

A importância da citometria de fluxo no diagnóstico raro de mieloma mielomonocítico

The importance of flow cytometry in the rare diagnosis of myelomonocytic myeloma

Nydia Strachman Bacal¹
João Carlos de Campos Guerra²
Eurípedes Ferreira³
Sonia Tsukasa Nozawa⁴
Ruth Hissae Kanayama⁵
Daniel Di Pietro⁶
Cleide Borovik⁷
Nelson Hamerschlag⁸
Vania Tietsche de Moraes Hungria⁹
Luiz Gastão Mange Rosenfeld¹⁰

Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 25-31, 2002

25

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

unitermos	resumo
Mieloma mielomonocítico	<p>O mieloma múltiplo consiste na proliferação de células plasmáticas. Raramente apresenta, ao diagnóstico, morfologia de células imaturas com citoplasma amplo basofílico, sugerindo quadro leucêmico inicial. O objetivo deste artigo é mostrar a importância da imunofenotipagem na elucidação destes achados morfológicos pela expressão simultânea de antígenos plasmocíticos, mielomonocíticos e de linhagem linfóide T, confirmando a hipótese diagnóstica de mieloma mielomonocítico. Apresentamos dois casos de mieloma mielomonocítico através de análise morfológica (coloração pancromática de Romanovsky), citoquímica (PAS, peroxidase, sudan black, alfa-naftil acetato esterase e oil red), citogenética e imunofenotipagem por citometria de fluxo em sangue periférico e medula óssea, de acordo com as técnicas recomendadas. Foram utilizados os anticorpos monoclonais: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD10, CD13, CD15, CD19, CD20, CD25, CD33, CD34, CD38, CD45, CD56, CD71, HLA-DR, TCR alfa/beta, TCR gama/delta, kappa, lambda, IgM e IgD de superfície e intracitoplasmática, assim como MPO, CD79a e CD3 intracitoplasmático. Utilizamos as técnicas de banda G e FISH nas análises citogenéticas. Foram observadas alterações clonais em ambos os casos, sendo uma com trissomia do cromossomo 8 e outro caso com deleção do braço longo do cromossomo 7 e do braço curto do cromossomo 6. Os percentuais de positividade encontrados nos anticorpos monoclonais CD4, CD7, CD10, CD13, CD14, CD15, CD33, CD38 e CD56 de forte expressão, HLA-DR, TCR gama/delta, MPO e IgM intracitoplasmático no histograma de volume x complexidade e no histograma de CD45 x complexidade permitiram concluir este diagnóstico em ambos os casos, demonstrando a importância do método.</p>
Análise morfológica	
Citometria de fluxo	
Citogenética	

abstract

key words

Multiple myeloma is a malignant disease caused by unregulated proliferation of mature plasma cells. Very few cases present as blast cells in the bone marrow with intense basophilic cytoplasm and monocytoid morphology, suggesting acute leukemia. This paper presents immunophenotyping in 2 cases with the diagnostic hypotheses of myelomonocytic myeloma, showing the simultaneous expression of plasmocytic, myelomonocytic and T cell antigens. Immunophenotyping was done in peripheral blood and bone marrow with classical techniques, using the following monoclonal antibodies: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD25, CD33, CD34, CD38, CD41, CD45, CD56, CD71, HLA-DR, TCR alpha/beta, DCR gama/delta, kappa, lambda, surface IGM and IGG, intracitoplasmic kappa, lambda, IGM and IGD, MPO, CD79a and intracitoplasmic CD3. Morphology was evaluated with pan-chromatic Romanovsky stain and cytochemical stains – PAS, peroxidase, Sudan Black B, alpha-naphthil acetate esterase and Oil Red O. Cytogenetic analysis was done with banding techniques and FISH. Clonal cytogenetic alterations were present in both cases, one with chromosome 8 trysomy and the other with long arm deletion of chromosome 7 and short arm deletion of chromosome 6. The percentage positivity of specific markers were clean cut making the diagnosis clear.

Multiple myeloma

Morphologic analysis

Cytogenetic analysis

Flow cytometry

1. Médica hematologista e patologista clínica; responsável pelo Setor de Citometria de Fluxo do Hospital Albert Einstein (HIAE).
 2. Médico patologista clínico e hematologista do HIAE.
 3. Professor doutor em Imunologia da Unifesp; médico patologista clínico e hematologista do HIAE.
 4. Biomédica do Laboratório Clínico do HIAE.
 5. Farmacêutica do Laboratório de Técnicas do HIAE.
 6. Bioquímico do Laboratório Clínico do HIAE.
 7. Doutora em Genética Humana pelo Instituto de Biociências da USP; bióloga e responsável pelo Laboratório de Técnicas Especiais do HIAE.
 8. Doutor em Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da USP; médico hemoterapeuta do HIAE.
 9. Professora assistente da disciplina de Hematologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.
 10. Médico hematologista e patologista clínico; responsável pelo Laboratório Clínico do HIAE.
- Este trabalho foi realizado no Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein – Setor de Hematologia e Citometria de Fluxo – e apresentado no 34º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial – Florianópolis, 1 a 5 de setembro de 2000.

Introdução

Vários artigos na literatura médica têm relatado o aparecimento de leucemias agudas após a utilização de quimioterapias prévias, principalmente com agentes alquilantes (1, 5). Discute-se o efeito leucemogênico destas drogas, ou se estas leucemias são secundárias ao longo período de imunossupressão, o que leva ao desenvolvimento de um clone maligno. Raros casos com o aparecimento simultâneo de duas doenças malignas, sem quimioterapia prévia, têm sido relatados, inclusive a associação do mieloma múltiplo com a leucemia mielomonocítica aguda (3, 14, 15).

Na ontogênese da linhagem B, as células maduras mais diferenciadas são os plasmócitos, que imunofenotipicamente caracterizam-se na medula óssea pela forte expressão antigênica do CD56, com fraca expressão do CD19, e pela constante perda de antígenos específicos B (CD20, CD22, CD23 e CD10) e da expressão de imunoglobulinas na superfície celular.

Nos plasmócitos do mieloma múltiplo podemos observar a forte expressão na superfície celular do CD56 concomitante ao CD38. Estas células encontram-se na região de grande volume e alta complexidade, sendo frequentemente CD19 negativas (13).

Não está totalmente confirmada a associação de um pior prognóstico nas células mielomatosas que frequentemente expressam o marcador de linhagem B precoce, CD10 positivo (17, 10).

A co-expressão de células plasmáticas e antígenos mielomonocíticos (CD4, CD13, CD14, CD15, CD33 e MPOc) com alfa-naftil acetato esterase positiva é rara, caracterizando esta linhagem celular. O mecanismo potencialmente responsável por esta co-expressão aberrante é controverso, como discutiremos abaixo (6).

Objetivos

Apresentar o raro diagnóstico da associação do mieloma múltiplo com a leucemia mielomonocítica aguda e demonstrar a importância da imunofenotipagem por citometria de fluxo na confirmação deste diagnóstico.

Casuística

Caso 1

Paciente de 52 anos, sexo masculino, internou-se no Hospital Albert Einstein (HIAE) com hematoma subdural

espontâneo. Os exames laboratoriais alterados no diagnóstico foram: Hb – 10,3g/dl; plaquetas – 128.000/mm³; glóbulos brancos – 13.500/mm³ com discreto desvio à esquerda. A única alteração bioquímica encontrada no diagnóstico foi DHL aumentado. O coagulograma mostrava leve diminuição do fibrinogênio (190mg/dl), com produtos de degradação de fibrina (PDF) e fração D e E aumentados (40mcg/ml) e o teste do dímero D 1,0mcg/ml. Foi submetido a cirurgia de drenagem do hematoma, sendo que após a cirurgia iniciou-se uma coagulopatia de consumo, com plaquetopenia progressiva. O mielograma mostrou substituição do tecido hematopoético normal por 90% de células blásticas. A citoquímica, a imunofenotipagem e o cariótipo firmaram o diagnóstico de mieloma mielomonocítico. O paciente foi tratado com três ciclos de idarrubicina, aracytin e etoposida (ICE), mais altas doses de dexametasona, apresentando-se em remissão completa após o primeiro ciclo de ICE e corticóide. Foi proposta a realização do transplante de medula óssea autólogo, mas na época da mobilização das células progenitoras do sangue periférico (CPSP) ocorreu recidiva da doença. Foi submetido ao transplante de medula óssea alogênico, tendo falecido por doença venoclusiva hepática seis meses após o diagnóstico inicial.

Caso 2

Paciente de 66 anos, sexo feminino, com diagnóstico inicial clínico laboratorial de mieloma múltiplo, estágio IIIA (7), IgG kappa, Bence Jones positivo. Realizou três ciclos de vincristina, adriamicina e dexametasona (VAD). Foi submetida a condicionamento com Alkeran em altas doses e a transplante de medula óssea autólogo. Após quatro meses do transplante, apresentou quadro de pancitopenia com: Hb – 9,6g/dl; plaquetas – 18.000/mm³; glóbulos brancos – 4.200/mm³ com 34% de blastos. Faleceu, por seps, dois meses após o transplante.

Material e método

Nos dois casos, o material de análise foi aspirado de medula óssea obtido conforme técnicas recomendadas. Foram realizadas análises morfológicas em lâminas coradas pelo método pancromático de Romanovsky.

As citoquímicas realizadas foram peroxidase (método de Washburn), *sudan black* (método de Sheehan e Storey), PAS (método de Tomasi), *oil red* (método de Lillie) e alfa-naftil acetato esterase (método de Yam et al.).

A citometria de fluxo foi realizada utilizando-se o equipamento da Coulter-Epics XL-MCL. As amostras foram preparadas através de separação das células em Ficoll-hypaque e marcação com os anticorpos monoclonais pelo método de imunofluorescência direta. Os anticorpos monoclonais utilizados na diferenciação das linhagens hematopoiéticas foram: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14 (My4), CD15, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD34, CD38, CD41, CD45, CD56, CD71, HLA-DR, glicoforina A, TCR alfa/beta e TCR gama/delta, kappa, lambda, IgM e IgD de superfície e intracitoplasmática, CD3, MPO e CD79a intracitoplasmático. Foram consideradas positivas as expressões antigênicas acima de 20% e valorizadas as regiões das células no histograma volume x complexidade e no histograma CD45 x complexidade.

As análises cromossômicas foram realizadas em culturas de 24 horas com bandeamento G. A descrição das anomalias cromossômicas seguiu as recomendações do Internacional System of Human Cytogenetic Nomenclature. A técnica de FISH foi empregada em células interfásicas da medula óssea, com o objetivo de confirmação da trissomia do cromossomo 8, encontrada pela técnica de citogenética tradicional.

Resultado

O caso 1 de mieloma mielomonocítico foi diagnosticado pela análise morfológica do aspirado de medula óssea, onde foram encontrados 90% de células volumosas, pleomórficas, com citoplasma basofílico intenso, sem grânulos, núcleo com cromatina pouco densa e um ou mais nucléolos evidentes. Não foram encontrados bastonetes de Auer (**Figuras 1a e 1b**).

A peroxidase, o *sudan black*, o PAS e o *oil red* (**Figura 2**) foram negativos nas células blásticas, sendo que a alfa-naftil acetato esterase apresentou-se positiva nestas células (**Figura 3**).

Os resultados obtidos na imunofenotipagem encontram-se na **Tabela** e na demonstração do histograma (**Figura 8**).

O cariótipo com banda G detectou clone com trissomia do cromossomo 8 em 30% das células, sendo este achado confirmado pela técnica de FISH (**Figuras 4 e 7**).

O caso 2 de mieloma múltiplo concomitante a leucemia mielomonocítica foi diagnosticado quatro meses após a realização do transplante de medula óssea

autólogo, pela análise morfológica do mielograma, a qual mostrou 27,1% de células blásticas volumosas, pleomórficas, com citoplasma basofílico intenso, sem grânulos, núcleo com cromatina pouco densa e um ou mais nucléolos evidentes, ausência de bastonetes de Auer (**Figura 5**) e a presença de ninhos de plasmócitos maduros (**Figura 6**).

Os resultados obtidos na imunofenotipagem encontram-se na Tabela.

O cariótipo com banda G detectou um clone com deficiência do braço longo do cromossomo 7 e deleção do braço curto do cromossomo 6 em 100% das células analisadas.

Nos dois casos ocorreu uma curta sobrevida, como descrito em literatura, de seis e dois meses, respectivamente.

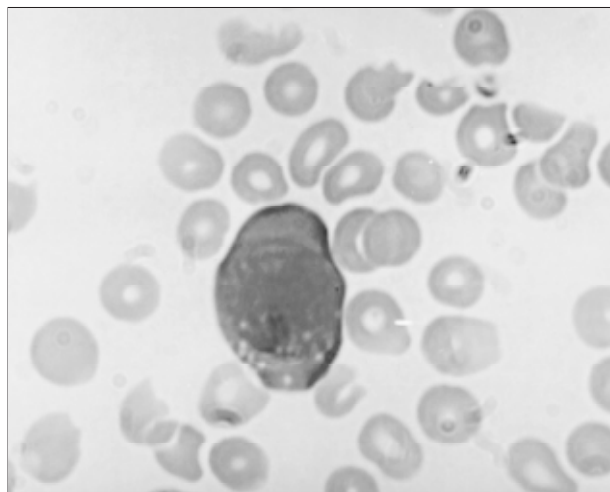


Figura 1a – Morfologia: caso 1

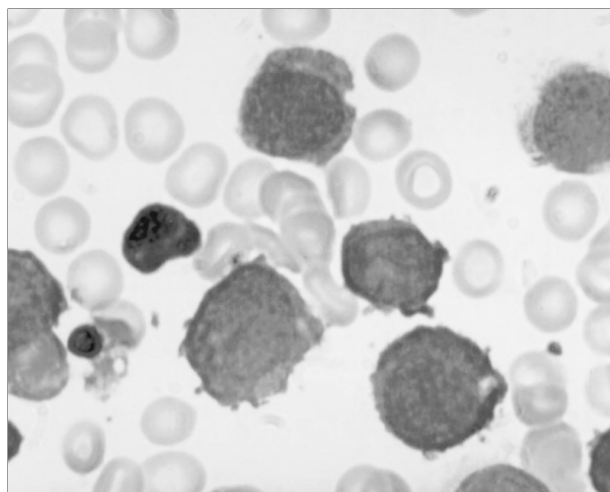


Figura 1b – Morfologia: caso 1

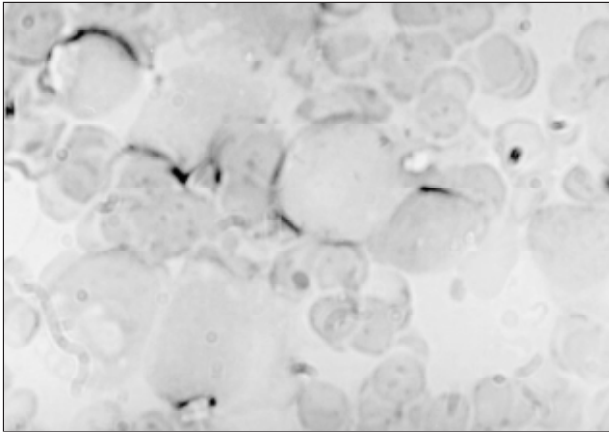


Figura 2 – Oil red: caso 1

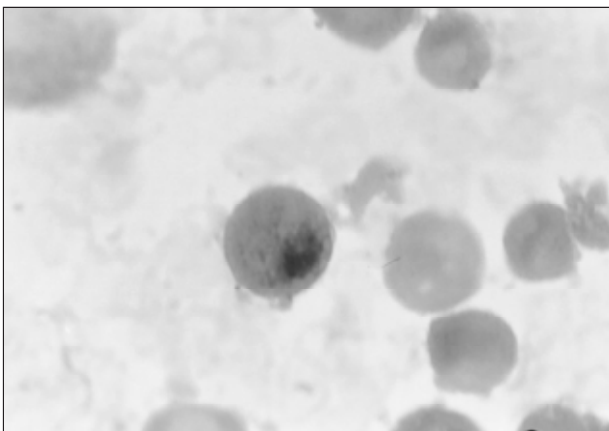
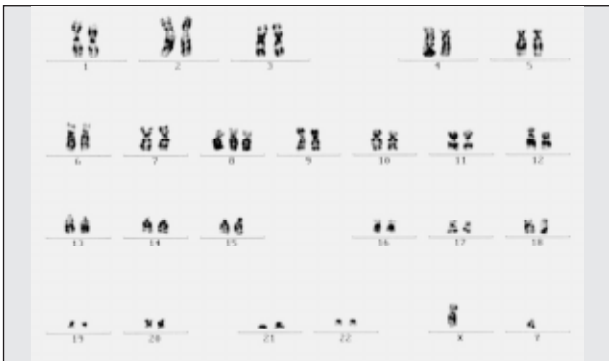
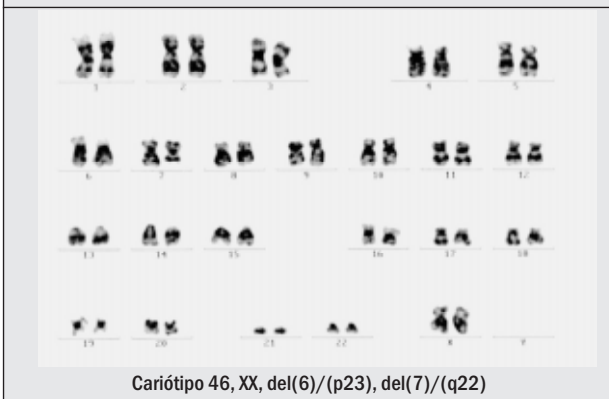


Figura 3 – Alfanafitil acetato esterase: caso 1



Cariótipo 46, XY/47, XY, +8



Cariótipo 46, XX, del(6)/(p23), del(7)/(q22)

Figura 4 – Cariótipo com banda G: casos 1 e 2



Figura 5 – Morfologia: caso 2

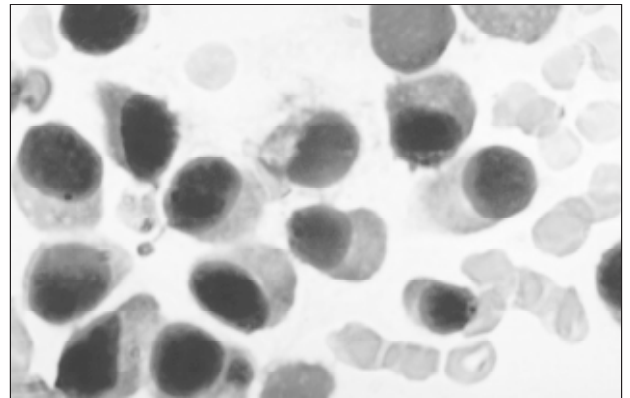


Figura 6 – Morfologia: caso 2



Figura 7 – FISH: caso 1

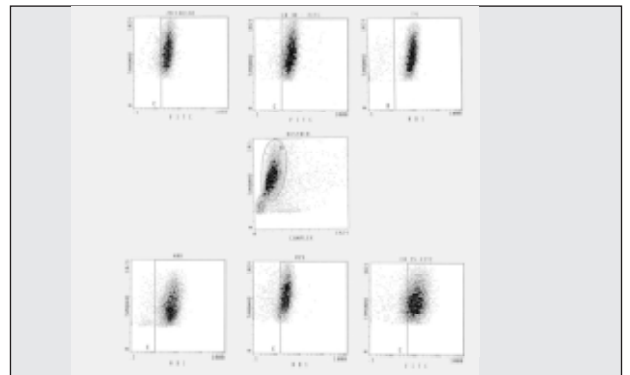


Figura 8 – Histogramas: caso 1

Tabela**Percentual e média da intensidade da expressão antigênica (número de canal em escala logarítmica: MnX) dos diferentes anticorpos monoclonais nos casos 1 e 2**

Ac. monoc.	Caso 1		Caso 2	
	%	MnX	%	MnX
CD2	22	1,62	15,1	7,83
CD3	24	1,57	10,1	6,51
CD4	94,8	6,77	31,4	3,43
CD5	32,8	4,24	9,1	4,03
CD7	50,3	1,82	6,8	5,34
CD8	7,5	1,75	9,2	13,7
CD10	89,7	2,82	37,2	5,49
CD13	19,6	17,1	89,7	7,78
CD14 (My4)	5	3,63	24,3	7,85
CD15	83,5	10,6	9	4,34
CD19	27,9	2,03	0,9	6,8
CD20	-	-	11,7	5,84
CD25	68,5	3,88	-	-
CD33	80,4	2,63	49,7	9,91
CD34	0,2	4,21	3,6	9,59
CD38	94,2	3,53	83,1	9,86
CD41	12	3,34	1,2	1,75
CD45	93,7	13,1	93,4	5,26
CD56	95,2	5	27,1	2,54
CD71	19,1	4,02	13	1,72
HLA-DR	82,2	6,47	88,8	34,2
Kappa superf.	67,1	1,73	9,8	2,89
Lambda superf.	69,9	1,69	5,9	2,95
IgM superf.	10,6	1,7	7,5	4,88
IgD superf.	1,2	1,33	1,7	2,18
Glicoforina A	1,1	23,2	1,6	14,9
CD3 intrac.	2,1	2,36	0,2	150,3
MPO intrac.	65,2	4,83	40	4,65
CD79a intrac.	0,2	4,03	12,7	2,96
Kappa intrac.	74,2	2,44	-	-
Lambda intrac.	62,6	2,13	-	-
IgM intrac.	51,8	2,64	-	-
IgD intrac.	0,7	1,79	-	-
TCR alfa/beta	1,5	3,43	-	-
TCR gama/delta	32,6	1,26	-	-

Discussão

A associação do mieloma múltiplo com a leucemia mielomonocítica aguda, ao diagnóstico inicial, é entidade rara, como foi levantado na literatura. A associação destas patologias logo após o transplante de medula óssea autólogo, como ocorrido no caso 2, é ainda menos frequentemente descrita.

Raz *et al.* (16) apresentam várias hipóteses para explicar essa associação:

- 1) coexistência de duas doenças sem qualquer relação entre elas;
- 2) desenvolvimento de uma segunda neoplasia, que pode ocorrer na vigência de uma doença, como o mieloma múltiplo, por estimulação crônica da medula óssea, ou, contrariamente, levar a uma depressão dos mecanismos de defesa imunológicos do hospedeiro;
- 3) uma estimulação antigênica crônica por células leucêmicas, que pode levar a uma proliferação linfoplasmocitária, com conseqüente gamopatia monoclonal;
- 4) a possibilidade de uma célula precursora única entre as linhagens granulocítica e plasmocitária.

Experimentos com injeção de óleo mineral intraperitoneal em babuíños e camundongos resultou no desenvolvimento simultâneo de plasmocitoma e leucemia mielomonocítica (19), indicando a quarta hipótese como a mais provável.

O estudo com culturas de colônias celulares provenientes da medula óssea em casos da ocorrência simultânea de leucemia mielomonocítica e mieloma múltiplo (IgG-kappa) sugere um progenitor leucêmico comum para ambas as células mielomonocíticas e mielomatosas e um mecanismo de *infidelidade de linhagem* que está provavelmente envolvido no desenvolvimento da diferenciação *bilinear* (2).

A identificação imunofenotípica de múltiplas linhagens nas células mielomatosas nos faz concluir que a origem mais provável desta patologia seja uma célula progenitora pluripotente (8, 18). A marcação fenotípica das células mielomatosas na medula óssea revela a expressão de antígenos mielóides/monocíticos (CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33), antígenos linfóides de linhagens T e B (CD2, CD4, CD5, CD7, CD10, PCA-1), antígenos associados aos linfócitos *natural killer* (CD56), antígenos associados a células precursoras (HLA-DR) e antígenos associados a proliferação (CD25, CD38) (11, 12).

Um dos primeiros trabalhos da imunofenotipagem das células mielomatosas foi o estudo de 27 pacientes com mieloma múltiplo anaplásico. A análise fenotípica das células na medula óssea evidenciou a expressão do antígeno Calla (CD10), o que levantou a possibilidade do envolvimento de células B precoces (9).

Posteriormente, outro estudo sugeriu a existência de um clone de células pré-mielomatosas (CD19 e CD11b positivas) circulantes no sangue periférico e discutiu que as células mielomatosas originadas na medula óssea migrariam para locais extramedulares, como linfonodos, e, através de moléculas de adesão, ocorreria o estímulo para a expansão e maturação deste clone celular. Neste estudo também discutiram-se as funções do fator de crescimento, de diferenciação das células pré-mielomatosas e do progenitor hematopoietico mais precoce pela citocina IL-6 (8).

A sintomatologia do mieloma múltiplo está relacionada à infiltração tumoral da medula óssea e à ação das citocinas (IL-3, IL-6 e IL-12), sendo resultante de uma complexa rede de interação entre as células plasmáticas, células do estroma medular e outras células hematopoieticas.

Nos dois casos apresentados, ficou evidente o envolvimento concomitante das linhagens plasmocítica e mielomonocítica anômalas.

No caso 1, a detecção de uma população homogênea de células com as marcações antigênicas de múltiplas linhagens – ou seja, linhagem T: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, TCR gama/delta; linhagem B: CD10, CD19, IgM intracelular; linhagem mielomonocítica: CD15, CD33, MPO intracitoplasmática; linhagem plasmocitária: CD56, CD38 e outros antígenos associados à proliferação, como HLA-DR e CD25 – evidencia a possível origem, neste caso, do mieloma mielomonocítico a partir de uma célula precursora única, como na quarta hipótese levantada por Raz *et al.*

No caso 2 encontramos dois tipos de população, sendo uma semelhante à população descrita no caso 1, e a outra representada por ninhos de plasmócitos maduros, possivelmente remanescentes da patologia de base. Este achado nos fez levantar a hipótese de que, após o transplante de medula óssea autólogo, com todas as suas implicações imunológicas, tenha ocorrido uma *estimulação* da linhagem de células plasmocitárias-mielomonocíticas. Esta explicação nos parece mais próxima à segunda hipótese abordada por Raz *et al.*

Conclusão

O exame de imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma técnica complementar à análise morfológica e

citoquímica que possibilita a realização do raro diagnóstico de mieloma mielomonocítico. A investigação de doença residual mínima pela presença das aberrações fenotípicas e citogenéticas é possível por estas metodologias.

Referências

1. Advani, S.H. et al. Therapy-related leukemia: a report of five patients and a review of literature. *Oncology*, 40(4): 268-72, 1983.
2. Akashi, K. et al. Simultaneous occurrence of myelomonocytic leukemia and multiple myeloma: involvement of common leukemic progenitors and their developmental abnormality of "lineage infidelity". *J. Cell. Physiol.*, 148(3): 446-56, 1991.
3. Annino, L. et al. Multiple myeloma and acute myelomonocytic leukemia: simultaneous occurrence without previous chemotherapy. *Acta. Haemat.*, 64: 195-200, 1980.
4. Cleary, B. et al. Simultaneous presentation of acute myelomonocytic leukemia and multiple myeloma. *Cancer*, 41: 1381-6, 1978.
5. Cyzich, J. et al. A comparison of incidence of the myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia following melphalan and cyclophosphamide treatment for myelomatosis. *Br. J. Cancer*, 55: 523, 1987.
6. Durie, B.G.M. et al. Myelomonocytic myeloma cell line. *Blood*, 15(73): 770-6, 1989.
7. Durie, B.G.M. et al. A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer*, 36: 842, 1975.
8. Epstein J. Myeloma phenotype: clues to disease origin and manifestation. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 6(2): 249-56, 1992.
9. Epstein, J. et al. Markers of multiple hematopoietic-cell lineages in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.*, 8: 322(10): 664-8, 1990.
10. Grogan, T.M. et al. Myelomonocytic antigen positive multiple myeloma. *Blood*, 15: 73(3): 763-9, 1989.
11. Orfao, A. et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann. Hematol.*, 70(4): 189-94, 1995.
12. Moscinski, L.C. et al. Recent progress in multiple myeloma. *Hematol. Oncol.*, 12(3): 11-23, 1994.
13. Orfao, A. et al. Immunophenotypic characterization of plasmatic cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients: implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am. J. Pathol.*, 152(6): 1655-65, 1998.
14. Parapia, L. et al. Simultaneous presentation of acute myelomonocytic leukemia and multiple myeloma. *Acta Haemat.*, 68: 153-6, 1982.
15. Pasqualetti, P. et al. Prognostic value of the plasma cell synthesis score in multiple myeloma. *Acta Haematol.*, 87(1-2): 58-62, 1992.
16. Raz, I. et al. Coexistence of myelomonocytic leukemia and monoclonal gammopathy or myeloma. *Cancer*, 53: 83-5, 1984.
17. Ruiz-Arguelles, G.J. et al. Cell surface markers in multiple myeloma. *Mayo Clin. Proc.*, 69(7): 684-90, 1994.
18. Stewart, A.K. et al. Acute leukemia evolving from multiple myeloma and co-expressing myeloid and plasma cell antigens. *Am. J. Hematol.*, 34(3): 210-4, 1990.
19. Warner, N.L. et al. A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB/C mice: cytology, karyotype, and muramidase content. *J. Nat. Cancer Inst.*, 43: 963-82, 1969.

Endereço para correspondência

Nydia Strachman Bacal
Hospital Albert Einstein
Laboratório de Patologia Clínica
Setor de Citometria de Fluxo
Av. Albert Einstein 627 – 4º andar
Morumbi
CEP 05652-000 – São Paulo-SP
e-mail: nsbacal@einstein.br