

Rol de la Citometria de Flux en l'estudi del Limfoma Limfoplasmocític

Introducció

Els limfòcits són cèl·lules del sistema immunitari d'origen hematopoètic, encarregades de reconèixer i respondre de forma específica i adaptada davant diferents agents estranys i també, d'induir tolerància contra estructures pròpies. En termes generals, els limfòcits s'engloben en dos grans grups depenent del seu origen i funció: els limfòcits T i els limfòcits B. A més, existeix un tercer grup de cèl·lules limfoides que comparteixen alguns mecanismes efectors de la resposta immune amb els limfòcits T, les cèl·lules Natural Killer (NK).

Entre les neoplàsies dels limfòcits, les síndromes limfoproliferatives cròniques B constitueixen un grup heterogeni de trastorns clonals de les cèl·lules B que, majoritàriament, reflecteixen les diferents etapes de diferenciació del limfòcit B madur. Els trets immunofenotípics i morfològics d'aquestes representen un recurs orientatiu del procés diagnòstic, tot i no ser l'única base per a la seva classificació.

Les cèl·lules B neoplàsiques presenten patrons d'expressió de proteïnes alterats (aberracions fenotípiques), degut a alteracions genètiques i moleculars adquirides per la cèl·lula neoplàsica i/o la seva interacció amb el microambient tissular. La citometria de flux (CMF) és una eina molt valuosa en el diagnòstic de les SLPC-B, a més d'altres neoplàsies hemopoètiques, ja que a través de la tinció amb anticossos lligats a fluorocroms de les proteïnes presents a les cèl·lules B, permet diferenciar, pels patrons fenotípics expressats a les diferents etapes maduratives, les cèl·lules B normals i de les cèl·lules B neoplàsiques.

Tot i que existeixen patrons fenotípics característics de cada grup de SLPC-B, s'ha de tenir present que certes entitats expressen perfils immunofenotípicament similars i és difícil discernir una entitat d'un altra només amb l'immunofenotip. Aquest fet dificulta el diagnòstic i li resta especificitat a la CMF a l'hora de classificar les SLPC-B. Per aquest motiu, les combinacions dels diferents anticossos utilitzades en els panells de fenotipatge està en constant canvi i evoluciona a mesura que es van introduint nous anticossos que permeten diferenciar amb més exactitud poblacions aberrants característiques d'una patologia determinada.

En aquest context, un dels reptes més freqüents en els estudis de SLPC-B per immunofenotip és poder diferenciar el Limfoma Limfoplasmocític d'altres SLPC-B de baix grau, com el Limfoma de la Zona Marginal.

Catlab Informa

Limfoma limfoplasmocític

El limfoma limfoplasmocític (LLP) és un SLPC-B caracteritzat per l'expansió clonal de limfòcits B de memòria i/o cèl·lules plasmàtiques que fenotípicament s'assemblen a una cèl·lula postfol·licular en l'etapa de diferenciació a cèl·lula plasmàtica. La mitjana d'edat al diagnòstic és de 70 anys, predominantment en homes, i la presentació clínica és heterogènia i inespecífica, amb símptomes entre els quals s'inclouen: fatiga, pèrdua de pes, o limfadenopatia. Generalment és indolent i de curs lent. L'afectació de la medul·la òssia és freqüent donant lloc a anèmia i trombopènia. Entre un 15-30% dels pacients també tenen afectació d'altres òrgans com el fetge o la melsa, manifestant hepato i esplenomegàlia.

El diagnòstic diferencial de LLP *versus* Macroglobulinèmia de Waldenström (MW) pot ser complicat i requereix d'un enfocament amb múltiples tècniques dins del laboratori clínic: l'electroforesi de proteïnes en sèrum, el diagnòstic molecular, proves d'imatge, la correlació morfològica, i finalment l'immunofenotip per citometria de flux. De fet, el diagnòstic de LLP/MW es considera un diagnòstic d'exclusió, ja que altres SLPC-B compleixen criteris similars, especialment el limfoma de zona marginal (LZM) o entitats amb diferenciació plasmocítica, com poden ser les gammopaties monoclonals de significat incert (MGUS).

Proteïnograma

Degut a la proliferació de cèl·lules B madures que es diferencien cap a cèl·lules plasmàtiques, una de les manifestacions distintives del LLP és la producció anormal d'immunoglobulines monoclonals, també conegudes com a paraproteïnes o proteïnes M. En el cas específic del LLP, la paraproteïna més comunament produïda és la immunoglobulina M (IgM). La IgM monoclonal es produeix en concentracions elevades i és detectable en sèrum. Aquesta immunoglobulina monoclonal pot tenir diverses implicacions clíniques, com contribuir a la hiperviscositat sanguínia o presentar activitat autorreactiva, resultant en un fenomen autoimmune o en una crioglobulinèmia.

No obstant, encara que el LLP sovint s'associa amb la producció de IgM (95% dels casos), la seva detecció no és un requisit pel diagnòstic de LLP, ja que la clona maligna pot ser secretora de IgG o IgA; de cadenes lleugeres exclusivament; o fins i tot ser no-secretora. La MW correspon a la majoria dels casos, ja que es defineix com un LLP amb implicació de la medul·la òssia i la presència de gammapatia monoclonal IgM a qualsevol concentració. Per tant, totes les MW són LLP, però no tots els LLP són MW.

Genètica

Des del punt de vista molecular, el LLP s'associa amb la presència de la mutació MYD88 L265P, que activa la via de senyalització NK-kB, promovent la supervivència cel·lular i la proliferació. La presència de la mutació fa el diagnòstic més probable, però no en tots els casos de LLP es troba

Catlab Informa

present, s'estima que la freqüència de la mutació en aquesta malaltia és al voltant del 90% (Treon et al, 2012).

No obstant això, aquesta mutació també està present en una petita proporció de gammapaties monoclonals de significat incert (MGUS) (50%), d'altres SLPC-B (com el LZM) i amb menys freqüència en el limfoma B difús de cèl·lula gran (LBDCG) (35%) (Swerdlow et al, 2017).

Caracterització immunofenotípica del LLP

A l'immunofenotip "típic" del LLP, la majoria de les cèl·lules expressen un fenotip característic de limfòcit B de memòria CD19+CD20+CD27+, negatius per CD5, CD10, CD103 i CD23, amb expressió freqüent de CD25 i CD38. Una minoria de casos poden ser positius per CD5, CD10 o CD23. Però, com hem dit, les característiques d'aquest immunofenotip poden ser compartides per altres entitats, com el LZM, per la qual cosa el LPL no presenta un immunofenotip específic pel seu diagnòstic:

CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD5-, CD10-, CD103-, CD23-, CD25+, CD27+, CD38+, IgM+

Al moll de l'os, els limfòcits B freqüentment són acompanyats de cèl·lules plasmàtiques clonals derivades de la clona neoplàsica madura (Lim JH et al, 2022), amb fenotip normal (CD19+, CD45+, CD38+, CD138+, CD56-, CD27+, smlg-, cylg+), a diferència del mieloma múltiple, que sovint presenta un fenotip aberrant clonal. Si bé aquesta característica permet acotar el diagnòstic diferencial d'aquesta entitat, hem de tenir en compte que no en tots els casos s'extreu mostra de moll de l'os per tractar-se d'una síndrome limfoproliferativa de baix grau. D'altra banda, aquesta observació no descarta per complet altres SLPC-B amb diferenciació limfoplasmocítica.

Des de l'àrea de Citometria de Catlab, a finals de l'any 2022 vàrem introduir el marcador CD13 per ajudar a orientar aquelles síndromes limfoproliferatives amb diagnòstic dubtós i compatibles amb un LPL, per la manca de marcadors prou específics per a una correcta conclusió diagnòstica. El marcador CD13 és positiu en cèl·lules mieloides però, la seva expressió a les cèl·lules limfoides es considera una expressió aberrant, suggestiva de diferenciació limfoplasmocítica. Ocasionalment, es pot presentar en la leucèmia limfàtica crònica (LLC), i amb menys freqüència en altres síndromes limfoproliferatives B (MZL, LLP/MW, entre d'altres).

Des de la secció de Citometria de Flux de Catlab, s'ha fet un estudi retrospectiu d'aquells pacients orientats com a un possible Limfoma Limfoplasmocític, durant el període 2022-2023. En total, es van orientar 50 pacients com a possible LLP, amb una mitjana d'edat dels pacients estudiats de 71 anys (42-95), amb un lleuger predomini del gènere femení (29 femení / 21 masculí). Del total de mostres en les quals es va realitzar l'immunofenotip, 26 mostres van ser de sang perifèrica, 22 de moll d'os i 2 de biòpsia d'una adenopatia.

L'orientació es va realitzar segons l'expressió fenotípica després de realitzar un panell de screening de síndrome limfoproliferativa (LST) i posteriorment una adaptació interna del panell específic per l'estudi de SLPC-B del consorci d'Euroflow (veure taula 1).

Catlab Informa

	V450	V500	FITC	PE	PERCP-CY5.5	PE-CY7	APC	APC-H7
LST	CD20	CD45	Smlgλ	SmlgK	CD5	CD19	CD3	CD38
Tub 1	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
Tub 2	CD20	CD45	CD31	LAIR	CD11c	CD19	IgM	CD81
Tub 3	CD20	CD45	CD103	CD13	CD22	CD19	CD185	-
Tub 4	CD20	CD45	FMC7	CD25	HLA-DR	CD19	CD27	-

Taula 1. Panell adaptat del consorci d'Euroflow.

Degut a que alguns d'aquests estudis no van ser realitzats de forma completa, només es consideren els casos en els quals es va realitzar l'estudi genètic de MYD88 i proteïnograma. Dels 26 pacients estudiats per genètica molecular, 17 van resultar positius per MYD88 i 9 negatius.

En total, hi ha hagut 16 pacients positius per MYD88+ amb presència d'una banda monoclonal en el proteïnograma. Cal destacar que d'aquests 16 pacients, únicament 3 van ser orientats/diagnosticats abans d'introduir el marcador CD13+ en el panell de SLPC-B, mentre que els 13 restants van ser orientats com un possible LLP/MW a partir d'incorporar aquest marcador a l'àrea.

Si tenim en compte que els pacients confirmats com a un LLP/MW són aquells amb un immunofenotip compatible, MYD88+ i presència d'una banda monoclonal, l'expressió fenotípica d'aquests casos es troba representada a la taula 2, incloent-hi només aquells diagnosticats a partir de la introducció del marcador CD13.

La totalitat dels casos estudiats expressen antigens característics de la línia B (CD19, CD20, CD22, CD79b) i en alguns casos ens podem trobar algun d'aquests, per exemple el CD20 o CD79b sobreexpressat. A més, predomina una clonalitat kappa sobre lambda (8 kappa / 5 lambda). El CD103, CD5, CD10, CD23, CD11c i LAIR són marcadors negatius en pràcticament tots els casos i la positivitat de CD5 s'observa només en un cas. El marcador de memòria CD27 i el d'activació CD25 són positius pràcticament en la totalitat dels pacients, així com el HLA-DR, CD185, CD81, FMC7 i CD200. La immunoglobulina de superfície es troba expressada, i en molts casos sobreexpressada, amb una única excepció que es va orientar com a LLP IgM-. Finalment, pel que fa al marcador més recentment incorporat, el CD13 s'expressa total o parcialment en 9 dels 13 casos.

Catlab Informa

	CD19	CD20	CD45	smlg	CD38	CD5	CD23	CD10	CD79b	CD200	CD43	LAIR	CD11c	IgM	CD81	CD103	CD13	CD22	FMC7	CD25	HLA-DR	CD27
Cas 1	+	+	+	λ	+	-	dim	-	+	+	-	-	+/	++	+	-	+	dim	+	parcial	+	+
Cas 2	+	+	+	κ	+	+/	-	-	++	+	-	-	+/	++	+/	-	+	+	+	+	+	+
Cas 3	+	++	+	κ	dim	+/	het	-	+	dim	-	+	-	+	+	-	+	+	+/	+	+	+
Cas 4	+	+	+	κ	dim	-	het	-	++	+	-	parcial	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Cas 5	+	++	+	κ	+	-	-	-	++	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	dim	+
Cas 6	+	++	+	κ	het	-	-	-	++	+	-	-	-	-	+	-	het	++	++	+	+	+
Cas 7	+	+	+	κ	het	-	-	-	+	+/	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Cas 8	+	++	+	λ	+	-	het	-	++	-	-	+	-	++	+	-	+	+	+	-	+	het
Cas 9	+	+	+	λ	-	-	-	-	+	+	het	-	-	+	+	-	-	dim	+	+	+	+/
Cas 10	+	+	+	κ	-	-	-	-	het	het	-	+	-	++	+	-	parcial	+	+	dim	+	+
Cas 11	+	+	+	λ	-	-	-	-	++	dim	-	-	-	++	+	-	-	+	+/	+	+	+
Cas 12	+	+	+	λ	-	+	-	-	++	+/	+	-	-	+	+	-	+	dim	+	+	+	-
Cas 13	+	+	+	κ	+	-	-	parcial	+	+	+	-	-	++	++	-	het	+	+	+	+	-

Taula 2. Immunofenotip dels casos confirmats de LPL a Catlab.

Catlab Informa

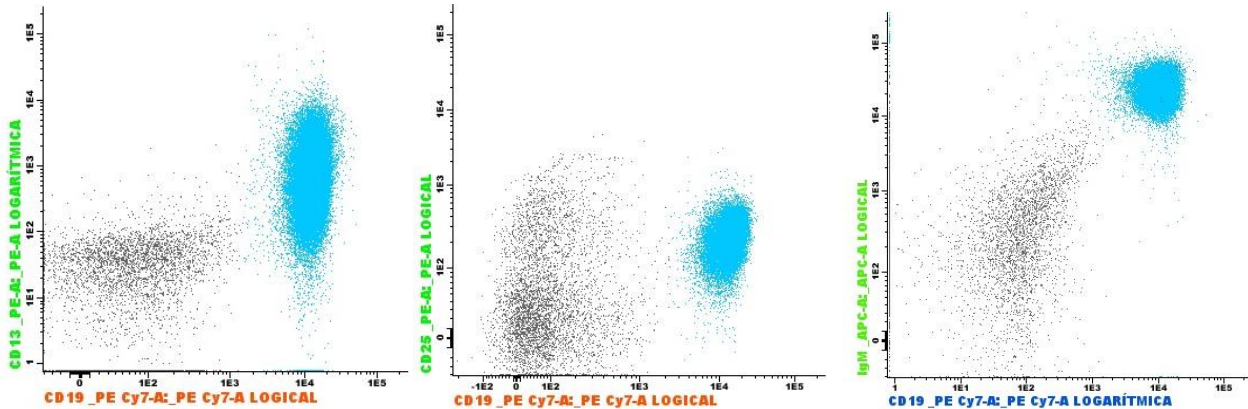


Figura 1. Limfoma limfoplasmocític expressant CD13, CD25 i IgM.

Conclusió

A la pràctica, tan sols 17 de 26 dels estudis orientats com a possible LLP per immunofenotip i amb sol·licitud d'estudi genètic van ser MYD88+, el que mostra la dificultat d'una orientació precisa para LLP per citometria de flux. La presència del marcador CD13 en aproximadament el 69% (9/13) de los casos MYD88+ posa en valor la utilitat d'aquest anticòs per l'orientació diagnòstica en l'estudi de SLPc-B, encara que per si sol no resulta suficientment específic per diferenciar la LLP de les diferents entitats englobades sota els SLPc-B. Per tant, segueix sent rellevant valorar la orientació diagnòstica en el conjunt de l'expressió fenotípica, existint una clara demanda per a la introducció de nous marcadors que siguin capaços de diferenciar entre entitats fenotípicament semblants, en especial les entitats dels SLPc-B que presenten un fenotip comú CD5-CD10-.

L'anàlisi d'aquests casos corrobora la necessitat d'integrar la informació diagnòstica dels resultats de genètica, del proteïnograma i de l'immunofenotip per millorar la capacitat orientativa diagnòstica del conjunt d'aquestes proves. Val a dir que a Catlab, destaquem la necessitat de completar els estudis des del laboratori a partir dels nostres resultats per oferir la millor orientació diagnòstica possible als clínics.

Catlab Informa

Bibliografia (AMA)

Lim JH, Wang JQ, Webb F, et al. Plasma cells arise from differentiation of clonal lymphocytes and secrete IgM in Waldenström macroglobulinemia. *iScience*. 2022;25(8):104856. Published 2022 Aug 4. doi:10.1016/j.isci.2022.104856

Raimbault A, Machherndl-Spandl S, Itzykson R, et al. CD13 expression in B cell malignancies is a hallmark of plasmacytic differentiation. *British Journal of Haematology*. 2018;184(4):625-633. doi:10.1111/bjh.15584

Swerdlow SH. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.*; 2017. <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BB24571652>

Stanganelli C, Cabrera J, Slavutsky I. Macroglobulinemia de Waldenström. Estudios citogenéticos y moleculares. *Revista Hematología*. 2021;25(1):21-32. doi:10.48057/hematologia.v25i1.356

Gorczyca W. *Flow Cytometry in Neoplastic Hematology.*; 2017. doi:10.1201/9781315113715

The EuroFlow Consortium. *EuroFlow innovation and standardization of flow cytometric diagnosis, classification and monitoring in hemato-oncology.*; 2017.

Arnau Sánchez García
Resident
CATLAB
Tel. 93.736.50.50 - ext. 19401,
35007
asanchez@catlab.cat
www.catlab.cat

Carlos Lázaro
Facultatiu Citometria de flux
CATLAB
Tel. 93.748.56.00 - ext. 35041 /
626.184.651
clazaro@catlab.cat
www.catlab.cat

Judith Vidal
Facultativa Responsable Citometria
de flux
CATLAB
Tel. 93.748.56.00 - ext. 35041 /
616.26.48.91
jvidal@catlab.cat
www.catlab.cat