

Estudio de ploidía de células plasmáticas por citometría de flujo en pacientes con mieloma múltiple.

Primeros casos estudiados en Uruguay

Dres. Sofía Grille*, Eloísa Riva*, Lic. Natalia Trías†, Lic. Andreína Brugini†, Dras. Cecilia Guillermo‡, Lilián Díaz§, Daniela Lens¶

Resumen

Introducción: la historia natural del mieloma múltiple (MM) es heterogénea con sobrevidas que van desde pocas semanas a más de 20 años. El análisis de los factores pronósticos es esencial para establecer una terapéutica adaptada al riesgo. El estudio de la ploidía de las células plasmáticas es un factor que ha demostrado tener un importante valor pronóstico.

Objetivo: estandarizar una técnica, no disponible en Uruguay, para determinar la ploidía de las células plasmáticas por citometría de flujo.

Material y método: el estudio de ploidía se realizó en médula ósea utilizando para la marcación de las células plasmáticas los anticuerpos monoclonales anti CD38 y CD138. Para el estudio del contenido del ácido desoxirribonucleico (ADN) se utilizó yoduro de propidio. En el análisis se calculó el índice de ADN (cociente entre la moda del pico correspondiente a la cantidad de ADN de las células plasmáticas en fase Go/G1 y la moda del pico Go/G1 de las células normales residuales).

Resultados: en este trabajo mostramos la estandarización

de la determinación de ploidía por citometría de flujo y los primeros casos analizados en nuestro país. Se estudiaron nueve pacientes con diagnóstico de MM, hallándose dos casos hipoploides (no hiperploide), un caso diploide (no hiperploide) y seis casos hiperploides.

Conclusiones: disponemos de una técnica de determinación de ploidía de células plasmáticas que es sencilla, rápida de realizar y con importante valor pronóstico para pacientes portadores de MM.

Palabras clave: PLOIDÍAS
CÉLULAS PLASMÁTICAS
CITOMETRÍA DE FLUJO
MIELOMA MÚLTIPLE

Key words: PLOIDIES
PLASMA CELLS
FLOW CYTOMETRY
MULTIPLE MYELOMA

* Asistente Cátedra de Hematología. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

† Lic. Bioquímica. Laboratorio de Citometría y Biología Molecular. Departamento Básico de Medicina. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

‡ Prof. Agregado. Cátedra de Hematología. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

§ Prof. Director. Cátedra de Hematología. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

¶ Prof. Agregado. Laboratorio de Citometría y Biología Molecular. Departamento Básico de Medicina. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Correspondencia: Dra. Daniela Lens. Laboratorio de Citometría y Biología Molecular. Departamento Básico de Medicina. Hospital de Clínicas, piso 15. Avda. Italia s/n, Montevideo CP 11600. Uruguay. Correo electrónico: dlens@hc.edu.uy

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Recibido: 8/4/13

Aceptado: 9/9/13

Introducción

El mieloma múltiple (MM) es una hemopatía maligna del grupo de las gamapatías monoclonales, caracterizada por la proliferación monoclonal atípica de una clona plasmocitaria y por la presencia de una paraproteína en el suero, orina o en ambas⁽¹⁾. Corresponde aproximadamente al 1% de todas las enfermedades malignas y es la segunda neoplasia hematológica en frecuencia⁽²⁾.

La historia natural del MM es heterogénea con sobrevivencias que van desde pocas semanas hasta más de 20 años, por lo que el detallado análisis de los factores pronósticos es esencial para establecer una terapéutica adaptada al riesgo.

La incidencia global de ADN aneuploide en MM varía entre 50% y 70%, siendo la mayoría hiperploides^(3,4). El estudio de la ploidía ha demostrado tener importante valor pronóstico. En este sentido, la hipoploidía se asocia con menor respuesta al tratamiento y sobrevida. En las gamapatías monoclonales de significado incierto (GMSI), los resultados de la cuantificación de ADN han sido contradictorios. El ADN aneuploide es un marcador tumoral específico que además de establecer un pronóstico podría usarse como técnica de detección de enfermedad mínima residual^(3,4).

La presencia de hiperploidía es considerada generalmente un evento favorable y, por el contrario, los MM no hiperploides (diploides e hipoploides) tienen un peor pronóstico. Hasta el momento todos los estudios realizados han demostrado una mayor sobrevida global y libre de progresión en los pacientes que presentan hiperploidía detectada mediante la determinación del contenido de ADN por citometría de flujo o por análisis cariotípico convencional^(3,5-10).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestro objetivo fue estandarizar e introducir en nuestro medio una técnica de citometría de flujo para la determinación de ploidía en células plasmáticas en pacientes con MM. Se presentan aquí los resultados de los primeros pacientes estudiados en nuestro país.

Pacientes, material y método

Pacientes

Se incluyeron los pacientes con MM que se diagnosticaron en la Cátedra de Hematología del Hospital de Clínicas desde febrero hasta diciembre de 2012. Se estudiaron nueve pacientes cuyas características se muestran en la tabla 1. Todos los pacientes incluidos fueron pacientes con mieloma sintomático previo al inicio del tratamiento y un caso correspondió a una leucemia de células plasmáticas. El diagnóstico de MM se realizó siguiendo los criterios propuestos por el International Myeloma Working Group⁽¹¹⁾.

Antes de realizar el estudio de ploidía se efectuó un estudio inmunofenotípico en médula ósea con el objetivo de conocer el porcentaje de células plasmáticas de la muestra y la relación de células plasmáticas patológicas/células plasmáticas normales⁽³⁾.

Estudio de ploidía por citometría de flujo

El contenido de ADN habitualmente se expresa como "índice ADN", que es la relación entre la moda del pico Go/G1 de las células plasmáticas y la moda del pico Go/G1 de las células normales residuales en la muestra. Se consideran hipoploides cuando el índice de ADN es menor a 0,95; hiperploide cuando está entre 1,06 y 1,74, y tetraploide cuando es mayor a 1,74. El resto de los casos se consideran diploides⁽¹²⁾.

Para realizar el estudio de ploidía se siguió la técnica descrita por Vindelov y colaboradores⁽¹³⁾ modificada para el marcaje del ADN con yoduro de propidio (Cycloscope™ Multiple Myeloma-Citognos). Se utilizan aproximadamente 100-200 µl de la muestra de médula ósea de forma de obtener diez células⁽⁶⁾. Posteriormente se realiza marcaje de los antígenos de superficie característicos de células plasmáticas (CD38 y CD138) con anticuerpos monoclonales conjugados con FITC. Se realiza lisis de eritrocitos y posteriormente se realiza la marcación de ADN con yoduro de propidio. Los datos son adquiridos a baja velocidad utilizando BD CellQuest Pro software (Becton Dickinson, San Diego, EEUU) en el citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Diego, EEUU) del Laboratorio de Citometría y Biología Molecular del Hospital de Clínicas. Para el análisis del índice de ADN se utiliza el ModFit software package (Verity Software House, Inc).

Normas éticas

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética Médica del Hospital de Clínicas para su realización.

Resultados

Se realizó la estandarización de la técnica de estudio de ploidía por citometría de flujo como fue comentado en Material y método.

Se estudiaron nueve pacientes con diagnóstico de MM (tabla 1), hallándose dos casos de MM hipoploide (no hiperploide), un caso diploide (no hiperploide) y seis casos hiperploides (figuras 1, 2 y 3). Los casos de hipoploidía correspondieron a una paciente con una leucemia de células plasmáticas y a un paciente que presentaba un MM IgG kappa con la presencia de una traslocación t(4,14) realizado por FISH en médula ósea. Asimismo, tuvimos un caso diploide que de acuerdo a la literatura es considerado de pronóstico adverso.

Tabla 1. Características de la población estudiada

Pacientes	Edad	Sexo	Diagnóstico	Clasificación Durie-Salmón	ISS	Infiltración M.O (mielograma)	Estudio citogenético	Ploidía por CF Índice ADN
1	65	M	MM	III B	3	90%	-	1,21 (Hiperploide)
2	59	F	MM IgG kappa	IIA	1	65%	Sin alteraciones	1,16 (Hiperploide)
3	77	M	MM IgG kappa	III A	3	36%	t(4;14) por FISH	0,9 (Hipoploide)
4	70	M	MM IgA kappa	IIIA	3	50%	Sin alteraciones	1,11 (Hiperploide)
5	58	M	MM IgG lambda	IIIB	3	70%	Sin alteraciones	1,1 (Hiperploide)
6	74	F	MM IgG lambda	IIIB	3	80%	-	1,01 (Diploide)
7	57	M	MM IgG kappa	IIA	1	35%	Sin alteraciones	1,29 (Hiperploide)
8	60	F	MM IgG kappa	IIIA	3	15%	Sin alteraciones	1,1 (Hiperploide)
9	56	F	Leucemia a células plasmáticas	-	-	80%	-	0,8 (Hipoploide)

ISS: International Staging System; CF: citometría de flujo; MM: mieloma múltiple

Discusión y conclusiones

En el presente trabajo hemos mostrado los primeros casos de estudio de ploidía por citometría de flujo en pacientes con MM en nuestro país. Este trabajo se enmarca en un proyecto multidisciplinario del Laboratorio de Citometría y Biología Molecular del Departamento Básico de Medicina y el Servicio de Hematología del Hospital de Clínicas con el objetivo de mejorar las herramientas diagnósticas y pronósticas en pacientes con MM.

Aproximadamente entre 50% y 70% de los pacientes con MM de nuevo diagnóstico presentan contenido aneuploide de ADN⁽⁴⁾, siendo la mayoría de tipo hiperdiploide (80% aproximadamente)⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Los casos de hipoploidía y biclonales (presencia de dos poblaciones celulares con diferente contenido de ADN) tienen una incidencia significativamente más baja^(15,17,18).

La determinación de la ploidía tiene significado pronóstico en MM, ya que los casos no hiperploides se asocian con enfermedad más agresiva, especialmente los hipoploides, con una respuesta pobre al tratamiento y una supervivencia más corta^(16,19-23). Cabe destacar la alta incidencia de hipoploidía en la leucemia de células

plasmáticas (como uno de los casos de nuestra serie), entidad de muy mal pronóstico⁽²⁴⁾.

La ploidía de las células plasmáticas se puede realizar por citogenética convencional o por citometría de flujo. La determinación por citometría de flujo tiene numerosas ventajas, ya que es una técnica más sencilla, más rápida (pudiendo tener el informe en menos de 24 horas) y con un costo razonable. Asimismo, la baja tasa proliferativa de las células plasmáticas dificulta la obtención de metafases y, por lo tanto, la determinación de la ploidía por citogenética convencional presenta bajo rendimiento, incluso utilizando técnicas de purificación de las células plasmáticas^(14,25-31). Es importante destacar que en los nueve casos incluidos, en ninguno de ellos se obtuvo resultado de ploidía por citogenética convencional.

Disponer de esta técnica en nuestro país es de especial utilidad, ya que los pacientes con MM hipoploides podrían beneficiarse del tratamiento con bortezomib, actualmente bajo la cobertura del Fondo Nacional de Recursos (FNR) (incluido en la normativa de cobertura FNR: http://www.fnr.gub.uy/sites/default/files/normativas/medicamentos/n_trat_mmultiple_bortezomib.pdf)

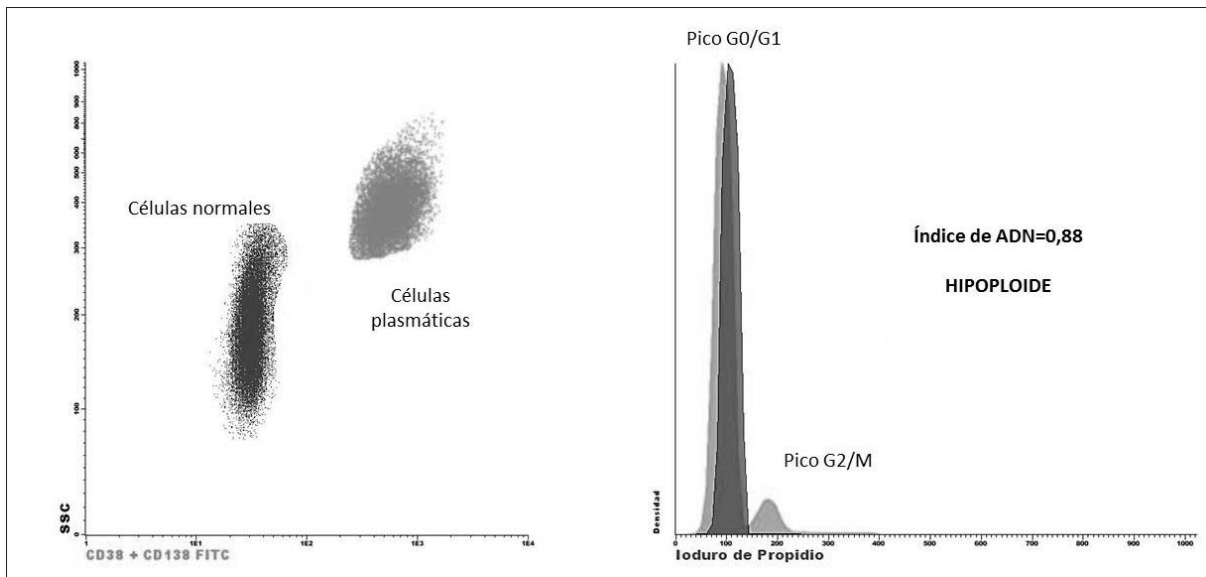


Figura 1. Ejemplo de estudio de ploidía en paciente con MM hipoploide

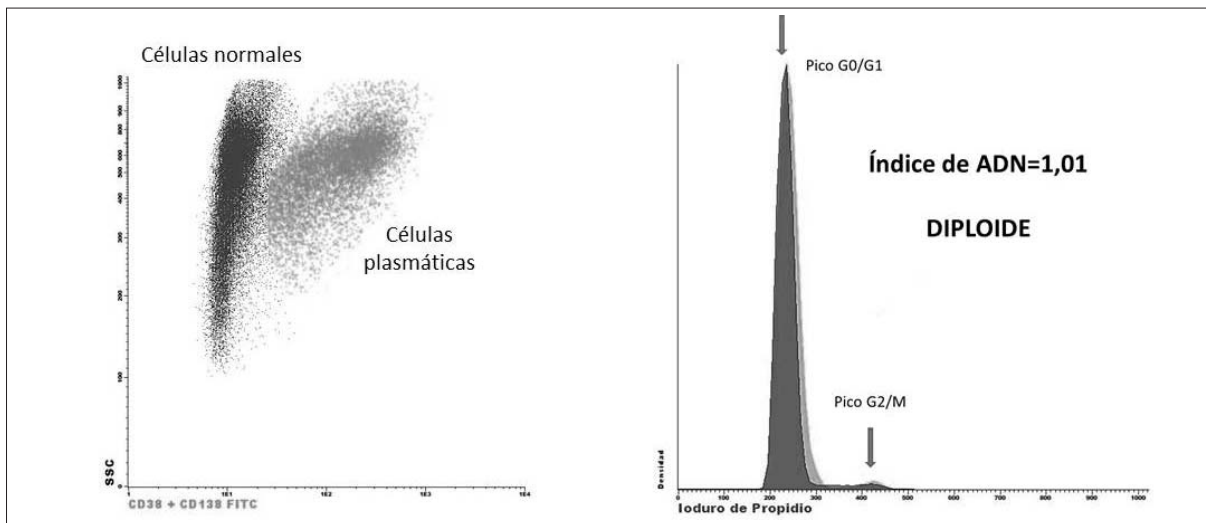


Figura 2. Ejemplo de estudio de ploidía en paciente con MM diploide

En conclusión: disponemos de una técnica de determinación de ploidía de células plasmáticas que es sencilla, rápida de realizar y con importante valor pronóstico para pacientes portadores de MM.

Abstract

Introduction: the natural history of multiple myeloma (MM) is heterogeneous, survival rates ranging from a few weeks to over 20 years. Analysis of prognostic factors is essential to decide on a therapy that is adapted to specific risks. Plasma cells ploidy analysis has proved to be a high prognostic value factor.

Objective: to standardize a technique, unavailable in Uruguay, consisting in flow cytometry for plasma cells ploidy analysis in order to determine ploidy values in plasma cells.

Method: ploidy analysis was performed in the bone marrow, and monoclonal anti-CD38 and CD-138 antibodies were used to mark plasma cells. Propidium iodide was used to study the content of deoxyribonucleic acid (DNA). The DNA was calculated in the analysis (the ratio of the peak mode corresponding to the DNA present in the plasma cells during the Go/G1 phase and the Go/G1 peak mode of residual normal cells).

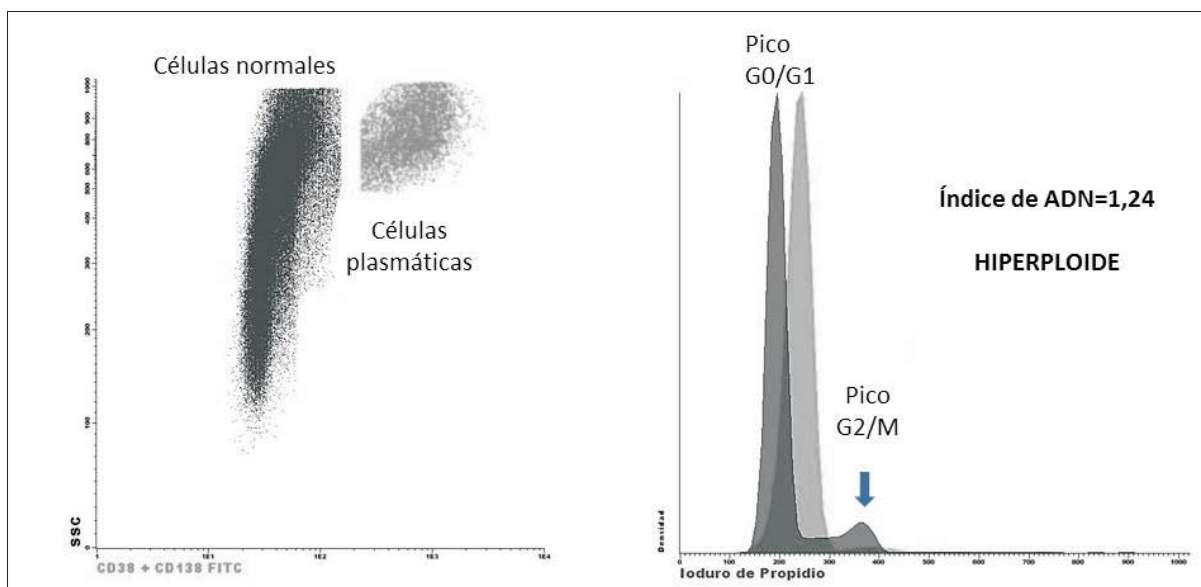


Figura 3. Ejemplo de estudio de ploidía en paciente con MM hiperploide

Results: the study presented the standardization of flow cytometry ploidy analysis and the first cases analyzed in our country. Nine patients with a diagnosis of MM were studied, having found two hypoploid cases (non-hyperploidy), one diploid case (non-hyperploidy), and six hyperploidy cases.

Conclusions: there is a technique for ploidy determination of plasma cells that is simple, fast to perform and has an important prognostic value for patients with MM.

Resumo

Introdução: a história natural do mieloma múltiplo (MM) é heterogênea com sobrevividas que variam de poucas semanas a mais de 20 anos. A análise dos fatores prognósticos é fundamental para estabelecer uma terapêutica adaptada ao risco. O estudo da ploidia das células plasmáticas é um fator que mostrou ter valor prognóstico importante.

Objetivo: padronizar uma técnica, não disponível no Uruguai, para determinar a ploidia das células plasmáticas por citometria de fluxo.

Material e método: o estudo da ploidia foi realizado na medula óssea utilizando para a marcação das células plasmáticas os anticorpos monoclonais anti CD38 e CD138. Para o estudo do conteúdo do ácido desoxirribonucleico (ADN) foi utilizado iodeto de propídio. Na análise o índice de ADN (quociente entre a moda do pico correspondente à quantidade de ADN das células plasmáticas na fase Go/G1 e a moda do pico Go/G1 das células normais residuais) foi calculado.

Resultados: neste trabalho descrevemos a padronização da determinação da ploidia por citometria de flu-

xo e os primeiros casos analisados no nosso país. Nove pacientes com diagnóstico de MM foram estudados, sendo encontrados dois casos hipoploides (não hiperploide), um caso diploide (não hiperploide) e seis casos hiperploides.

Conclusões: dispomos de uma técnica de determinação de ploidia de células plasmáticas que é simples, rápida de realizar e com valor prognóstico importante para pacientes portadores de MM.

Bibliografía

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 28; 351(18):1860-73.
2. Caers J, Vande broek I, De Raeye H, Michaux L, Trullémans F, Schots R, et al. Multiple myeloma-an update on diagnosis and treatment. *Eur J Haematol* 2008; 81(5):329-43.
3. San Miguel JF, García-Sanz R, González M, Orfão A. DNA cell content studies in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1996; 23(1-2):33-41.
4. Decaux O, Cuggia M, Ruelland A, Cazalets C, Cadore B, Jego P, et al. (Monoclonal gammopathies of undetermined significance and their progression over time. Retrospective study of 190 patients). *Presse Med* 2006; 35(7-8):1143-50.
5. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Litzow MR, Henderson KJ, et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 2005; 106(8):2837-40.
6. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003; 101(11):4569-75.

7. **Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique.** Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001; 98(7):2229-38.
8. **Decaux O, Lodé L, Magrangeas F, Charbonnel C, Gouraud W, Jézéquel P, et al; Intergroupe Francophone du Myélome.** Prediction of survival in multiple myeloma based on gene expression profiles reveals cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients: a study of the Intergroupe Francophone du Myélome. *J Clin Oncol* 2008; 26(29):4798-805.
9. **Greipp PR, Trendle MC, Leong T, Oken MM, Kay NE, Van Ness B, et al.** Is flow cytometric DNA content hypodiploidy prognostic in multiple myeloma? *Leuk Lymphoma* 1999;35(1-2):83-9.
10. **Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al.** Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* 2007;109(8):3489-95.
11. **Durie BG, Kyle RA, Belch A, Bensinger W, Blade J, Boccadoro M, et al; Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation.** Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *Hematol J* 2003;4(6):379-98.
12. **Paiva B, Almeida J, Pérez-Andrés M, Mateo G, López A, Rasillo A, et al.** Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78(4):239-52.
13. **Vindelov LL.** Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1977;24(3):227-42.
14. **García-Sanz R, Orfão A, González M, Moro MJ, Hernández JM, Ortega F, et al.** Prognostic implications of DNA aneuploidy in 156 untreated multiple myeloma patients. Castelano-Leonés (Spain) Cooperative Group for the Study of Monoclonal Gammopathies. *Br J Haematol* 1995;90(1):106-12.
15. **Mateo G, Castellanos M, Rasillo A, Gutiérrez NC, Montalbán MA, Martín ML, et al.** Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2005;11(10):3661-7.
16. **Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB, Lahuerta JJ, Mateos MV, Gutiérrez N, et al; PETHEMA Study Group; GEM Study Group.** Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol* 2008;26(16):2737-44.
17. **Morgan RJ Jr, Gonchoroff NJ, Katzmann JA, Witzig TE, Kyle RA, Greipp PR.** Detection of hypodiploidy using multi-parameter flow cytometric analysis: a prognostic indicator in multiple myeloma. *Am J Hematol* 1989;30(4):195-200.
18. **Smith L, Barlogie B, Alexanian R.** Biclonal and hypodiploid multiple myeloma. *Am J Med* 1986;80(5):841-3.
19. **Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, et al.** Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 2004;64(4):1546-58.
20. **Terpos E, Eleutherakis-Papaikovou V, Dimopoulos MA.** Clinical implications of chromosomal abnormalities in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2006;47(5):803-14.
21. **Higgins MJ, Fonseca R.** Genetics of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18(4):525-36.
22. **Dispenzieri A, Rajkumar SV, Gertz MA, Fonseca R, Lacy MQ, Bergsagel PL, et al.** Treatment of newly diagnosed multiple myeloma based on Mayo Stratification of Myeloma and Risk-adapted Therapy (mSMART): consensus statement. *Mayo Clin Proc* 2007;82(3):323-41.
23. **Chng WJ, Ketterling RP, Fonseca R.** Analysis of genetic abnormalities provides insights into genetic evolution of hyperdiploid myeloma. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45(12):1111-20.
24. **Colovic M, Jankovic G, Suvajdzic N, Milic N, Dordevic V, Jankovic S.** Thirty patients with primary plasma cell leukemia: a single center experience. *Med Oncol* 2008; 25(2):154-60.
25. **Duque RE, Andreeff M, Braylan RC, Diamond LW, Peiper SC.** Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in neoplastic hematopathology. *Cytometry* 1993;14(5):492-6.
26. **Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Bladé J, González M, García-Sanz R, et al.** Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 1998;152(6):1655-65.
27. **Almeida J, Orfao A, Mateo G, Ocqueteau M, García-Sanz R, Moro MJ, et al.** Immunophenotypic and DNA content characteristics of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Pathol Biol (Paris)* 1999;47(2):119-27.
28. **Orfão A, García-Sanz R, López-Berges MC, Belén Vidriales M, González M, Caballero MD, et al.** A new method for the analysis of plasma cell DNA content in multiple myeloma samples using a CD38/propidium iodide double staining technique. *Cytometry* 1994;17(4):332-9.
29. **Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IM, Loken MR.** Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 1990;76(9):1739-47.
30. **Scudla V, Ordeltova M, Minarik J, Dusek L, Zemanova M, Bacovsky J.** Prognostic significance of plasma cell propidium iodide and annexin-V indices and their mutual ratio in multiple myeloma. *Neoplasma* 2006;53(3):213-8.
31. **San Miguel JF, Gutiérrez NC, Mateo G, Orfao A.** Conventional diagnostics in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006;42(11):1510-9.