

CLONALPATH

ANÁLISIS DIFERENCIAL ENTRE MM Y MGUS POR CITOMETRIA DE FLUJO

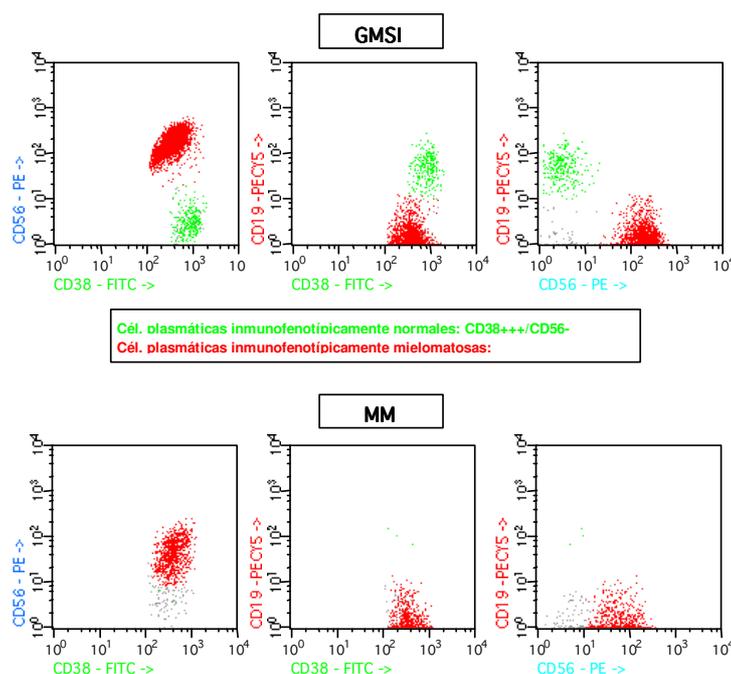
INTRODUCCION

Las gammopatías monoclonales son un grupo de enfermedades que se caracterizan por la expansión clonal de células plasmáticas que producen una inmunoglobulina monoclonal (componente M), detectable en orina y/o suero. Aunque se considera como prototipo de gammopatía monoclonal al mieloma múltiple (MM), la patología de célula plasmática más frecuente es la gammopatía monoclonal de significado incierto (GMSI) (1). La importancia de hacer una diferenciación entre los MM y las GMSI viene determinado porque la inapropiada falta de tratamiento en los MM diagnosticados erróneamente como GMSI puede llevar al desarrollo de síntomas clínicos y complicaciones de gravedad como fallos renales y fracturas óseas, y por otro lado los pacientes con GMSI diagnosticados erróneamente como MM son sometidos a un tratamiento innecesario con quimioterapia.

Clonalpath es un reactivo indicado para diferenciar entre MM y GMSI en base a la cuantificación de células plasmáticas inmunofenotípicamente normales (CPIN) en muestras de médula ósea. Recientemente se ha demostrado que este parámetro es el criterio individual más determinante en el diagnóstico diferencial entre MM y GMSI (2).

PROCEDIMIENTO

Los pacientes con GMSI presentan dos subpoblaciones diferentes de células plasmáticas en muestras de médula ósea (2, 3). Una de estas subpoblaciones (CPIN) muestra características fenotípicas idénticas a las células plasmáticas de individuos normales que se caracterizan por una fuerte reactividad para el antígeno CD38⁺⁺⁺, bajo FSC/SSC, son CD19⁺ y generalmente CD56⁻. En cambio, la segunda y predominante subpoblación de células plasmáticas muestra el patrón inverso, típico de células plasmáticas mielomatosas (4, 5): son CD56⁺⁺, CD19⁻ y CD38⁺⁺. La subpoblación de células plasmáticas inmunofenotípicamente normales (CPIN) está presente en todos los pacientes con GMSI, mientras que en los MM prácticamente no se manifiesta o lo hace con una frecuencia significativamente más baja que en las GMSI (2).



OBJETIVO

Este reactivo está enfocado a diferenciar entre GMSI y MM en base al número de células plasmáticas inmunofenotípicamente normales respecto el total de células plasmáticas de muestras de médula ósea. El punto de corte estaría situado en torno al 3%: los casos de GMSI presentan un porcentaje de CPIN (CD38⁺⁺⁺CD56⁻CD19⁺) mayor de 3% respecto a las células plasmáticas totales, mientras que los pacientes con MM muestran un número de CPIN menor o igual a 3%.

REACTIVO

Cada vial contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales murinos: CD38 conjugado con isotiocianato de fluoresceína, CD56 conjugado con ficoeritrina, y CD19 conjugado con el tándem de fluorocromos ficoeritrina-cianina5. Añadir 15 µl por test. Presentación: vial para 100 test.

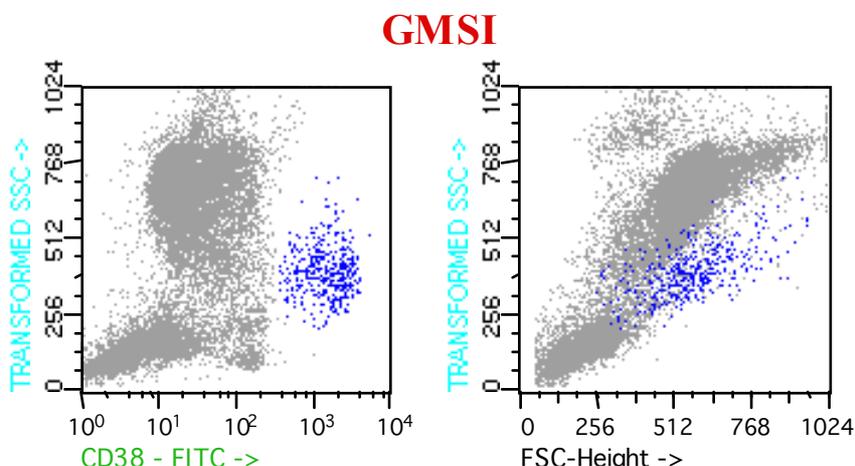
PROTOCOLO

1. -Pasar la muestra de médula ósea 3 ó 4 veces a través de una jeringa con aguja de 20 µm para deshacer los agregados celulares. Realizar un recuento de la celularidad de la muestra y seleccionar 10⁶ células en un volumen de 100 - 150 µl.
2. Añadir 15 µl de Clonalpath y agitar la mezcla resultante.
3. Incubar 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente
4. Añadir 2 ml de solución lisante de hematíes. Agitar la mezcla e incubar durante 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.
5. Para eliminar de la mezcla los hematíes lisados* centrifugar a 540g durante 5 minutos, decantar el sobrenadante y escurrir cada tubo sobre papel de filtro, eliminando así los posibles restos de solución lisante. A continuación resuspender el botón celular que queda como precipitado golpeando suavemente con los dedos el fondo del tubo.
6. Añadir 2 ml de PBS y lavar las células centrifugando de nuevo a 540g durante 5 minutos, decantando a continuación el sobrenadante y resuspendiendo el botón celular.
7. Adquirir los datos en un citómetro de flujo. La adquisición de los datos deberá ser realizada preferentemente durante las tres horas siguientes a la preparación de la muestra. Mantener hasta entonces los tubos a 4 °C.

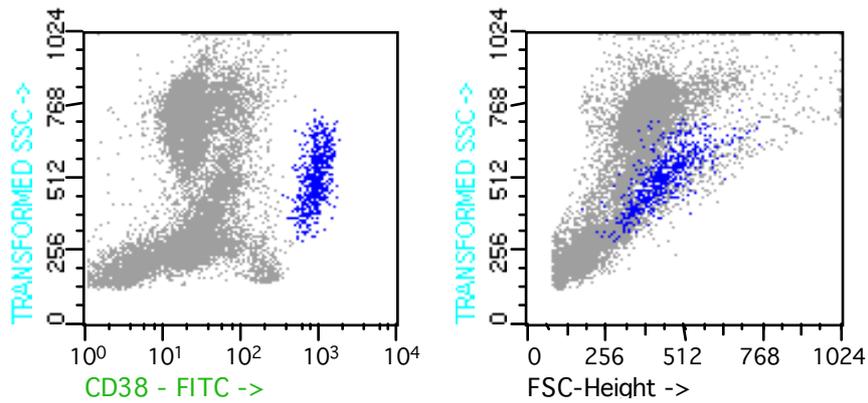
***Nota:** El uso de la solución lisante de hematíes QUICKLYSYS no necesita centrifugaciones ni lavados posteriores con PBS (Pasos 5 y 6), permitiendo una adquisición directa en el citómetro de flujo una vez terminado el periodo de incubación.

ANALISIS DE LOS DATOS

1. Seleccionar las células plasmáticas conforme a su mayor intensidad de fluorescencia para el anticuerpo CD38-FITC y su distribución de FSC/SSC tal y como se muestra en las figuras siguientes:

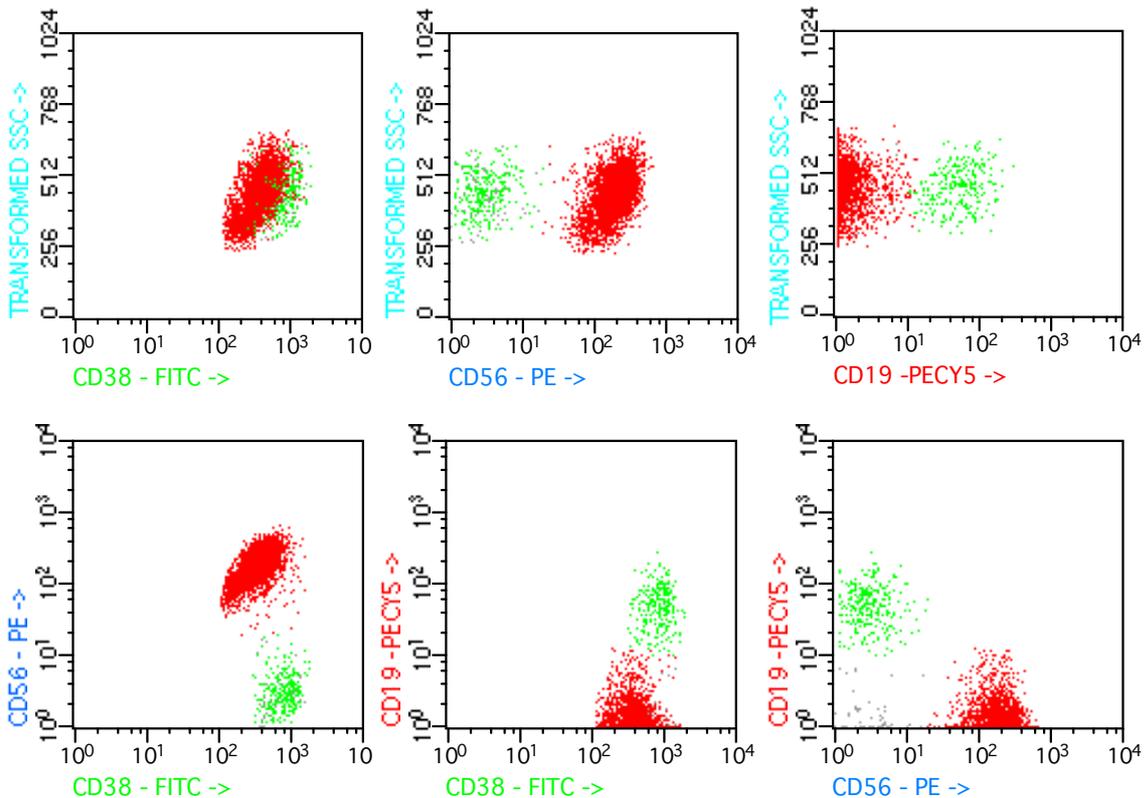


MM



2. Discriminar entre las células plasmáticas inmunofenotípicamente normales y las mielomas presentes en la muestra:

- Las células plasmáticas inmunofenotípicamente normales, pintadas de color verde en las siguientes figuras, se caracterizan por una marcada positividad para el antígeno CD19, generalmente son negativas para el CD56 y muestran una muy fuerte reactividad para el antígeno CD38 con bajo FSC/SSC.
- Las células plasmáticas mielomatosas, pintadas de color rojo en las figuras que se muestran a continuación, desarrollan el patrón opuesto: son marcadamente positivas para el antígeno CD56, son siempre CD19 negativas y muestran una expresión de CD38 positiva pero de menor intensidad con valores de FSC/SSC más altos a los de las CPIN.



3. Cuando el porcentaje de células plasmáticas inmunofenotípicamente normales - calculadas respecto al número de células plasmáticas totales - es mayor de 3%, es compatible con una GMSI, mientras que los pacientes con MM generalmente presentan un número de células plasmáticas inmunofenotípicamente normales menor o igual al 3 % respecto al número total de células plasmáticas de la muestra de médula ósea.

UTILIDAD CLINICA

Con la prolongación de la esperanza de vida la probabilidad de desarrollar componentes monoclonales aumenta, llegando a ser un problema importante para las instituciones sanitarias en cuanto a número de pacientes y costes de atención a los mismos. La mayoría de estos pacientes padecerán una GMSI de carácter benigno, si bien al menos un cuarto de los casos de GMSI se transforma en MM generalmente después de un largo período de estabilidad (1, 6).

Clonalpath es un reactivo que permite la cuantificación de forma directa de las proporciones de células plasmáticas normales y clonales presentes en muestras de médula ósea, lo que recientemente se ha revelado como el criterio individual más selectivo a la hora de realizar una diferenciación entre GMSI y MM (2). La capacidad de discriminación entre ambas patologías en base a los resultados obtenidos con Clonalpath concede a este reactivo un importante valor clínico, especialmente en los casos en los que resulta difícil establecer una clara diferencia entre uno y otro.

BIBLIOGRAFIA

1. Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Baillier's Clinical Haematology*, 1995; 8: 761-81.
2. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, García-Sanz R, López Berges C, Moro J, Hernández J, Escribano L, Caballero MD, Rozman M, San Miguel JF. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *The American Journal of Pathology*, 1998; 152: 1655-65.
3. Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, Tanaka H, Sakai A, Asaoku H, Kuramoto A. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood*, 1993; 81: 2658-63.
4. San Miguel JF, García Sanz R, González M, Orfao A. Immunophenotype and DNA cell content in multiple myeloma. *Baillier's Clinical Haematology*, 1995; 8: 735-59.
5. Orfao A, García-Sanz R, López-Berges MC, 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: 332-9.
6. Baldini L, Guffanti A, Cesana BM, Colombi M, Chiorboli O, Damilano Y, Maiolo AT. Role of different hematopoietic variables in defining the risk of malignant transformation in monoclonal gammopathy. *Blood*, 1996; 87: 912-18.