

Valor del fenotipaje mediante citometría de flujo en la confirmación del diagnóstico de leucemia de células plasmáticas

Palabras clave: Células plasmáticas, citometría de flujo.

Key words: Plasmatic cells, flow cytometric

Recibido: 25/02/2012

Aceptado: 28/06/2012

Este artículo puede ser consultado en versión completa en: <http://www.medigraphic.com/patologiaclinica>

Anwar Hussein Aidroos,* Y Valdés Rodríguez,* JE Muño Parurena,** J Carnot Uria,** T Carballo Treto,** E Abraham Marcel,*** M Gómez León**

* Universidad de La Habana, Cuba.

** Hospital Hermanos Ameijeras, Cuba.

*** Ministerio de Salud Pública, Cuba.

Correspondencia:

MSc. Anwar Hussein Aidroos

Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Residencia Estudiantil, Calle 222 la Lisa, Ciudad Habana.

Tel.: (0053)53346202. E-mail: kakiloder@yahoo.es

134

Resumen

La leucemia de células plasmáticas (LCP) es una variante infrecuente y agresiva del mieloma múltiple. Ante la sospecha de esta leucemia se requiere de la combinación de diferentes indicadores clínicos y paraclínicos que permitan confirmar la presencia de células tumorales monoclonales en sangre periférica. Para confirmación del diagnóstico de una paciente de 62 años con leucemia de células plasmáticas se procedió a la determinación del fenotipo de las células tumorales mediante la técnica de citometría de flujo, empleando como marcadores antiantígenos CD45⁺/CD38⁺. Los datos obtenidos mediante la citometría de flujo fueron relacionados con los proporcionados por los estudios radiológicos, bioquímicos y morfológicos (medulograma y conteo de células tumorales en la lámina periférica), además de otros datos de la historia clínica. En la citometría de flujo se encontró 29.25% de células tumorales, lo que confirmó el diagnóstico de leucemia de células plasmáticas. Esta paciente presentaba dolores óseos frecuentes, síndrome anémico e inmunoglobulina (IgG). No obstante, considerando la ausencia de signos de insuficiencia renal u otras afecciones hematológicas, fue clasificada en el estadio III según los criterios de Durie-Salmon.

Abstract

The leukemia of the plasmatic cells (LPC) is an infrequent variant and aggressive multiple myeloma. When one suspects of LPC they need a combination of different clinical and paraclinic indicators that permits confirmation of the presence of monoclonal tumor cells in peripheral blood. To confirm diagnosis of a 62 year old patient suspected to have LPC, they determined the phenotype of the tumor cells employing the flow cytometric method and antigens CD45⁺/CD38⁺ as markers. The information obtained by the flow cytometric method was compared to the obtained from the radiological, biochemical and morphological studies (medulogram and tumor cells count on the peripheric slide); as well as other information from the patients clinical history. With the flow cytometric method 29.25% of tumor cells were observed which confirms LPC diagnosis. The patient presented frequent bone pain, anemia syndrome and immunoglobulin (IgG). However considering the absence of renal insufficiency or other hematological affections, we have come to the conclusion of classifying LPC as a stage III according to the Durie-Salmon criteria.

Introducción

Las discrasias de células plasmáticas representan un grupo heterogéneo de neoplasias hematológicas. Se caracterizan por proliferación desordenada de células plasmáticas monoclonales, la mayoría de las cuales producen inmunoglobulina del tipo monoclonal (paraproteína M).¹⁻⁴ El fenotipo clínico está determinado por la cantidad y las propiedades biológicas de las células anormales y el tipo de proteína monoclonal.⁵⁻⁶

La leucemia de células plasmáticas (LCP) es una variante singular del mieloma múltiple que se presenta como un estadio previo de este mieloma, es decir, de la manifestación inicial de la discrasia.⁷⁻⁹ En los Estados Unidos, la prevalencia de la LCP es aproximadamente de 0.02 a 0.03 casos por 100,000 habitantes. El mieloma múltiple es más común entre los afroamericanos que los caucasianos.^{10,11} La LCP es más frecuente en el hombre que en la mujer, con relación 3:2. A diferencia de otras formas de mieloma múltiple, la LCP suele diagnosticarse en personas relativamente más jóvenes, entre 55-66 años de edad.^{7,12,13}

Existen discrepancias en la literatura acerca del fenotipo exacto de las células tumorales y de su significado clínico. La citometría de flujo es una técnica sencilla que se aplica en la rutina diaria de algunos laboratorios clínicos y de investigación, en el fenotipaje de estirpes celulares diferentes. Las ventajas de la citometría de flujo respecto a otros métodos para el diagnóstico de células tumorales son: que permite disponer de los resultados en breve tiempo, que posee sensibilidad y especificidad diagnóstica en la discriminación de diferentes poblaciones celulares, así como información simultánea sobre varios parámetros de éstas y de otras. Esta técnica permite el análisis de dos parámetros de dispersión: dispersión lateral (SSC) y dispersión frontal (FSC) y tres de fluorescencia (con un solo láser): FI1, FI2 y FI3, e incluso, un cuarto tipo de fluorescencia en algunos equipos. (www.citometriadeflujo.com).

Caso clínico

Se recibe en el Servicio de Hematología del Hospital Hermanos Ameijeras (HHA) una paciente de 62 años remitida por el Servicio de Medicina Interna del mismo hospital. Esta mujer tenía antecedentes de hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y sospecha de una hemopatía. Entre los datos más significativos destaca que el padre falleció a consecuencia de un mieloma múltiple.

Al ingresar, la paciente presentaba dolor óseo en parrilla costal derecha irradiado a espalda (de cinco meses de duración), anemia e incremento de la eritrosedimentación. Dado que en la sintomatología de una hemopatía es común encontrar dolor óseo, infecciones recurrentes, anemia e insuficiencia renal, se procedió a realizar las pruebas paraclínicas correspondientes.

Se practicaron hemograma completo con conteo diferencial, química sanguínea y electroforesis de proteínas plasmáticas. También se efectuaron medulograma y biopsia de médula ósea (BMO), así como examen radiológico de Survey. En un extendido celular (técnica de la lámina periférica) se realizó el conteo celular en el Departamento de Hematología.

Fenotipaje de células tumorales mediante citometría de flujo. Con la finalidad de confirmar el diagnóstico de la LCP, se realizó el análisis mediante citometría de flujo, empleando los anticuerpos monoclonales (AcMc) CD45 conjugado con ficoeritrina (RPE) y CD38 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) como marcadores de superficie en la detección y fenotipaje de células de leucemia plasmática. Las lecturas se realizaron en equipo FACScan en el Instituto Pedro Kuri (IPK) y en el Centro de Inmunología Molecular (CIM) de Cuba.

Fase preanalítica. Con el objetivo de asegurar la calidad diagnóstica de la técnica de citometría de flujo, se tomaron ciertas medidas en la fase preanalítica: la sangre se colectó en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm con tapa que contenía EDTA y se mezcló suavemente con el anticoagulante.

A cada tubo, previamente codificado, se le añadieron 100 μ L de sangre total, para una concentración final de 1×10^6 leucocitos. Posteriormente se adicionaron 10 μ L de cada uno de los anticuerpos monoclonales por tubo (anti-CD45 y anti-CD38) conjugados con los fluorocromos RPE y FITC, respectivamente. Las mezclas fueron homogenizadas durante cinco segundos en un vórtex. Ambos tubos fueron incubados a 4 °C durante 15 a 20 minutos, mantenidos en oscuridad. Posteriormente se procedió a la lisis de la suspensión celular.

Obtención del lisado de la muestra. El lisado se obtuvo adicionando 4 mL de solución de lisis a cada tubo. Éstos se colocaron a 4 °C durante 15 a 20 minutos. Fueron centrifugados a 1,500 revoluciones por minuto (rpm) durante seis minutos. Se descartó el sobrenadante y se desprendió suavemente el vórtex.

El precipitado se lavó con solución salina, mediante adición de 2 mL de CINA al 0.9% para eliminar los hematíes, y se centrifugó a 1,500 rpm durante seis minutos. Este proceso se repitió dos veces, posteriormente el lisado se colocó en el equipo de citometría de flujo (FACScan) para la lectura.

Fase analítica. El fenotipo de las células tumorales y la actividad proliferativa de los plasmocitos neoplásicos en circulación periférica se determinó con la técnica de citometría de flujo mediante la expresión de los marcadores: CD45RPE/CD38FITC.

Los datos de la lectura de cada tubo se registraron en la computadora acoplada al citómetro de flujo, mediante un software que cuantifica el porcentaje absoluto de células positivas para CD45 y para CD38, respectivamente.

Las histogramas biparamétricos de dispersión frontal (FS) y dispersión lateral (SS) se obtuvieron a partir de las células mononucleadas (CMN) marcadas, en un rango de fluorescencia de 675 nm. Esto permitió diferenciar las que expresaban el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal anti-CD45 RPE de las marcadas con el anti-CD38 FITC.

Análisis estadístico. A los datos obtenidos por citometría de flujo se les aplicó un análisis es-

tadístico mediante el método no paramétrico del programa WinMDI. Los porcentajes de anticuerpos monoclonales anti-CD45 RPE y los anti-CD38 FITC se representaron a partir de los histogramas obtenidos en los registros de lecturas de la citometría de flujo. El cálculo de las células plasmáticas en circulación periférica de la paciente se obtuvo a partir del conteo diferencial de leucocitos y el porcentaje de células plasmáticas por citometría de flujo.

Resultados

Diagnóstico morfológico. En el conteo celular en lámina periférica se observaron alteraciones morfológicas de los eritrocitos que se correspondían con una anemia normocítica normocrómica. Además de una leucocitosis ligera, la presencia de células plasmáticas, así como la formación de rouleaux (xxx), quizá debido a una hipergammaglobulinemia. En el conteo diferencial se encontró 4% de normoblastos, 19% de segmentados, 25% linfocitos y 52% de células plasmáticas (*figura 1*).

Medulograma. Como se puede apreciar en la *figura 2*, en el aspirado medular se encontró infiltración masiva de células plasmáticas tumorales en médula ósea.

Biopsia de la médula ósea. En el estudio de anatomía patológica de la biopsia de la médula ósea se encontró alrededor de 100% de infiltración difusa por células plasmáticas inmaduras, así como la decremento de las tres series hematopoyéticas.

Electroforesis de proteína. En la *figura 3* se presenta el perfil electroforético de las proteínas plasmáticas de la paciente. Se puede observar una banda estrecha monoclonal en la región gamma.

Estudios de imágenes. Como se observa en las *figuras 4 y 5*, el examen radiológico (Rx) de Survey óseo demuestra la presencia de múltiples lesiones osteolíticas en las costillas. Se detectaron fracturas del cuello del húmero derecho con gran toma de la escápula (*figura 4*) y lesiones múltiples osteolíticas en cráneo (*figura 5*).

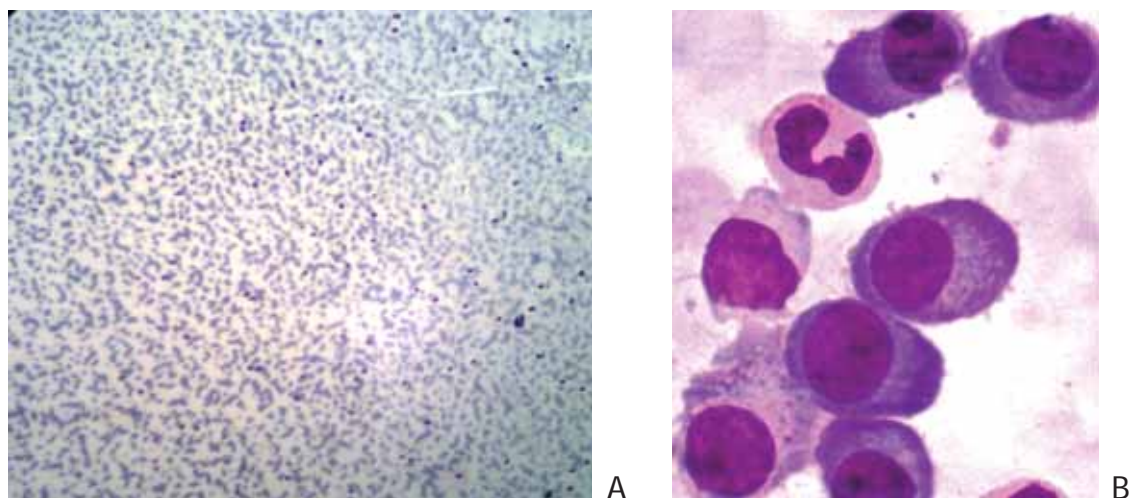


Figura 1. Células plasmáticas tumorales de la circulación periférica (leucemia de células plasmáticas). **A:** 10X. **B:** 100X. Imágenes en color en: www.medigraphic.com/patologiaclinica

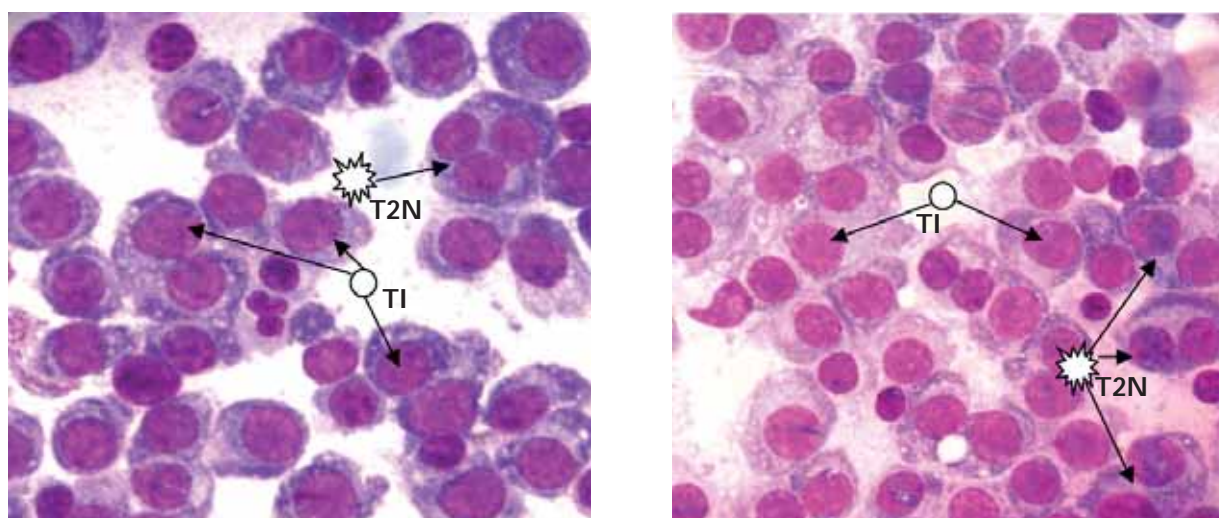


Figura 2. Características morfológicas de las células plasmáticas tumorales de la leucemia de células plasmáticas (LCP). En la médula ósea se observó una infiltración de células plasmáticas inmaduras. Tinción de May-Grunwald-Giemsa, 100X. T2N = Células plasmáticas tumorales que presentan más de dos núcleos. T1 = Células plasmáticas tumorales inmaduras. Imágenes en color en: www.medigraphic.com/patologiaclinica

Fenotipaje de células tumorales plasmáticas de leucemia de células plasmáticas (LCP). La figura 6 muestra los histogramas obtenidos con citometría de flujo de las células mononucleadas (CMN) procedente de la sangre total de la paciente con diagnóstico de LCP. En el primer histograma, R1-SSC-H/FSC-H (figura 6A), se muestran los

diferentes tipos de células mononucleadas en ausencia de anticuerpos monoclonales (AcMc). En este gráfico se marca una región R1 para mostrar la localización de las células linfocitarias. Éstas fueron cuantificadas a partir del marcaje con el anticuerpo monoclonal anti-CD45⁺⁺, específico para células linfocitarias.

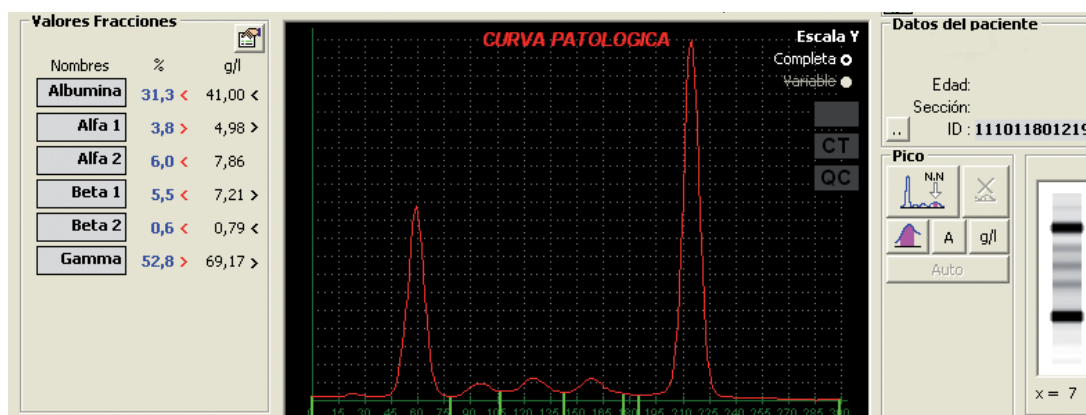


Figura 3. Electroforesis de las proteínas plasmáticas del caso con diagnóstico de leucemia de células plasmáticas. En esta paciente, la paraproteína M se localiza en la zona gamma.

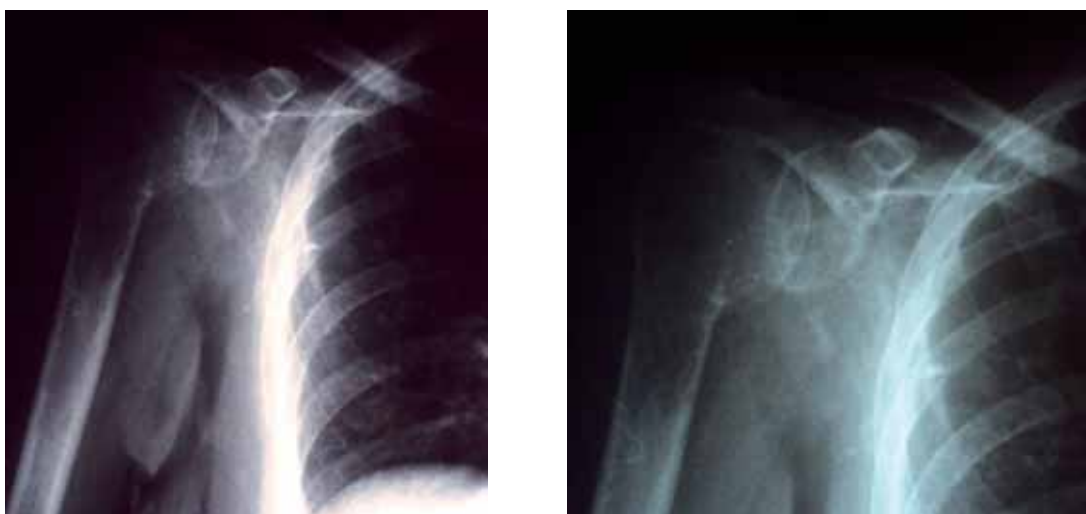


Figura 4. Rayos X de la parte superior del tórax derecho. Se observan fracturas del cuello del húmero derecho con gran toma de la escápula.

En el histograma FL2-H/FSC-H (*figura 6B*) se observan las células linfocitarias CD45⁺⁺RPE (FL2-H/FSC-H). El cálculo del porcentaje de estas células mostró 85.33% de las CD45⁺⁺RPE.

En el histograma de la *figura 6C*, región R2 de color verde, se muestra la presencia de células plasmáticas positivas para el anti-CD38⁺⁺ (FL1-H/FSC-H). Al calcular del porcentaje de estas células se encontró 29.25%.

Finalmente, el conjugado de los dos anticuerpos monoclonales anti-CD38⁺⁺/anti-CD45⁺⁺ (FL1-H/FL2-H) (*figura 6D*) de la región R3 muestra resultados similares a los de R2 (29.71%).

Como se demuestra el empleo de los marcadores anti-CD45 y anti-CD38 permitió comprobar la actividad proliferativa de las células plasmáticas en circulación periférica, lo que confirmó el diagnóstico de leucemia de células plasmáticas (LCP) de la paciente estudiada.

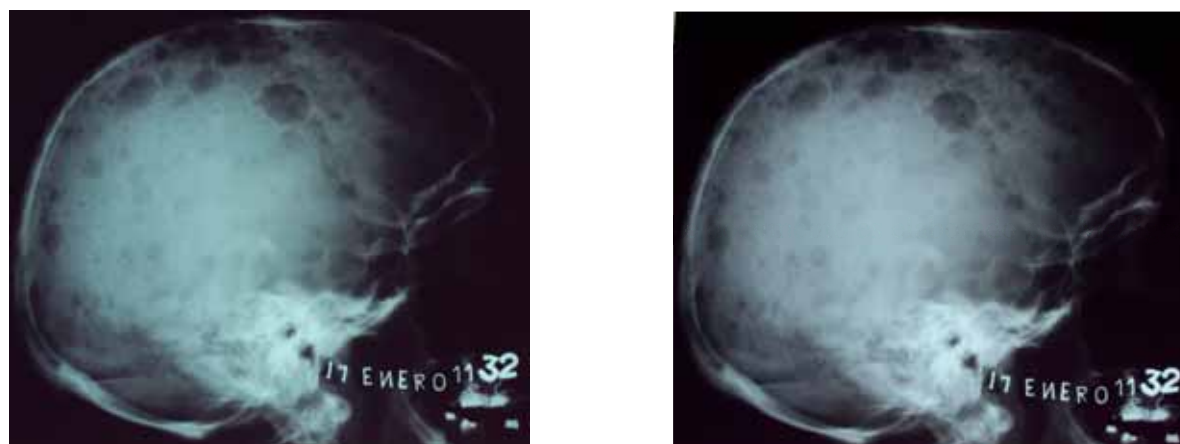


Figura 5. Placas radiológicas del cráneo de la paciente con diagnóstico leucemia de células plasmáticas. Muestra lesiones osteolíticas múltiples.

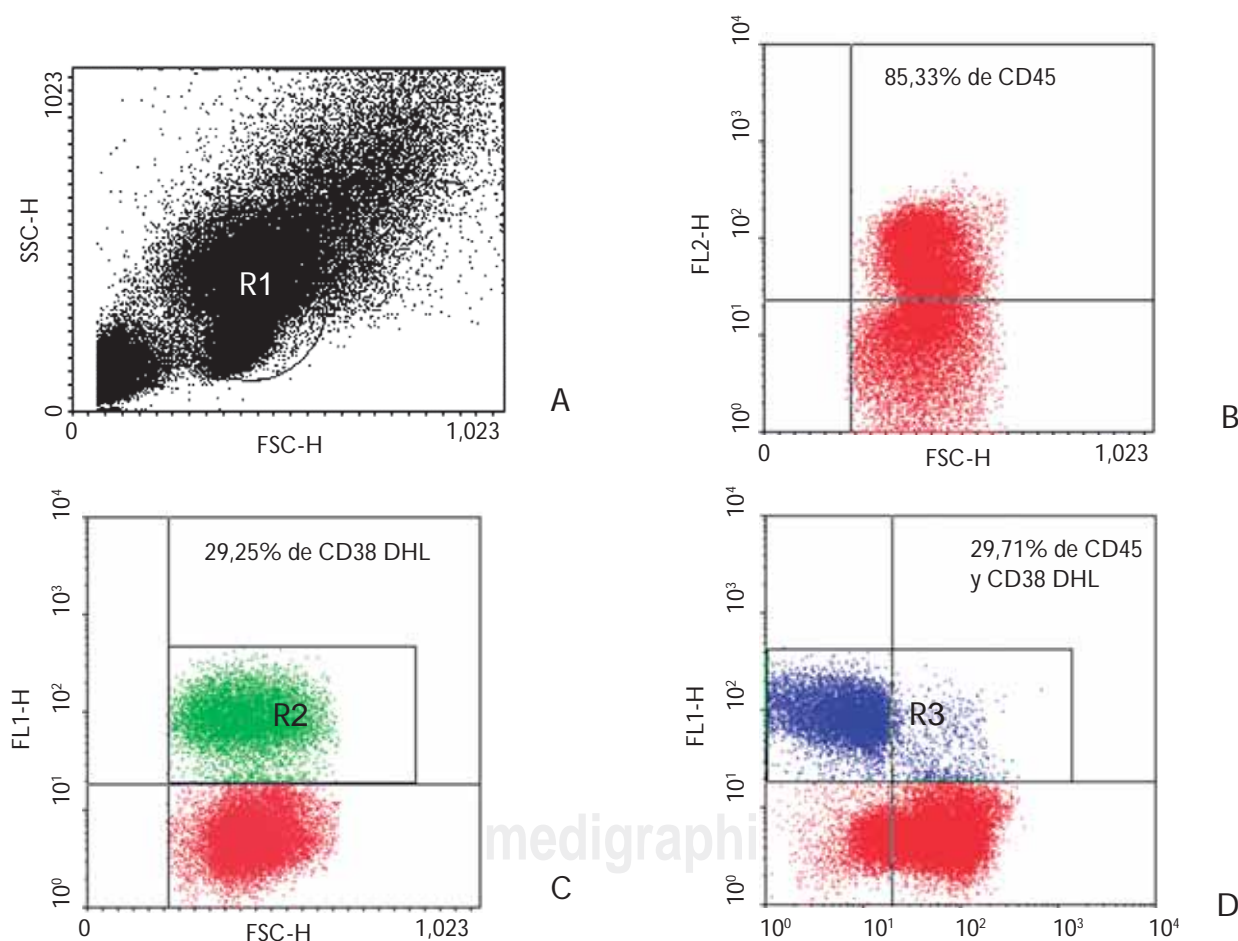


Figura 6. **A:** R1: SSC-H/FSC-H. Células sin marcador de superficie. La región circunscrita corresponde a la población linfocitaria. **B:** FL2-H/FSC-H. Presenta 85,33% de células linfocitarias con CD45 (RPE). **C:** R2: FL1-H/FSC-H. Muestra 29,25% de CP en SP con AoMo-anti-CD38 (FITC). **D:** R3: FL1-H/FL2-H. Presenta 29,71% de CP en SP marcadas con CD45/38 (RPE, FITC).

Discusión

Las gammopatías monoclonales se caracterizan por la proliferación anormal de un clon de células plasmáticas que producen un solo tipo de paraproteína (proteína monoclonal o componente M). Éstas pueden estar constituidas por moléculas completas y/o fracciones de inmunoglobulinas.¹⁴

La leucemia de células plasmáticas (LCP) es una forma infrecuente y agresiva del mieloma múltiple que tiene mal pronóstico y se caracteriza por proliferación de células plasmáticas que circulan en sangre periférica. Puede ser de origen primario (LCP 1re) o surgir como resultado de una transformación de leucemia secundaria del mieloma múltiple (LCP secundario).^{7,11}

Las características clínicas de esta paciente se relacionan con lo planteado por Kyle, 2003. Sin embargo, la manifestación clínica inicial de este paciente fue el dolor óseo en parrilla costal derecha irradiado,^{7,15} el cual se correlacionó con la presencia de lesiones múltiples osteolíticas (*figuras 4 y 5*) y las fracturas patológicas presentadas.

En las alteraciones hematológicas presentadas destaca la anemia normocítica normocrómica, la cual se correspondió a valores de hemoglobina (Hb) inferior a 90 g/L, eritrosedimentación acelerada y leucocitosis ligera con aumento de células plasmáticas circulantes. Además, presentó las infecciones que suelen ocurrir debido a la depresión de las tres series hematopoyéticas, particularmente la granulocítica. La aspiración de médula ósea y la biopsia demostraron infiltración por células plasmáticas tumorales y la depresión de las tres series hematopoyéticas. Este resultado coincide con lo encontrado por otros investigadores.^{1-2,19}

Presentó hipergammaglobulinemia tipo M,¹⁶ que en el perfil electroforético de proteínas plasmáticas se correspondió a una banda estrecha monoclonal en la región gamma, típica del mieloma múltiple. Ésta es de naturaleza monoclonal, se trata de una IgG producida por el clon tumoral.¹⁷

Teniendo en cuenta la ausencia de signos de insuficiencia renal u otro tipo de afección hematológica diferente a las presentadas, la paciente se clasificó en el estadio III, de acuerdo con los criterios de Durie-Salmon.¹⁸ Destaca que el padre de esta paciente falleció como consecuencia de un mieloma múltiple. Esto pudiera relacionarse con un posible origen o predisposición genética al desarrollo de este tipo de cáncer.

Por definición, el recuento de células plasmáticas sobrepasó los 2,000/ μ L o 20% del conteo diferencial en sangre periférica.¹⁹ Con la citometría de flujo fueron detectadas las células plasmáticas positivas para el marcador de superficie CD38⁺⁺. Éstas llegaron a representar alrededor de 50% de las células totales analizadas,¹⁴ como se observa en el histograma biparamétrico de las células de la ventana dibujada en la fracción proliferante: 29.25% de (FL1-H).

Conclusión

La citometría de flujo permitió confirmar el diagnóstico de la leucemia de células plasmáticas en el caso clínico estudiado. Estos resultados se relacionan con los obtenidos por otras pruebas paraclínicas.

Agradecimientos

Son muchas las cosas que nos engrandecen en la vida, jamás un éxito profesional será personal, es la suma de múltiples esfuerzos. Por eso gracias a todos: A mi familia, porque todos de alguna manera han participado en este triunfo. Los compañeros de los departamentos implicados, Hospital Hermanos Ameijeras (HHA), Instituto Pedro Kouri (IPK) y el Centro de Inmunología Molecular (CIM) de Cuba, por el apoyo brindado a la realización de este trabajo.

Referencias

1. Grogan TM, Van Camp B, Kyle RA, Müller-Hermelink HK, Harris NL. Pathology and genetics of tumors of haemato-poietic and

- lymphoid tissues. In: Grogan TM et al (eds). World Health Organization Classification of Tumors (WHO): Plasma cell neoplasm. Lyon: IARC Press. 2001. p. 142-156.
2. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press. 2001. p. 142-147.
3. Kyle AR. The international Myeloma Working Group: Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: *Brit J Haematol* 2003; 121: 749-757.
4. Ioannou MG, Stathakis E, Lazaris AC et al. Immunohistochemical evaluation of 95 bone marrow reactive plasmacytoses. *Blood* 2008; 111: 3941.
5. Van Camp B, Vanderkerken K, Bakkus M, Van Riet I. New insights into myeloma biology. En: Sesión 3 del 5o Congreso de la Asociación Hematológica Europea. Birmingham, UK. 2000. Disponible en: <http://listis.mmsupport.net>
6. Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B et al. Molecular pathways in bone marrow homing: Dominant role of alpha 4 beta 1 over beta 2 integrins and selectins. *Blood* 2001; 98: 2403.
7. Costello R, Sainty D, Bouabdallah R, Fermand J, Delmer A, Roussetot P, Chaibi P. Primary Plasma Cell Leukemia: A report of 18 cases. *Leukemia Research* 2001; 25: 103-107.
8. Noel P, Kyle RA. Plasma cell leukemia: An evaluation of response to therapy. *Am J Med* 1987; 83: 1062.
9. Yamamoto, JF, Goodman, MT. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Causes Control* 2008; 19: 379.
10. Blade J, Kyle RA. Nonsecretory myeloma, immunoglobulin D myeloma, and plasma cell leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999; 13: 1259.
11. Tiedemann RE, Gonzalez-Paz, N, Kyle RA et al. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia* 2008; 22: 1044.
12. Zeppa P, Marino G, Troncone G, Fulciniti F et al. Fine needle cytology and Flow Cytometry immunophenotyping and subclassification of Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Cytopathology* 2004; 102 (1): 55-65.
13. Smith A, Wisloff F, Samson D. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma. *Br J Haematol* 2005; 132: 410-451.
14. IMWG. 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.
15. Berenson JR. Myeloma bone disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18 (4): 653-672.
16. Dispenzieri A, Kyle RA. Multiple myeloma: Clinical features and indications for therapy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18 (4): 553-568.
17. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathies of undetermined significance: a review. *Immunol Rev* 2003; 194: 112-139.
18. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer* 1975; 36 (3): 842-854.
19. Garcia-Sanz R, Orfao A, González M et al. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 2001; 97: 822.