

Utilitat de l'estudi immunofenotípic en la classificació i monitorització de les discràsies de cèl·lules plasmàtiques. Marcadors pronòstic i Malaltia Mínima Residual

Introducció

Les gammapaties monoclonals (GM) constitueixen un grup de trastorns o entitats caracteritzats per la proliferació clonal de cèl·lules plasmàtiques (CP) que produeixen una immunoglobulina de caràcter monoclonal (component M o paraproteïna) que es detecta en sèrum i/o orina.

Tot i que el Mieloma Múltiple (MM) constitueix el prototip de GM (representa el 1% de totes les neoplàsies i el 10% de les hemopaties malignes), el trastorn més freqüent és la Gammapatia Monoclonal de Significat Incert (GMSI) que representa fins a un 60% de les GM detectades al laboratori, de vegades benigne. A Espanya es detecten 5 casos de MM per cada 100.000 habitants i any. Hi ha 2000 nous casos cada any.

Amb l'objectiu de definir les diferents GM, el "International Myeloma Working Group" (IMWG) va reconsiderar els criteris diagnòstics per a cadascuna d'elles (IMWG, 2003).

Així, la GMSI es defineix per la presència d'un component M sèric $\leq 30\text{g/L}$ i $< 10\%$ de CP al moll de l'os (m.o.) amb absència de simptomatologia associada. Pel contrari, els pacients amb MM tenen un component M sèric superior a 30g/L o bé excreten més de 1g de cadenes lleugeres en orina de 24 hores, presenten infiltració medul·lar per CP superior al 10% i pot acompanyar-se d'anèmia, insuficiència renal, hipercalcèmia o lesions osteolítiques.

Els valors del component M i el grau d'infiltració medul·lar són arbitraris, i s'accepta el diagnòstic de MM amb valors inferiors als fixats sempre que existeixi afectació orgànica atribuïble al mieloma.

El Mieloma Quiescent (MQ) (Kyle&Greipp, 1980) constitueix una situació intermitja entre la GMSI i el MM, a on els pacients, encara que compleixin els criteris diagnòstics de MM (component M $> 30\text{g/L}$ i $\geq 10\%$ de CP en m.o.), es troben asimptomàtics.

Les causes de les GM no estan ben establertes però la incidència d'elles augmenta amb l'edat i això fa pensar que probablement es produeixen com a conseqüència d'un trastorn a la regulació del sistema immunològic relacionat amb l'edat.

Catlab Informa

La CP representa l'últim estadi maduratiu de la diferenciació limfoide B. Aquesta cèl·lula es caracteritza per la pèrdua d'expressió d'alguns marcadors associats a línia B, com les immunoglobulines de superfície (suplg), receptor del complement, antígens HLA de classe II i receptors Fc. Aquesta característica, sumada a la seva escassa representativitat medul·lar en situacions normals (aproximadament el 0.25%), ha condicionat algunes dificultats per a la caracterització de les CP.

A les últimes versions de les diferents guies clíniques de mieloma, la relació de proves que s'han de realitzar pel diagnòstic i l'estudi pronòstic de les GM en general i del Mieloma en particular passa per l'anàlisi de proteïnes, la quantificació de paràmetres hematològics i bioquímics, proves d'imatge, l'estudi citològic del moll de l'os (obligat), l'estudi per punció-aspiració d'agulla fina (PAAF) de grassa abdominal, estudis citogenètics (les alteracions citogenètiques en el MM constitueixen un dels factors pronòstics més importants), i també s'inclou l'immunofenotip per citometria de flux (CMF).

Paper de l'immunofenotip

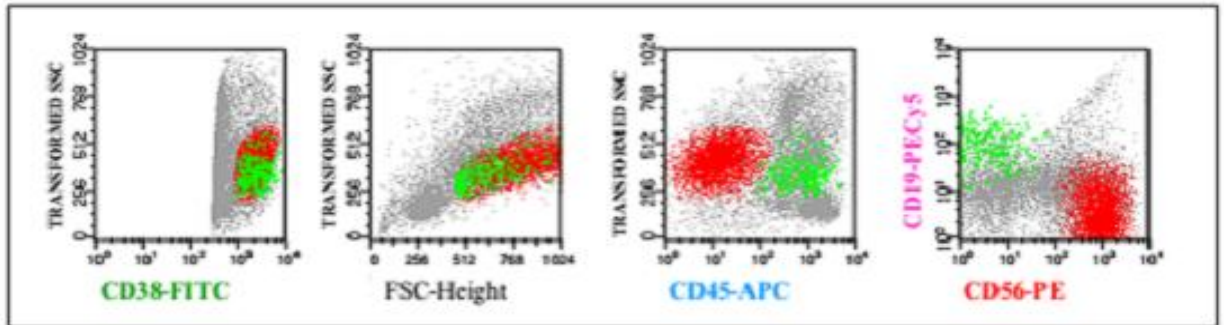
A l'any 1998 Ocqueteau i col·laboradors van demostrar que la CMF permet analitzar la clonalitat (les CP normals són generalment policlonals i les neoplàsiques sempre monoclonals) i quantificar el nombre de CP amb fenotip patològic o aberrant i que això té especial valor per diferenciar el MM de la GMSI.

Clàssicament, la CP maligna (amb el marcatge només de membrana) expressa habitualment CD38 i CD56 i no expressa CD19 ni CD45 (patró fenotípic: CD45-, CD38+, CD19-, CD56+). Al contrari que la CP medul·lar d'individus sans que normalment presenta el patró fenotípic: CD45+, CD38+, CD19+, CD56- (San Miguel et al., 2006).

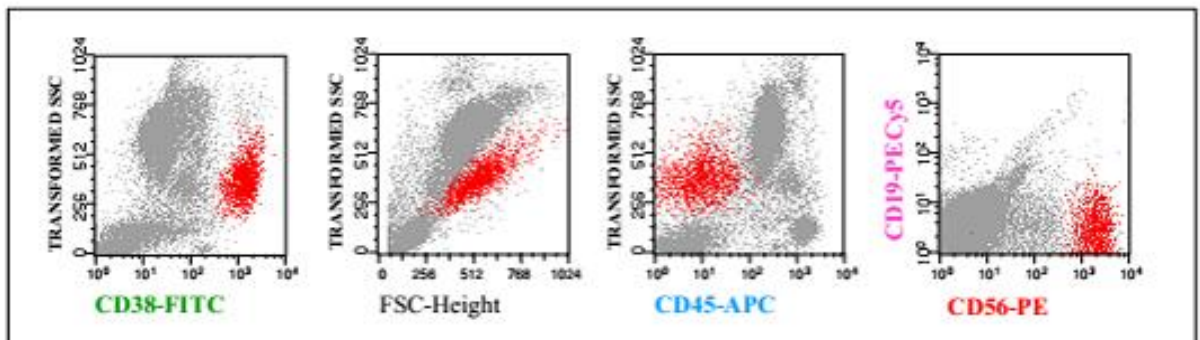
A les figures següents (cedides per Cytognos) es poden observar com es pinten les CP característiques d'una GMSI i d'un MM per CMF on queden representades en color verd (CP normals o reactives) i en color vermell (CP aberrants).

Catlab Informa

GMSI



MM



Com es pot apreciar, a la mostra de GMSI coexisteixen 2 sub poblacions de CP, les verdes amb un patró fenotípic de CP normal i les vermelles i predominants, amb fenotip aberrant. La presència de CP immunofenotípicament normals, que es troba sempre en els pacients amb GMSI, és excepcional en els MM (com es pot veure a la segona figura on no n'hi ha cap), i quan estan presents, el percentatge respecte al total de CP és inferior a l'observat en una GMSI. Els pacients amb una GMSI presenten un percentatge de CP normals respecte al total de CP superior al 3%, mentre que en els pacients amb MM el percentatge de CP normals respecte al total de CP presents a la mostra és inferior o igual al 3%.

El percentatge de CP aberrants respecte al total de CP és indicatiu de la càrrega tumoral i és de utilitat durant el seguiment de la malaltia.

Aquests patrons d'expressió antigènica són especialment importants quan el percentatge de CP és inferior al 10%. S'ha de tenir en compte que el recompte de CP per citometria és significativament inferior a la quantitat mesurada i

Catlab Informa

observada per microscopia en l'aspirat o a la biòpsia medul·lar (Nadav et al., 2006), i que la CMF per sí sola, no pot ser utilitzada pel diagnòstic de mieloma.

Malaltia Mínima Residual

D'altra banda, l'estudi inicial (al diagnòstic) del fenotip de la CP tumoral en cada cas individual és imprescindible per definir el patró d'aberració fenotípica que s'haurà d'utilitzar per avaluar la malaltia mínima residual després del tractament, amb una sensibilitat amb els citòmetres digitals multiparamètrics actuals (enfrentant 8 anticossos alhora) de 10^{-4} (Almeida et al), dada especialment important en el cas de remissió completa de la malaltia ja que en més del 40% d'aquests pacients poden delectar-se CP tumorals, pel que es pot identificar pacients amb alt risc de recaiguda (Rawstron et al., 2002; San Miguel et al., 2002; Sarasquete et al., 2005; Paiva 2008 (Blood); Paiva et al., 2011 (JCO)).

Segons la European Myeloma Network (2008), per aconseguir una sensibilitat del 0.01% (10^{-4}) s'han d'adquirir pel citòmetre al menys 100 CP neoplàsiques i un mínim de $1 \cdot 10^6$ cèl·lules totals.

El concepte de Malaltia Mínima Residual (MMR) neix com a conseqüència dels límits de la definició de l'estat de Remissió Completa empleat en l'avaluació terapèutica de totes les malalties oncohematològiques en general.

La MMR es pot definir com la identificació d'una petita quantitat de cèl·lules patològiques residuals (tumorals) resistents al tractament, no detectades per tècniques citològiques convencionals com la morfologia i que poden provocar una recaiguda de la malaltia.

Actualment, les tècniques més emprades pel pronòstic i l'estudi de MMR en el MM són la hibridació *in situ* fluorescent (FISH), la biologia molecular i la CMF multiparamètrica.

La CMF està demostrant especial rellevància per l'impacta que pot tenir sobre les decisions terapèutiques posteriors degut a l'elevada sensibilitat del mètode, la rapidesa en tenir resultats i els costos respecte a altres tècniques més cares. En aquest sentit, el grup *Euroflow*, consorci integrat per experts en citometria i biologia molecular, han dirigit els seus esforços al desenvolupament i la classificació de les neoplàsies hematològiques, així com a la monitorització després del tractament quimioteràpic o transplantament.

En els últims anys, els avenços en el tractament del MM han fet necessari l'estudi de MMR perquè encara que els tractaments actuals permeten aconseguir elevades tasses de respostes completes, la majoria dels pacients segueixen recaient, probablement com a conseqüència de la MMR positiva.

Catlab Informa

Repte que ha portat a aquest grup a la optimització de les tècniques d'estudi de MMR en aquests pacients.

La implementació de la metodologia estandarditzada *Euroflow* en els laboratoris de citometria assistencials sembla fonamental i necessària en la monitorització de la MMR per a que hagi consens i que l'obtenció de resultats sigui reproducible entre els diferents laboratoris i orientin a l'hematòleg clínic a la presa de decisions en el seguiment i maneig d'aquests pacients.

El Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de Salamanca està treballant activament desenvolupant un protocol més sensible (10^{-5}) que permetrà detectar amb més fiabilitat si els pacients tenen MMR o no, amb nous biomarcadors i noves combinacions d'aquests que permeten detectar cèl·lules tumorals inclús després d'utilitzar tractaments nous que eliminen els biomarcadors clàssics que s'utilitzaven per monitoritzar la malaltia i que per tant, després de les teràpies ja no són detectats.

Selecció i expressió d'antígens

A Catlab, seguim les recomanacions d'*Euroflow* i anem incorporant els anticossos monoclonals que seleccionen per l'estudi més adient de les cèl·lules plasmàtiques de manera que els panels d'estudi per CMF s'han anat modificant i ampliant o substituint per altres.

Des de fa un temps fins ara, estudiem les CP fent un panel de 2 tubs de 8 colors amb una combinació d'anticossos i fluorocroms (on incloem CD45, CD38, CD138, CD19, CD56, citKappa, citLambda, CD27, CD28, β_2 Microglobulina i CD81; en el citòmetre FACSCantoll) que ens permeten identificar-les, quantificar-les, classificar-les i veure en funció de l'expressió o l'absència de determinats marcadors (alguns relacionats amb determinades mutacions) el pronòstic de la malaltia, a més de poder fer el seguiment posterior de la MMR.

Per poder seleccionar les cèl·lules plasmàtiques, normalment de mostres de moll de l'os, per citometria, es requereix conèixer les característiques fenotípiques i de dispersió de les CP normals i l'expressió antigènica i dispersió de les CP aberrants i això s'aconsegueix, juntament amb la calibració, la linearitat dels làsers i la compensació de color òptimes del citòmetre i la preparació adequada de la mostra, amb diferents marcadors, dels quals faig una breu descripció a continuació.

1. Molècules que intervenen a la diferenciació i maduració de la CP:

CD38: És una glicoproteïna de membrana amb activitat enzimàtica que es troba àmpliament distribuïda en totes les línies hematopoiètiques.

Catlab Informa

Totes les CP expressen CD38+ de manera més o menys intensa i actualment representa el marcador per excel·lència per identificar-les juntament amb el CD138, comentat més avall.

CD19: Marcador pan-B, implicat en la diferenciació i activació de les cèl·lules B i que està present a la CP normal. És negatiu a la gran majoria de CP aberrants.

CD45: Antigen leucocitari comú. És una proteïna tirosin-fosfatasa, necessària per l'activació i desenvolupament dels limfòcits. Les CP mielomatoses són majoritàriament negatives.

2. Receptors de citocines: Proteïnes solubles produïdes i secretades per diferents cèl·lules hematopoiètiques incloses les CP.

CD117: Receptor c-Kit (*Cytokine stem cell factor*). És un receptor tirosin-quinasa que s'expressa en precursors mieloides. A les CP aberrants s'expressa en aproximadament un 30% dels casos. L'expressió del CD117 en CP patològiques s'associa a hiperploïdia, a absència de translocacions i a millor pronòstic.

3. Molècules d'adhesió: Afavoreixen la interacció del microambient medullar amb la cèl·lula, permetent una alta especialització del teixit i facilitant la transferència d'informació.

CD56: Molècula d'adhesió (NCAM) típicament associada a les cèl·lules NK (*Natural Killer*). Normalment la seva expressió és negativa a les CP normals i sol ser intensament positiu a la majoria de CP neoplàsiques. És típicament negatiu a la leucèmia de CP.

CD138: És un proteoglicà de superfície. Promou l'adhesió de les CP al col·lagen tipus II a la fibronectina. S'expressa a les CP tan normals com patològiques. S'utilitza per la identificació i purificació de CP.

4. Altres molècules i estudis d'interès:

CD27: Marcador de memòria immunològica que s'expressa a les cèl·lules limfoides del centre germinal, a les cèl·lules amb memòria i a les CP sanes. L'expressió d'aquest antigen sol estar disminuïda a les CP patològiques. Quan la seva expressió es manté en nivells normals, s'associa a millor pronòstic. Alguns autors han descrit que l'expressió de CD27 es va reduint amb la progressió de la malaltia.

Catlab Informa

CD28: Implicat en l'activació dels limfòcits T i la seva interacció amb els limfòcits B. La seva expressió sol ser aberrant en CP patològiques en quasi la meitat de pacients amb MM. Quan està present, s'associa a una pitjor evolució (progressió de la malaltia per augment del risc de recaiguda). Es correlaciona amb la presència de t(11;14), t(4;14), del17p, del13q, cariotip no hiperdiploide i fenotip agressiu. L'expressió conjunta de CD28+ i CD117+ també s'associa a pronòstic desfavorable.

CD81: Descrit com a factor pronòstic independent en la progressió i supervivència lliure de malaltia. Aquest antigen juga un paper important a la patogènesi del MM i s'ha vist que en els MM asimptomàtics o latents quan està present, el temps de progressió a MM és més curt. (Paiva B. et al; Leukemia, 2012).

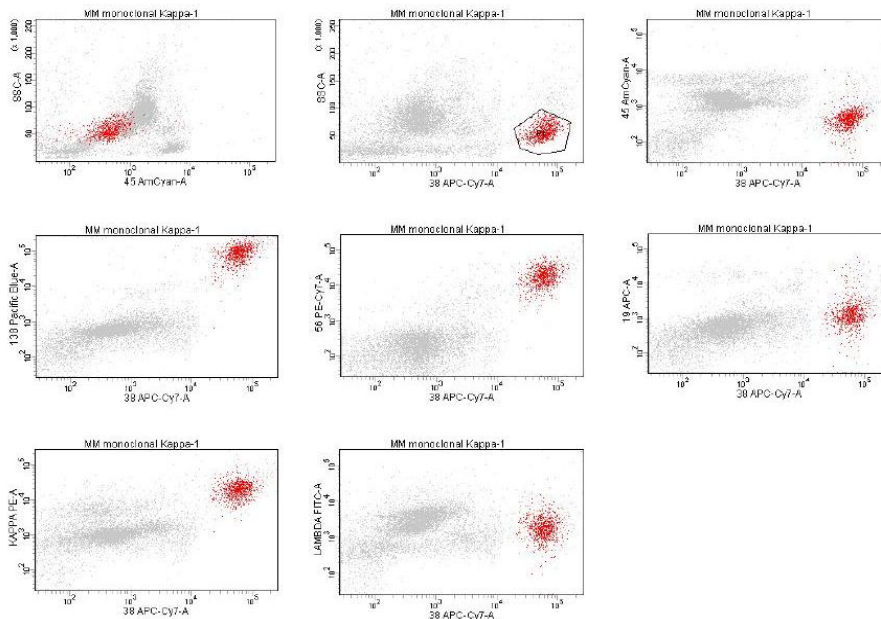
Cicle cel·lular: L'anàlisi del cicle cel·lular de les CP facilita la identificació d'anormalitats cromosòmiques numèriques (aneuploïdia) i l'estimació de l'índex de proliferació de les CP. Índex de proliferació elevats (fase S >3%) s'associa a pronòstics més advers. (San Miguel et al, 1995). Actualment a Catlab no l'estudiem.

Índex d'apoptosi: L'índex d'apoptosi de les CP estimat mitjançant la tinció amb Anexina-V i citometria és un factor predictiu de valor pronòstic. A Catlab no ho fem.

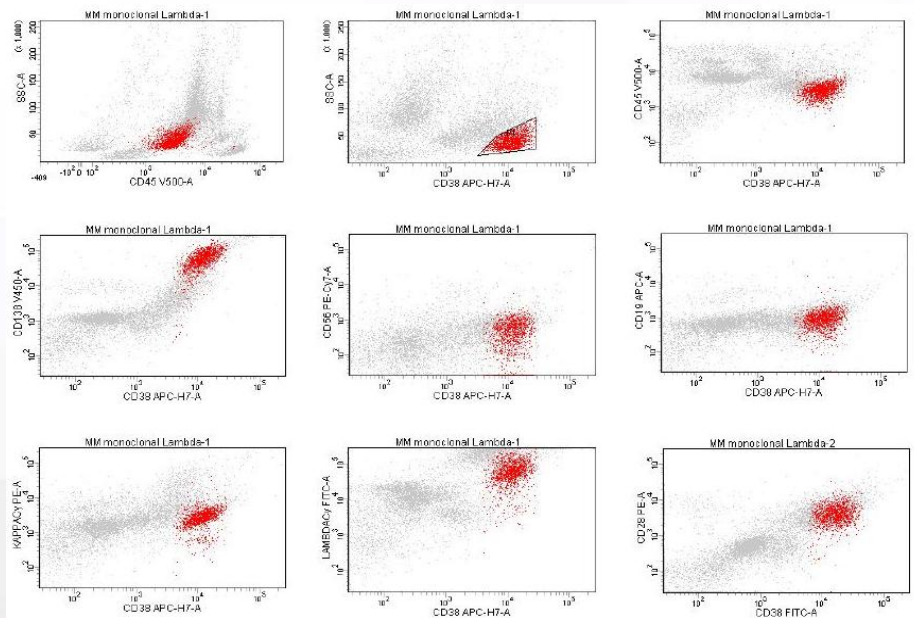
citKappa i citLambda: Cadenes lleugeres de les immunoglobulines citoplasmàtiques de la CP. També s'expressen a la superfície i al citoplasma dels limfòcits B. Permeten establir la clonalitat (monoclonal Kappa o monoclonal Lambda) de les CP patològiques i diferenciar-les de les CP sanes de distribució policlonal. De vegades, el fenotip de membrana no permet diferenciar amb claredat les CP patològiques de les sanes i l'estudi de les cadenes lleugeres ens diu si són clonals o no i ens ajuda a establir la ratio CP patològiques/sanes.

Catlab Informa

A continuació presento un cas de MM monoclonal Kappa amb patró fenotípic característic: CD45-, CD38+, CD138+, CD19-, CD56+, citKappa+, citLambda-



I un altre cas de MM monoclonal Lambda amb fenotip: CD45-, CD38+, CD138+, CD19-, CD56-, CD28+, citKappa-, citLambda+.



Conclusions

L'estudi immunofenotípic de les cèl·lules plasmàtiques per citometria de flux multiparamètrica contribueix decisivament en el diagnòstic diferencial, el pronòstic i la monitorització de les gammopaties monoclonals. Ajuda a l'establiment de tractaments adaptats al pronòstic de la malaltia i a l'augment

Catlab Informa

de la supervivència global. L'elevada sensibilitat de la tècnica, la fan de gran utilitat en la monitorització de la malaltia post-tractament, aportant informació rellevant per predir la seva evolució.

La comunicació entre els diferents professionals implicats de dins i fora del laboratori és fonamental per una millor utilització de la informació que ofereix un estudi de citometria.

Judith Vidal

Responsable Citometria de flux

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 5041 / 616.26.48.91

jvidal@catlab.cat

www.catlab.cat

Referències

Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. Br J Haematol 2003; 121:749-57.

deTute RM, Jack AS, Child JA, Morgan GJ, Owen RG, Rawstron AC. A single-tube six-colour flow cytometry screening assay for the detection of minimal residual disease in myeloma. Leukemia 2007; 21:2046-9.

Landgre O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. Blood. 2009; 113(22):5412-7.

Moreau P, Robillard N, Jego G, Pellat C, Le GS, Thoumi S, et al. Lack of CD27 in myeloma delineates different presentation and outcome. Br J Haematol 2006; 132: 168-70.

Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, Garcia-Sanz R, et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. Am J Pathol 1998; 152: 1655-65.

Owen R, Rawstron AC, Davies EE, Bell S, Cocks K, Cook G, et al. Response by SFLC and marrow flow cytometry in MRC myeloma IX. Haematologica 2007; 92:40.

Catlab Informa

Paiva B, Vidriales MB, Pérez JJ, et al. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica* 2009; 94: 1599-1602.

Paiva B, Vidriales MB, Mateo G, et al. The persistence of immunophenotypically normal residual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple myeloma patients. *Blood* 2009; 114: 4369-4372.

Perez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso M, Moro MJ, Martin-Nuñez G, Galende J, et al. Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia* 2005; 19: 449-55.

Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, Garcia-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, et al. New Criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007; 110(7):2586-92.

Raja KRM, Kovorova L, Hajek R. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. *British Journal Haematology* 2010; 149: 334-351.

Rosinol L, Ciberia MT, Montoro S, Rozman M, Esteve J, Filella X, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: predictors of malignant transformation and recognition of an evolving type characterized by a progressive increase in M protein size. *Mayo Clin Proc*. 2007. ; 82(4): 428-34.

San Miguel JF, Gutierrez NC, Mateo G, Orfao A. Conventional diagnostics in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006; 42: 1510-9.

San Miguel JF, Gonzalez M, Gascon A, Moro MJ, Hernandez JM, Ortega F, et al. Immunophenotypic heterogeneity of multiple myeloma: influence on the biology and clinical course of the disease. *Br J Haematol* 1991; 77: 185-90.

Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of MGUS and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica* 2001; 86: 837-43.

Stetler-Stevenson M. H43-A2 clinical flow cytometric analysis of neoplastic hematology cells; approved guideline. Second ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.

Catlab Informa

Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Euroflow™ antibody panels. Handout at 14th EHA Congress 2009; Berlin, DE.
