

# Validar técnicas de enriquecimiento celular y comparar resultados de FISH en pacientes con Mieloma Múltiple

Ciclo de Metodología Científica II – 2017 –  
Grupo 72

Br. Elina De Vera Braggio

Br. Micaela Rey Camacho

Br. Eloisa Rodríguez Benzano

Br. María Eugenia Rodríguez Iacopino

Br. Lucía Romero Ardoino

Br. Matilde Rufo Miró

Orientador: Prof. Adj. Dra. Faride Uturbey

Co-orientador: Asistente (i) Lic. Analía Sanguinetti

Instituciones participantes:

Facultad de Medicina (UDELAR)



Departamento de Genética Facultad de Medicina



Hospital Maciel



Círculo católico



Casmu



## Índice

1. Resumen .....	1
2. Introducción .....	2
2.1. Citogenética.....	2
2.2. Citometría de flujo .....	3
2.3. Mieloma múltiple .....	3
2.3.1. Clínica .....	3
2.3.2. Humoral.....	4
2.3.3. Citomorfología en el MM .....	4
2.3.4. Citometría de flujo en MM.....	4
2.3.5. Citogenética en el MM.....	5
2.4. Presentación del problema .....	6
3. Objetivos .....	8
3.1. Objetivos Generales .....	8
3.2. Objetivos específicos.....	8
4. Metodología Científica.....	8
4.1. Materiales y métodos .....	8
5. Resultados .....	11
5.1. Validación de la técnica .....	12
5.2. Comparación por FISH de pellet vs producto enriquecido .....	13
6. Conclusión.....	14
7. Bibliografía .....	16
8. Agradecimientos.....	18
9. ANEXO A: Consentimiento informado .....	19
10. ANEXO B: Protocolo FISH y de cultivo y detención.....	22
11. ANEXO C: Protocolo de selección negativa .....	26

## **1. Resumen**

*Introducción:* El diagnóstico de Mieloma Múltiple (MM) se basa en elementos clínicos, humorales, inmunofenotípicos y citogenéticos.

La caracterización por citogenética convencional y citogenética molecular (FISH) establece el pronóstico permitiendo la inclusión de pacientes para el tratamiento con bortezomib, medicación financiada por el Fondo Nacional de Recursos.<sup>1</sup>

Las técnicas citogenéticas convencionales detectan alteraciones cromosómicas de solo un tercio de los mielomas. Las técnicas de FISH. mejoran hasta un 90% el hallazgo de dichas alteraciones. Sin embargo, al detectar únicamente alteraciones específicas, no permite la evaluación de todo el genoma tumoral. La aplicación del FISH interfásico presenta alta tasa de falsos negativos dada la baja infiltración medular por células mielomatosas (10-40% de celularidad medular).<sup>2</sup>

Esta tasa de falsos negativos mejora, pero no desaparece realizando FISH sobre pellets citogenéticos obtenidos por estimulación del cultivo con mitógenos de linfocitos B.

Esta investigación plantea la puesta a punto de una técnica de selección negativa de células mielomatosas y su validación, inmunotipificando el tipo celular por citometría de flujo. Además, compara resultados obtenidos por FISH sobre pellets citogenéticos y sobre producto enriquecido.

*Materiales y métodos:* Se incluyeron 14 pacientes con probable diagnóstico de MM entre julio y setiembre de 2017. Dicho diagnóstico se realizó en el Departamento de Genética de Facultad de Medicina. Ningún paciente se sometió a maniobras invasivas adicionales a las necesarias para el diagnóstico solicitándose en todos el consentimiento informado.

Se validó la técnica de enriquecimiento celular por citometría de flujo comparándose los resultados obtenidos para cada paciente entre el FISH sobre pellet y producto enriquecido.

*Resultados:* los porcentajes de células patológicas fueron mayores en las muestras enriquecidas que en médula entera. Se encontró una tendencia al aumento de alteraciones citogenéticas en muestras sometidas a FISH sobre producto enriquecido en comparación con pellet citogenético.

*Palabras claves:* mieloma múltiple, enriquecimiento, FISH, falsos negativos, citometría de flujo, citogenética convencional

## **2. Introducción**

Los avances en técnicas de citogenética, citometría de flujo y biología molecular han cambiado la práctica habitual de la hematología. Esto sumado a la clínica y citomorfología, permiten un diagnóstico cada vez más certero, dándole así la oportunidad al paciente de recibir un tratamiento precoz y adecuado a su patología.

### **2.1.Citogenética**

La citogenética estudia las características de los cromosomas y su comportamiento a lo largo del ciclo celular. Estos están constituidos por dos cromátidas hermanas que contienen al ADN, unidas por un centrómero que divide al cromosoma en un brazo largo (q) y un brazo corto (p). Cada cromosoma tiene características específicas dadas por tamaño, posición del centrómero y el patrón de bandas.

El cariotipo humano está formado por 23 pares de cromosomas, 22 autosomas y un par sexual. Se ordenan en siete grupos de la A – G según morfología y tamaño.<sup>3</sup>

Mediante estudios citogenéticos, se han podido identificar cambios cromosómicos específicos en ciertas patologías hematológicas con clínica y hallazgos de laboratorio característicos.

Estos estudios tomarán como muestra el tipo celular donde asienta la enfermedad sospechada. En el mieloma múltiple, se evaluarán linfocitos B con diferenciación plasmocitaria.

En los resultados citogenéticos se pueden encontrar alteraciones numéricas, relacionadas con la ploidía, ganancia (hiperdiploidía) o pérdida (hipodiploidía) de cromosomas; y cambios estructurales como adición (ganancia de material genético de origen desconocido), delección (pérdida de material genético), inserción (interposición de material entre dos bandas desde el mismo u otro cromosoma) o traslocación (intercambio de material genético entre dos cromosomas, o ambos brazos de un mismo cromosoma).

La citogenética puede ser convencional o molecular. La primera consiste en la organización del cariotipo según el patrón de bandas cromosómicas analizadas mediante microscopía óptica. Para esto es necesario que el estudio se realice en metafase (fase de mayor compactación de la cromatina). Esto se presenta como una dificultad en ciertas circunstancias como son la mala calidad de los extendidos cromosómicos o bajo índice mitótico en patologías con baja tasa proliferativa. La segunda, citogenética molecular (hibridación in situ fluorescente: FISH), permite detectar anomalías cromosómicas tanto en metafase como en interfase, a través de

sondas (secuencias de ADN complementarias) marcadas con fluorocromos que se unen a alteraciones específicas ya conocidas, propias de la patología en estudio.

## **2.2. Citometría de flujo**

El estudio inmunofenotípico por citometría de flujo es un método que analiza las células y sus componentes según su composición y marcadores. Consta de evaluación estructural según complejidad nuclear y citoplasmática y determina las características cualitativas y cuantitativas de las diferentes poblaciones celulares, mediante la utilización de Anticuerpos específicos que se unen a proteínas de membrana o citoplasmáticas. Estos anticuerpos se denominan monoclonales (AcMo) por su forma de producción en cultivos linfocitarios (cluster differentiation, CD) y están marcados por fluorocromos.

## **2.3. Mieloma múltiple**

El Mieloma Múltiple (MM) es una gamapatía monoclonal maligna resultado de la proliferación de una clona de células plasmocitarias productora de una inmunoglobulina monoclonal detectada en sangre y orina. Esto da lugar a daño óseo, falla renal, hipercalcemia y anemia (C.R.A.B. por su sigla en inglés).

Constituye el 1% de todas las neoplasias y un 10% de las hemopatías malignas. Se presentan en una edad promedio de 65 años, con mayor incidencia en afro-descendientes sin claro predominio sexual.

Su incidencia anual a nivel mundial es de 40 casos por millón de habitantes. En Uruguay se estiman 120 casos nuevos al año.

Su diagnóstico se basa en la clínica, test humorales, inmunofenotipo y citogenético.<sup>4,5,6</sup>

### **2.3.1. Clínica**

Dentro del pilar clínico el 70% de los pacientes presentan dolor óseo de características orgánicas principalmente en el esqueleto axial y cráneo. Es característico observar lesiones osteolíticas, osteoporosis y fracturas patológicas al momento del diagnóstico. La resorción ósea se debe a la proliferación tumoral plasmocelular y citoquinas producidas por las células plasmáticas generando una hipercalcemia. Aproximadamente un 30% presentan anemia normocítica normocrómica de causa multifactorial (infiltración mielomatosa medular, insuficiencia renal, anemia de estado inflamatorio crónico, entre otros). A su vez se pueden presentar infecciones

recurrentes a predominio respiratorio y urinario por diversos gérmenes, principalmente *StreptococcusPneumoniae* debidas a la disminución de inmunoglobulinas policlonales. El 25% de los pacientes presentan al momento del diagnóstico insuficiencia renal por depósitos de cadenas ligeras en los túbulos renales y en el 50% de los casos de causa multifactorial por la hipercalcemia sostenida, hiperuricemia e infección. <sup>4,5,6</sup>

### **2.3.2. Humoral**

El diagnóstico **humoral**, consta del proteinograma electroforético con inmunofijación de cadenas (PEF con IEF) el cual muestra una banda homogénea en el 85% de los casos. Este estudio identifica la inmunoglobulina producida en exceso conocida como proteína M, confirmando su carácter monoclonal (pico mayor a 5gr), siendo imprescindible para el diagnóstico del Mieloma Múltiple.

La distribución del MM según el tipo de inmunoglobulina secretada es: IgG (50% - 60%), IgA (20 – 30%), cadenas ligeras (15%), IgD (2%) y no secretor (1% - 2%).

Otros estudios necesarios para completar la valoración son el hemograma (serie roja y serie plaquetaria), función renal (creatininemia) y calcemia. <sup>4,5,6</sup>

### **2.3.3. Citomorfología en el MM**

Debe realizarse un mielograma como estudio citológico, donde suele encontrarse una infiltración de células plasmáticas mayor al 20%. Las mismas presentan una zona clara perinuclear debido al aparato de Golgi prominente y núcleo excéntrico. Pueden coexistir plasmoblastos con cromatina nuclear vesicular, nucleolo único evidente y células multinucleadas de aspecto extraño. Otras variantes citológicas son las células flambeadas, que contienen acúmulos de proteínas enteras o degradadas a nivel intracelular, células de Mott con múltiples gotículas citoplasmáticas en racimo de uvas. <sup>7</sup>

### **2.3.4. Citometría de flujo en MM**

En relación al inmunofenotipo la caracterización de células plasmáticas permitirá diferenciar las sanas de las mielomatosas. Para identificar las células plasmáticas, los AcMo más utilizados son CD 38 y CD 138.

El CD 138 es un receptor de factores de crecimiento. Se expresan tardíamente a partir del estadio plasmoblastos. Esta expresión puede aumentar en las células plasmáticas patológicas.

El CD 38 es un receptor común de varias células hematopoyéticas siendo mayor su expresión en las células plasmáticas. En el MM su expresión suele estar disminuida.

En relación al MM, el CD 56 es el que mejor marca a las células plasmáticas mielomatosas expresándose en el 78% de los casos, mientras que en las células plasmáticas sanas habitualmente es negativo. Junto a éste, se utiliza el CD 19 con el mismo fin, no expresándose en el 97,5% de los pacientes con MM a diferencia de las sanas donde si lo hacen.<sup>8,9</sup>

Por lo tanto, el fenotipo clásico de las células plasmáticas se caracteriza por presentar CD38<sup>++</sup>, CD 138<sup>+</sup>, CD 19<sup>+</sup>, CD 56<sup>-</sup> diferenciándose de las mielomatosas por poseer CD38<sup>++</sup>, CD 138<sup>+</sup>, CD 19<sup>-</sup>, CD 56<sup>+</sup> (Tabla 1)

	Célula plasmática	Célula mielomatosa
CD 38	++	++
CD 138	+	+
CD 19	+	-
CD 56	-	+

Tabla 1

Se pueden utilizar también otros marcadores con valor pronóstico como el CD 28<sup>+</sup> y CD 45<sup>-</sup> desfavorable para la enfermedad, o el CD 27 que a concentraciones normales es de buen pronóstico disminuyendo su expresión al avanzar la enfermedad.

### 2.3.5. Citogenética en el MM

El estudio citogenético identifica en el MM alteraciones por ganancia de cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15 y 19 entre otros, que suelen asociarse a cariotipos hiperdiploides y de buen pronóstico. La pérdida cromosómica e hipodiploidía se asocian a un pronóstico sombrío. La delección del 13q es detectada en el 50% de los MM (monosomía parcial). A nivel estructural la afección de la cadena pesada de las inmunoglobulinas situados en 14q32 se detecta en el 75% de los casos. Esta puede traslocarse a diferentes cromosomas, principalmente a 11q13, 4p16 y 16q23. Otras mutaciones como las del gen *ras* y *p53*, pueden encontrarse con menor frecuencia.<sup>4, 10, 11, 15</sup>

La caracterización por citogenética convencional y citogenética molecular (F.I.S.H) establece el pronóstico y permite la inclusión de pacientes para tratamiento con bortezomib, medicación financiada por el Fondo Nacional de Recursos, que aumenta la sobrevida global y tiempo libre de enfermedad de estos pacientes. <sup>12</sup>

#### **2.4. Presentación del problema**

Una de las mayores dificultades en la utilización de la citogenética como técnica diagnóstica es el bajo índice mitótico de éste tipo de neoplasias lo cual resulta en la obtención de solo un 60% de metafases.

La segunda dificultad reside en que muchos de los cambios cromosómicos frecuentes son extremadamente complejos de identificar por técnicas citogenéticas de uso habitual, dado que son rearrreglos crípticos por debajo del nivel de resolución de las técnicas convencionales de bandedo. Únicamente un tercio de los mielomas presentan alteraciones cromosómicas que puedan ser demostradas por las mismas. El desarrollo de las técnicas de F.I.S.H. ha ayudado a resolver este tipo de problemas ya que mejora hasta un 90% el hallazgo de alteraciones citogenéticas. Esta es una técnica sensible que puede detectar numerosas alteraciones cromosómicas inclusive deleciones submicroscópicas. Por otro lado, esta técnica no permite la evaluación de todo el genoma tumoral ya que sólo busca alteraciones específicas.

En trabajos sobre el tema, se identificaron alteraciones en un 30 % de los pacientes por citogenética convencional, y 97% por FISH y CGH, por lo que se concluye que la citogenética convencional es un análisis limitado para el diagnóstico de mieloma múltiple <sup>13</sup>. Por esto es imprescindible el diagnóstico mediante la técnica de FISH.

En tercer lugar, la aplicación de la técnica de FISH interfásico presenta alta tasa de falsos negativos dada la baja infiltración medular por células mielomatosas (10 - 40% de celularidad medular total). Esta tasa de falsos negativos mejora, pero no desaparece realizando FISH sobre pellets citogenéticos (se denomina pellet citogenético al conjunto de células fijadas de un cultivo obtenidas por centrifugación) que han sido obtenidos por estimulación del cultivo con mitógenos de linfocitos B.

Es así que han surgido múltiples técnicas para realizar selección de células mielomatosas a partir de muestras de médula ósea entera.

El gold estándar para el estudio de alteraciones citogenéticas es la selección positiva por citometría de flujo realizada en citómetros con capacidad de seleccionar las células previamente marcadas con AcMo específicos. Estos equipamientos son de alto costo, escasos en nuestro país y de difícil acceso, solo contamos en la práctica diaria con citómetros que clasifican, pero no seleccionan.

En el departamento de genética de la Facultad de Medicina (UDELAR) en coordinación con el el Instituto de Investigaciones Biologicas Clemente Estable se realizó en el año 2015, un estudio preliminar, utilizando selección positiva por citometría y cultivo celular con mitógenos B, donde se incluyeron muestras de 10 pacientes que se sometieron a ambas técnicas. Los resultados obtenidos demostraron que el grupo sometido a la técnica de FISH sobre células seleccionadas por sorting (selección positiva), detectaba alteraciones presentes en las células mielomatosas que no eran detectadas en el grupo de FISH sobre pellet de cultivo de médula ósea. Por lo tanto, de no realizarse el FISH sobre células seleccionadas, varios pacientes quedarían sin diagnóstico y sin el tratamiento proporcionado por el Fondo Nacional de Recursos. (Tabla 2).

Paciente	Cariotipo	FISH sobre pellet de cultivo de Médula ósea	FISH sobre células seleccionadas por sorting
1-	No se obtuvieron metafases	Sin alteraciones en los loci estudiados	Compromiso IGH.
2-	No se obtuvieron metafases	Delección p53	Delección p 53
3-	46XX	Sin alteraciones en los loci estudiados	Compromiso IGH, ganancia 13q, ganancia p53, amplificación 1q
4	Del 9 (1.3-2.1), monosomía clonal del cromosoma 17, 19 y 20	Sin alteraciones en los loci estudiados	Sin alteraciones en los locis estudiados
5-	46 XY	Amplificación locus p53	Amplificación p53
6-	46XX	Sin alteraciones en los loci estudiados	Compromiso IGH
7-		Sin alteraciones en los loci estudiados	Compromiso IGH
8-	No se obtuvieron metafases	Sin alteraciones en los loci estudiados	Sin alteraciones
9-	46XX	Sin alteraciones en los loci estudiados	Amplificación 1q
10-	46 XY del 13 (q14-q21)	Delección 13 (q14.3)	Delección 13 (q14.3)

Tabla 2.

Este proyecto plantea la utilización de una técnica de selección negativa, que no se realiza en el país, mediante la utilización de un producto producido por STEM CELL™ Technologies, que se denomina Rosette Sep™ Human Multiple Myeloma Cell Enrichment Cocktail <sup>14</sup>.

El método consiste en aumentar el porcentaje de células mielomatosas en muestras de médula entera. Se basa en la formación de rosetas de glóbulos rojos con las células no deseadas unidas a anticuerpos tetraméricos para proteínas de membrana de estas células y glicoforina A. Utilizando un medio gradiente de densidad se separan por centrifugación estos macrocomplejos, quedando en el sobrenadante las células no unidas, que corresponden a las células mielomatosas (selección negativa). Como esta técnica no se ha realizado antes, es necesario evaluar que las células del sobrenadante correspondan verdaderamente a plasmocitos patológicos. Para esto utilizamos citómetros de clasificación disponibles. Si el porcentaje de células mielomatosas aumenta en el producto enriquecido en relación al porcentaje inicial en médula entera, incorporaremos este paso a los protocolos de rutina, para minimizar los falsos negativos por FISH, dependientes de la baja infiltración.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivos Generales**

Optimizar el diagnóstico por FISH de pacientes portadores de MM

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Poner a punto la técnica de selección negativa de células mielomatosas a partir de muestras de médula ósea entera.
2. Validar esta selección tipificando las células obtenidas y su porcentaje por citometría de flujo
3. Comparar resultados de FISH sobre pellets citogenéticos y sobre extendidos del producto enriquecido.

### **4. Metodología Científica**

#### **4.1. Materiales y métodos**

Este estudio consiste en la puesta a punto de una técnica de diagnóstico citogenético en pacientes con Mieloma Múltiple (MM).

Se incluirán muestras de los pacientes con diagnóstico probable de MM que recibe el Departamento de Genética para análisis citogenético en el periodo de julio – setiembre del 2017. Proviene de Círculo Católico, Casmu y Hospital Maciel.

Se presentó el protocolo de investigación en cada institución y en Facultad de Medicina logrando la aprobación de los respectivos Comités de Ética y de la Dirección Técnica en el caso del Círculo Católico que aceptó los criterios de aprobaciones de los otros comités institucionales, ya que no cuenta con uno propio.

Se incluyeron pacientes internados o que concurren a las policlínicas de extracción de médula ósea derivados por su médico tratante con sospecha de mieloma múltiple. En estos pacientes debió confirmarse el diagnóstico mediante obtención de médula ósea por punción aspirativa. No se realizaron maniobras invasivas adicionales para la obtención de las muestras utilizadas en nuestra investigación.

Se obtuvieron los consentimientos informados en forma verbal y escrita, de los pacientes incluidos. (ANEXO A)

Las muestras de médula ósea recolectadas se recibieron en el Laboratorio del Departamento de Genética de Facultad de Medicina por medio de cadetería, en condiciones de preservación y bioseguridad adecuadas para su traslado, en recipientes aislados y refrigerados en gradillas, en un plazo no mayor de 6 horas.

La muestra se dividió en dos partes. La primera se procesó de manera convencional realizándose cultivos con mitógenos B y FISH sobre el pellet citogenético. (ANEXO B)

En la segunda parte se aplicó la técnica de selección negativa mediante la utilización de Rosette Sep<sup>TM</sup> Human Multiple Myeloma Cell Enrichment Cocktail<sup>14</sup>. (ANEXO C)

Las muestras utilizadas en el laboratorio de genética de la facultad de medicina fueron reversiblemente anonimizadas, adjudicándole un número a cada una.

Luego de ser realizada la técnica, las muestras se descartaron con los requisitos de seguridad pertinentes.

El procedimiento generó finalmente un informe que se manejó con la misma confidencialidad que la historia clínica.

Una parte del producto enriquecido se envió al Laboratorio de citometría para fenotipar utilizando AcMo específicos, CD19, CD38, CD138 y CD56.

Esto nos permitió confirmar que las células seleccionadas corresponden verdaderamente a las células mielomatosas. (Tabla 1). El Laboratorio envió los resultados por escrito especificando si el fenotipo celular corresponde a células plasmocitarias y su porcentaje en la muestra actual y en la inicial de medula entera (necesaria para el diagnóstico inicial).

Con la certeza de la celularidad obtenida se realizaron extendidos para FISH con la segunda porción de la muestra enriquecida que mantuvimos en nuestro Laboratorio.

Se compararon los resultados obtenidos para cada paciente entre el FISH sobre pellet y sobre producto enriquecido.

Nuestras variables de estudio son entonces los resultados de FISH sobre pellet y sobre producto enriquecido.

Se compararon ambas técnicas esperando encontrar que la selección negativa aumentara la sensibilidad y el valor predictivo positivo del diagnóstico de alteraciones por FISH en relación al diagnóstico por FISH sobre pellet. De esta forma aquellos pacientes que quedarían sin diagnóstico por la técnica de FISH sobre pellet, se verían beneficiados.

## 5. Resultados

Se incluyeron 14 pacientes con diagnóstico probable de MM.

Todas las muestras se sometieron a cultivo celular y enriquecimiento celular por selección negativa.

En la tabla 3 puede observarse los resultados obtenidos en cada paciente para cada técnica que se analizará a continuación dentro de su sección correspondiente.

	Validación		Comparación de técnicas	
	Células plasmocitarias		Alteraciones citogenéticas	
Pacientes	Médula entera (%)	Producto enriquecido (%)	FISH pellet	FISH enriquecido
P1	0,19	9,75	sin alteraciones	sin alteraciones
P2	0,17	2,47	sin alteraciones	sin alteraciones
P3	10,7	45	sin alteraciones	sin alteraciones
P4	1,7	29,7	sin alteraciones	sin alteraciones
P5	1	8,5	sin alteraciones	sin alteraciones
P6	no se conto	3,07	sin alteraciones	compromiso IgH
P7	no se contó	no se contó	sin alteraciones	compromiso IgH
P8	39	87	sin alteraciones	delección p53
P9	5,4	43	sin alteraciones	sin alteraciones
P10	no se contó	no se contó	sin alteraciones	compromiso IgH
P11	1,64	no enriqueció	sin alteraciones	no enriqueció
P12	2,65	no enriqueció	sin alteraciones	no enriqueció
P13	10	49	delección p53	muestra insuficiente
P14	28,2	muestra insuficiente	sin alteraciones	sin alteraciones

Tabla 3

## 5.1. Validación de la técnica

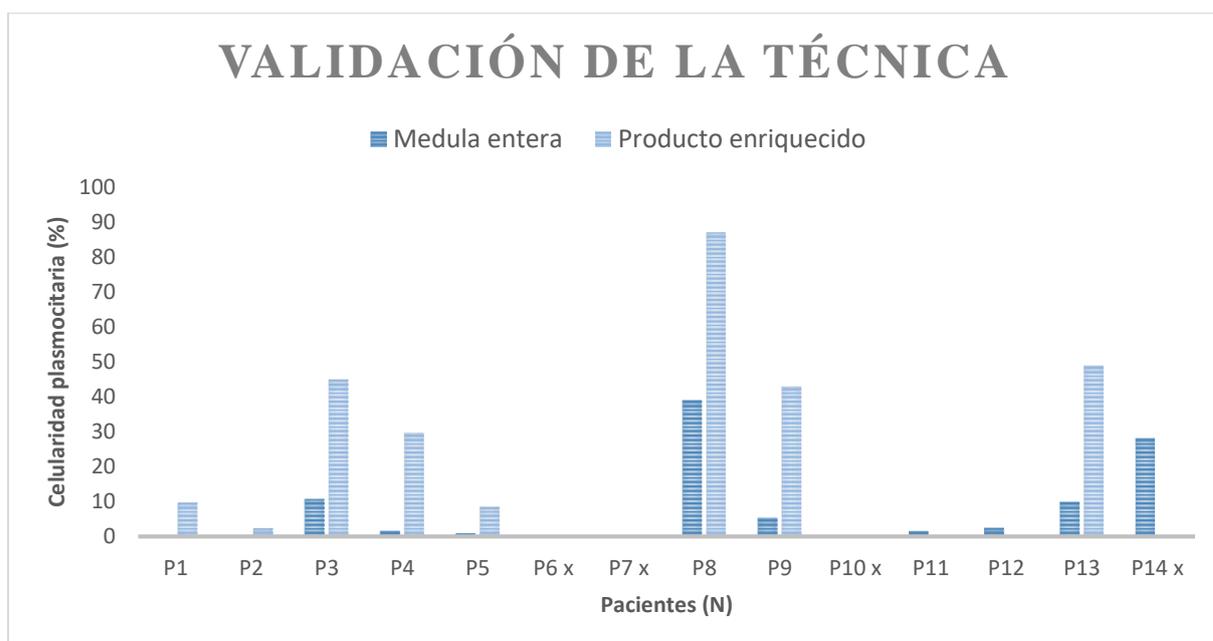
La técnica se validó demostrando un aumento del porcentaje de células mielomatosas en el producto enriquecido en relación a médula entera, cuantificado por citometría de flujo.

De las 14 muestras, se logró realizar el procedimiento completo (contabilizar por citometría de flujo tanto la muestra de médula entera como la del producto enriquecido) en 10 de ellas.

De las 10 muestras, en 2 no se logró enriquecimiento. Esto se interpretó como secundario a hemólisis de la muestra (P11 y P12). En las otras 8 se encontró un aumento significativo del porcentaje de células plasmocitarias en el producto enriquecido en comparación con la médula entera.

De las 4 muestras en las que no se logró realizar el procedimiento completo, 2 de ellas no lograron contabilizarse ni la médula entera ni el producto enriquecido por citometría de flujo (P7 y P10). Otra de ellas no logró contabilizarse en médula entera, pero sí en el producto enriquecido (P6). En estos tres casos, la ausencia de datos se debió a falta de disponibilidad del citómetro. La muestra restante se contabilizó por citometría en médula entera, pero en el producto enriquecido no logró contarse por volumen de muestra insuficiente.

Los resultados se analizaron mediante un Test de Student para variables independientes donde se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa (valor  $p < 0,05$ ).



Gráfica 1

El paciente P6x debido a que se contabilizó el producto enriquecido por citometría pero no en médula entera, no se incluyó el resultado obtenido en la validación, pero mostró un porcentaje de 3,09% en muestra enriquecida (esto permitió el hallazgo de una alteración citogenética no presente en el pellet, ver adelante).

El P7x y P10x no se contabilizaron por citometría como se describió anteriormente.

Del P14x se contó la celularidad plasmocitaria en médula entera pero debido a que la muestra restante era insuficiente no fue posible contabilizar el producto enriquecido por lo que no se incluyó el resultado en la validación.

## 5.2.Comparación por FISH de pellet vs producto enriquecido

Se incluyeron 12 de las 14 muestras para comparar por FISH, dado que dos de ellas no pudieron ser enriquecidas, como se mencionó previamente (P11 y P12).

De las 12 muestras enriquecidas, en 4 de ellas se evidenciaron alteraciones citogenéticas en el FISH sobre el producto enriquecido que no fueron detectadas en el FISH sobre el pellet. Tres de ellas fueron con compromiso IgH (Figura 1) y una con delección p53 (Figura 2).

De los 8 restantes, 7 de ellos no mostraron alteraciones específicas en ninguna de las dos técnicas mientras que en 1 se detectó delección p53 en el FISH sobre pellet citogenético. En este último no contamos con la posibilidad de realizar el FISH sobre el producto enriquecido dado que la muestra era insuficiente por lo que no se incluye en el análisis.

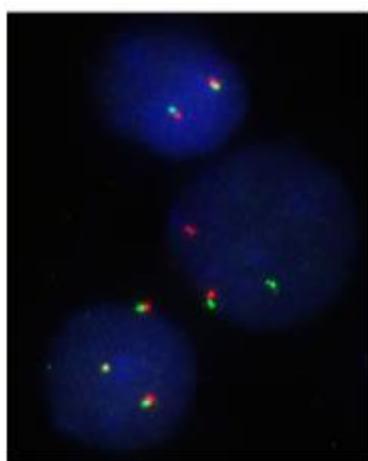


Figura 1. Compromiso IgH

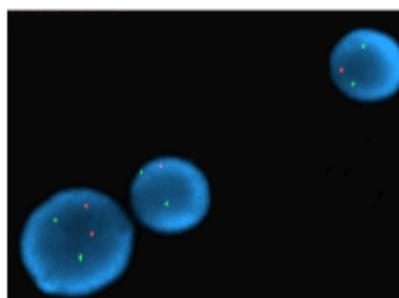


Figura 2. Compromiso p53

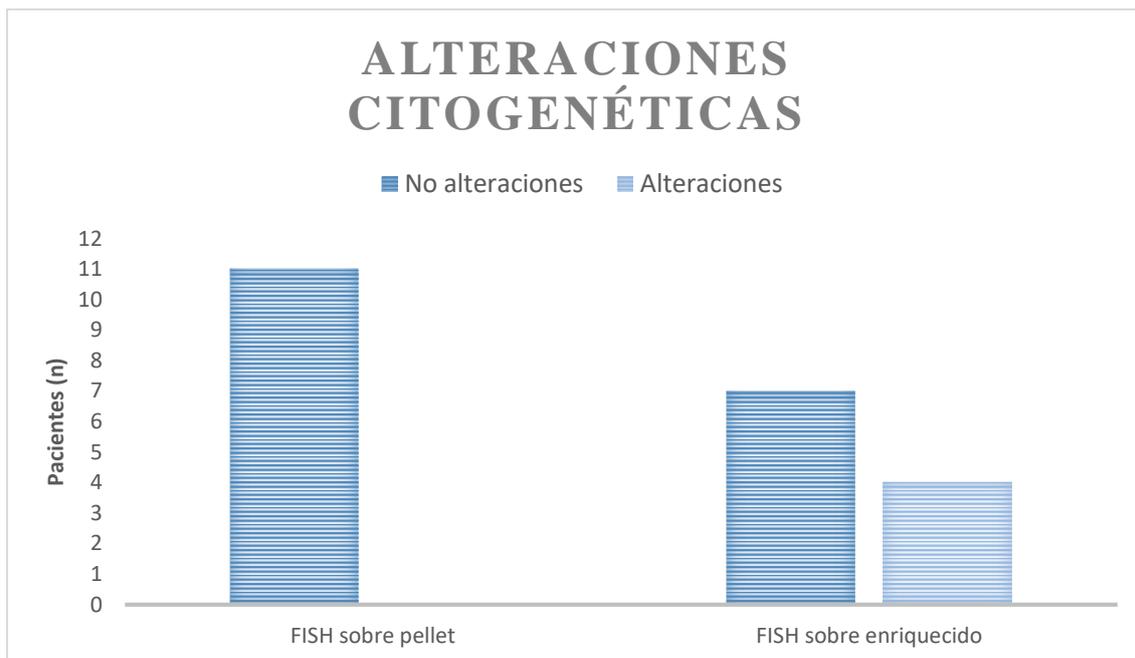


Gráfico 2

## 6. Conclusión

Durante la investigación, se encontraron varias dificultades al momento de manipular muestras de distintos centros. La principal fue conseguir disponibilidad del citómetro. Las instituciones participantes colaboraron sistemáticamente con el proyecto, pero no se pudo realizar el inmunofenotipo en algunos casos específicos, detallados previamente, porque la demora en la disponibilidad del citómetro (correspondió a fines de semana) perjudicó el análisis de las muestras que perdieron viabilidad para ser marcadas.

Los resultados de la validación de la técnica de enriquecimiento celular (selección negativa) fueron analizados mediante Test de Student para variables independientes donde se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa (valor  $p < 0,05$ ) entre el porcentaje de células plasmocitarias halladas por citometría en los preparados de médula entera y el hallado en el producto enriquecido, habiendo mayor proporción en el segundo grupo. Con esto podemos concluir que la implementación del enriquecimiento celular aumenta el porcentaje de celularidad plasmocitaria, al eliminar otros tipos de células, incrementando así la posibilidad diagnóstica de MM al momento de realizar el FISH sobre el producto enriquecido.

Con respecto a la comparación de hallazgos de alteraciones, de las 12 muestras enriquecidas, 11 no mostraron alteraciones en el FISH sobre el pellet citogenético. En cuanto a la muestra

restante, se evidenció una delección p53, no siendo posible realizar la comparación con el FISH sobre el producto enriquecido dado que la muestra fue insuficiente.

Al analizar el FISH sobre el producto enriquecido se evidenciaron 4 alteraciones citogenéticas que no se observaban en el FISH sobre pellet citogenético.

Por lo tanto, se concluye que, de 11 pacientes sin alteraciones en la técnica habitual, 4 de ellos presentaban alteraciones al realizar el FISH sobre el producto enriquecido. De esta forma, estos 4 pacientes no hubieran sido contemplados por el Fondo Nacional de Recursos para la financiación del bortezomib, que incluye la implementación de tratamientos de alto costo con indicaciones específicas como la delección p53 o el compromiso de IgH.

No se realizaron tests estadísticos específicos para esta comparación, dado que una de las clases (alteraciones sobre pellet) no mostró alteraciones (valor 0). La única muestra que mostró una alteración en el pellet, no pudo ser comparada por no haber sido posible evaluar el porcentaje en el enriquecimiento. De esta forma se realiza una descripción de los hallazgos.

Frente a estos resultados se observa una tendencia que muestra que el enriquecimiento celular (selección negativa) optimizaría el diagnóstico por FISH de pacientes portadores de MM.

Esta tendencia ya fue observada en el estudio previo realizado por sorting.

En relación al N utilizado en la investigación se puede encontrar como desventaja que es una cantidad pequeña de pacientes para considerar una nueva técnica diagnóstica. Considerando que estamos ante una patología en la que se estima una incidencia en Uruguay de 120 casos anuales, promedialmente 10 casos nuevos al mes, se obtuvieron 14 pacientes en un periodo de 3 meses contando únicamente con la colaboración de 3 instituciones prestadoras de servicio de salud en Montevideo, quedando por fuera de la investigación el resto de los centros de salud de Montevideo y el interior del país. Por lo tanto, el N obtenido durante la investigación es bueno en relación a las posibilidades que se presentaban.

De todas maneras, estamos frente a un resultado alentador en relación a optimizar el valor predictivo positivo del FISH en el MM, que nos permite incorporar esta técnica a la práctica cotidiana protocolizándola en nuestro laboratorio.

Además, este estudio podría tomarse como punto de partida para próximas investigaciones donde se puedan incluir un mayor número de pacientes con el fin de emplear tests diagnósticos

que evalúen numéricamente la sensibilidad entre cada técnica. A su vez se podría realizar una comparación entre el gold estándar (selección positiva, sorting) y la selección negativa para proporcionarle mayor validez.

## 7. **Bibliografía**

1. Landgren O. Seminars in Oncology Combination therapy for fit ( younger and older ) newly diagnosed multiple myeloma patients : Data support car fi lizomib , lenalidomide , and dexamethasone independent of cytogenetic risk status. Semin Oncol [Internet]. Elsevier; 2016;43(6):703–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.11.008>
2. Kishimoto RK, de Freitas SLVV, Ratis CA, Borri D, Sitnik R, Velloso EDRP. Validation of interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH) for multiple myeloma using CD138 positive cells. Rev Bras Hematol Hemoter [Internet]. Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular; 2016;38(2):113–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.01.005>
3. Griffiths A, Miller H, Suzuki D, Lewontin R, Gelhart W. Genética. 7ª ed. Madrid: McGraw - Hill, Interamericana; 2002.
4. Blade J, San Miguel JF, Gammapatias monoclonales. En: Rozman C, Lopez A. Farreras Rozman medicina interna. 17ª ed. Barcelona: elsevier; 2012. 1619- 1628.
5. Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL. Hematología Clínica. Quinta edición. Madrid-España: An Elsevier Imprint; 2006.
6. Curuchet M del C, Kusminsky G, Labanca V, Orlando S, Quiorga L, Sanchez Avalos JC, et al. Mieloma Múltiple. Soc Argentina Hematol.
7. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins y Cotran Patología estructural y funcional. 8ª ed. Barcelona : Elsevier España; 2010.
8. Reyes NDL, Monserrat-coll J, Martínez-sánchez M V, Campillo JA, Periago A, González C, et al. Artículo de revisión /D FLWRPHWUtD GH ÀXMR HQ HO HVWXGLR GH ODV GLVFUDVLDV GH FpOXODV plasmáticas. Rev Hematol. 2011;12(2):90–8.
9. Lin P, Editor M, Preffer FI. Introduction to Multiple Myeloma Special Issue : The Flow Cytometric Detection of Minimal Residual Disease. 2016;10:9–10.
10. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Litzow MR, Henderson KJ, et al. in myeloma patients treated with high-dose therapy. 2017;106(8):2837–41.

11. Stella F, Pedrazzini E, Agazzoni M, Ballester O, Stella F, Pedrazzini E, et al. Cytogenetic Alterations in Multiple Myeloma : Prognostic Significance and the Choice of Frontline Therapy Cytogenetic Alterations in Multiple Myeloma: Prognostic Significance and the Choice of Frontline Therapy. 2015;7907(November).
12. Sonneveld P, Lonial S, Usmani S, Siegel D, Anderson KC, Donk NWCJ Van De, et al. Perspectives Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics : a consensus of the International Myeloma Working Group. 2017;127(24):2955–63.
13. Rack K, Vidrequin S, Dargent J. Genomic profiling of myeloma : the best approach , a comparison of cytogenetics , FISH and array-CGH of 112 myeloma cases. 2016;82–6.
14. Multiple RH, Marrow B. This document is available at [www.stemcell.com/PIS](http://www.stemcell.com/PIS) RosetteSep™ Human Multiple Myeloma Cell Directions for Use – RosetteSep™ Protocol. :2–
15. Fonseca R, Blood EA, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Bailey RJ, et al. Myeloma and the t ( 11 ; 14 )( q13 ; q32 ); evidence for a biologically defined unique subset of patients. 2017;99(10):3735–4

## **8. Agradecimientos**

Agradecemos en primer lugar al Hospital Maciel, Círculo Católico y CASMU por permitirnos llevar a cabo esta investigación. A su vez, queremos agradecer al Departamento de Citogenética de Facultad de Medicina por brindarnos los recursos, materiales necesarios y su buena disposición durante el proceso.

Además, hacer especial mención a la Dra. Cecilia Canessa, Lic. Aurora Daners, del Laboratorio de Citometría del CASMU; Lic. Jorge Souto, Dra. María Noel Spangenberg, asistentes del Departamento de Genética, Dra. Camila Guidali, residente de Hematología del Hospital Maciel y Dra. Carolina Sosa, citometrista del servicio de Hematología del Hospital Maciel, por el apoyo durante la investigación.

Para finalizar, queremos expresar nuestro agradecimiento a Valentina Colistro docente del departamento de Métodos Cuantitativos y Sebastián Toledo docente del departamento de Bioética.

## **9. ANEXO A: Consentimiento informado**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

El proyecto “Validar técnicas de enriquecimiento celular por selección negativa y comparar resultados de FISH para caracterización de los pacientes con Mieloma Múltiple” tiene como objetivo poner a punto una técnica que mejora el diagnóstico de Mieloma Múltiple (MM). El proyecto se llevará a cabo en el Departamento de Genética de la Facultad de Medicina.

Se incluirán pacientes de instituciones públicas y privadas, con probable diagnóstico de MM entre junio y agosto de 2017.

No se realizarán maniobras invasivas adicionales a las necesarias para el diagnóstico.

Si está de acuerdo el abajo firmante

#### **Declara:**

- Haber recibido la información adecuada acerca del proyecto de investigación al cual presto mi colaboración.
- Que fui seleccionado para ser incluido en este proyecto por tener sospecha diagnóstica de MM.
- Haber sido informado que la extracción de una muestra de médula ósea es parte habitual del proceso diagnóstico y de seguimiento de la enfermedad.
- Que mi participación en dicha investigación puede arrojar resultados que aumenten el conocimiento científico sobre el diagnóstico, evolución y/o tratamiento de mi enfermedad.
- Que la duración de este proyecto es hasta octubre de 2017.
- Que he sido informado de las personas que intervienen en la investigación, a las cuales puedo contactar para aclarar preguntas durante o después de mi participación.
- Teléfono Departamento de Genética- Facultad de Medicina: 29243414. Interno. 3469

Encargadas de investigación:

-Faride Uturbey: 099 734 636. Email: farideuturbey@gmail.com

-Ana Lia Sanguinetti: 099 295 425. Email: analia.sang@gmail.com

- Que he comprendido que mi participación es voluntaria y que puedo abandonarla en cualquier momento sin inconveniente ni explicación de causa, ni perjuicio por mi parte y no afectará la atención médica que me corresponda recibir en el futuro.
- Que el investigador puede retirarme del estudio si es necesario.
- Que mi participación es anónima, que los datos recabados son confidenciales y se protegerá mi intimidad.
- Que si es de mi interés podré acceder a los resultados posteriormente.
- Que no hay retribución económica por participar.
- Que dicha investigación ha sido aprobada por el comité de ética en la institución donde me asisto y en caso de no contar con él, por el comité de ética de la Facultad de Medicina.
- Que he podido leer detenidamente el texto del consentimiento antes expuesto y que lo firmo en forma consciente y libre en la fecha de hoy.
- Que he tenido el plazo prudencial para tomar una decisión y poder consultarlo con terceros.
- Que he podido realizar todas las preguntas que estime convenientes.

Firmo por lo tanto, este documento como expresión de mi libre conformidad.

#### **PACIENTE**

Nombre \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

CI \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

#### **TESTIGO**

Nombre \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

CI \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

**INVESTIGADOR PRINCIPAL**

Nombre\_\_\_\_\_

Firma\_\_\_\_\_

CI\_\_\_\_\_

Fecha\_\_\_\_\_

Laboratorio de Citogenética. Dpto de Genética. Facultad de Medicina. UDELAR.  
Gral. Flores 2125  
29243414 Int. 3469/3468

## **10. ANEXO B: Protocolo FISH y de cultivo y detención**

### Protocolo de FISH

#### Preparación de muestras para FISH

1. Registro.
2. Traspasar la muestra a tubo cónico.
3. Centrifugar a 2500 rpm durante 10 min.
4. Extraer capa de blancos y traspasarla a un nuevo tubo cónico previamente rotulado.
5. Agregar 10 mL de solución hipotónica a 37° C y resuspender bien haciendo espuma. Dejar temperatura a 37° C durante 20´.
6. Agregar 4 -5 gotas de fijador 3:1 y resuspender.
7. Centrifugar 10´ y retirar el sobrenadante hasta 1 cm por encima del pellet.
8. Agregar 1 mL de 3:1 lentamente por las paredes del tubo y resuspender suavemente, luego agregar 4 a 6 mL más (según el tamaño del pellet).
9. Dejar 15´ a temperatura ambiente.
10. Centrifugar 5´ y retirar el sobrenadante.
11. Agregar 4 cm de 3:1 y resuspender.
12. Centrifugar 5´ y retirar el sobrenadante.
13. Hacer los extendidos tirando 2 gotas sobre el porta objetos. Los preparados se dejan en estufa a 37° C.
14. Repetir este paso hasta que el sobrenadante quede claro.
15. Agregar 1 mL de 3:1 (dependiendo de la cantidad de pellet)

#### Preparación de reactivos

Utilizamos un kit comercial (Dako) y sondas comerciales (Vysis) utilizando diluciones de las mismas en aquellas que sea necesario.

Tampón de lavado

Diluir 1/20 en agua destilada. (solución 1).

Formaldehído 37%

Diluir 5ml en 45 ml de solución tampón de lavado

Alcoholes

Prepara tres soluciones de alcohol, 70%. 90% y 100%

Tampón astringente

Diluir 1/20 en agua destilada (solución 2).

## DÌA 1

1. Sumergir las láminas en formaldehído 37% durante 2 min.
2. Traspasar las láminas a un koplín con solución 1 y dejarlas durante 5 min. Repetir este paso en solución 1 nueva 5min.
3. Deshidratar las láminas en alcohol 70%, 90% y 100% 2 min en cada uno.
4. Dejar secar en posición vertical.
5. Hibridizar con la sonda correspondiente. En oscuridad.
6. Cubrir las láminas con cubre objetos.
7. Programar el HyBrite: desnaturalización a 82° C durante 5 min, hibridación a 45° C de 14-20 horas.
8. Colocar las láminas y correr el programa.

## DIA 2

Todos los pasos deben realizarse en oscuridad

1. Preparar 2 koplín con solución 2.
2. Colocar uno de ellos en baño a 65° C.
3. Retirar las láminas de Hybrite y sumergirlas en koplín con solución 2 ( a temperatura ambiente) el tiempo necesario para que se desprendan los cubre objetos.
4. Sumergir las láminas en koplín a 65° C durante 10 min.
5. Traspasar las láminas a koplín con solución 1 durante 4 min a temperatura ambiente. Repetir en solución 1 nueva durante 4 min.
6. Deshidratar las láminas en alcohol 70%, 90% y 100% durante 2 min en cada uno.
7. Dejar secar en posición vertical.
8. Aplicar 5 µl de DAPI.
9. Guardar láminas en freezer durante 24 hrs.
10. Observar láminas al microscopio.

## Protocolo de cultivo y detención

### Cultivo

1. Registro.
2. En la cámara de flujo laminar previamente limpia con alcohol 70°, se traspasa la muestra a tubo cónico.
3. Se toma aproximadamente 0,5 ml de la muestra y se realiza el conteo celular.
4. Se realiza el cultivo en 9 ml del medio adecuado (MarrowMax) en frascos de cultivo. De ser necesario agregar estimulantes (por ej, TPA).
5. Dejar en estufa a 37° C el tiempo necesario según patología.

### Detención

1. Agregar a cada caj 10 µl dr Bret y 0,5 mL de colchicina. Se deja durante 1 h a 37° C.
2. Traspasar la muestra a tubo cónico previamente rotulado.
3. Centrifugar durante 10´ y sacar el sobrenadante.
4. Agregar 10 mL de solución hipotónica a 37° C y resuspender haciendo espuma. Dejar temperatura a 37° C durante 20´.
5. Agregar 4 -5 gotas de fijador 3:1 y resuspender.
6. Centrifugar 10´ y retirar el sobrenadante hasta 1 cm por encima del pellet.
7. Agregar 1 mL de 3:1 lentamente por las paredes del tubo y resuspender suavemente, luego agregar 4 a 6 mL más (según el tamaño del pellet).
8. Dejar 15´ a temperatura ambiente.
9. Centrifugar 5´ y retirar el sobrenadante.
10. Agregar 4 cm de 3:1 y resuspender.
11. Centrifugar 5´ y retirar el sobrenadante.
12. Agregar 1 mL de 3:1 (dependiendo de la cantidad de pellet).

## Protocolos de extendido y bandedo

### Extendidos

1. Limpiar y rotular los portaobjetos a utilizar. Tirar 2 gotas del preparado sobre el portaobjetos a una distancia de 10 a 20 cm.
2. Dejar secar a temperatura ambiente durante unos minutos, o con ayuda de un secador (en condiciones de alta humedad).

3. Procurar almacenar el pellet en un tubo eppendorf rotulado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Bandeo G

Para esta técnica se utilizan preparados envejecidos durante 1 semana o en estufa a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 30´.

1. Preparar 3 koplíng:
  - a. A: 25 mL de Suero fisiológico (NaCl 0,9 g/mL).  
25 mL de Solución Fosfato.  
100  $\mu\text{L}$  de Tripsina en solución. (10X)
  - b. B: 40 mL de Suero fisiológico.
  - c. C: 45 mL de buffer Sorensen.  
5 mL de Giemsa.
2. Sumergir los preparados en el koplíng A por 1 minuto.  
Se recomienda comenzar probando el tiempo de digestión con 1 preparado de cada paciente y fijar el tiempo óptimo de bandeo.
3. Lavar los preparados en el koplíng B.
4. Sumergir los preparados en el koplíng C durante 2´ o más (controlar la tinción en microscopio)

Se recomienda cambiar la Solución del Koplíng C cada 3 tandas de bandeo.

## **11. ANEXO C: Protocolo de selección negativa**

Material necesario para la técnica

Material por muestra

- 2 tubos cónicos de tapón azul
- 5 etiquetas
- Gradilla
- 1 Eppendorf
- Hoja de registro para citometría de flujo
- Pipetas de 1 ml y 100  $\mu$ L
- Puntas de 1000  $\mu$ L y 100  $\mu$ L
- Contenedor de desechos
- Jeringa y aguja para el ficoll
- Pipeta Pasteur para dispensar la muestra sobre el ficoll

Material eléctrico

- Centrífuga
- Reloj
- Baño de termostato a 36°

Reactivos

- Reactivo de RosetteSep
- Reactivo de PBS
- Reactivo Ficoll (envuelto con papel de plata)
- Fijador 3/1
- KCl hipotónico
- PBS + SBF 2%

Técnica

1. Añadir 50  $\mu$ L de reactivo RosetteSep por mL de muestra directamente de la muestra de la médula y mezclar bien
2. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos
3. Si se trabaja un volumen de 1 mL de muestra de M.O agregar otro mL de PBS + SBF 2% (suero bovino fetal) directamente al mismo tubo que contiene la mezcla de la muestra inicial. Volver a mezclar bien. Recordar que conviene cambiar la muestra a un tubo de 10 mL con respecto al volumen a trabajar de muestra de M.O.
4. En un tubo cónico poner Ficoll en un tubo cónico
5. Dispensar cuidadosamente la muestra sobre el Ficoll procurando que la muestra no se mezcle con el reactivo (aplicar la pipeta Pasteur apoyada sobre la pared y la dejar deslizar la muestra poco a poco)
6. Centrifugar 20 minutos a 1500 rpm
7. Recuperar las células plasmáticas de la interfase formada

8. Las células conseguidas y separadas se colocarán en un tubo cónico y lavaremos con 5 mL de PBS + SBF 2%
9. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm
10. Decantar
11. Añadir 1 ml de PBS + SBF 2% y de este volumen pasar a marcadores 100  $\mu$ L.

#### Fijación para FISH

1. Agregar al volumen restante 5 mL de solución hipotónica e incubar a 37°C por 20 minutos
2. Añadir lentamente gota a gota solución 3/1 y centrifugar a 800 rpm por 10 minutos
3. Descartar sobrenadante y resuspender en solución 3/1
4. Realizar los preparados en porta objetos convencionalmente
5. Considerar que suele haber poco núcleos y concentrar bien (1 mL)