

## La citometría de flujo en el estudio de las discrasias de células plasmáticas

Natividad de los Reyes,\* Jorge Monserrat-Coll,\*\* María V Martínez-Sánchez,\* José A Campillo,\* Adela Periago,\*\*\* Consuelo González,\*\* Jerónima Ibáñez,\*\*\*\* José M Moraleda,\*\* María R Álvarez-López,\* Alfredo Minguela-Puras\*

### RESUMEN

En la última década, la supervivencia de los pacientes afectados por discrasias de células plasmáticas se ha incrementado, principalmente por el mejor conocimiento de las alteraciones celulares y moleculares implicadas en cada paciente. La citometría de flujo y los estudios genéticos han contribuido de forma decisiva a definir mejor las diferentes afecciones y a establecer pautas terapéuticas adecuadas en cada caso. La citometría de flujo permite caracterizar fenotípicamente las células plasmáticas (CD38<sup>++</sup>CD138<sup>+</sup>) y diferenciar las patológicas (generalmente CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) de las sanas o reactivas (generalmente CD19<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), a la vez que proporciona información de marcadores con utilidad pronóstica (CD27, CD28, CD45, CD117, CD200 y CD221). El estudio de la clonalidad de las cadenas pesadas o ligeras de las inmunoglobulinas ayuda a definir y a cuantificar con exactitud el ratio de células plasmáticas patológicas-sanas, otro parámetro con impacto pronóstico. La citometría de flujo aporta información adicional de utilidad pronóstica, como la aneuploidía y los índices de proliferación y apoptosis de las células plasmáticas. La elevada sensibilidad de la citometría de flujo multiparamétrica hace que sea también una herramienta de utilidad para la monitorización de la enfermedad residual tras el tratamiento, una información predictiva de la evolución de la enfermedad, particularmente de utilidad en la era de los nuevos fármacos, como bortezomib y lenalidomida. Por tanto, la citometría de flujo se ha convertido en una herramienta útil para el diagnóstico, el establecimiento de terapias adaptadas al pronóstico de la enfermedad y el seguimiento de las discrasias de células plasmáticas.

**Palabras clave:** discrasias de células plasmáticas, citometría de flujo, diagnóstico, pronóstico, monitorización post-tratamiento.

### ABSTRACT

#### Flow cytometry in the study of plasma cell dyscrasias

In the last decade survival of patients suffering from plasma cell dyscrasias has improved mainly due to a better understanding of its cellular and molecular pathophysiology. Flow cytometry and genetic studies have decisively contributed to a better categorization of the disease and to set the adequate treatment in each patient. Flow cytometry facilitates the phenotypic characterization of plasma cells (CD38<sup>++</sup>CD138<sup>+</sup>), the differentiation between malignant (generally CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) and normal or reactive plasma cells (generally CD19<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), and at the same time provides us with relevant prognostic parameters (CD27, CD28, CD45, CD117, CD200 y CD221). Clonality analysis of immunoglobulin heavy and/or light chains allows to define and to precisely quantify the ratio of pathologic/healthy plasma cells, also with prognostic interest. Flow cytometry offers additional prognostic information such as the presence of aneuploidy as well as the plasma cell proliferative and apoptotic indexes. The high sensitivity of multiparametric flow cytometry makes it also useful for monitoring the residual disease after treatment, providing relevant predictive information of the evolution of the disease, particularly with the use of the new drugs such as Bortezomib and Lenalidomide. As a consequence, flow cytometry is becoming an essential tool for diagnosis, the selection of prognostic-directed therapies and for monitoring the treatment of plasma cell dyscrasias.

**Key words:** Plasma cell dyscrasias, flow cytometry, diagnostic, prognostic, post-treatment monitoring.

\* Servicio de Inmunología.  
\*\* Servicio de Hematología.  
Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca y Universidad de Murcia.  
\*\*\* Servicio de Hematología, Hospital Rafael Méndez.  
\*\*\*\* Servicio de Hematología, Hospital Santa María del Rosell.  
Murcia, España.

España. Correo electrónico: alfredo.minguela@carm.es  
Recibido: marzo 2011. Aceptado: mayo 2011.

Este artículo debe citarse como: De los Reyes N, Monserrat-Coll J, Martínez-Sánchez MV, Campillo JA, y col. La citometría de flujo en el estudio de las discrasias de células plasmáticas. Rev Hematol Mex 2011;12(2):90-98.

Correspondencia: Dr. Alfredo Minguela Puras. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia 30120,

## AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO Y MANEJO CLÍNICO DE LAS DISCRASIAS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS

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 ha permitido una mejor tipificación de las distintas gammopatías monoclonales, facilitando así su diagnóstico diferencial. Para explicar el incremento de la supervivencia alcanzada durante la última década en el mieloma múltiple 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 gammopatías monoclonales que ha permitido el desarrollo de fármacos más eficaces.<sup>1</sup> A mediados del decenio de 1990, la mediana de supervivencia del mieloma múltiple era de tres años, mientras que actualmente se estima en más de cinco años; incluido 20% de pacientes con supervivencia que excede los 10 años.<sup>2</sup> En paralelo, se han venido modificando los criterios diagnósticos de las gammopatías monoclonales<sup>3</sup> y los parámetros de estadíaje<sup>4</sup> y la definición de respuesta al tratamiento.<sup>5</sup> 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 gammopatías monoclonales son, principalmente: 1) citomorfología del aspirado de médula ósea; 2) hemograma, determinación de la función renal y concentraciones de calcio,  $\beta$ 2 microglobulina, albúmina y LDH; 3) inmunoelectroforesis sérica y urinaria para comprobación y cuantificación del componente monoclonal; y 4) técnicas radiológicas, desde la radiología simple a la tomografía computada, la resonancia magnética y la tomografía de emisión de positrones.<sup>6</sup> Como se describe en este artículo, la citometría de flujo se ha consolidado como una herramienta útil para demostrar clonalidad de forma sensible, específica y objetiva; así como para evaluar la respuesta terapéutica y la progresión en fases preclínicas o avanzadas de la enfermedad.

Entre las aplicaciones de la citometría de flujo al estudio de las gammopatías monoclonales podemos describir: 1) identi-

cación diferencial de las células plasmáticas (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 células plasmáticas mediante citometría de flujo 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 células plasmáticas en médula ósea mayores de 30 o 15%, respectivamente.<sup>7</sup>

## APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL ESTUDIO DE LAS DISCRASIAS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS

### *Identificación diferencial de células plasmáticas patológicas*

El mieloma múltiple es el paradigma de las denominadas gammopatías monoclonales. Éstas son un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación clonal de células plasmáticas y la presencia en suero de una inmunoglobulina homogénea, o un fragmento de ella, denominado *componente monoclonal*. Las gammopatías monoclonales engloban un espectro de entidades clínicas, desde cuadros relativamente benignos como la gammopatía monoclonal de significado incierto (GMSI) a otros malignos, como el mieloma múltiple.<sup>3</sup>

Los marcadores más utilizados en citometría de flujo para la identificación de las células plasmáticas en humanos son CD138 y CD38 (Figura 1). CD138 (sindecano-1) es una molécula de la familia del heparán-sulfato que se expresa en células plasmáticas, células epiteliales, mesenquimales y carcinomas. CD138 es un receptor de diversos factores de crecimiento de especial relevancia para las células plasmáticas de mieloma múltiple. 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 células plasmáticas, aunque su expresión puede estar incrementada en las células plasmáticas patológicas en comparación con las sanas. Esta molécula se libera al plasma por células plasmáticas apoptóticas pasando a ser una molécula soluble que cuando se encuentra en suero permite estimar la el tumor y el índice apoptótico (espontáneo e inducido).<sup>8,9</sup>

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 en células plasmáticas sanas o afectadas, lo que permite diferenciarlas del resto de leucocitos.<sup>8,9</sup> Además, la expresión de CD38 puede estar reducida en las células plasmáticas de mieloma múltiple, respecto de las células plasmáticas sanas. (Figura 1)

El marcador más característico que define a las células plasmáticas patológicas es CD56 (Figura 2) que es una molécula típicamente asociada con las células NK (Natural Killer) que se expresa en las células plasmáticas

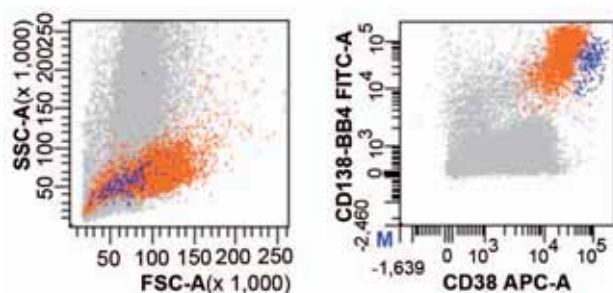
de 78% de los pacientes con mieloma múltiple, mientras que en las células plasmáticas sanas y en las células de la leucemia de células plasmáticas, su expresión suele ser negativa.<sup>8,9</sup> La expresión de CD56 parece estar en relación con el nicho de localización de las células plasmáticas. De hecho, CD56 es una molécula de adhesión entre las células plasmáticas y entre éstas y los osteoblastos. Además, el fenotipo CD56<sup>+</sup> se asocia con ausencia de osteolisis. También CD56<sup>+</sup> se asocia con un isotipo de cadena ligera  $\lambda$  y con mal pronóstico.

Junto a CD56, CD19 es un marcador de gran utilidad para diferenciar células plasmáticas patológicas de células sanas. En la mayoría de los pacientes con mieloma múltiple (97.5%) se manifiesta una pérdida de la expresión de CD19 sobre las células plasmáticas patológicas, mientras que las células plasmáticas sanas habitualmente retienen la expresión de este marcador.<sup>8,9</sup>

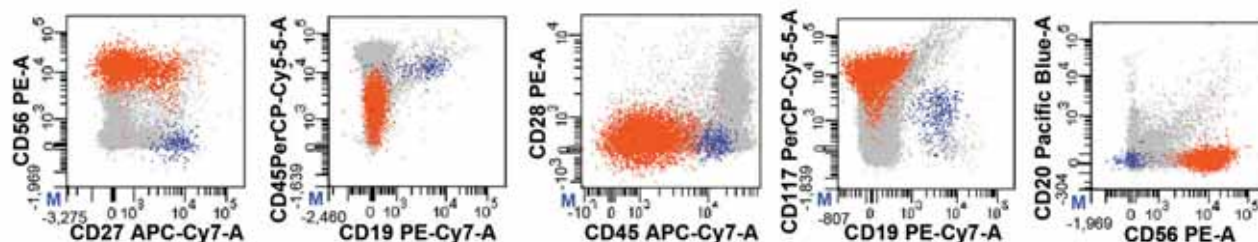
#### Marcadores con valor pronóstico

Otro marcador diferencial es CD28. Se encuentra con normalidad en células T; su expresión es aberrante en células plasmáticas patológicas en 47.8% de los pacientes.<sup>8,9</sup> En células T, CD28 participa en la activación celular y en la secreción de citocinas, pero se desconoce su función en las células plasmáticas de mieloma múltiple. No obstante, su expresión se asocia con peor evolución (progresión de la enfermedad por aumento del riesgo de recaída).

CD27 es otra molécula de utilidad; se trata de un marcador de memoria inmunológica, cuya expresión suele restringirse a células linfoides del centro germinal, células memoria y células plasmáticas sanas. La expresión de CD27 en células plasmáticas patológicas está claramente disminuida en 50% de los pacientes.<sup>8,9</sup> Cuando su expre-



**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, células plasmáticas 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 flociocianina). Ambas poblaciones de células plasmáticas son CD138<sup>+</sup> aunque las células plasmáticas sanas (azul) tienen mayor intensidad de CD38 que las patológicas (naranjas).



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

sión se mantiene en concentraciones normales, se asocia con mejor pronóstico. Está descrito que con la progresión de la enfermedad CD27 reduce su expresión.

Otro marcador asociado con malignidad y 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 células plasmáticas sanas, pero su expresión se reduce o se negativiza en las células plasmáticas patológicas. Se ha descrito, además, que las células plasmáticas en proliferación, sanas o patológicas, son CD45 intermedias y esta correlación entre el índice de proliferación y CD45 se confirma por estar, a su vez, inversamente relacionada con Bcl-2, proteína que regula la apoptosis celular.<sup>8</sup>

CD45 se relaciona con otra molécula asociada con malignidad: CD221 o IGF-1R ("insulin-like growth factor 1 receptor"). Los estudios clínicos revelan que la ausencia de CD45 en células plasmáticas patológicas se vincula con peor pronóstico. Aparentemente, la ausencia CD45 favorece la activación de la proteína-cinasa AKT, molécula relacionada con la supervivencia celular mediada por IGF-1 e insulina. CD221 se expresa de manera aberrante en células plasmáticas de mieloma múltiple, por lo que los pacientes con fenotipo CD221<sup>++</sup> tienen supervivencias más cortas.<sup>8</sup> Además, su expresión se asocia con translocaciones de mal pronóstico t(4;14) y t(14;16).

En alrededor de un tercio de los pacientes, también de forma anormal, las células plasmáticas patológicas pueden expresar CD17 (conocido como receptor de c-Kit, "cytokine stem cell factor"). CD117 se expresa de forma natural en células progenitoras de estirpe mieloide. La expresión de CD117 en células plasmáticas patológicas se asocia con hiperdiploidía, ausencia de translocaciones y mejor pronóstico.<sup>8</sup>

CD200 (OX-2) es una glicoproteína de membrana de carácter inmunorregulador, que al interaccionar con su receptor (CD200R o OX-2R) suprime la respuesta mediada por células T. De hecho, está demostrado que los pacientes con expresión positiva de CD200 sobre sus células plasmáticas patológicas tienen una supervivencia libre de eventos más reducida (14 meses), comparada con los que no la expresan (24 meses) después de terapia y trasplante. Además, es un parámetro pronóstico independiente del estadio clínico y de las concentraciones de  $\beta$ 2-microglobulina sérica.<sup>10</sup>

Algunos pacientes con mieloma múltiple presentan una población de células plasmáticas 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 población de células plasmáticas CD19<sup>+</sup> o CD20<sup>+</sup> se detecta mayor asociación con reordenamiento t(11;14), diploidía y buen pronóstico. El fenotipo CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> se relaciona con reordenamientos de IgH de pronóstico adverso -t(4;14) y t(14;16)- y ausencia de hiperdiploidía. La expresión de CD20 se vincula con células plasmáticas pequeñas. También, la expresión de CD28 se asocia con (17p) y t(14;16). La del(13q) y t(4;14) igualmente se han relacionado con la falta de expresión de CD117.<sup>9</sup>

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

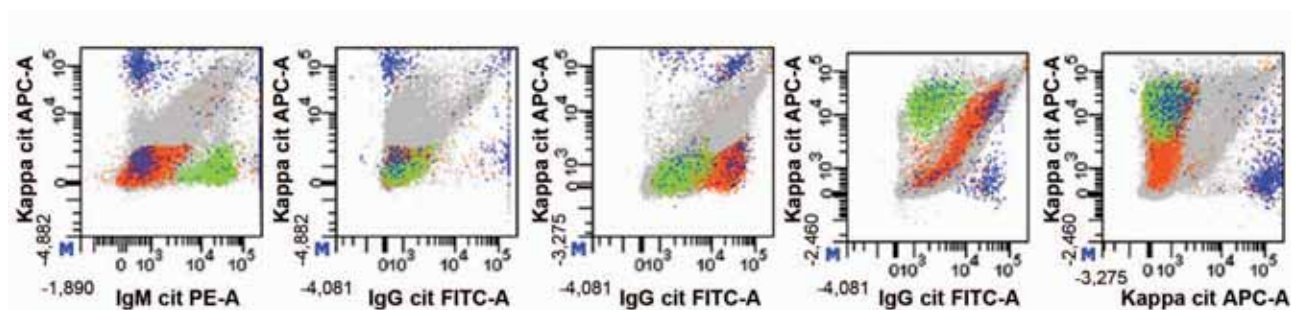
#### **Estudio de la clonalidad de las células plasmáticas**

El estudio de las inmunoglobulinas citoplasmáticas (IgCit) de cadenas ligeras (kappa y lambda) o pesadas (IgA, IgD, IgG e IgM) permite establecer la clonalidad de las células plasmáticas patológicas y diferenciarlas de las células plasmáticas sanas de distribución policlonal, e identificar múltiples líneas de células plasmáticas patológicas (Figura 3). Para la correcta identificación de más de una línea de células plasmáticas patológica es necesario incluir en el panel cadenas ligeras y pesadas y, de ser posible, en combinación de ambas. Cuando el fenotipo de membrana no permite diferenciar las células plasmáticas patológicas de las sanas, el estudio de la IgCit puede ayudar a establecer el ratio de células plasmáticas patológicas-sanas.

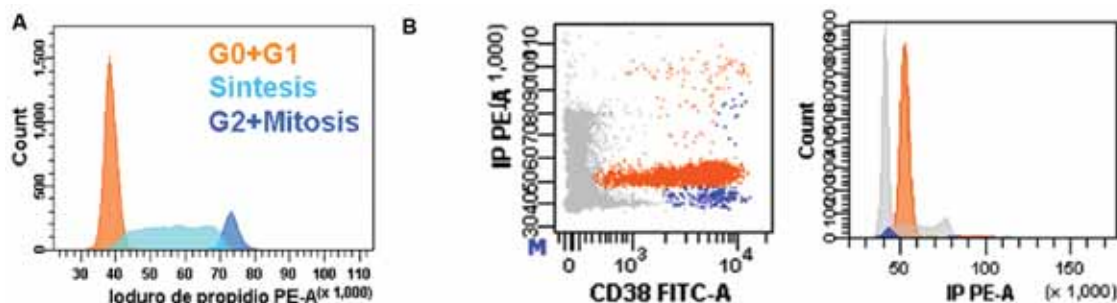
#### **Índice de proliferación y plodía de las células plasmáticas**

El análisis del ciclo celular de las células plasmáticas mediante citometría de flujo y doble tinción con yoduro de propidio y CD38 (Figura 4), aporta información de dos aspectos complementarios en el diagnóstico y pronóstico de las gammopatías: la identificación de anomalías cromosómicas numéricas (aneuploidía) y la estimación del índice de proliferación de las células plasmáticas. Diversos trabajos han puesto de manifiesto que la determinación del contenido de ADN mediante citometría de flujo es un parámetro de utilidad para la evaluación clínica de pacientes con mieloma múltiple. Entre 50 y 70% de los pacientes





**Figura 3.** Representación en gráficos de puntos de las inmunoglobulinas citoplasmáticas (IgCit) en la misma muestra celular de las figuras 1 y 2. Las células plasmáticas 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 células plasmáticas 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 células plasmáticas patológicas.



**Figura 4.** Análisis del ciclo celular y del contenido de ADN mediante citometría de flujo por doble tinción con ioduro de propidio (IP, contenido de ADN) y CD38 (células plasmáticas) de las células de médula ósea del paciente con mieloma múltiple 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 células plasmáticas CD38<sup>++</sup> sanas (azul) y patológicas (naranja) y del resto de células no-plasmáticas (gris). Las células plasmáticas sanas (azul) muestran un contenido de ADN diploide mientras que las células plasmáticas patológicas (naranja) son hiperdiploides. Además, se aprecia que parte de las células plasmáticas sanas y patológicas se distribuyen en las diferentes fases del ciclo celular y por tanto se desplazan hacia arriba al tener mayor contenido en ADN y mayor tinción con IP. B-derecha) representación en histograma del ciclo celular de las células que se muestran en el gráfico de puntos.

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

El análisis del ciclo celular por citometría ha permitido comprobar que los valores superiores al 3% de células plasmáticas en fase de síntesis (fase S) se asocian con pronóstico más adverso y es un parámetro independiente de supervivencia en pacientes con mieloma múltiple. San Miguel y sus colaboradores describen que el número de células plasmáticas en fase S, junto con otros marcadores pronóstico, como  $\beta 2$ -microglobulina, edad y estado del paciente, son de gran utilidad para la correcta estratificación de pacientes con mieloma múltiple.<sup>11</sup> Aunque los pacientes con mieloma múltiple suelen tener células

plasmáticas con mayores índices de proliferación que los pacientes con MGUS o mieloma múltiple-quiescente, no es un dato que permita una clara discriminación de este tipo de patologías.

#### **Valor pronóstico del índice de apoptosis de las células plasmáticas**

En los estados iniciales de la patogenia del mieloma múltiple tiene lugar una desregularización del ciclo celular que conduce a la expansión inicial de la clona tumoral. El mieloma múltiple se ha relacionado tradicionalmente con una patología de alta proliferación. Sin embargo, los estudios recientes revelan que sólo un pequeño porcentaje de la clona patológica prolifera y es la pérdida de los controles de la *apoptosis* o *muerte celular programada* de las células plasmáticas tumorales lo que lleva a su acumulación y al inicio de la enfermedad.<sup>12</sup>

Las nuevas terapias, como el bortezomid o la talidomida, poseen potentes mecanismos de acción como inductores de apoptosis. Sin embargo, hasta ahora han sido muy escasos los estudios dirigidos a evaluar el impacto del índice de apoptosis de las células plasmáticas patológicas en la evolución de la enfermedad y en la eficacia de las terapias. En la actualidad, la citometría de flujo permite un análisis rápido y sencillo, basado en la detección de moléculas de fosfatidil-serina en la membrana celular de las células plasmáticas mielomatosas mediante la utilización de anexina-V. Ésta es un marcador ideal que refleja el estado apoptótico de las células, con independencia del origen del estímulo que la indujo, intrínseco o extrínseco.

Los estudios recientes parecen demostrar que la estimación del índice de apoptosis de las células plasmáticas patológicas es un parámetro independiente de gran valor pronóstico predictivo. De tal forma que con valores superiores a 4.5% de células plasmáticas apoptóticas, los pacientes alcanzan una supervivencia media total de 38 meses, mientras que desciende hasta los 16 meses en quienes se define un valor inferior a 4.5%. Estos datos también son aplicables a pacientes en tratamiento con talidomida y bortezomib tras la primera y segunda recaída.<sup>12</sup> 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 células plasmáticas, la evaluación del índice de apoptosis de las células

plasmáticas por citometría se perfila como un marcador pronóstico de gran utilidad en el futuro.

#### **Diagnóstico diferencial entre mieloma múltiple y otro tipo de gammopatías**

Existen diversas patologías clonales que involucran células con diferenciación plasmocitoide y componente monoclonal en suero: mieloma múltiple, mieloma múltiple-quiescente, MGUS, macroglobulinemia de Waldenström (WM) o linfoma linfoplasmocitoide, plasmocitoma, leucemia de células plasmáticas (PCL), linfoma de la zona marginal (MZL) y AL-amiloidosis. En cada caso, el análisis del fenotipo de las células patológicas, mediante citometría de flujo, permite diferenciar dichas patologías.

Quizá, el parámetro que permite mejor discriminación entre mieloma múltiple, mieloma múltiple-quiescente y MGUS, aparte de los parámetros clínicos y serológicos, es la relación entre el número de células plasmáticas sanas y patológicas. En MGUS y mieloma múltiple-quiescente la coexistencia de células plasmáticas sanas y patológicas es habitual, pero es raro en mieloma múltiple. El 82% de los pacientes de MGUS y 40% de pacientes de mieloma múltiple-quiescente muestran más de 5% de células plasmáticas sanas. Así, el parámetro que mejor parece discriminar a los pacientes con MGUS de quienes tienen mieloma múltiple es la cantidad células plasmáticas sanas y patológicas inferior o superior a 3%, respectivamente.<sup>13</sup> En este estudio, del grupo español de mieloma, se puso de manifiesto, además, que el riesgo de progresión a mieloma múltiple de los pacientes con MGUS y mieloma múltiple-quiescente era de 25 y 63%, respectivamente. Si las células plasmáticas patológicas eran 3 a 95%, frente a 5 y 8%, respectivamente, con valores de células plasmáticas patológicas menores a 95%. Hace poco, el mismo grupo demostró que los pacientes con mieloma múltiple con concentraciones de células plasmáticas sanas-patológicas mayores de 5% tenían mejor pronóstico, menor frecuencia de citogenicidad de alto riesgo, mejores respuestas al tratamiento y de supervivencia libre de progresión y total.<sup>14</sup>

Las características fenotípicas de las células plasmáticas patológicas suelen ser diferentes en MGUS y en mieloma múltiple. Generalmente, las células plasmáticas monoclonales en MGUS, a diferencia del mieloma múltiple, suelen retener la expresión de CD19 y CD27 y su pérdida se asocia con progresión a mieloma múltiple; además, la expresión de CD28 es rara (19% de los pacientes) y habitualmente débil.<sup>9</sup>

Para discriminar mieloma múltiple de otras patologías de células plasmáticas es importante analizar la expresión de las moléculas CD19, CD45 y CD56. Así, el MZL suele tener el fenotipo CD19<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>, lo que permite diferenciarlo del mieloma múltiple (CD19<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>), de la MW (CD19<sup>++</sup>CD45<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> con CD138 generalmente negativo) y de la LCP (CD19<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>).<sup>9</sup>

#### **Utilidad del estudio de la sangre periférica**

En una elevada proporción de pacientes con mieloma múltiple (>80%) es posible detectar células plasmáticas patológicas circulando en la sangre periférica y, aunque con menor frecuencia, también en pacientes con MGUS (20%).<sup>15</sup> Este dato tiene, además, valor diagnóstico y pronóstico, de manera que la supervivencia global disminuye según se incrementan las cifras de células plasmáticas detectadas en la sangre.<sup>16</sup> Con todo, las cifras de células plasmáticas circulantes no parecen guardar una relación clara con el tumor, sino más bien con la biología de éste.

El estudio en sangre periférica del grado de activación de los linfocitos T también ha demostrado ser útil en pacientes con linfomas y mielomas. Es posible detectar cifras más elevadas de linfocitos T que expresan marcadores de activación CD57<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD(16+56)<sup>+</sup>, CD28<sup>-</sup> en los pacientes afectados por mieloma múltiple que en los controles sanos y que en los pacientes con MGUS<sup>17</sup> (datos no publicados de nuestro laboratorio).

#### **Monitorización postratamiento**

Las técnicas convencionales para evaluar la respuesta al tratamiento en mieloma múltiple no siempre tienen suficiente sensibilidad para identificar tempranamente pacientes que podrían beneficiarse de las nuevas terapias postrasplante. Sin embargo, las técnicas recientes de biología molecular (ASO-PCR) y de citometría de flujo sí alcanzan el grado de sensibilidad necesario. Mediante citometría de flujo es posible detectar células plasmáticas tumorales tres meses después del trasplante, en al menos 40% de los pacientes. Una vez detectadas, las cifras de células plasmáticas tumorales se incrementan hasta alcanzar la progresión clínica. En los pacientes en quienes se detectan células plasmáticas patológicas tempranamente postrasplante, o en los que a los seis meses sólo se detectan células plasmáticas patológicas (sin células plasmáticas sanas residuales) tienen una supervivencia libre de progresión de 20 meses, inferior a la de los pacientes en quienes

no se detectaron (35 meses). Los pacientes libres de células plasmáticas patológicas a los tres meses y que continuaron sin ellas en el segundo estudio (6-12 meses) tuvieron un riesgo muy reducido de progresión y supervivencia de 100% a los cinco años. Por el contrario, quienes sólo tenían células plasmáticas patológicas a los tres meses, o sólo células plasmáticas sanas a los tres meses, pero sólo neoplásicas a los 6-12 meses, la supervivencia bajó a 54% a los cinco años.<sup>18</sup>

#### **Equipo antigénico para estudiar discrasias de células plasmáticas**

La introducción de la citometría digital multiparamétrica en los últimos años ha estimulado el desarrollo de equipos que facilitan el análisis de los marcadores descritos en los apartados anteriores. En el Cuadro 1 se describen los equipos utilizados en nuestro centro y el recientemente propuesto por el grupo de trabajo Euroflow.<sup>19</sup> En los tubos 2-5 de nuestro panel se abordan marcadores relacionados con el estudio de células plasmáticas (fenotipo para diagnóstico y pronóstico, IgCit, apoptosis y ciclo celular) pero sin perder de vista de forma genérica el resto de las poblaciones celulares de la médula ósea. En el tubo-1 se analizan, además, las subpoblaciones de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), células NK (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>), mieloides maduras (CD66<sup>+</sup>CD13<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup>) e inmaduras (CD66<sup>+</sup>CD13<sup>-/+bajo</sup>) y monocitos (CD14<sup>+</sup>CD13<sup>+</sup>).

El panel propuesto por Euroflow se centra, específicamente, en el estudio de los marcadores de diagnóstico y pronóstico de células plasmáticas y en discriminar la posible clonalidad por medio del estudio de cadenas ligeras de IgCit. Así mismo, pretende evaluar dos marcadores de utilidad menos establecida, como CD81 y  $\beta$ 2microglobulina. CD81 (de la familia de las tetraspaninas) se incluye por su relación con la supervivencia celular y el potencial invasivo de las células plasmáticas. Se ha observado el mismo efecto para CD82 (otra tetraspanina). Ambas moléculas se relacionan con la muerte de células plasmáticas mielomatosas; al parecer actúan reduciendo la expresión de AKT, activando FoxO a través de sus factores de transcripción y disminuyendo la actividad de las vías mTOR y mTOR/rictor.<sup>20</sup> La utilidad de la  $\beta$ 2microglobulina evaluada en plasma en el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple es bien conocida; sin embargo, es difícil encontrar referencias de la utilidad de la evaluación de la  $\beta$ 2microglobulina expresada en células plasmáticas.

**Cuadro 1.** Panel de anticuerpos monoclonales utilizado en nuestro centro y el propuesto por Euroflow

	Panel Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca							
	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>PerCP</i> <sup>1</sup>	<i>PE-Cy7</i>	<i>APC</i>	<i>APC-Cy7</i> <sup>2</sup>	<i>Pacific Blue</i>	<i>AmCyan</i> <sup>3</sup>
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	Igk-cit	CD45	CD56	
Tubo-5	IgG-cit	IgI-cit	CD38	CD19	Igk-cit	CD45	CD56	
Panel Euroflow								
Tubo-1	CD38	CD56	b2micro	CD19	Igk-cit	IgI-cit	CD45	CD138
Tubo-2	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81	CD45	CD138

Fluorocromo o sus equivalentes: <sup>1</sup>PerCP-Cy5.5, <sup>2</sup>APC-H7 o <sup>3</sup>Pacific Orange

## CONCLUSIÓN

La citometría de flujo contribuye decisivamente a la mejor caracterización de las células plasmáticas patológicas; además, aporta marcadores de valor pronóstico, como el inmunofenotipo, la tasa de células plasmáticas patológicas-sanas, la aneuploidía o clonalidad múltiple y los índices de proliferación y apoptosis, parámetros de especial relevancia clínica para los nuevos tratamientos con bortezomib y talidomida. En conjunto, ayudan al establecimiento de tratamientos adaptados al pronóstico de la enfermedad y al aumento de la supervivencia global. Su elevada sensibilidad la hacen de gran utilidad en la monitorización de la enfermedad postratamiento, aportando información relevante para predecir su evolución.

## REFERENCIAS

- Reece DE. Management of multiple myeloma: The changing Landscape. *Blood* 2007;21:301-314.
- Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood* 2008;11:2962-2972.
- 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;121:749-757.
- Greipp PR, S Miguel J, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma. *Journal Clinical Oncology* 2005;23:3412-3420.
- Durie BG, Harousseau JL, S Miguel J, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-1473.
- D'Sa S, Abildgaard N, Tighe J, et al. Guidelines for the use of imaging in the management of myeloma. *British Journal Haematology* 2007;137:49-63.
- 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.
- Bataille R, Jégou G, Robillard N, 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;91:1234-1240.
- 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.
- Moreaux J, Hose D, Reme T, et al. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2006;108:4194-4197.
- San Miguel JF, García-Sanz R, González M, et al. DNA cell content studies in multiple myeloma. *Leukemia Lymphoma* 1996;23(1-2):33-41.
- Minarik J, Scudla V, Ordeltova M, et al. Prognostic significance of apoptotic index in multiple myeloma patients treated by conventional therapy and novel agents, thalidomide and bortezomib. *European Journal Haematology* 2009;83:528-534.
- Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo, 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;110:2586-2592.
- 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.
- Kumar S, Rajkumar SV, Kyle R, et al. Prognostic value of circulating plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Journal Clinical Oncology* 2005;23:5668-5674.
- Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, et al. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2005;106:2276-2279.
- Van den Hove LE, Meeus P, Derom A, et al. Lymphocyte profiles in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of



- undetermined significance: flow-cytometric characterization and analysis in a two-dimensional correlation biplot. *Annals of Hematology* 1998;76:249-256.
18. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, 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.
  19. 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 14<sup>th</sup> EHA Congress 2009; Berlin, DE.
  20. Tohami T, Drucker L, Shapiro H, et al. Overexpression of tetraspanins affects multiple myeloma cell survival and invasive potential. *The FASEB Journal* 2007;21:691-699.