

Utilidad de la Citometría de Flujo en el diagnóstico y pronóstico del Mieloma Múltiple

II

Cuadernos de Hematología

*Dra. Natividad de los Reyes
Montes Barqueros¹*

Dr. Jorge Monserrat Coll²

Dra. María Victoria Martínez Sánchez¹

Dra. María Rocío Álvarez López^{1,3}

Dr. Alfredo Minguela Puras^{1,3}

*¹Servicio de Inmunología.
Hospital Universitario Virgen de la
Arrixaca (Murcia)*

*²Servicio de Hematología.
Hospital Universitario Virgen de la
Arrixaca (Murcia)*

*³Centro de Investigación Biomédica
en Red de Enfermedades Hepáticas
y Digestivas (CIBERehd)*

Resumen

- En pacientes con gammapatías monoclonales, la citometría de flujo (CF) permite diferenciar las células plasmáticas (CPs) patológicas de las sanas, estimar marcadores de valor pronóstico y evaluar la respuesta al tratamiento.
- Los marcadores más utilizados para identificar las CPs son CD138 y CD38. Así mismo, los marcadores que nos permiten diferenciar las CPs patológicas de las sanas son CD56, CD19, CD27 y CD45, y en menor medida, CD28 y CD117.
- El ratio CPs sanas/patológicas es un factor que permite evaluar:
 - 1) el riesgo de progresión a MM en pacientes con MGUS o MM-quiescente;
 - 2) el riesgo de progresión y mala evolución en MM, y
 - 3) el riesgo de recaída y muerte en pacientes con MM tras el trasplante.
- El análisis del ciclo celular de las CPs mediante CF facilita la identificación de anomalías cromosómicas numéricas (aneuploidía) y la estimación del índice de proliferación de las CPs. Índices de proliferación elevados (fase S >3%) se asocian a pronósticos más adversos.

Utilidad de la Citometría de Flujo en el diagnóstico y pronóstico de Mieloma Múltiple

- El índice de apoptosis de las CPs estimado mediante tinción con anexina-V y CF es un factor predictivo de valor pronóstico, también para tratamientos con talidomida o bortezomib.

Utilidad de la Citometría de Flujo en el diagnóstico y pronóstico del Mieloma Múltiple

Dra. Natividad de los Reyes Montes Barqueros, Dr. Jorge Monserrat Coll, Dra. María Victoria Martínez Sánchez, Dra. María Rocío Álvarez López y Dr. Alfredo Minguela Puras

La citometría de flujo en el estudio de las gammopatías

El mieloma múltiple (MM) es el paradigma de las denominadas gammopatías monoclonales (GMs). Las GMs son un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación clonal de células plasmáticas (CPs) y la presencia en suero de una inmunoglobulina homogénea, o un fragmento de ella, denominado *componente monoclonal*. Las GMs engloban a un espectro de entidades clínicas, desde cuadros relativamente benignos como la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) a otros malignos como el MM¹.

El avance de las ciencias básicas aplicadas al estudio de las neoplasias hematológicas ha promovido profundos cambios en los algoritmos terapéuticos. Entre ellos, la caracterización de marcadores en los clones tumorales mediante citometría de flujo (CF) ha permitido una mejor tipificación de las distintas GMs, facilitando así su diagnóstico diferencial. Para explicar el incremento de la supervivencia alcanzado durante la última década en el MM hay que añadir, además, la identificación de alteraciones citogenéticas con impacto pronóstico al diagnóstico, la optimización de las terapias de soporte y, en particular, el mejor conocimiento de la biología y patogenia molecular de las GMs que ha posibilitado el desarrollo de fármacos más eficaces². A mediados de los noventa, la mediana de supervivencia del MM era de 3 años, mientras que actualmente se estima en más de 5 años;

incluyendo un 20% de pacientes cuya supervivencia excede los 10 años³. En paralelo, se han venido modificando tanto los criterios diagnósticos de las GMs¹ como los parámetros de estadiaje⁴ y la definición de respuesta al tratamiento⁵. Todo ello facilita la adaptación de la mejor opción terapéutica disponible al momento evolutivo de la enfermedad y a las características de cada paciente.

Las exploraciones complementarias habituales aplicadas al diagnóstico de las GMs son principalmente:

- 1) citomorfología del aspirado de médula ósea;
- 2) hemograma, determinación de la función renal y niveles de calcio, β_2 -microglobulina, albúmina y LDH;
- 3) inmunoelectroforesis sérica y urinaria para constatación y cuantificación del componente monoclonal, y
- 4) técnicas radiológicas, desde la radiología simple a la tomografía computarizada, la resonancia magnética y la tomografía de emisión de positrones⁶.

Como se describe en este capítulo, la CF se ha consolidado como una herramienta útil para demostrar clonalidad de forma sensible, específica y objetiva; así como para evaluar tanto la respuesta terapéutica como la progresión en fases preclínicas o avanzadas de la enfermedad.

Entre las aplicaciones de la CF en el estudio de las GMs podemos describir:

- 1) identificación diferencial de las CPs tumorales de las reactivas y de las sanas;
- 2) evaluación de marcadores de valor pronóstico;
- 3) identificación del riesgo de progresión de MGUS y MM-quiescente, y
- 4) evaluación de la respuesta al tratamiento.

En este sentido, aunque el recuento de CPs mediante CF generalmente proporciona valores inferiores a los estimados por microscopía, existe una correlación significativa entre ambas técnicas. Una y otra permiten, además, discriminar grupos de pacientes con pronósticos más adversos para valores de CPs en médula ósea mayores del 30 o 15%, respectivamente⁷.

Imunofenotipo de las CPs sanas y patológica

Los marcadores más utilizados en CF para la identificación de las CPs en humanos son CD138 y CD38 (Fig. 1). **CD138** (Sindecano-1) es una molécula de la familia del heparán-sulfato que se expresa en CPs, células epiteliales, mesenquimales y carcinomas. CD138 es un receptor de diversos factores de crecimiento de especial relevancia para las CPs de MM. Su expresión aparece tardíamente en la diferenciación de los linfocitos B, y se detecta a partir del estadio de plasmoblasto. La tinción con CD138 en leucocitos, permite identificar de forma específica todas las CPs, aunque su expresión puede estar incrementada en las CPs patológicas en comparación con las sanas. Esta molécula se libera al

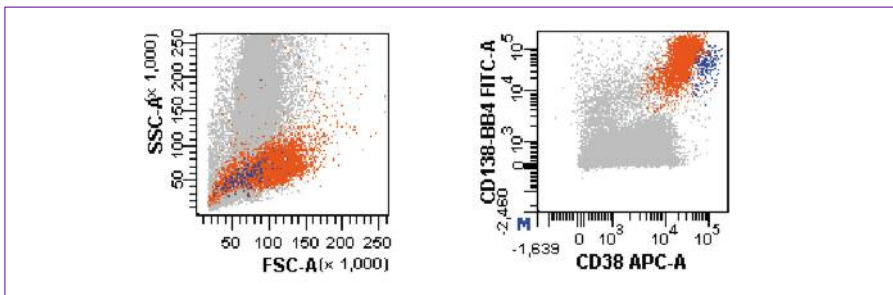


Figura 1. Representación en gráficos de puntos (dot plots) de células procedentes del aspirado de médula ósea de un paciente con mieloma múltiple. En el gráfico de la izquierda se representa Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) correspondientes al tamaño y a la granulación/complejidad celular, respectivamente. Se detectan dos poblaciones de células plasmáticas (CPs), CPs sanas (azul) con menor FSC (0,37% del total celular) y patológicas (naranja) con mayor FSC (7,35% del total celular). En el gráfico de la derecha se representan los marcadores CD138 (conjugado con fluoresceína) y CD38 (conjugado con alofocianina). Ambas poblaciones de CPs son CD138+ aunque las CPs sanas (azul) tienen mayor intensidad de CD38 que las patológicas (naranjas).

Utilidad de la Citometría de Flujo en el diagnóstico y pronóstico del Mieloma Múltiple

Dra. Natividad de los Reyes Montes Barqueros, Dr. Jorge Monserrat Coll, Dra. María Victoria Martínez Sánchez, Dra. María Rocío Álvarez López y Dr. Alfredo Minguela Puras

plasma por CPs apoptóticas, pasando a ser una molécula soluble cuya presencia en suero permite estimar la masa tumoral y el índice apoptótico (espontáneo e inducido)^{8,9}.

CD38 es un marcador cuya expresión comparten numerosas células hematopoyéticas, especialmente en sus etapas tempranas de maduración y tras su activación. Hay que destacar el elevado nivel de expresión que adquiere CD38 tanto en CPs sanas como patológicas, lo que permite diferenciarlas del resto de leucocitos^{8,9}. Además, la expresión de CD38 puede estar reducida en CPs de MM respecto a las CPs sanas (Fig. 1).

El marcador más característico que define a las CPs patológicas es **CD56** (Fig. 2). CD56, molécula típicamente asociada a las células NK (*Natural Killer*), se expresa en las CPs del 78% de los pacientes de MM, mientras que en las CPs sanas y en las células de la leucemia de CPs, su expresión suele ser negativa^{8,9}. La

expresión de CD56 parece estar en relación con el nicho de localización de las CPs. De hecho, CD56 es una molécula de adhesión entre las CPs y entre éstas y los osteoblastos. Además, el fenotipo CD56- se asocia a ausencia de osteolisis. También CD56- se asocia a isotipo de cadena ligera λ y a mal pronóstico.

Junto a CD56, **CD19** es un marcador de gran utilidad para diferenciar las CPs patológicas de las sanas. En la mayoría de los pacientes con MM (97,5%) se manifiesta una pérdida de la expresión de CD19 sobre las CPs patológicas, mientras que las CPs sanas habitualmente retienen la expresión de este marcador^{8,9}.

Otro marcador diferencial es **CD28**. Presente con normalidad en células T, su expresión es aberrante en CPs patológicas en el 47,8% de los pacientes^{8,9}. En células T, CD28 se implica en la activación celular y en la secreción de citoquinas, pero se desconoce su función en las CPs de MM. No obstante, su expresión se

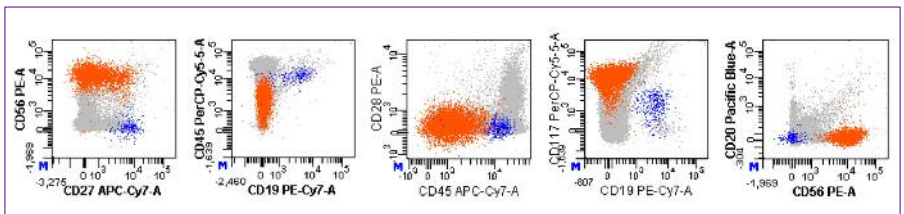


Figura 2. Representación en gráficos de puntos de marcadores de malignidad y pronóstico en la misma muestra celular de la figura 1. Las CPs sanas (azul) muestran un fenotipo CD56- CD27++ CD45++ CD19+/- CD28- CD117-/+ CD20-, mientras que el fenotipo de las CPs patológicas (naranja) es CD56++ CD27-/+débil CD45+débil/CD19- CD28- CD117++ CD20-.

asocia a una peor evolución (progresión de la enfermedad por aumento del riesgo de recaída).

Otra molécula de utilidad es **CD27**. Se trata de un marcador de memoria inmunológica, cuya expresión suele restringirse a células linfoides del centro germinal, células memoria y CPs sanas. La expresión de CD27 en CPs patológicas está claramente disminuida en el 50% de los pacientes^{8,9}. Cuando su expresión se mantiene en niveles normales, se asocia a un mejor pronóstico. Por otro lado, se ha descrito que CD27 reduce su expresión con la progresión de la enfermedad.

Otro marcador asociado a malignidad y a pronóstico adverso es **CD45**. Esta molécula es una tirosina-fosfatasa de expresión casi universal en las células del sistema hematopoyético (*marcador panleucocitario*). Se expresa intensamente en las CPs sanas, pero su expresión se reduce o se negativiza en las CPs patológicas. Se ha descrito, además, que las CPs en proliferación tanto sanas como patológicas son CD45^{intermedias} y esta correlación entre el índice de proliferación y CD45 se confirma por estar a su vez inversamente relacionada con la presencia de Bcl-2, proteína que regula la apoptosis celular⁸.

CD45 se relaciona con otra molécula asociada a malignidad, **CD221** o **IGF-1R** (*insulin-like growth factor 1 receptor*). Los estudios clínicos revelan que la ausencia de CD45 en CPs

patológicas se asocia a peor pronóstico. Aparentemente, la ausencia de CD45 favorece la activación de la proteína-quinasa AKT, molécula relacionada con la supervivencia celular mediada por IGF-1 e insulina. CD221 se expresa de manera aberrante en CPs de MM, por lo que los pacientes con fenotipo CD221++ muestran supervivencias más cortas⁸. Además su expresión se asocia a translocaciones de mal pronóstico t(4;14) y t(14;16).

También de forma anormal las CPs patológicas pueden expresar **CD117** (conocido como receptor de c-Kit, *cytokine stem cell factor*), aproximadamente en un tercio de los pacientes. CD117 se expresa de forma natural en células progenitoras de estirpe mieloide. La expresión de CD117 en CPs patológicas se asocia a hiperdiploidía, a ausencia de translocaciones y a mejor pronóstico⁸.

CD200 (OX-2) es una glicoproteína de membrana de carácter inmunoregulador, que al interactuar con su receptor (CD200R u OX-2R) suprime la respuesta mediada por células T. De hecho, se ha demostrado que los pacientes que muestran expresión positiva de CD200 sobre sus CPs patológicas tienen una supervivencia libre de eventos más reducida (14 meses) comparada con los que no la expresan (24 meses) tras terapia y trasplante. Además, es un parámetro pronóstico independiente del estadio clínico y de los niveles de β_2 -microglobulina sérica¹⁰.

Utilidad de la Citometría de Flujo en el diagnóstico y pronóstico del Mieloma Múltiple

Dra. Natividad de los Reyes Montes Barqueros, Dr. Jorge Monserrat Coll, Dra. María Victoria Martínez Sánchez, Dra. María Rocío Álvarez López y Dr. Alfredo Minguela Puras

Algunos pacientes de MM presentan una población de CPs patológicas que retienen marcadores de linfocitos B, como **CD20** y, más raramente **CD19**, aunque no se conocen casos de co-expresión de ambos. En los pacientes con una población de CPs CD19+ o CD20+ se detecta una mayor asociación con reordenamiento t(11;14), diploidía y buen pronóstico. Por otro lado, el fenotipo CD19-CD20-CD27- se relaciona con reordenamientos de IgH de pronóstico adverso -t(4;14) y t(14;16)- y a ausencia de hiperdiploidía. La expresión de CD20 se asocia a CPs pequeñas. También la expresión de CD28 se asocia a del(17p) y a t(14;16). La del(13q) y t(4;14) igualmente se han asociado a la falta de expresión de CD117⁹.

Otros antígenos de interés en el estudio del fenotipo de las CPs, pero cuya aplicabilidad clínica no ha sido completamente establecida, son CD33, CD34, CD44 y CD49d (VLA-4)⁹.

Inmunoglobulinas citoplasmáticas

El estudio de las inmunoglobulinas citoplasmáticas (IgCit), tanto de cadenas ligeras (kappa y lambda) como pesadas (IgA, IgD, IgG e IgM) permiten, por un lado, establecer la clonalidad de las CPs patológicas y diferenciarlas de las CPs sanas de distribución policlonal, y por otro, identificar la presencia de múltiples líneas de CPs patológicas (Fig. 3). Para la correcta identificación de la presencia de más de una línea de CPs patológica es necesario incluir en el panel tanto cadenas ligeras como pesadas y, a ser posible, en combinación de ambas. Por otro lado, cuando el fenotipo de membrana no permite diferenciar las CPs patológicas de las sanas, el estudio de la IgCit puede ayudar a establecer el ratio de CPs patológicas/sanas.

Índice de proliferación y contenido de ADN

El análisis del ciclo celular de las CPs mediante CF y doble tinción con

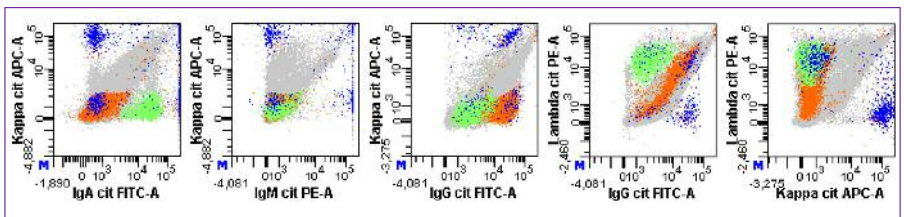


Figura 3. Representación en gráficos de puntos de las inmunoglobulinas citoplasmáticas (IgCit) en la misma muestra celular de las figuras 1 y 2. Las CPs sanas (azul) muestran una distribución policlonal tanto de las cadenas ligeras (kappa y lambda) como de las pesadas (IgA, IgG e IgM). Sin embargo, se pueden diferenciar dos líneas de CPs patológicas, una monoclonal de tipo IgA/lambda (verde claro) y otra monoclonal de tipo IgG/lambda (naranja). El resto de marcadores de superficie celular ensayados en las figuras 1 y 2 no habían permitido la distinción de la doble línea de CPs patológicas.

yoduro de propidio y CD38 (Fig. 4), aporta información sobre dos aspectos complementarios en el diagnóstico y pronóstico de las gammopatías. Por un lado, la identificación de anomalías cromosómicas numéricas (aneuploidía), y por otro, la estimación del índice de proliferación de las CPs. Diversos trabajos han puesto de manifiesto que la determinación del contenido de ADN mediante CF es un parámetro de utilidad para la evaluación clínica en MM. Entre el 50 y el 70% de los pacientes de MM presentan aneuploidías, siendo la mayoría de las veces por hiperdiplo-

día con ganancia de cromosomas, típicamente trisomías, y con menor frecuencia por hipodiploidía con pérdida de cromosomas. Las ganancias más frecuente suelen ser de los Cr-9 y -15, mientras que la pérdida más frecuente es la del Cr-13. Generalmente, la hiperdiploidía se asocia a mejor pronóstico, mientras que las hipodiploidías lo hacen a una peor evolución. La diploidía tiene un efecto neutro, salvo que se asocie a translocaciones de buen pronóstico t(11;14) o de mal pronóstico t(4,14) y t(14;16).

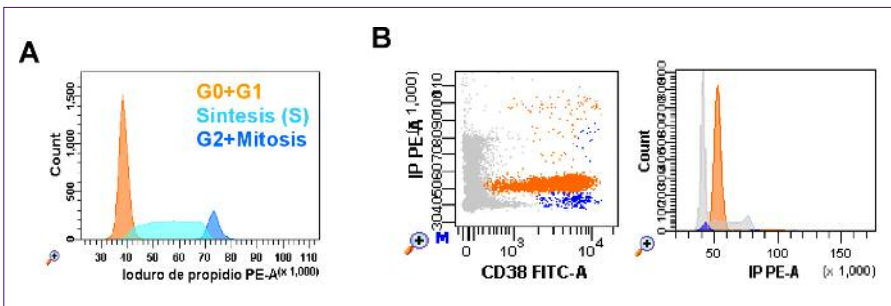


Figura 4. Análisis del ciclo celular y del contenido de ADN mediante citometría de flujo por doble tinción con yoduro de propidio (IP, contenido de ADN) y CD38 (CPs) de las células de médula ósea del paciente con MM que se muestra en las figuras 1-3. A) Histograma que muestra el contenido de ADN y la distribución en los diferentes estadios del ciclo celular, fase G0+G1 (naranja), fase de síntesis (azul claro, S) y fase G2+M (azul oscuro) en las células no plasmáticas de la médula ósea. Se considera como "índice de proliferación celular" a la suma de las células en fase S y G2+M. B-izquierda) Gráfico de puntos que representa el ciclo celular de las CPs CD38++ sanas (azul) y patológicas (naranja) y del resto de células no-plasmáticas (gris). Las CPs sanas (azul) muestran un contenido de ADN diploide mientras que las CPs patológicas (naranja) son hiperdiploides. Además, se aprecia que parte de las CPs tanto sanas como patológicas se distribuyen en las diferentes fases del ciclo celular y, por tanto, se desplazan hacia arriba al tener mayor contenido en ADN y una mayor tinción con IP. B-derecha) representación en histograma del ciclo celular de las células que se muestran en el gráfico de puntos.

Utilidad de la Citometría de Flujo en el diagnóstico y pronóstico del Mieloma Múltiple

Dra. Natividad de los Reyes Montes Barqueros, Dr. Jorge Monserrat Coll, Dra. María Victoria Martínez Sánchez, Dra. María Rocío Álvarez López y Dr. Alfredo Minguela Puras

El análisis del ciclo celular por citometría ha permitido comprobar que valores superiores al 3% de CPs en fase de síntesis (fase S) se asocian a pronóstico más adverso y es un parámetro independiente de supervivencia en pacientes con MM. Por otro lado, San Miguel y cols. describen que el número de CPs en fase S, junto a otros marcadores pronóstico como β_2 -microglobulina, edad y estado del paciente, son de gran utilidad para la correcta estratificación de los pacientes de MM¹¹. Aunque los pacientes con MM suelen tener CPs con mayores índices de proliferación que los pacientes con MGUS o MM-quiescente, no es un dato que permita una clara discriminación de este tipo de patologías.

Índice de apoptosis

En los estados iniciales de la patogénesis del MM tiene lugar una desregulación del ciclo celular que conduce a la expansión inicial de la clona tumoral. De manera tradicional, se ha relacionado el MM con una patología de alta proliferación. Sin embargo, estudios recientes revelan que sólo un pequeño porcentaje de la clona patológica proliferativa es la pérdida de los controles de la *apoptosis o muerte celular programada* de las CPs tumorales lo que lleva a su acumulación y al desarrollo de la enfermedad¹².

Las nuevas terapias como el *bortezomib* o la *talidomida* poseen potentes mecanismos de acción como inductores de apoptosis. Sin embargo, hasta ahora han sido muy esca-

sos los estudios dirigidos a evaluar el impacto del índice de apoptosis de las CPs patológicas en la evolución de la enfermedad y en la eficacia de las terapias. En la actualidad, la CF permite un análisis rápido y sencillo, basado en la detección de moléculas de fosfatidil-serina en la membrana celular de las CPs mielomatosas mediante la utilización de *anexina-V*. La *anexina-V* es un marcador ideal por reflejar el estado apoptótico de las células, con independencia del origen del estímulo que la indujo, intrínseco o extrínseco.

Estudios recientes parecen demostrar que la estimación del índice de apoptosis de las CPs patológicas es un parámetro independiente de gran valor pronóstico predictivo. De tal forma que con valores superiores a 4,5% de CPs apoptóticas, los pacientes manifiestan una supervivencia total de 38 meses de media, mientras que desciende hasta los 16 meses en aquellos pacientes en los que se define un valor inferior al 4,5%. Estos datos también son aplicables a pacientes en tratamiento con *talidomida* y *bortezomib* tras la primera y segunda recaída¹². Si tenemos en cuenta que la introducción de estos nuevos fármacos ha reducido significativamente la capacidad predictiva de los factores pronósticos clásicos como la citogenética y las características proliferativas de las CPs, la evaluación del índice de apoptosis de las CPs por citometría se perfila como un marcador pronóstico de gran utilidad en el futuro.

Paneles multiparamétricos (8 fluorescencias)

En los últimos años, la introducción de la citometría digital multiparamétrica ha estimulado el desarrollo de paneles que facilitan el análisis de los marcadores descritos en los apartados anteriores. En la tabla I se describen los paneles que se utilizan en nuestro centro y el recientemente propuesto por el grupo de trabajo Euroflow¹³. En los tubos 2-5 de nuestro panel se abordan marcadores relacionados con el estudio de las CPs (fenotipo para diagnóstico y pronóstico, IgCit, apoptosis y ciclo celular) pero sin perder de vista de forma genérica el resto de poblaciones celulares de la médula ósea. En el tubo 1 se analizan, además, las subpoblaciones de linfocitos T (CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺), células NK (CD3⁺CD16⁺), mieloides maduras (CD66⁺CD13⁺⁺CD16⁺⁺) e inmaduras

(CD66⁺CD13^{-/+bajo}) y monocitos (CD14⁺CD13⁺).

El panel propuesto por Euroflow se centra específicamente en el estudio de los marcadores de diagnóstico y pronóstico de las CPs, y en discriminar posible clonalidad por medio del estudio de las cadenas ligeras de IgCit. Así mismo, pretende evaluar dos marcadores de utilidad menos establecida como son CD81 y β_2 -microglobulina. CD81 (de la familia de las tetraspaninas) se incluye por su relación con la supervivencia celular y el potencial invasivo de las CPs. El mismo efecto ha sido observado para CD82 (otra tetraspanina). Ambas moléculas se relacionan con muerte de CPs mielomatosas; parece que actúan reduciendo la expresión de AKT, activando FoxO a través de sus factores de transcripción y disminuyendo la actividad de las

Tabla I

Panel de anticuerpos monoclonales utilizado en nuestro centro y el propuesto por Euroflow

Panel Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca								
	FITC	PE	PerCP*	PE-Cy7	APC	APC-Cy7*	Pacific Blue	AmCyan*
Tubo 1	CD66	CD13	CD8	CD4	CD14	CD45	CD16	CD3
Tubo 2	CD138	CD56	CD45	CD19	CD38	CD27	CD20	
Tubo 3	CD138	CD28	CD117	CD19	CD38	CD45	Anexina-V	
Tubo 4	IgA-cit	IgM-cit	CD38	CD19	Ig κ -cit	CD45	CD56	
Tubo 5	IgG-cit	Ig λ -cit	CD38	CD19	Ig κ -cit	CD45	CD56	
Panel Euroflow								
Tubo 1	CD38	CD56	β_2 -micro	CD19	Ig κ -cit	Ig λ -cit	CD45	CD138
Tubo 2	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81	CD45	CD138

* Fluorocromo o sus equivalentes (PerCP-Cy5.5, APC-H7 o Pacific Orange)

Utilidad de la Citometría de Flujo en el diagnóstico y pronóstico del Mieloma Múltiple

Dra. Natividad de los Reyes Montes Barqueros, Dr. Jorge Monserrat Coll, Dra. María Victoria Martínez Sánchez, Dra. María Rocío Álvarez López y Dr. Alfredo Minguela Puras

vías mTOR y mTOR/riCTOR¹⁴. La utilidad de la β_2 -microglobulina evaluada en plasma en el manejo de pacientes con MM es bien conocida, sin embargo, es difícil encontrar referencias de la utilidad de la evaluación de la β_2 -microglobulina expresada sobre células plasmáticas.

Discriminación entre MM y otras gammapatías

Son diversas las patologías clonales que involucran células con diferenciación plasmocitoide y componente monoclonal en suero: MM, MM-quiescente, MGUS, macroglobulinemia de Waldstrom (WM) y/o linfoma linfoplasmocitoide, plasmocitoma, leucemia de células plasmáticas (PCL), linfoma de la zona marginal (MZL) y AL-amiloidosis. El análisis del fenotipo de las células patológicas en cada caso mediante CF permite diferenciar dichas patologías.

Quizás el parámetro que permite una mejor discriminación entre MM, MM-quiescente y MGUS, aparte de los parámetros clínicos y serológicos, es la relación existente entre número de CPs sanas y patológicas. En MGUS y MM-quiescente la coexistencia de CPs sanas y patológicas es habitual, pero es raro en MM. Un 82% de los pacientes de MGUS y un 40% de pacientes de MM-quiescente muestran más del 5% de CPs sanas. Así, el parámetro que mejor parece discriminar los pacientes con MGUS de los pacientes con MM es el ratio CPs sanas/patológicas inferior o superior al 3%, respectivamente¹⁵. En este estudio, del Grupo Español de Mielo-

ma, se puso de manifiesto además que el riesgo de progresión a MM de los pacientes con MGUS y MM-quiescente era del 25 y 63%, respectivamente, si las CPs patológicas eran \geq al 95%, frente al 5 y 8%, respectivamente, con valores de CPs patológicas $<$ al 95%. Más recientemente el mismo grupo ha demostrado que los pacientes con MM con ratios de CPs sanas/patológicas $>$ al 5% tenían mejor pronóstico, menor frecuencia de citogenética de alto riesgo, mejores respuestas al tratamiento y mejores supervivencias libres de progresión y total¹⁶.

Por otro lado, las características fenotípicas de las CPs patológicas suelen ser diferentes en MGUS y el MM. Generalmente, las CPs monoclonales en MGUS, a diferencia del MM, suelen retener la expresión de CD19 y CD27 y su pérdida se asocia con progresión a MM; además, la expresión de CD28 es rara (19% de los pacientes) y habitualmente débil⁹.

Para discriminar MM de otras patologías de CPs es importante analizar la expresión de las moléculas CD19, CD45 y CD56. Así, el MZL suele tener el fenotipo CD19⁺CD45⁺CD56⁻, lo que permite diferenciarlo del MM (CD19⁻CD45⁻CD56⁺), de la MW (CD19⁺⁺CD45⁺CD56⁻ con CD138 generalmente negativo), de la LCP (CD19⁻CD45⁻CD56⁻)⁹.

Utilidad del estudio de la sangre periférica

Es posible detectar CPs patológicas circulando en sangre periférica en

una elevada proporción de pacientes con MM (>80%) y, aunque con menor frecuencia, también en pacientes con MGUS (20%)¹⁷. Este dato tiene, además, valor diagnóstico y pronóstico, de manera que la supervivencia global disminuye según se incrementan las cifras de CPs detectadas en la sangre¹⁸. Con todo, las cifras de CPs circulantes no parecen guardar una relación clara con la masa tumoral, sino más bien con la biología del tumor.

También se ha demostrado útil en pacientes afectados por linfomas y mielomas, el estudio en sangre periférica del grado de activación de los linfocitos T. De manera que es posible detectar cifras más elevadas de linfocitos T que expresan marcadores de activación CD57⁺, CD62L⁻, CD(16+56)⁺, CD28⁻ en los pacientes afectados por MM que en los con-

troles sanos y que en los pacientes con MGUS¹⁹ (y datos no publicados de nuestro laboratorio).

Monitorización post-tratamiento

Las técnicas convencionales para evaluar la respuesta al tratamiento en MM no siempre tienen suficiente sensibilidad para identificar de forma temprana pacientes que podrían beneficiarse de nuevas terapias tras el trasplante. Sin embargo, técnicas recientes de biología molecular (ASO-PCR) y de CF sí alcanzan el grado de sensibilidad necesario. Mediante CF es posible detectar CPs tumorales 3 meses post-trasplante en al menos el 40% de los pacientes. Una vez detectadas, las cifras de CPs tumorales se incrementa hasta alcanzar la progresión clínica. Estos pacientes en los que se detecta la presencia de CPs patológicas tempranamente post-trasplan-

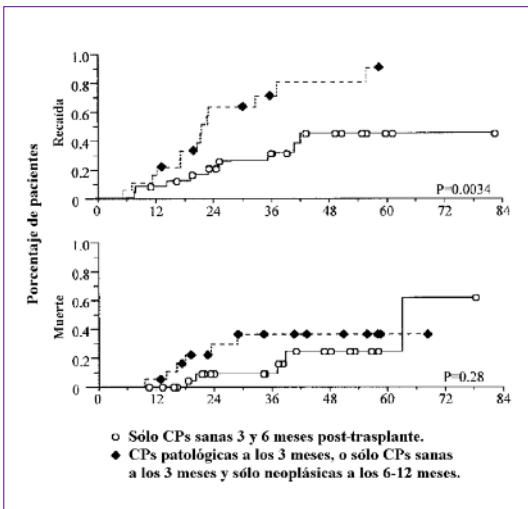


Figura 5. Porcentaje de pacientes con MM que tras trasplante de médula ósea recaen o mueren. Los pacientes en los que sólo se detectan CPs sanas a los 3 y 6 meses post-trasplante tienen una supervivencia del 100% a los 5 años (rombo negro), mientras que los que tienen CPs patológicas a los 3 meses o sólo CPs sanas a los 3 meses pero sólo neoplásicas a los 6-12 meses la supervivencia bajó hasta el 54% (círculo blanco). (datos extraídos de Rawstrom et al. Blood 2002;100: 3095-100).

Utilidad de la Citometría de Flujo en el diagnóstico y pronóstico del Mieloma Múltiple

Dra. Natividad de los Reyes Montes Barqueros, Dr. Jorge Monserrat Coll, Dra. María Victoria Martínez Sánchez, Dra. María Rocío Álvarez López y Dr. Alfredo Minguela Puras

te, o en los que a los 6 meses sólo se detectan CPs patológicas (sin CPs sanas residuales) tienen una supervivencia libre de progresión de 20 meses, inferior que la de los pacientes en los que no se detectaron (35 meses). Por otro lado, aquellos pacientes libres de CPs patológicas a los 3 meses y que continuaron sin ellas en el segundo estudio (6-12

meses) tuvieron un riesgo muy reducido de progresión y una supervivencia del 100% a los 5 años. Por el contrario, aquellos que tenían sólo CPs patológicas a los 3 meses, o sólo CPs sanas a los 3 meses pero sólo neoplásicas a los 6-12 meses la supervivencia bajó hasta el 54% a los 5 años²⁰ (Fig. 5).

Bibliografía

1. International Myeloma Working Group. 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(5):749-57.
2. Reece DE. Management of multiple myeloma: The changing Landscape. *Blood* 2007; Reviews; 21(6):301-14.
3. Kumar A, Djulbegovic B. Myeloma (multiple). *Clin Evid* 2006;15:1-29.
4. Greipp PR, S Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23(15):3412-20.
5. Durie BG, Harousseau JL, S Miguel J, Bladé J, Barlogie B, Anderson K et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20(9):1467-73.
6. D'Sa S, Abildgaard N, Tighe J, Shaw P, Hall-Craggs M. Guidelines for the use of imaging in the management of myeloma. *Br J Haematol* 2007;137(1):49-63.
7. Paiva B, Vidriales MB, Pérez JJ, Mateo G, Montalbán MA, Mateos MV 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(11):1599-1602.
8. Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barille-Nion S, Harousseau JL, Moreau P et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006;91(9):1234-40.
9. 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. *Br J Haematol* 2010;149,3-351.
10. Moreaux J, Hose D, Reme T, Jourdan E, Hundemer M, Legouffe E et al. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2006;108(13):4194-7.
11. San Miguel JF, García-Sanz R, González M, Orfao A. DNA cell content studies in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1996;Sep;23(1-2):33-41.
12. Minarik J, Scudla V, Ordeltova M, Bacovsky J, Pika T, Langova K. Prognostic significance of apoptotic index in multiple myeloma patients treated by conventional therapy and novel agents, thalidomide and bortezomib. *Eur J Haemat* 2009;83:528-34.
13. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J 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.
14. Tohami T, Drucker L, Shapiro H, Radnay J, Lishner M. Overexpression of tetraspanins affects multiple myeloma cell survival and invasive potential. *The FASEB Journal* 2007;691-99.
 15. Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, García de Coca A 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.
 16. Paiva B, Vidriales MB, Mateo G, Pérez JJ, Montalbán MA, Sureda A 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;114:4369-72.
 17. Kumar S, Rajkumar SV, Kyle R, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R et al. Prognostic value of circulating plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J Clin Oncol* 2005;23(24):5668-74.
 18. Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, Tracz MJ, Gertz MA, Lacy MQ et al. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2005;106(7):2276-9.
 19. van den Hove LE, Meeus P, Derom A, Demuynck H, Verhoef GEG, Vandenberghe P et al. Lymphocyte profiles in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: flow-cytometric characterization and analysis in a two-dimensional correlation biplot. *Ann Hematol* 1998b, 76(6):249-56.
 20. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002;100:3095-3100.