

# **Citometría de flujo para diagnosticar gammopatías monoclonales en Hospital de Clínicas en período 2014-2017.**

Integrantes del equipo:

Patricia Gómez

Juliana Laporte

Verónica Gasco

Carolina Fernández

Jordan Bambini

Docentes orientadoras:

Prof. Agda. Dra. Daniela Lens

Asist. Dra. Matilde Boada

Universidad de la República - Facultad de Medicina  
Hospital de Clínicas - Departamento Básico de Medicina

**Ciclo de Metodología Científica II - 2017**

**Grupo N° 30**



## Índice de contenido

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN .....	4
OBJETIVOS .....	9
METODOLOGÍA .....	10
NORMAS ÉTICAS.....	12
RESULTADOS.....	13
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	17
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	18
AGRADECIMIENTOS .....	19



## **RESUMEN**

Las Gammopatías Monoclonales (GM) son un grupo de patologías que incluyen entidades clínicamente evidentes como el Mieloma Múltiple (MM) y entidades quiescentes como las Gammopatías de Significado Incierto (GMSI) y Mieloma Asintomático (MA).

La Citometría de Flujo (CF) es uno de los métodos utilizados para establecer diagnóstico de GM principalmente a través de la determinación de la clonalidad de las células plasmáticas. Adicionalmente, la relación células plasmáticas normales/células plasmáticas totales (CPN/CPT) se ha asociado al diagnóstico diferencial entre MM, MA y GMSI. Además, se han asociado diferentes marcadores inmunofenotípicos con pronóstico en el MM.

Esta investigación tiene como objetivo determinar la utilidad diagnóstica de la relación células plasmáticas normales/células plasmáticas totales en pacientes diagnosticados en el Hospital Universitario.

Es un estudio observacional, retrospectivo, analítico, dónde se analizaron datos de pacientes del Hospital de Clínicas que cuenten con CF con planteo diagnóstico de GM entre los años 2014 y 2017 y presenten historia clínica completa. Incluye 46 pacientes, 22 (48%) con diagnóstico de MM, 3 (6%) de MA, y 21 (46%) de GMSI.

Se evaluó un cut off de 5% en el ratio CPN/CPT como herramienta diagnóstica para diferenciar entre MM y GMSI. Se obtuvo una sensibilidad (S) de 100% y una especificidad (E) de 90%. El valor predictivo positivo (VPP) fue de 95,45% y el valor predictivo negativo (VPN) de 100%. Además, se estudió la relación de los marcadores inmunofenotípicos CD81, CD56, CD117 con el score pronóstico internacional revisado (RISS), evidenciándose una asociación estadísticamente significativa entre este último y la expresión de CD56 ( $p < 0,011$ ).

Se demostró que en el Hospital de Clínicas el cut off de 5% para células plasmáticas normales es excelente para diferenciar GMSI de MM, validando esta herramienta en el diagnóstico de las GM.

**PALABRAS CLAVE:** Mieloma múltiple, Gammopatía monoclonal de significado incierto, Mieloma asintomático, citometría de flujo, células plasmáticas.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Gammapatías Monoclonales**

Las gammapatías monoclonales (GM) son un grupo de patologías que se caracterizan por presentar una proliferación descontrolada de células plasmáticas que producen una proteína homogénea de carácter monoclonal.(1)

Si bien su etiología no es muy conocida, se pueden identificar algunos factores de riesgo como la exposición a radiaciones ionizantes, tratamiento con inmunodepresores, la edad y antecedentes familiares.

En las GM encontramos la presencia de una infiltración plasmocitaria en médula ósea, de porcentaje variable según el tipo de gammapatía. Además, en la mayoría de los casos existe producción de una inmunoglobulina monoclonal, que puede ser una Inmunoglobulina completa o fragmentos de ella como las cadenas livianas. La más frecuente es la IgG. Existe además un porcentaje de gammapatías no secretoras.(2)

Se pueden clasificar en Mieloma Múltiple (MM), Mieloma Asintomático (MA) y Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto (GMSI).

El MA como la GMSI se consideraron clásicamente estados premalignos ya que la presencia de ellos aumenta significativamente las posibilidades de desarrollar MM en el futuro. El mayor conocimiento de las bases patogénicas ha permitido establecer la existencia de un continuo desde las GMSI al MM pasando por MA, dirigido por la acumulación de sucesivas alteraciones genéticas y epigenéticas.(2)

Se considera que entre 1-2% de los pacientes con GMSI anualmente desarrollarán MM. El porcentaje de progresión del MA a MM en dos años es aproximadamente del 65%, donde factores como las alteraciones citogenéticas, y los altos niveles de células plasmáticas en circulación aumentan las posibilidades a un 80% de avanzar a MM en dos años.

El diagnóstico de MM de acuerdo a los criterios del Grupo Internacional de Mieloma se basa en los siguientes pilares:(3)

Diagnóstico de infiltración de MO  $\geq 10\%$  de plasmocitos clonales o presencia de un plasmocitoma (el cual se trata de una proliferación única de células plasmáticas cuya localización más frecuente es la columna vertebral) más al menos uno de los siguientes:

- Evidencia de daño orgánico (CRAB):
  - Hipercalcemia: calcio sérico  $>2.75$  mmol/L ( $>11$ mg/dL).
  - Insuficiencia renal: clearance de creatinina  $<40$  mL por minuto o creatinina sérica  $>177$   $\mu$ mol/L ( $>2$ mg/dL).
  - Anemia: hemoglobina  $<10$  g/dL.
  - Lesión ósea: una o más lesiones osteolíticas en radiografía, tomografía computarizada (TC) o PET-TC.
- O en ausencia de CRAB, uno o más de los siguientes eventos definidores de mieloma:
  - Células plasmáticas en médula ósea clonales  $\geq 60\%$
  - Relación de cadena ligera libre de suero de 100 o mayor

- o Más de una lesión focal en la Resonancia Magnética Nuclear

El diagnóstico de MA se basa en los siguientes criterios:

- Proteína sérica monoclonal (IgG o IgA) mayor o igual a 30 g/L o proteína monoclonal urinaria mayor o igual a 500 mg/24hrs o células plasmáticas clonales en médula ósea entre 10-60%.
- Ausencia de criterios que diagnostican Mieloma Múltiple o Amiloidosis.

Se deben cumplir ambos.

El diagnóstico de GMSI se basa en los siguientes criterios:

- Proteína sérica monoclonal menor a 3g/dL (IgG o IgA) y células plasmáticas clonales en médula ósea menores a 10 %.
- Ausencia de criterios diagnósticos de MM o Amiloidosis.

Ambos criterios deben estar presentes.(3)

La incorporación de pacientes sin evidencia de CRAB que presenten uno o más eventos definidores de Mieloma al diagnóstico de MM sintomático se realizó en la última revisión de los Criterios diagnósticos del International Myeloma Working Group (IMWG) en 2014. Esto responde a que se evidenció que algunas condiciones presentes en pacientes asintomáticos se asociaban a un riesgo de progresión a MM mayor a 80% en 2 años.(3)

Se ha demostrado que los pacientes con una afectación de las células plasmáticas del 60% o mayor en el examen de la médula ósea deben ser considerados como diagnosticados con mieloma múltiple, y por lo tanto requieren terapia independientemente de la presencia o ausencia de características de CRAB. El ensayo de cadena ligera libre (FLC) identifica y mide las cadenas de inmunoglobulinas  $\kappa$  y  $\lambda$  que circulan sin unirse a cadenas pesadas en el suero. La relación normal para FLC-K /  $\lambda$  es 0.26-1.65. En los trastornos de las células plasmáticas clonales, el exceso de producción de un tipo FLC (el componente clonal denominado cadena ligera) a menudo resulta en una relación FLC anormal. Aproximadamente un tercio de los pacientes con GMSI, el 70% de los pacientes con MA, y más del 90% de los pacientes con MM tienen relaciones de FLC alteradas que indican producción en exceso de un FLC clonal por la proliferación de la población de células plasmáticas. La presencia de una relación FLC anormal y la medida en que la relación FLC es anormal predice el riesgo de progresión de GMSI, MA, amiloidosis y plasmocitoma solitario.(3)

En pacientes con MA, una relación de FLC de 8 o más está asociada con un riesgo de progresión a mieloma múltiple sintomático de aproximadamente un 40% en los primeros 2 años desde el diagnóstico.

Para la clasificación de las neoplasias hematológicas según la OMS, se necesita la siguiente información:

- Información clínica
- Morfología
- Inmunofenotipo

Inmunohistoquímica

Citometría de flujo

- Citogenética y/o estudios moleculares

### **Citometría de flujo**

La citometría de flujo (CF) es un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión”.

El estudio consiste en hacer pasar una suspensión de partículas alineadas y de una en una, por delante de uno o varios haces de luz focalizada (láser).(4) La interacción haz luminoso-célula genera señales provenientes de la dispersión de la luz, propiedades intrínsecas de las células (tamaño y complejidad interna) y señales fluorescentes provenientes de moléculas dirigidas a dianas de interés. Los citómetros constan de cuatro sistemas: el sistema óptico, formado por un conjunto de espejos que filtran la luz de una específica longitud de onda; el sistema electrónico, que comprende la o las fuente de luz que contiene cada equipo y los detectores capaces de detectar la luz que los lleva y transformarla en señal electrónica y finalmente en digital; el sistema de fluido, cuya función es alinear las células en un sistema de flujo continuo de manera que se dispongan en filas para permitir el análisis de cada célula individualmente en un corto lapso de tiempo; y por último, un sistema informático para permitir procesar toda la información recibida.

La primera información que podemos analizar son las características físicas de las células, gracias a los detectores de dispersión de la luz frontal; de tal manera que cuanto menor es el tamaño de la célula, menor es la dispersión frontal, y viceversa. Los elementos intracelulares también modifican la dispersión de la luz, desviando su trayecto de forma lateral; el porcentaje de modificación del trayecto de la luz es dada por la complejidad citoplasmática, o sea, cuanto mayor sea su complejidad plasmática (por ejemplo, el número de gránulos), mayor será la dispersión. Los citómetros también permiten diferenciar células por su espectro lumínico, mediante el uso de fluorocromos que son estimulados por una longitud de onda específica, posibilitando ver cambios en la intensidad de luz emitida, cualidades que recibe el nombre de fluorescencia. Una característica interesante que tienen los fluorocromos es que se pueden unir a anticuerpos monoclonales, que a su vez se unen de manera específica a antígenos que se localizan en la superficie de la célula o en su interior; esto posibilita que en el momento en que los fluorocromos sean estimulados se confirme la presencia de un antígeno específico en una determinada célula. Además, la fluorescencia también nos permite conocer la densidad del mismo, de manera que las células que brillen más, tienen mayor densidad de un determinado antígeno, y las células que brillan menos tienen menor densidad.

Todos estos datos pueden ser representados de forma monoparamétrica, biparamétrica, o triparamétrica. La representación monoparamétrica o histograma, consiste en la representación gráfica donde el eje de las abscisas representa la intensidad de la fluorescencia, y el eje de las ordenadas el número de células o eventos que emiten esa intensidad. En representación biparamétrica graficamos simultáneamente dos parámetros y donde cada eje de la gráfica representa un parámetro. Esto lo podemos realizar como diagrama de puntos o dot plot donde cada punto representa una célula y a medida que se van acumulando puntos aparece dibujada la población. De esta manera se permite identificar células que poseen ambos parámetros, células que son positivas para un único parámetro y las células que no poseen ninguno de los dos parámetros.

Con esa técnica podemos identificar diferentes antígenos en diferentes células mediante el uso de anticuerpos en general conjugados con diferentes fluorocromos, los cuales están dirigidos contra estos antígenos. De esta manera podemos caracterizar el inmunofenotipo de las diferentes poblaciones celulares de interés.

Actualmente la CF forma parte de los estudios básicos a realizar en un paciente con sospechas de GM constituyendo un método importante en la identificación, caracterización y monitorización de las neoplasias plasmocitarias. Su principal rol radica en identificar la población plasmocitaria, establecer la clonalidad y caracterizarla del punto de vista de su inmunofenotipo (IF). (4) Un IF aberrante se define por la ausencia de expresión de CD19 y/o CD45, expresión disminuida de CD38 y expresión aumentada de CD56 con expresión clonal de cadenas livianas en plasmocitos los cuales se identifican por la expresión fuerte de CD38 y de CD138. (5) Adicionalmente existen marcadores que tienen un significado pronóstico como CD117+ que se asocia a buen pronóstico o CD20+, CD45+ o CD81+ que determinan un mal pronóstico (6)

Por lo tanto, la CF puede diferenciar dentro de las células plasmáticas qué porcentaje corresponde a un remanente normal y cuáles son las células patológicas. Esto se logra mediante la detección de antígenos de expresión mutua como el CD138+++ y CD38++, de expresión única en los plasmocitos normales como el CD19+, CD20- y CD45+ CD56-, y los llamados fenotipos aberrantes como el CD56+++, CD117++, CD33++, CD13++, CD19-, CD45- y la clonalidad para Kappa o Lambda. (6)(7)(8)

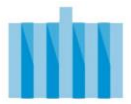
En el último tiempo surgen evidencias del valor que puede tener el ratio de células plasmáticas normales en relación a las totales (CPN/CPT) para diferenciar las diferentes categorías de GM y como valor pronóstico en los casos de GM quiescente. Se plantea que la presencia de 5 % o más de células plasmáticas normales se asocia al diagnóstico de GMSI o MA, mientras que en la gran mayoría de los MM existen menos de 5 % de células plasmáticas normales. (5)

El pronóstico dentro de las GM se establece en base a múltiples características. En el MM se destacan: las alteraciones citogenéticas, la presencia de insuficiencia renal (IR), el nivel de LDH,  $\beta 2$  microglobulina y albúmina. Existen diferentes scores pronósticos para MM como el ISS, y más recientemente el RISS y el mSMART. En el MM la estratificación de riesgo permite elaborar estrategias terapéuticas adaptadas al riesgo. (9)

La estratificación de riesgo de las GMSI y el MA no está tan bien establecida y existen dos grandes grupos que plantean diferentes variables que definirían el pronóstico. El grupo de la Clínica Mayo identifica como factores de riesgo de progresión de GMSI a MM la presencia de: proteína monoclonal  $> 1.5$  g/dL, subtipo no-IgG, relación FLC  $< 0.26$  o  $> 1.65$ , en base a estos factores de riesgo, clasifica a los pacientes en cuatro categorías: riesgo bajo, riesgo bajo-intermedio, riesgo intermedio-alto riesgo alto. El grupo español PETHEMA estratifica en tres categorías de riesgo: riesgo bajo, riesgo intermedio y riesgo alto; esta clasificación se realiza considerando factores de riesgo la presencia de:  $> 95\%$  de células plasmáticas aberrantes entre el total de células plasmáticas de la médula ósea y la aneuploidía. (8)

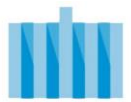
El principal beneficio de definir el riesgo de las GMSI y el MA radica en adecuar las pautas de seguimiento en función del riesgo, Una definición más temprana y precisa del riesgo de progresión a MM de ambas entidades podría ayudar a establecer una mejor estrategia de seguimiento adaptada al riesgo individual del paciente. El manejo de GMSI y MA se basa en una actitud expectante con ausencia de un tratamiento estandarizado aprobado. Trabajos recientes seleccionando pacientes de alto riesgo muestran evidencias de beneficios con tratamiento temprano en el caso del MA.

De todo lo anterior surge que las GM son un grupo de afecciones donde existe un continuo evolutivo que va desde estados premalignos sin evidencia de daño orgánico como la GMSI hasta el Mieloma Múltiple sintomático. Se ha vuelto prioritario conocer qué alteraciones se encuentran en la base de esta evolución, en este sentido existen evidencias de que el porcentaje de células



plasmáticas normales y anormales en médula ósea podría jugar un papel preponderante. Es por esto que nos interesa conocer cómo se correlaciona esta relación entre células normales y aberrantes con el diagnóstico de las diferentes gammopatías, así como qué implicancias pronósticas acarrea.





## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

-Determinar la utilidad de la citometría de flujo en el diagnóstico de las gammopatías monoclonales

### **Objetivos específicos:**

-Identificar pacientes del Hospital de Clínicas con diagnóstico de gammopatías monoclonales a partir de los estudios de citometría de flujo solicitados con diagnóstico probable de gammapatía monoclonal.

- Determinar sensibilidad y especificidad, así como VPP y VPN de la Citometría de Flujo en el diagnóstico de gammopatías monoclonales.

-Evaluar la relación del ratio células plasmáticas normales/células plasmáticas totales con el diagnóstico final (GMSI, MA, MM).

- Evaluar expresión de marcadores inmunofenotípicos como factor pronóstico de mieloma.

## METODOLOGÍA

El estudio incluyó 74 pacientes del Hospital de Clínicas a los que se les realizó estudios de citometría de flujo con planteo diagnóstico de GM, entre los años 2014 y 2017.

Se incluyeron todos los mayores de 18 años y se excluyeron los que no disponían de historia clínica completa, creando con los resultantes, una base de datos manejada por los integrantes del grupo.

### Recolección de datos clínicos

A partir de la base de datos del Laboratorio de Citometría de Flujo y Biología Molecular del Departamento Básico de Medicina, se obtuvieron los números de registro de pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión. Para recolectar el resto de los datos, se solicitaron en Archivos Médicos las historias clínicas y de esta forma completamos la base de datos a analizar. Además accedimos al sistema Gestión Salud del Hospital de Clínicas para conseguir datos paraclínicos ausentes y controles en policlínica de Hematología.

A partir de la revisión de las historias clínicas se obtuvieron los diagnósticos clínicos de los pacientes, que se clasificaron en tres grupos: pacientes con GMSI (Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto); pacientes con MA (Mieloma Asintomático) y pacientes con MM (Mieloma Múltiple). Esta variable cualitativa ordinal, es una de las que definen el outcome.

### Datos recabados del Laboratorio de citometría de flujo

Frente a un planteo diagnóstico de GM se realiza en la muestra de médula ósea del paciente, un tubo de screening para valorar clonalidad en células plasmáticas y presencia de IF aberrante, según protocolo EUROFLOW[D2].

Los marcadores estudiados en esta instancia son: CD45, CD38, CD138, CD19, CD56, kappa, lambda. En caso de MM se realiza un segundo tubo para completar la valoración de otros marcadores inmunofenotípicos pronósticos tales como: CD117, CD81, CD28, CD27.

Basado en lo publicado previamente sobre la relación del porcentaje de células plasmáticas normales/tales y el diagnóstico clínico de las gamapatías monoclonales[D3], el laboratorio de citometría establece en sus informes tres categorías en el diagnóstico citométrico: Sin evidencia de GM, GMSI/MA y MM según existieran menos o más de 5% células plasmáticas normales respectivamente.

### Análisis estadístico

Para la evaluación de la validez del ratio CPN/CPT para el diagnóstico diferencial entre las diferentes GM se determinó la sensibilidad, la especificidad y el VPP y VPN. Para ello en una primera instancia se comparó el valor del ratio CPN/CPT con el diagnóstico clínico.

Como variable independiente se utilizó el porcentaje del ratio CPN/CPT, siendo de tipo cuantitativa continua. A partir de esta además se generó una variable cualitativa nominal como diagnóstico citométrico de acuerdo a lo descrito previamente. La variable dependiente fue el diagnóstico clínico, variable cualitativa ordinal.

En función de lo anterior se analizaron: Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN del diagnóstico citométrico para GM.

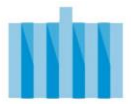


Además, se valoró por medio de análisis de varianza (ANOVA) las diferencias en el porcentaje de células plasmáticas normales/totales entre los tres grupos de diagnóstico clínico, utilizando como análisis post hoc la corrección de Bonferroni.

Se estudió la relación de la expresión de marcadores inmunofenotípicos con valor pronóstico (CD117, CD56, CD81), variables cualitativas nominales y el score pronóstico internacional (RISS), variable cualitativa ordinal. Para esto se realizó cálculo de Chi cuadrado.

La significancia estadística utilizada fue 5%.

Los datos se ingresaron en planillas de Excel manejadas por los investigadores, para el análisis de los datos se utilizó el software IBM SPSS Statistics Base v23.0.



### **NORMAS ÉTICAS**

Se manejaron los datos de forma anónima. Se consideró necesario realizar la investigación ya que no se disponen de datos sobre el estudio actualmente en Uruguay. El equipo de investigación se compromete en difundir los resultados finales. Se declara la ausencia de conflictos de intereses.

Se envió el protocolo de investigación al Comité de Bioética del Hospital de Clínicas Dr Manuel Quintela. El Comité resolvió otorgar la aprobación sin ninguna corrección desde el 21 de junio de 2017 hasta la fecha de finalización del Proyecto para la realización en la Institución.

## **RESULTADOS**

### Desarrollo del trabajo de investigación

En primer lugar, se realizó una búsqueda bibliográfica sobre GM para comprender dicha patología, cuáles son sus criterios diagnósticos y el valor de la CF en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con GM. Además, se concurrió al Laboratorio de Citometría de Flujo del Departamento Básico de Medicina para comprender como se realiza la CF en las GM y para corroborar los datos de la base.

En policlínica de Mieloma de la Cátedra de Hematología se conocieron algunos pacientes y sus historias clínicas. Se concurrió también al laboratorio de citología de la Cátedra de Hematología para conocer las características citológicas de las células plasmáticas y tener una aproximación al diagnóstico citomorfológico.

Los datos ausentes en el Sistema Gestión Salud y en las bases de datos aportadas, se recolectaron a partir de historias clínicas solicitadas en Archivos Médicos. El número de historias disponibles por semana fue una limitante, ya que se puso a disposición ocho en cada oportunidad, retrasando el análisis de los datos.

Durante este proceso, se realizaron reuniones con los orientadores del grupo para plantear dudas y guiar el trabajo.

Se contó con el apoyo de los docentes integrantes del Departamento de Métodos Cuantitativos para el correcto procesamiento de datos.

En múltiples instancias el grupo se reunió para discutir las variables obtenidas, analizarlas estadísticamente y redactar del trabajo final.

### Diagnóstico diferencial entre GMSI, MA y MM

Los pacientes seleccionados de la base de datos del Laboratorio de Citometría y Biología Molecular fueron 74. De estos, 28 debieron ser excluidos por no contar con diagnóstico clínico, por lo tanto, el estudio incluyó 46 pacientes, de los cuales 25 fueron pacientes de sexo femenino y 21 de sexo masculino; con un promedio de edad de 64 años.

22 pacientes (48%) tienen diagnóstico clínico de MM, 3 (6%) tienen diagnóstico clínico de MA, y 21 (46%) tienen diagnóstico clínico de GMSI. (Tabla 1) (Figura 1).

De los 22 pacientes con diagnóstico clínico de MM, 21 (95%) de ellos se corresponden con un diagnóstico citométrico de MM, mientras que un paciente no mostró evidencia de GM por CF. De los 3 pacientes con diagnóstico clínico de MA, 2 (67%) de ellos presentaron diagnóstico citométrico de MM y otro paciente no mostró evidencia de GM por CF. El bajo número de pacientes dificulta realizar ninguna conclusión sobre este grupo. De los 21 pacientes con diagnóstico clínico de GMSI, 9 (43%) se corresponden con un diagnóstico citométrico de GMSI/MA, 11 (52%) no presentaron evidencia citométrica y un paciente mostró evidencia de MM por citometría (Tabla 2). Este último paciente de diagnóstico discordante entre la clínica y la citometría (diagnóstico clínico de GMSI y diagnóstico citométrico de MM) en junio del año

2014; en mayo del año 2016 progresó a un MM. Este es el único paciente que progresa del grupo de las GMSI (Figura 2).

El mayor porcentaje de pacientes sin evidencia de GM por CF se encuentra en el grupo con diagnóstico clínico de GMSI (52,3% en GMSI vs 4,8% en MM). Esto puede deberse a que en la GMSI así como en la MA, la afectación medular no es uniforme y la muestra puede haber sido extraída de una zona no afectada en la médula ósea. En el caso del grupo de MA 1/3 pacientes no tenía evidencia de GM por CF. Sin embargo, el bajo número de casos hace imposible sacar conclusiones de este grupo.

Para determinar la asociación estadística entre diagnóstico clínico y citométrico, se recurrió al test estadístico de Chi cuadrado, del cual se obtiene que las tres poblaciones (MM, MA, GMSI) se comportan diferente respecto al diagnóstico citométrico de forma estadísticamente significativa ( $p < 0,000$ ).

En cuanto a las medidas de validez interna y externa de la técnica de citometría de flujo para el diagnóstico de MM se obtuvo una sensibilidad de 100% y una especificidad de 90%, con un VPP de 95,45% y un VPN de 100%. Para el diagnóstico de GMSI resultó en un valor de sensibilidad de 90% y especificidad del 100%, con un VPP de 100% y un VPN de 95,45% (Tabla 2).

#### Correlación marcadores inmunofenotípicos con el score RISS

Se realizó el test de Chi cuadrado para establecer la relación entre la presencia de marcadores inmunofenotípicos y el score pronóstico RISS en los casos de MM. Se observó que no existe una relación estadísticamente significativa entre la estadificación por score RISS y la presencia de marcadores CD 81 (20 pacientes) y CD 117 (19 pacientes), esto puede deberse a que estos marcadores fueron estudiados en pocos pacientes.

El marcador CD 56 (45 pacientes) fue estudiado en un mayor número de pacientes, y se encontró una relación estadísticamente significativa entre su presencia y la estadificación por score RISS.

Mediante la técnica de CF se valoró el porcentaje de células plasmáticas normales en pacientes con posible diagnóstico de GM, observando la variación del mismo en las distintas categorías clínicas. En estadios precoces de la enfermedad, este porcentaje fue mayor, disminuyendo con la progresión de la misma; siendo 0 la cantidad de células plasmáticas normales en MM (Figura 3).

Para valorar la existencia de diferencias en el porcentaje CPN/CPT se realizó un ANOVA que mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. El análisis post hoc (corrección de Bonferroni) permitió establecer que esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) fue entre los grupos de GMSI y MM; GMSI y MA; sin existir diferencias significativas entre MM y MA.

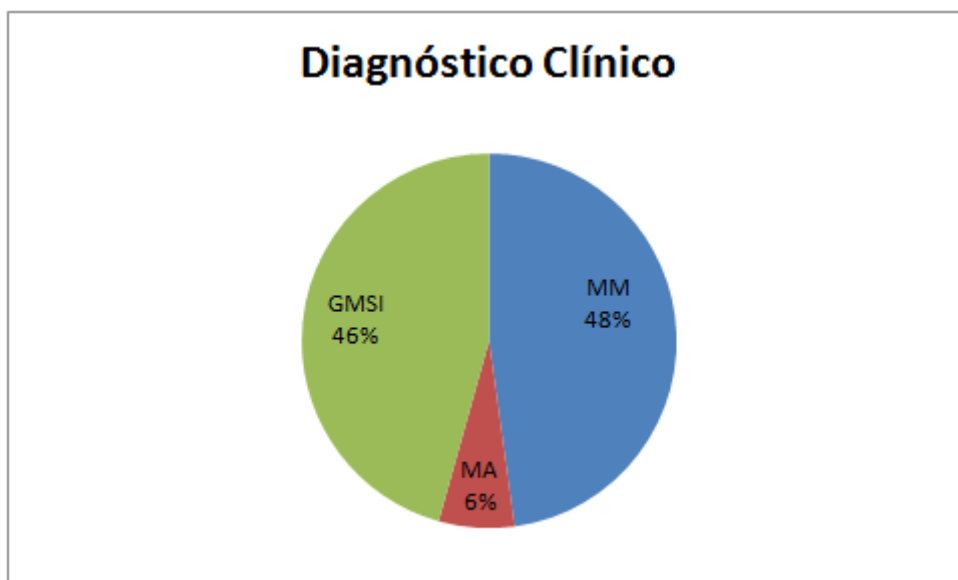
Tablas y gráficos

**Tabla 1. Características de los pacientes.**

		DIAGNÓSTICO CLÍNICO			
		GMSI (n = 21)	MA (n = 3)	MM (n = 22)	TOTAL (n = 46)
<b>Sexo</b>	Femenino	11 (52,4%)	2 (66,6%)	12 (54,5%)	25 (54,4%)
	Masculino	10 (47,6%)	1 (33,4%)	10 (45,5%)	21 (45,6%)
<b>Edad media (años) +-DE</b>		66 ± 17	74 ± 12,76	62 ± 16,4	64 ± 16,35

**Tabla 2. CPN/CPT**

	MM	GMSI	TOTAL
CPN/CPT > 5	0	9	9
CPN/CPT < 5	21	1	22
<b>TOTAL</b>	21	10	31



**Figura 1. Representación porcentual de los diagnósticos clínicos.**

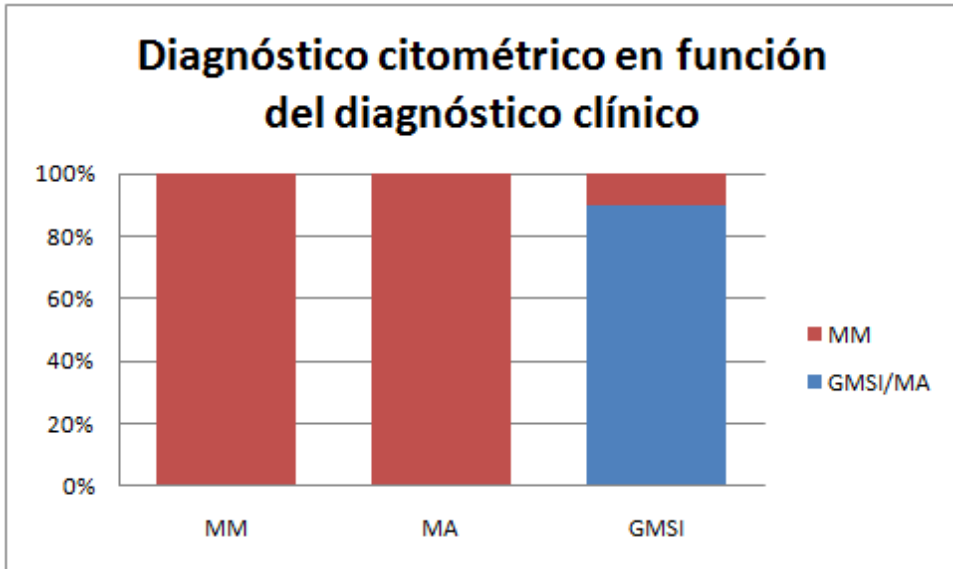


Figura 2. Porcentaje de CPN/CPT según diagnóstico clínico.

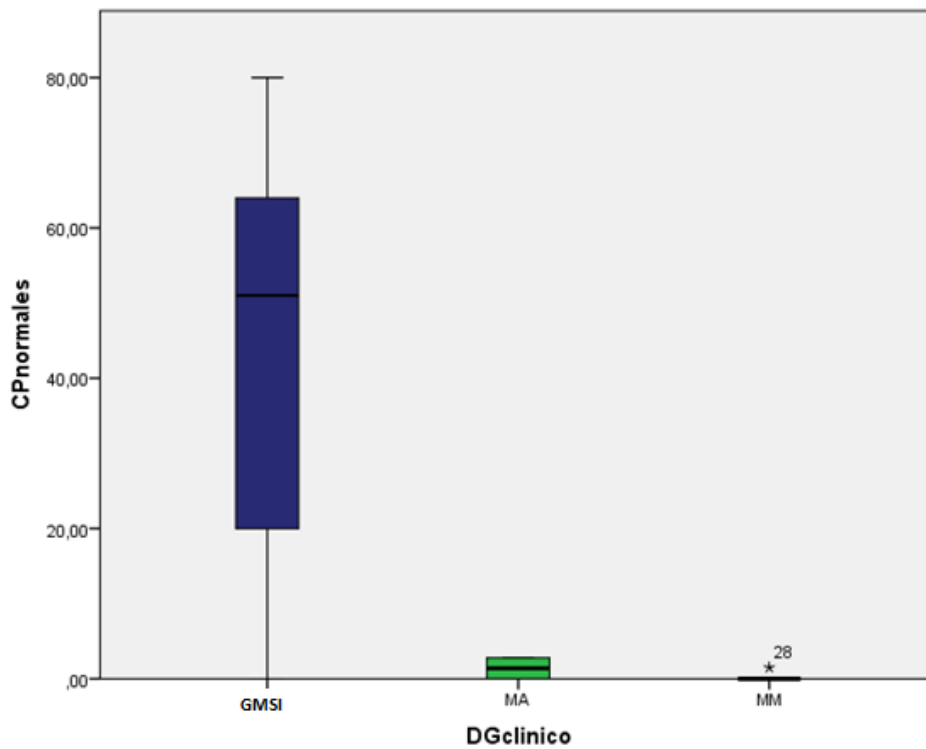
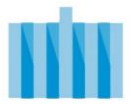


Figura 3. Porcentaje de CPT en función del diagnóstico clínico.





### **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

El objetivo de nuestro trabajo era estudiar el valor de la CF en el diagnóstico de las GM. Para ello se valoró la validez diagnóstica del porcentaje de CPN/CPT en el diagnóstico diferencial entre GMSI y MM. En nuestro medio, a pesar que los estudios de CF son frecuentemente solicitados para apoyar el diagnóstico de GM, no se ha reportado la utilidad de los mismos para dicho fin. Este trabajo evidenció una elevada sensibilidad y especificidad para esta técnica confirmando trabajos internacionales. (2)(4)

El porcentaje CPN/CPT se correlacionó con los diferentes diagnósticos clínicos y en el caso de la GMSI, si bien se trata de un solo caso, se relacionó al riesgo de progresión a MM. Este caso es interesante ya que tal como demuestran otros estudios, la presencia de menos de 5% de células plasmáticas normales por citometría en pacientes con diagnóstico clínico de GMSI se relaciona con mayor riesgo de progresión clínica a MM. (8)

Respecto a los pacientes con diagnóstico clínico de MA, se podrían obtener mejores resultados de contar con un mayor número de pacientes, ya que no se pueden realizar conclusiones estadísticamente significativas con solamente 3 pacientes.

Esta descripto el rol pronóstico del porcentaje CPN/CPT en GMSI. Se observó que la única paciente que tuvo una GMSI con menos del 5% de plasmocitos normales se constató una progresión a MM sintomático por lo cual, si bien no se pueden sacar conclusiones por ser un único caso, sería interesante a futuro seguir estudiando con una muestra mayor de pacientes GMSI en un mayor período de tiempo.

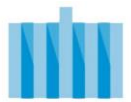
Dado que contamos con un número de pacientes reducido en un corto periodo de tiempo no podemos concluir sobre otras variables obtenidas de las Historias Clínicas tales como la estadificación de Durie y Salmon, porcentaje de infiltración plasmocitaria por mielograma, ratio FLC, CRAB, pico monoclonal e Isotipo de gammaglobulina. En un próximo estudio se podrían incluir las mismas y analizarlas. Se demostró que en Uruguay en el Hospital de Clínicas el cut off de 5% para células plasmáticas normales es excelente para diferenciar GMSI de MM. Esta evidencia constituye un aporte al conocimiento actual siendo que hasta el momento esto no ha sido publicado en nuestro medio.

Los resultados de nuestro trabajo se presentarán en la Cátedra de Hematología, así como se difundirán a modo de presentaciones en congresos del área para lograr mayor alcance.



### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Rajkumar SV, Landgren O, Mateos MV. Smoldering multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3069–75.
2. Leite LAC, Almeida MS, Kimura ES, Bigonha JG, Colleoni GWB, Chauffaille M de LLF, et al. Caracterização imunofenotípica das células plasmáticas em pacientes portadores de mieloma múltiplo. *J Bras Patol e Med Lab* [Internet]. 2010;301–8.
3. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M, et al. Review International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Blood*. 2014
4. Barrera Ramírez LM, Drago Serrano Mae, Pérez Ramos J, Sainz Espuñes Tdler, Zamaro Anac, Gómez Arroyo F, et al. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias . scielomx* ; 2004. (17): 42–55.
5. Manasanch EE, Salem DA, Yuan CM, Tajeja N, Bhutani M, Kwok M, et al. Flow cytometric sensitivity and characteristics of plasma cells in patients with multiple myeloma or its precursor disease: influence of biopsy site and anticoagulation method. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2015;56(5):1416–24.
6. Alenda R, Medina S. *Inmunología*. 2013;3(1):6–10.
7. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, et al. AND Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. 2008;93(3):431–8.
8. 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.
9. Pérez-Persona E, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, De Las Heras N, De Coca AG, et al. Risk of progression in smoldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: Comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. *Br J Haematol*. 2010;148(1):110–4.



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, a nuestras orientadoras Prof. Agda. Dra. Daniela Lens y Asist. Dra. Matilde Boada quienes prestaron su tiempo y conocimiento para la realización de este trabajo de investigación. Corrigieron el trabajo exhaustiva y pacientemente innumerables veces enseñándonos y facilitando nuestra introducción en la investigación científica.

Al Departamento de Métodos Cuantitativos de la Facultad de Medicina por orientarnos en la realización de este trabajo de investigación científica con clases teóricas y de consulta.

Al Departamento Básico de Medicina y su personal docente y no docente por brindarnos todos sus recursos humanos y materiales.

A la Cátedra de Hematología del Hospital de Clínicas, especialmente a la Dra. Eloísa Rivas.