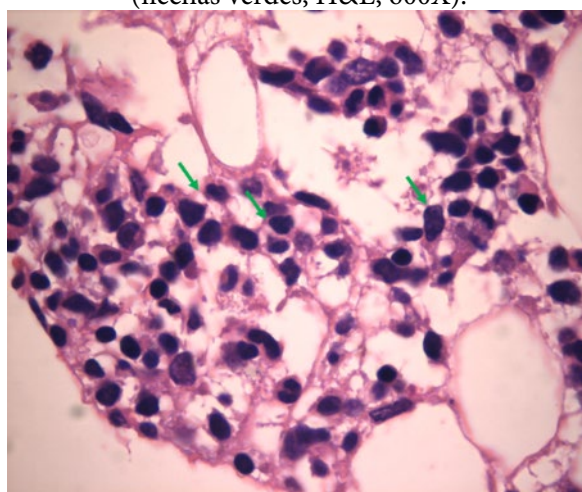


Figura 4. Expresión de CD56 en células linfoides de tamaño mediano (Inmunohistoquímica CD56, 400X).

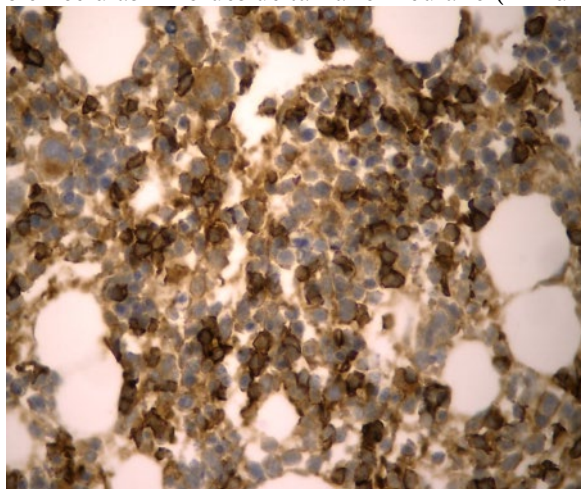
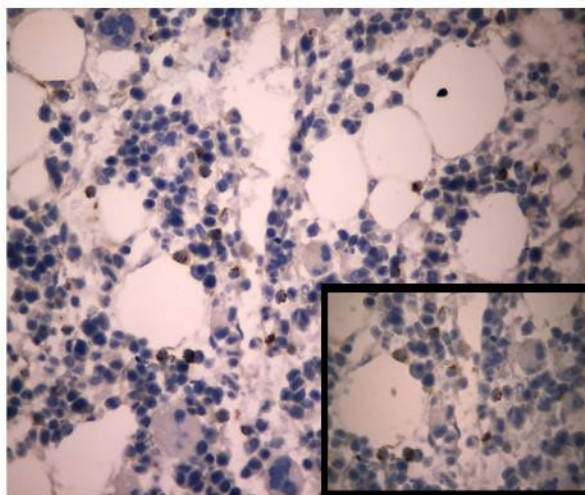


Figura 5. Expresión citoplasmática de Granzima B con patrón granular. (Inmunohistoquímica con Granzima B, 400X, inserto con aceite de inmersión, 1000x.)



(MO) se encuentran en mayor proporción las células NK CD56^{+dim} (90% del total de las células NK). Es actualmente aceptado que, bajo la influencia de estímulos adecuados, las células NK CD56^{+bright} se diferencian a células NK CD56^{+dim}. Se ha propuesto que en esta diferenciación ocurre una disminución gradual en la expresión de CD94 y la adquisición de los receptores de tipo inmunoglobulina de las células NK (KIRs)⁽²⁻⁴⁾ (Tabla 1).

Las células NK halladas en SP de pacientes con infecciones crónicas son CD56^{+dim}, CD16⁺, CD2^{+bright} y expresan niveles bajos y heterogéneos de CD7 y CD38, niveles altos de CD57 y menor expresión de CD11c que la observada en las células NK CD56^{+dim} de SP de dadores sanos⁽²⁾ (Tabla 2).

En la mayoría de las series de pacientes con ANKL

y linfoma NK extranodal (ENKL), típicamente se encuentra que CD56 está expresado de manera intensa, CD16 puede ser débil y variable (una considerable proporción de casos son negativos) y se observa pérdida total o parcial de CD7. Granzima B y perforina generalmente son positivas, lo que demuestra su naturaleza citotóxica, aunque CD57 es negativo. La expresión de HLA-DR, CD45RO y CD45RA se observa en la mayoría de los casos cuando han sido ensayados. Este patrón de expresión es similar al encontrado en las células NK reactivas de pacientes con infecciones virales o enfermedades tumorales. La misma observación puede ser aplicada al patrón de expresión CD11c, que cuando se encuentra expresado es débil y heterogéneo. La pérdida de CD7 en la mayoría de las células tumorales

también podría resultar de la activación, ya que en células NK activadas crónicamente, su expresión es también débil y heterogénea (Tabla 2). El receptor de tipo lectina CD94 se encontró expresado en la mayoría de las ANKL y ENKTL⁽²⁾.

Dado que la ANKL y el ENKTL se originan a partir de células NK transformadas y usualmente infectadas con EBV, es esperable que el inmunofenotipo hallado en estas entidades sea el de “células NK activadas”. Además, de acuerdo con los inmunofenotipos de las distintas series, es probable que el origen de estas células activadas sea una célula NK CD56⁺ CD16⁺,

y esto podría justificar en parte la hepatoesplenomegalia, la insuficiencia hepática y la invasión de otros órganos observados en la ANKL, ya que el patrón de expresión de los receptores de citoquinas (CKR) hallados en las células tumorales de la ANKL son similares al de las células normales NK CD56⁺ CD16⁺. Dicho patrón de CKR permiten a estas células migrar a tejidos periféricos en condiciones de inflamación crónica⁽²⁾.

En el caso presentado las células NK identificadas como aberrantes fueron CD56⁺ CD16⁺, CD94⁺⁺, CD57⁻ y fueron identificadas por la pérdida de

Tabla 1. Principales características de las subpoblaciones de células NK

Células NK	CD56 ⁺ CD16 ⁺	CD56 ⁺ CD16 ^{-/+dim}
Función	Citotóxicas	Inmunorreguladoras
Distribución	SP, MO y bazo	Órganos linfoides secundarios
Inmunofenotipo	CD2 ⁺ (unas pocas CD2 ⁻)	CD2 ⁺
	CD7 ⁺	CD7 ⁺
	CD5 ⁻	CD5 ⁻
	CD8 ^{-/+dim}	CD8 ^{-/+dim}
	CD38 ⁺	CD38 ⁺
	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺
	KIR ⁺	KIR ⁻
	CD45RO ⁻	CD45RO ⁻
	HLA-DR ⁻	HLA-DR ⁻
	CD26 ⁻	CD26 ⁺
	CD11c heterogéneo y variable	CD11c ⁺⁺
	CD94 heterogéneo y variable	CD94 ⁺⁺
CD57 heterogéneo y variable	CD57 ⁻	

Tabla 2. Principales características de las células NK activadas

NK recientemente activadas (infecciones agudas)	NK activación tardía (infecciones crónicas)
CD56 ⁺ CD16 ⁺	CD56 ⁺ CD16 ⁺
Patrón de expresión CD7/CD2 similar al observado en células NK CD56 ⁺ normales	CD2 ⁺ y niveles bajos (y heterogéneos) de CD7
CD38 ⁺	Bajos niveles (y heterogéneos) de CD38
CD45RA ⁺	
Fración elevada de células NK CD45RO ⁺ y/o HLA-DR ⁺	
CD11c ⁺	CD11c ^{-/+}
CD57 ⁻	CD57 ⁺

expresión de CD7 y la expresión débil de CD2. Las células demostraron tener un fenotipo “activado” (HLA-DR⁺ CD7^{-/+heterog.}) y citotóxico (granzima B⁺), semejante a lo descrito en la literatura. La expresión intensa de CD56, la positividad para CD94 y la ausencia de expresión de CD16 y CD57 avalan lo propuesto en la literatura, que la contrapartida normal de estas células neoplásicas podrían ser las células NK CD56^{bright}.

La transformación a ANKL de los procesos linfoproliferativos T/NK asociados a EBV de la infancia, como la infección crónica activa de células T/NK por EBV, es particularmente propensa a ocurrir en pacientes jóvenes⁽⁵⁾.

Debe mencionarse que, si bien la asociación entre ANKL y la infección por EBV es bien establecida, también es reconocida la ANKL negativa para EBV. En contraste con la ANKL EBV-positiva, los casos de ANKL EBV-negativa se observan más frecuentemente en pacientes de edad avanzada. La sospecha de ANKL no debería descartarse por el estatus EBV-negativo si el cuadro clínico, los hallazgos inmunofenotípicos y morfológicos avalan este diagnóstico. No se han observado diferencias fenotípicas ni morfológicas en las ANKL EBV-positivas versus las EBV-negativas^(6,7).

En el análisis citogenético convencional se han reportado pocas alteraciones, las más comúnmente reportadas incluyen del (6)(q21q25) y del(11q)⁽⁷⁾.

Los avances en los métodos de secuenciación masiva han proporcionado información valiosa para poder comprender la patogenia molecular de la enfermedad. Las mutaciones más comúnmente reportadas son las que implican a la vía de señalización JAK/STAT. Otras alteraciones reportadas han sido en la vía RAS/MAPK, así como mutaciones en reguladores epigenéticos y reguladores del ciclo celular como TP53. Estos hallazgos representan potenciales dianas terapéuticas para la enfermedad^(6,7).

Las células NK expresan altas concentraciones de glicoproteína P, lo que confiere resistencia a múltiples fármacos. En la actualidad no se ha establecido un régimen óptimo de quimioterapia, pero se ha visto que los resultados han mejorado con los esquemas que contienen L-asparaginasa⁽⁸⁾, incluido el esquema SMILE, VIDL, AspMetDex. El esquema GDP mostró ser eficaz en ciertos pacientes con ANKL^(7,9). A pesar de esto, el pronóstico continúa siendo pobre y la respuesta usualmente es transitoria. El trasplante

allogénico de células hematopoyéticas puede ayudar a prolongar la sobrevida, pero tiene un éxito limitado, más de la mitad de los pacientes recaen con la enfermedad^(7,9).

Esta neoplasia de células NK maduras es de curso clínico agresivo y de muy mal pronóstico.

A su vez, el síndrome hemofagocítico (SHF), frecuentemente presente en los pacientes con ANKL, es un síndrome potencialmente mortal, caracterizado por una activación incontrolada y persistente de linfocitos T citotóxicos y células NK. La incapacidad del huésped de remover el estímulo antigénico resulta en una respuesta inmune constante y amplificada, con liberación de citoquinas proinflamatorias que resultan en niveles altos de activación de macrófagos con hemofagocitosis resultante, daño tisular y falla orgánica⁽⁵⁾.

Conclusión

Las neoplasias de células NK son poco frecuentes, de curso clínico agresivo y aún no se conoce con precisión el origen celular de su contrapartida normal. Aunque no es posible demostrar clonalidad de las células NK por citometría de flujo multiparamétrica, se destaca la importancia de esta técnica que permite identificar, caracterizar y cuantificar las células NK con expresión aberrante de antígenos que, en el caso clínico presentado, ayudaron a direccionar rápidamente el diagnóstico.

Cabe destacar que la causa más común de SHF secundario en adultos son las enfermedades malignas y, de ellas, las hematológicas son disparadores mucho más frecuentes que los tumores sólidos⁽⁵⁾, por lo que, frente a un SHF, los procesos linfoproliferativos deben ser una de las primeras causas a descartar. La CFM es una herramienta fundamental y presenta varias ventajas para alcanzar este objetivo: rapidez, sensibilidad y especificidad.

Agradecimientos

Al Dr. Norberto Zwirner, director del Laboratorio de Fisiopatología de la Inmunidad Innata del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), por su aporte desinteresado y enriquecedor y corrección del manuscrito; a la Dra. Erica Rojas Bilbao del Departamento de Patología del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, por su gran aporte desinteresado que contribuyó al diagnóstico; al Dr. Diego Rosso, jefe del Departamento de Pediatría de nuestro hospital.

Conflictos de interés: Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Referencias

- Ishida F. Aggressive NK-Cell Leukemia. *Front Pediatr.* 2018; 6:292.
- Lima M. Extranodal NK/T cell lymphoma and aggressive NK cell leukaemia: evidence for their origin on CD56+bright CD16-/dim NK cells. *Pathology.* 2015; 47(6):503-514.
- Caldirola MS, Rodriguez Broggi MG, Gaillard MI, Bezrodnik L, Zwirner NW. Primary Immunodeficiencies Unravel the Role of IL-2/CD25/STAT5b in Human Natural Killer Cell Maturation. *Front Immunol.* 2018; 9:1429.
- Domaica CI, Fuertes MB, Uriarte I, Girart MV, Sardanons J, Comas DI et al. Human Natural Killer Cell Maturation Defect Supports In Vivo CD56(bright) to CD56(dim) Lineage Development. *PLOS One.* 2012;7:e51677.
- Al-Samkari H, Berliner N. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Annu Rev Pathol. Mech. Dis.* 2018;13:1.1-1.23
- El Hussein et al. Genomic and Immunophenotypic Landscape of Aggressive NK-Cell Leukemia. *Am J Surg Pathol.* 2020; 44:1235-1243.
- El Hussein, Siba et al. Aggressive NK Cell Leukemia: Current State of the Art. *Cancers (Basel).* 2020 Oct 9;12(10):2900.
- Hue et al. Epstein-Barr virus-associated T- and NK-cell lymphoproliferative diseases: an update and diagnostic approach. *Pathology.* 2020;52(1),111-127.
- Zhang Y, Lee D, Gesiotto Q, Sokol L. Aggressive natural killer cell leukemia: diagnosis, treatment recommendations, and emerging therapies. *Expert Rev Hematol.* 2021 Aug;14(8):731-740.
- Bárcena P, Vidriales MB, Lima M, van Dongen J, Orfao A. Phenotypic profile of expanded NK cells in chronic lymphoproliferative disorders: a surrogate marker for NK-cell clonality. *Oncotarget.* 2015 Dec 15;6(40):42938-51.
- Tse and Kwong. The diagnosis and management of NK/T-cell lymphomas. *Journal of Hematology & Oncology.* (2017;10:85.
- Jin Z, Wang Y, Wang J, Wu L, Pei R, Lai W, Wang Z. Multivariate analysis of prognosis for patients with natural killer/T cell lymphoma-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Hematology.* 2018 May;23(4):228-234.
- Yamashita Y et al. Identification of a novel CCDC22 mutation in a patient with severe Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and aggressive natural killer cell leukemia. *Int J Hematol.* 2019; 109(6):744-750.
- Michel T et al. Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol.* 2016, 196: 2923-2931.
- Swerdlow SH et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016; 127(20):2375-2390.
- van Dongen JJM et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012;26, 1908-1975.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2017.
- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular.* 8° ed., 2015.



Atribución – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original. Esta licencia no es una licencia libre.