

## Citometría de flujo en Hematología

En las últimas décadas, la citometría de flujo (CMF) se ha convertido en una de las aproximaciones más útiles para el estudio de las células hematopoyéticas, proporcionando información sobre los perfiles de expresión proteica mediante análisis simultáneo de los niveles de expresión de varias proteínas para un gran número de células individuales presentes en una muestra.<sup>1</sup> Con este tipo de mediciones puede definirse la mayor o menor proximidad (distancia) fenotípica entre distintas células, lo cual permite establecer con relativa precisión si se trata de células de la misma línea y/o estadio madurativo o si, por el contrario, se trata de células diferentes de las células normales/reactivas (por ejemplo, células tumorales).<sup>2</sup> Por ello, la hematología en general, y de forma específica las hemopatías malignas, constituye una de las áreas de la medicina en las que las aplicaciones de la citometría de flujo han alcanzado mayor desarrollo en las últimas décadas.

### *Rastreo diagnóstico de hemopatías malignas*

El inmunofenotipado por CMF constituye un método rápido, sensible y específico para el rastreo diagnóstico de la presencia de células linfoides neoplásicas/clonales en sangre periférica (SP), médula ósea (MO), y otros tipos de muestras hematológicas o no hematológicas. Así, una sola combinación de 12 anticuerpos monoclonales (AcMo) distribuidos entre 8 fluorescencias para el rastreo diagnóstico de linfocitosis absolutas permite la identificación de síndromes linfoproliferativos crónicos B (SLPC-B) con una sensibilidad y especificidad del 100%, superior a la observada cuando empleamos aproximaciones diagnósticas basadas en la utilización secuencial de técnicas morfológicas, inmunofenotípicas y moleculares, según criterios convencionales.<sup>3</sup> Esta estrategia, combinada con el empleo de paneles relativamente amplios de AcMo dirigidos frente a diferentes miembros de las familias TCRV $\beta$  y TCRV $\gamma$ /V $\delta$ , resulta también de utilidad contrastada en el diagnóstico de clonalidad T.<sup>4</sup> De forma similar, el empleo de esta aproximación al estudio de tejido linfoide (p. ej.: ganglio linfático) obtenido mediante punción-aspiración con aguja fina ha demostrado ser de gran utilidad diagnóstica al combinarse con estudios citológicos e histopatológicos convencionales.<sup>5</sup> Más recientemente se ha demostrado, además, la utilidad diagnóstica de los estudios fenotípicos mediante CMF para la identificación de enfermedad leptomeníngea en pacientes con linfomas B agresivos y otras hemopatías, permitiendo la identificación de pequeñas cantidades de células neoplásicas (< 1 célula en 50  $\mu$ L) en líquido cefalorraquídeo.<sup>6</sup> Por último, la CMF ha demostrado ser una herramienta muy eficaz a la hora de establecer la clonalidad vs policlonalidad de células plasmáticas y ayudar al diagnóstico diferencial, incluida predicción de riesgo, de las gammopatías monoclonales.<sup>7</sup>

### *Clasificación de las hemopatías malignas*

Una vez demostrada la presencia de células leucémicas/neoplásicas en una muestra, los estudios inmunofenotípicos por CMF permiten un recuento y caracterización precisa de las mismas, por ejemplo, asignar células leucémicas a las líneas mieloide y linfoides T y B, y clasificarlas según su grado de diferenciación en células inmaduras.<sup>3</sup> Algunos ejemplos concretos sobre dicha utilidad incluyen: 1) el diagnóstico de la línea de las células blásticas en las leucemias agudas; 2) la identificación de las leucemias agudas bifenotípicas, y 3) la clasificación fenotípica de las LLA.<sup>8</sup> Además, la disponibilidad, en los últimos años, de un conocimiento mucho más detallado acerca de los patrones fenotípicos normales de diferentes líneas hematopoyéticas y sus compartimentos madurativos ha contribuido a la identificación de nuevos subtipos de leucemias agudas, como pueden ser aquellas en las que los blastos muestran características similares a las de los precursores de células dendríticas

plasmocitoides.<sup>9</sup> Por otro lado, es necesario considerar las asociaciones fenotipo-genotipo que ocurren tanto en las leucemias agudas como en los SLPC-B. Así, entre las LMA, los blastos leucémicos de los pacientes con leucemia promielocítica aguda (LPA) portadores de t(15;17) muestran compromiso madurativo a granulocito neutrófilo, con bloqueo en el estadio de promielocito. No obstante, a diferencia del promielocito normal/reactivo, carecen de expresión fuerte para CD15.<sup>10</sup> A su vez, en la LLA-B BCR/ABL+ del adulto, las células blásticas muestran un fenotipo correspondiente a un precursor B inmaduro (CD34++, CD19+débil, CD13-/+débil), asociado a expresión anormalmente débil y heterogénea de CD38.<sup>11</sup> En contraposición, los niños con LLA-B y reordenamientos de los genes TEL/AML1 y MLL, de forma característica presentan un fenotipo BII/común asociado a una expresión heterogénea de CD34 en ausencia de reactividad para CD20<sup>12</sup>, o un fenotipo pro-B/BI asociado a expresión de 7.1, CD15 y/o CD65<sup>13</sup>, respectivamente. En relación a los síndromes mielodisplásicos (SMD), durante años, la utilización de los estudios inmunofenotípicos para la caracterización de pacientes con SMD se ha visto limitada por el uso de marcajes simultáneos de dos o tres marcadores; sin embargo, estudios más recientes basados en marcajes multicolores y empleando las herramientas introducidas por el grupo EuroFlow sugieren que la CMF podría ser una herramienta útil para el screening rápido y complementario de displasia, así como para establecer el número de líneas hematopoyéticas displásicas.<sup>14</sup>

#### *Monitorización de enfermedad mínima residual (EMR)*

Aparte de la aplicación de los estudios inmunofenotípicos por CMF al diagnóstico y clasificación de las leucemias agudas, SLPC-B y SMD, la identificación de células fenotípicamente aberrantes ha demostrado ser de gran utilidad en la detección de EMR, tanto para el estadiaje de la enfermedad como para la monitorización de los efectos del tratamiento en pacientes con LMA, LLA, LLC y mieloma múltiple (MM). Así, la evaluación de la presencia de pequeñas cantidades de células neoplásicas en SP, MO o líquido cefalorraquídeo representa una de las aplicaciones más extendidas de la CMF para evaluar el grado de extensión de la enfermedad en SLPC-B y T y en pacientes con LLA, respectivamente. A su vez, la monitorización de los niveles de EMR después de instaurado el tratamiento ha demostrado ser uno de los factores pronósticos más relevantes a la hora de predecir la posible ocurrencia de una recaída, tanto en la LMA y LLA como en la LLC-B y el MM.<sup>15-18</sup> Finalmente, los estudios inmunofenotípicos por CMF pueden emplearse también para predecir la respuesta a tratamientos dirigidos frente a antígenos celulares concretos, identificar nuevas posibles dianas terapéuticas o evaluar el efecto *in vitro* de múltiples fármacos sobre células tumorales vs células normales.<sup>19</sup>

#### *Avances recientes en la caracterización fenotípica de hemopatías malignas por citometría de flujo*

En los últimos 5 años hemos asistido a un incremento en las herramientas disponibles para el análisis inmunofenotípico de hemopatías malignas por CMF. Así, en un número creciente de laboratorios de hematología, hoy disponemos de citómetros de flujo de 8 o más colores, junto a paneles amplios de AcMo conjugados con un número creciente de fluorocromos que, asociados a los avances informáticos, permiten el análisis simultáneo de un número infinito de marcadores en células individuales de una o más poblaciones celulares. Estos avances, junto a la disponibilidad de citómetros separadores de cuatro vías, más rápidos y eficaces, han facilitado también la posibilidad de purificar distintas poblaciones celulares de interés, presentes en una muestra; ello permite la posterior realización de estudios genéticos y moleculares sobre poblaciones puras de células neoplásicas. Esta posibilidad abre todo un campo de nuevas aplicaciones de la CMF en áreas tan diferentes como la caracterización de las alteraciones genéticas de células tumorales presentes en baja frecuencia en la muestra

(p. ej.: en el caso de las GM) <sup>20</sup>, la evaluación del grado de extensión de la enfermedad en mastocitosis sistémicas agresivas <sup>21</sup>, el diagnóstico de clonalidad en pacientes con sospecha de SMD (p. ej.: ICUS vs. SMD) <sup>22</sup> o la distinción entre LMA de novo y LMA secundaria o LMA asociada a displasia multilineal, entre otras aplicaciones.<sup>23</sup>

Particularmente atractivas son las innovaciones tecnológicas que el grupo europeo EuroFlow<sup>TM</sup> ha introducido recientemente en el diagnóstico de las hemopatías, por ejemplo la disección de las vías de diferenciación normal de células hematopoyéticas por citometría de flujo. Hasta hace relativamente poco tiempo este tipo de comparación estaba basado fundamentalmente en el conocimiento de un experto en citometría acerca de los perfiles de expresión proteica de las células normales/reactivas, su panel y combinaciones de marcadores favoritos. Tal aproximación introducía un importante componente de subjetividad y variabilidad en los resultados obtenidos. Recientemente, el Consorcio EuroFlow ha propuesto una nueva estrategia para la interpretación de los datos derivados de los estudios inmunofenotípicos de células hematopoyéticas por citometría de flujo.<sup>1,2</sup> Esta aproximación combina nuevas herramientas informáticas para el análisis simultáneo de un gran número de marcadores/parámetros fenotípicos, el empleo de paneles optimizados de reactivos y la construcción de bases de datos con casos de referencia de muestras (por ejemplo, de muestras de MO normal/reactiva) marcadas con el mismo panel de anticuerpos, preparadas y medidas de idéntica forma y bajo las mismas condiciones en instrumentos calibrados de forma estandarizada<sup>2,24</sup>. Mediante la comparación directa de las células presentes en una muestra con la información de la base de datos inmunofenotípica correspondiente puede definirse con gran precisión la línea, el estadio madurativo y el perfil fenotípico (por ejemplo, normal vs reactivo vs neoplásico) de las células presentes en esa muestra.<sup>3</sup>

#### *Nuevas aplicaciones de la citometría de flujo: inmunomonitorización*

Pese a que el deterioro inmunológico en diversas hemopatías es bastante conocido, empiezan a surgir datos que apuntan a la existencia de una firma inmunológica específica en pacientes capaces de alcanzar una supervivencia libre de progresión muy prolongada en el tiempo. Ante el interés creciente sobre estrategias inmunoterapéuticas así como la evidencia de que inexplicablemente algunos pacientes con respuestas de menor calidad no terminan recayendo y pueden incluso alcanzar una cura operacional, un mayor entendimiento y la monitorización del sistema inmune es hoy día un campo de investigación prioritario en hematología. Cabe la posibilidad que ocurra en estas enfermedades lo mismo que se ha descrito en múltiples tumores sólidos, y donde se demuestra que la clasificación inmunológica del paciente (immunoscore) tiene un valor pronóstico que a veces es incluso superior a los criterios convencionales de estratificación de riesgo. En este sentido, se deberán desarrollar nuevos métodos inmunofenotípicos de cara a definir inmunoscores (firma del sistema inmune) que identifiquen pacientes cuyo sistema inmune es capaz de controlar la progresión de la enfermedad en sus estadios benignos (medicina preventiva) o en contexto de EMR persistente tras tratamiento (medicina personalizada).

#### Referencias

1. 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. *Leukemia*. 2012;26:1908-75.
2. Pedreira CE, Costa ES, Lecrevisse Q, van Dongen JJM, Orfao A. On behalf of the EuroFlow Consortium: Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends Biotechnol*. 2013;31:415-25.

3. Costa ES, Arroyo ME, Pedreira CE, García-Marcos MA, Tabertero MD, Almeida J, et al. A new automated flow cytometry data analysis approach for the diagnostic screening of neoplastic B-cell disorders in peripheral blood samples with absolute lymphocytosis. *Leukemia* 2006; 20: 1221-30.
4. Sandberg Y, Almeida J, González M, Lima M, Bárcena P, Szczepanski T, et al. TCRgammadelta(+) large granular lymphocyte leukemias reflect the spectrum of normal antigenesected TCRgammadelta(+) T-cells. *Leukemia* 2006; 20: 505-13.
5. Barrena S, López A, García MC, Rivas R, Almeida J, Orfao A. Utility of flow cytometry for the screening of chronic lymphoproliferative disorders from lymphoid tissue samples obtained by fine-needle aspiration. XXII International congress of the international society for analytical cytology (ISAC). *Cytometry A* 2004; 59: 38.
6. Quijano S, López A, Manuel Sancho J, Panizo C, Debén G, Castilla C, et al. Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol.* 2009;27(9):1462-9.
7. Paiva B, Vidriales MB, Rosiñol L, Martínez-López J, Mateos MV, Ocio EM, et al. A multiparameter flow cytometry immunophenotypic algorithm for the identification of newly diagnosed symptomatic myeloma with an MGUS-like signature and long-term disease control. *Leukemia.* 2013;27(10):2056-61.
8. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9:1783-6.
9. Martín-Martín L, López A, Vidriales B, Caballero MD, Rodrigues AS, Ferreira SI, et al. Classification and clinical behavior of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms according to their maturation-associated immunophenotypic profile. *Oncotarget.* 2015;6(22):19204-16.
10. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, López A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry* 2004; 58: 62-71.
11. Tabertero MD, Bortoluci AM, Alaejos I, López-Berges MC, Rasillo A, García-Sanz R, et al. Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. *Leukemia* 2001; 15: 406-14.
12. De Zen L, Orfao A, Cazzaniga G, Masiero L, Cocito MG, Spinelli M, et al. Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: correlation with specific genotype. I. ETV6/AML1 ALLs identification. *Leukemia* 2000; 14: 1225-31.
13. De Zen L, Bicciato S, te Kronnie G, Basso G. Computational analysis of flow-cytometry antigen expression profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia: an MLL/AF4 identification. *Leukemia* 2003; 17: 1557-65.
14. Porwit A, van de Loosdrecht AA, Bettelheim P, Brodersen LE, Burbury K, Cremers E, et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia.* 2014;28(9):1793-8.

15. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VH, San Miguel JF, van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol* 2001; 2: 409-17.
16. Vidriales MB, Pérez-López E, Pegenaute C, Castellanos M, Pérez JJ, Chandía M, et al. Minimal residual disease evaluation by flow cytometry is a complementary tool to cytogenetics for treatment decisions in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res*. 2015 pii: S0145-2126(15)30394-5. doi: 10.1016/j.leukres.2015.10.002.
17. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, Villamor N, Letestu R, Nomdedeu J, et al. A complementary role of multiparameter flow-cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease (MRD) detection in chronic lymphocytic leukemia (CLL): An european research initiative on CLL (ERIC) study. *Leukemia*. 2015. doi: 10.1038/leu.2015.313.
18. Paiva B, van Dongen JJ, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3059-68.
19. Bennett TA, Montesinos P, Moscardo F, Martinez-Cuadron D, Martinez J, Sierra J, et al. Pharmacological profiles of acute myeloid leukemia treatments in patient samples by automated flow cytometry: a bridge to individualized medicine. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014;14(4):305-18.
20. Paiva B, Corchete LA, Vidriales MB, García-Sanz R, Perez JJ, Aires-Mejia I, et al. The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2015;125(15):2370-80.
21. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, Teodosio C, Sanchez-Muñoz L, Muñiz C, et al. KIT D816V mutated bone marrow mesenchymal stem cells in indolent systemic mastocytosis are associated with disease progression. *Blood*. 2015. pii: blood-2015-07-655100.
22. Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 2007; 31: 727-36.
23. Fernandez C, Santos-Silva MC, López A, Matarras S, Jara-Acevedo M, Ciudad J, et al. Newly diagnosed adult AML and MPAL patients frequently show clonal residual hematopoiesis. *Leukemia*. 2013 Nov;27(11):2149-56.
24. Kalina T, Flores-Montero J, van Der Velden VHJ, Martín-Ayuso M, Bottcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometry instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26:1986-2010.