



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO

↳ Instituto de Ciências da Saúde

β 2-MICROGLOBULINA NOS DOENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública

Por

Maria da Conceição Pinto de Magalhães

Setembro de 2012



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO

↳ Instituto de Ciências da Saúde

β 2-MICROGLOBULINA NOS DOENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública

Por Maria da Conceição Pinto de Magalhães

Sob orientação de:

Professor Dr^o João Tiago Guimarães

Dr^a Maria José Teles

Setembro de 2012

RESUMO:

As Gamapatias Monoclonais resultam de uma expansão clonal de células B que produzem e secretam imunoglobulinas monoclonais (Kappa ou Lambda), ou fragmento dessa chamada proteína M. O diagnóstico é baseado na combinação de características clínicas, laboratoriais e imagiológicas.

A avaliação do prognóstico é mandatória para selecção da melhor estratégia terapêutica, especialmente quando se decidem tratamentos com elevada morbidade e/ou mortalidade, como transplante de medula óssea. Um bom sistema de estadiamento é importante na decisão terapêutica. A β 2-m sérica constitui um bom marcador para o prognóstico do Mieloma Múltiplo.

A β 2-m pode ser doseada por nefelometria no soro dos doentes. Actualmente passou a ser possível a sua detecção nos plasmócitos por imunofenotipagem por Citometria de Fluxo.

Este estudo tem como principal objectivo avaliar se existe associação da β 2-m em doentes com Mieloma Múltiplo por dois métodos: nefelometria e citometria de fluxo.

Foi realizado um estudo retrospectivo destes doentes, em que foram estudadas 88 amostras. Doseou-se a β 2-m sérica por nefelometria e a β 2-m na superfície dos plasmócitos por citometria de fluxo.

Os resultados obtidos foram posteriormente analisados estatisticamente onde se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os dois métodos nas amostras com plasmócitos anormais ($p < 0,001$), quando efetuada a correlação de Pearson, obteve-se uma correlação negativa fraca em todas as amostras ($p < -0,144$).

A β 2-m celular torna-se um marcador adicional, muito importante, de prognóstico no Mieloma Múltiplo.

Palavras-chave: Citometria de fluxo, Nefelometria, β 2-microglobulina, Gamapatias Monoclonais, Mieloma Múltiplo.

ABSTRACT:

Monoclonal Gammopathy results of a B cell clonal expansion that produces and secretes monoclonal immunoglobulins or a immunoglobulin fragment called M protein. The diagnosis is based on the combination of clinical, laboratorial and immagiological characteristics.

In order to get the best therapeutic strategy a prognostics evaluation is mandatory, especially when the chosen treatments have rates of morbidity and mortality, like, for example, bone marrow transplants.

A good staging system is essential for the therapeutic decision. The beta-2 microglobulin (β 2-m) constitutes a good marker for the Multiple Myeloma prognostic.

β 2-m can be dosed by Nephelometry in the patient's serum. Nowadays it is possible to detect β 2-m in the plasma cells by Immunophenotyping by Flow Citometry.

The objective of this study is to verify if there is an association of β 2-m in patients with Multiple Myeloma with two distinct methods: Nephelometry and Flow Citometry.

Retrospectively we studied 88 patients samples. The β 2-m was dosed in the serum by Nephelometry and determined in the surface of the plasma cells by Flow Citometry..

The obtained results were then statistically analysed when there were statistically significant differences between the two methods in the samples with abnormal plasma cells ($p < 0,001$), in Pearson correlation were obtained a weak negative correlation in all samples ($p < -0.144$).

β 2-m determined in the surface of the plasma cells become an important additional prognostic marker.

Key-words: Flow Citometry, Nephelometry, β 2-microglobulin, Monoclonal Gammopathy, Multiple Myeloma.

AGRADECIMENTOS:

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a ajuda de algumas pessoas, que merecem o meu sincero agradecimento.

À Universidade Católica do Porto, pela abertura e incentivo para a conclusão do mestrado, quando por dificuldades externas quase tive que desistir.

Ao meu orientador Prof. Drº João Tiago Guimarães, director do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de S. João, pelo apoio e incentivo prestado.

À minha co-orientadora Drª Maria José Teles, pela disponibilidade e ajuda constante na leitura crítica da tese.

À Prof. Drª Elisabete Ramos e a Drª Joana Teixeira pela ajuda no tratamento estatístico dos dados.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Citometria, Drª Cristina Marques, Técnicos Cláudio Reis e Sónia Silva, pela ajuda que me proporcionaram durante este projecto.

Aos meus filhos Mafalda, Tiago e Rui pela paciência.

MUITO OBRIGADA

ABREVIATURAS:

APC – Alofocianina (do inglês Allophycocyanin)

APC-H7 – Alofocianina H7 (do inglês Allophycocyanin- H7)

β2-m – β2-microglobulina

CD – Grupo de Diferenciação (do inglês Cluster of Differentation)

FISH – Hibridização por fluorescência in situ (do inglês Fluorescence in situ hybridization)

FITC – Isotiocinato de Fluoresceína (do inglês Fluorescein Isothiocyanate)

FSC – Tamanho (do inglês Forward Scatter Light)

Ig – Imunoglobulinas

IMWG – International Myeloma Working Group

ISS – International Staging System

K3- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético- tripotássico

LDH – Desidrogenase Láctea

Mg/dl – Miligramas por decilitro

MGUS – Gamopatias Monoclonais de Significado Indeterminado (do inglês Monoclonal Gamopathy Underterminated Signification)

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade

MM – Mieloma Múltiplo

MO – Medula Óssea

Pe – Ficoeritrina (do inglês Phycoerythrin)

Pe- Cy-7 – Ficoritrina Cianina 7 (do inglês Phycoerythrin- Cyanin 7)

PerCP – Proteína Peridina Clorofila (do inglês Peridin Clorophyl Protein)

PerCP-Cy 5.5 – Proteína Peridina Clorofila Cianina 5.5 (do inglês Peridin Clorophyl Protein – Cyanin 5,5)

POEMS – Polineuropatia, Organomegalia, Endocrinopatia, Proteína Monoclonal, Lesões cutâneas (do inglês Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrynophaty, Monoclonal Protein, Skin Lesions)

Rpm – rotações por minuto

SSC – Complexidade (do inglês Side Scatter Light)

ÍNDICE

- RESUMOpág. I
- ABSTRACTpág. II
- AGRADECIMENTOS.....pág III
- ABREVIATURAS.....pág. IV
- ÍNDICEpág. VI
- ÍNDICE DE FIGURAS E
TABELAS.....pág. VII
- INTRODUÇÃOpág. 1
- OBJECTIVO.....pág. 9
- MATERIAIS E MÉTODOS.....pág.13
- RESULTADOS.....pág.23
- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....pág.33
- BIBLIOGRAFIA.....pág.37

INDICE DE FIGURAS E TABELAS

- FIGURA 1a: Dot-plot SSC/FSC.....pág.18
- FIGURA 1b: Dot-plot SSC/CD45.....pág.18
- FIGURA 2: Dot-plot SSC/CD45.pág.18
- FIGURA 3: Dot-plots CD56/SSC.....pág.19
- FIGURA 4: Dot-plot Kappa/ Lambda.....pág.19
- FIGURA 5: Dot-plot CD19/SSCpág.19
- FIGURA 6: Plasmócitos marcados a rosa e intensidade média de fluorescência da β 2-m nestas células.....pág.20
- FIGURA 7: Plasmócitos normais marcados a rosa e intensidade média de fluorescência da β 2-m nestas células.....pág.21

- TABELA 1: Estadiamento de Durie & Salmon Modificado.....pág.6
- TABELA 2: International Staging System.....pág.6
- TABELA 3: Distribuição por sexo nas patologias plasmocitárias e nos normais.....pág.25
- TABELA 4: Estatística descritiva das idades das amostras analisadas.....pág.26
- TABELA 5: Estatística descritiva das idades nas amostras patológicas e normais.....pág.26
- TABELA 6: Distribuição por faixa etária nas discrasias plasmocitárias e normais.....pág.27
- TABELA 7: Cadeias kappa e lambda e CD56 nos MM.....pág.27
- TABELA 8: Distribuição da β 2-m sérica e creatinina nos MM E GM... pág.28
- TABELA 9: Comparação da β 2-m celular e sérica nos casos de MM, GM e normais..... pág.31
- TABELA 10: Correlação entre a β 2-m celular e sérica em todas as amostras analisadas.....pág.32
- TABELA 11: Correlação entre a β 2-m celular e sérica nos MM, GM e normais.....pág.32

As Gamopatias Monoclonais resultam de uma expansão clonal de células B que produzem e secretam imunoglobulinas (Ig) monoclonais (Kappa ou Lambda) ou fragmento dessa chamada proteína M (1). Normalmente, a maturação dos plasmócitos faz-se produzindo anticorpos em resposta ao antigénio para o qual a Ig de superfície é dirigida. Nas discrasias de plasmócitos perde-se o controlo deste processo desencadeando uma gamapatia monoclonal.

Neste grupo de patologias incluem-se o Mieloma Múltiplo (MM), o Plasmacitoma solitário, as Gamopatias Monoclonais de Significado Indeterminado (MGUS), a Macroglobulinémia de Waldenström's, a Amiloidose Primária e o Síndrome de POEMS (polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, proteína monoclonal, lesões cutâneas).
(1)

O *Internacional Myeloma Working Group* (IMWG) e a Clínica Mayo estabeleceram critérios idênticos para o diagnóstico destes síndromes proliferativos: (2,3,4)

- MGUS (estabelece-se pela presença de 3 critérios):
 - Imunoglobulinas monoclonais no soro <30g/l;
 - Plasmócitos patológicos na medula óssea (MO) <10%;
 - Ausência de manifestações clínicas associadas a discrasias de plasmócitos como hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas líticas.
- MM indolente ou assintomático (estabelece-se pela presença de 2 critérios):
 - Imunoglobulina monoclonal IgG ou IgA $\geq 30\text{g/l}$ e/ou Plasmócitos patológicos na MO $\geq 10\%$;
 - Ausência de manifestações clínicas associadas a discrasias de plasmócitos como hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas líticas.
- MM (estabelece-se pela presença de 3 critérios):
 - Plasmócitos patológicos na MO $\geq 10\%$;
 - Presença de Imunoglobulina monoclonal no soro e/ou na urina (excepto no caso dos MM não secretores ou hipossecretores);
 - Presença de manifestações clínicas associadas a discrasias de plasmócitos como hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas líticas.
- Macroglobulinemia de Waldenström's (estabelece-se pela presença de 2 critérios):

- Gamapatia monoclonal IgM independente da quantidade de Ig monoclonal;
- Infiltração linfoplasmocítica da MO \geq a 10% com um fenótipo típico (IgM superfície +, CD5+/-, CD10-, CD19+, CD20+, CD23-).
- Plasmacitoma Solitário (estabelece-se pela presença de 4 critérios):
 - Biopsia óssea que comprove lesão solitária do osso ou tecido mole com evidência de plasmócitos patológicos;
 - Citologia da MO normal sem plasmócitos patológicos;
 - Estudo imagiológico do esqueleto axial normal, exceptuando a lesão óssea solitária;
 - Ausência de manifestações clínicas associadas a discrasias de plasmócitos como hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas líticas.
- Amiloidose primária (estabelece-se pela presença de 4 critérios):
 - Presença de uma manifestação sistémica associada a deposição de substância amilóide (como envolvimento renal, hepático, cardíaco, gastro-intestinal, ou de nervos periféricos);
 - Coloração de vermelho de Congo positiva para substância amilóide;
 - Evidência de que a substância amilóide é uma Ig intacta ou fragmentada de cadeias leves ou pesadas (por coloração imuno-histoquímica, sequenciação ou outro método);
 - Evidência de doença proliferativa monoclonal de plasmócitos (proteína M sérica ou urinária, razão anormal entre as cadeias leves ou plasmócitos patológicos na MO).
- Síndrome de POEMS (estabelece-se pela presença de 3 critérios):
 - Presença de plasmócitos patológicos;
 - Neuropatia periférica;
 - Presença de, pelo menos, um dos seguintes critérios: lesões ósseas, doença de Castleman, organomegalia, endocrinopatia (exceptuando diabetes mellitus ou hipertiroidismo), edema, lesões cutâneas típicas e papiledema.

O MM representa cerca de 1% dos tumores malignos e 10-15% das neoplasias hematológicas. Esta patologia é mais comum nos homens do que nas mulheres (1,4:1) aumentando progressivamente a incidência com a idade, sendo que 90% dos casos ocorrem a partir dos 50 anos e a média de idades ao diagnóstico é de 70 anos.(1)

O diagnóstico é baseado na combinação de características clínicas, laboratoriais e imagiológicas: (2,4,5).

Clínicas:

- Sintomas e sinais de anemia;
- Sintomas e sinais de hipercalcemia;
- Insuficiência renal;
- Lesões ósseas líticas.

Laboratoriais:

- Hemograma com observação de esfregaço sanguíneo;
- Doseamento sérico do cálcio, creatinina, β 2-m e Desidrogenase Láctica (LDH);
- Doseamento de proteínas no soro e na urina;
- Electroforese das proteínas séricas e urinárias e imunofixação;
- Doseamento das imunoglobulinas e cadeias leves livres;
- Citologia, biópsia e imunofenotipagem da MO;
- Técnicas de citogenética convencional e/ou FISH (*Fluorescence in situ hybridization*)

Exames Imagiológicos:

- Radiografia do esqueleto axial;
- Ressonância magnética ou tomografia computadorizada do esqueleto axial.

As consequências fisiopatológicas da evolução desta doença incluem: destruição óssea, falência renal, supressão da hematopoiese e risco aumentado de infecções. (5,6)

A avaliação do prognóstico é mandatória para selecionar a melhor estratégia terapêutica, especialmente quando se decidem tratamentos com elevada morbidade e/ou mortalidade, como o transplante de MO. Um bom sistema de estadiamento permite a identificação de doentes em risco de morte precoce. (7,8)

O sistema de estadiamento proposto por Durie & Salmon (1975), amplamente utilizado, baseia-se na combinação de factores (hemoglobina, cálcio sérico, componente monoclonal, comprometimento ósseo e creatinina sérica) que se correlacionam com a massa tumoral (1,2,4,6). (tabela 1)

ESTÁDIOS	CRITÉRIOS
ESTADIO 1	- Níveis baixos de proteína M (IgG<50g/l, IgA<30g/l), proteínas de Bence-Jones na urina (< 4g/l); - Ausência de lesões ósseas solitárias; - Hemoglobina, cálcio sérico e imunoglobulinas normais.
ESTADIO 2	-Valores gerais entre estadio 1 e 3
ESTADIO 3: qualquer um ou mais do que um dos seguintes critérios	- Lesões ósseas líticas várias e em estado avançado; - Hemoglobina baixa e cálcio sérico aumentado.

Tabela 1: Estadiamento de Durie & Salmon Modificado.

Cada um destes estadios pode ser subclassificado de acordo com a função renal:

- A: creatinina sérica < 2mg/dl
- B: creatinina sérica \geq 2mg/dl.

Atualmente, segundo as recomendações da Organização Mundial de Saúde (2008), e do IMWG passou a ser utilizado o *International Staging System* (ISS) (1,2,3,6,7,8,9). (Tabela 2), que define muito bem o prognóstico utilizando como critérios a determinação de β 2-m e albumina.

ESTÁDIOS	CRITÉRIOS
ESTADIO 1	- β 2-m sérica <3,5mg/l -Albumina sérica 3,5g/dl
ESTADIO 2	- Nem estadio 1 nem 3
ESTADIO 3	- β 2-m sérica > 5,5mg/l

Tabela 2: International Staging System.

Esta classificação define 3 estadios para o prognóstico:

- Estadio 1: com uma β 2-m sérica baixa e albumina normal, implica uma média de sobrevivência de 5 anos;
- Estadio 2: de prognóstico intermédio;
- Estadio 3: com uma β 2-m sérica alta determina uma média de sobrevivência inferior a 2 anos e meio.

A β 2-m pode ser doseada por nefelometria no soro dos doentes constituindo um bom marcador para o prognóstico do MM (10). Níveis elevados desta proteína estão associados a um mau prognóstico. A β 2-m faz parte do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) classe I estando presente em todas as células nucleadas. Esta proteína está aumentada em muitas outras patologias como, por exemplo, linfomas, insuficiência renal e infecção por VIH(11).

Actualmente, passou a ser possível a detecção da β 2-m nos plasmócitos por imunofenotipagem. A Euroflow definiu recentemente um painel para o estudo das discrasias plasmocitárias, que combina num só tubo 8 anticorpos monoclonais, com a finalidade de identificar a população de plasmócitos e ao mesmo tempo dizer se estes são normais ou patológicos, policlonais ou monoclonais e quais os anticorpos presentes ou ausentes nestas células (12).

Não está estudado o valor da determinação da β 2-m por citometria de fluxo e a sua relação com a β 2-m por nefelometria. Assim este estudo tem como principal objectivo comparar a determinação da β 2-m em doentes com MM por dois métodos: doseamento sérico por nefelometria e intensidade de expressão nos plasmócitos por citometria de fluxo. Para a análise por citometria de fluxo é necessário determinar a intensidade média de fluorescência da β 2-m de plasmócitos normais e plasmócitos mielomatosos,

Realizou-se um estudo retrospectivo de doentes com MM, desde junho de 2010 a junho de 2011 no Centro Hospitalar de S. João. O diagnóstico de MM foi estabelecido por imunofenotipagem por citometria de fluxo, pela presença de $\geq 95\%$ de plasmócitos anormais (CD38+, CD56+/-, CD19-, CD45-), não tendo sido considerados outros critérios de diagnóstico. Nestes doentes foram correlacionados os resultados obtidos de $\beta 2$ -m por dois métodos: nefelometria e citometria de fluxo, de amostras de soro e MO, respectivamente.

O estudo em questão não possui qualquer tipo de obstáculo de índole ética, dado que não implica a utilização de qualquer dado de identificação, das amostras estudadas.

Determinação da $\beta 2$ -microglobulina sérica

Para a determinação da $\beta 2$ -m sérica as amostras foram colhidas em tubo seco com gel e centrifugadas 10 minutos (min) a 3500 rotações por minuto (rpm), de acordo com o procedimento normal do laboratório. A $\beta 2$ -m foi determinada quantitativamente por imunonefelometria com partículas intensificadoras no nefelómetro da Dade-Behring Nephelometer II® da Siemens®. Nesta técnica, as partículas de poliestireno carregadas com anticorpos específicos anti $\beta 2$ -m humana, ao serem misturadas com a amostra contendo $\beta 2$ -m, formam agregados que dispersam a luz irradiada. A intensidade de luz dispersa depende da concentração da respectiva proteína na amostra. A avaliação foi feita por comparação com um padrão de concentração conhecida, após ter sido efectuado o controlo de qualidade diário. Os valores de referência utilizados no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar S. João são: 1090 $\mu\text{g/l}$ - 2530 $\mu\text{g/l}$.

Determinação da creatinina

Para a determinação da creatinina sérica, as amostras foram colhidas em tubo seco com gel ou em tubo com heparina-lítio com gel e centrifugadas 10 min a 3500 rpm, de acordo com o procedimento normal do laboratório. Foi efectuado um ensaio de cor cinético (variante do Método de Jaffé) para a determinação quantitativa da creatinina no soro no auto-analisador Olympus®, AU 5460. Nesta técnica, a creatinina forma um composto amarelo alaranjado com ácido pícrico em meio alcalino. A taxa de alteração na absorvância a 520/800nm é proporcional à concentração da creatinina na amostra. A avaliação da creatinina foi efectuada após o controlo de qualidade diário. Os valores de referência utilizados pelo laboratório são: 6-10 $\mu\text{g/l}$ (em Junho de 2010), 0,6-1,4 mg/dl

(em Julho e Agosto de 2010) e 0,6-1,1 mg/dl (a partir de Setembro de 2010 até Junho de 2011).

Citometria de fluxo:

Para imunofenotipagem por citometria de fluxo, as amostras de MO foram colhidas em tubo contendo o ácido etilenodiaminotetracético-tripotássico (K3-EDTA) como anticoagulante. Foi utilizado um painel de anticorpos, marcados com diferentes fluorocromos, de acordo com o projecto europeu “EUROFLOW”(12): CD45 – Pacific Blue, CD138 - V500-C, CD38 - Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), CD56 - Ficoeritrina (PE), β 2-m - Proteína Pericidina Chlorofila-Cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), CD19 - Proteína Pericidina Chlorofila-Cianina 7 (PE-Cy7), Kappa citoplasmático - Alofocianina (APC) e Lambda citoplasmático - Alocianina 7 (APC H7). Os anticorpos foram obtidos da *Dako*® (*Glostrup, Denmark*: CD45), da *Becton-Dickinson*® (*San José, Califórnia, USA*: CD38, CD56, β 2-m, Lambda) e *Beckman-Coulter*® (*Marseille, France*: CD19). As amostras foram preparadas utilizando o protocolo standard do Centro Hospitalar São João, de incubação e lavagem, e para a pesquisa de antigénios citoplasmáticos foi utilizado o Kit Fix&Perm, da *Invitrogen*®. A aquisição foi efectuada no citómetro BD FACS CANTO II da *Becton-Dickinson*® no programa FACS DIVA®, após o controlo diário com esferas fluorescentes de configuração, Cytometer Setup and Tracking Beads (CST), da *Becton-Dickinson*®, e analisados no programa *Infinicyt*® da *Cytognos*®. Este citómetro possui três lasers: um octógono (azul) de 488 nm para ler quatro fluorescências (FITC, PE, PerCP-Cy5.5 e PE-Cy 7), um triângulo (vermelho) de 633 nm que lê duas fluorescências (APC e APC-H7) e outro triângulo (violeta) de 405 nm que lê três fluorescências (Pacific Blue, Pacific Orange/V500-C e AmCyan). Desta forma é possível ler num só tubo oito fluorescências diferentes e os parâmetros de dispersão: tamanho e granularidade.

Para a análise por citometria foram também avaliados os resultados obtidos de amostras de MO sem patologia hematológica primária para determinação do canal médio de fluorescência da β 2-m nos plasmócitos normais.

Procedimento para preparação das amostras para imunofenotipagem:

- A partir da amostra pipetou-se 100 µl para um tubo de plástico;
- Adicionou-se os anticorpos monoclonais para pesquisa de antígenos de superfície: CD45 (5 µl), CD138 (5 µl), β2-m (5 µl), CD19 (5 µl), CD38 (10 µl) e CD56 (10 µl);
- Agitou-se e incubou-se durante 15 min à temperatura ambiente, no escuro;
- Adicionou-se 3 ml de FacsFlow® e centrifugou-se 5 min a 1500 rpm (rotações por minuto);
- Aspirou-se o sobrenadante;
- Agitou-se e adicionou-se 100 µl de reagente A do Kit Fix&Perm da *Invitrogen*®;
- Incubou-se durante 15 min à temperatura ambiente, no escuro;
- Adicionou-se 3 ml de FacsFlow® e centrifugou-se 5 min a 1500 rpm;
- Aspirou-se o sobrenadante;
- Agitou-se e adicionou-se 100 µl de reagente B do Kit Fix&Perm da *Invitrogen*® mais os anticorpos monoclonais para pesquisa dos antígenos intracitoplasmáticos Kappa (5 µl) e Lambda (5 µl);
- Incubou-se durante 15 min à temperatura ambiente, no escuro;
- Adicionou-se 3 ml de FacsFlow® e centrifugou-se 5 min a 1500 rpm;
- Aspirou-se o sobrenadante;
- Adicionou-se 500 µl de FacsFlow®;
- Agitou-se e adquiriu-se no citómetro BD FacsCANTO II®, no programa FacsDIVA®;
- A análise efectuou-se utilizando o programa Infinicyt® da *Cytognos*®.

Procedimento para análise das amostras

Nos dot-plots SSC/FSC (Granularidade/Tamanho) e SSC/CD45 (Granularidade/CD45) marcaram-se os eventos que representavam os restos celulares (figuras 1a, 1b - marcados a preto) e eliminam-se para que não interferissem na análise.

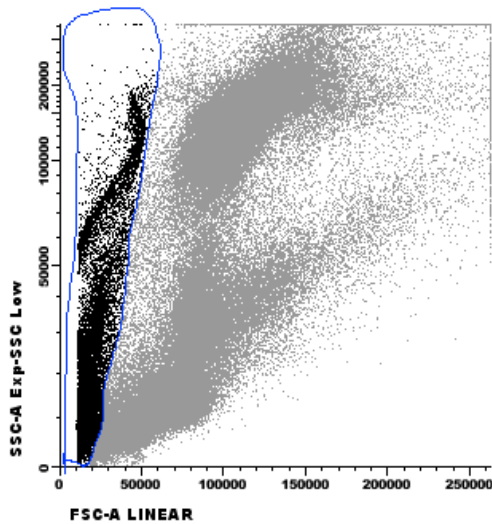


Figura 1a – Dot-plot SSC/FSC

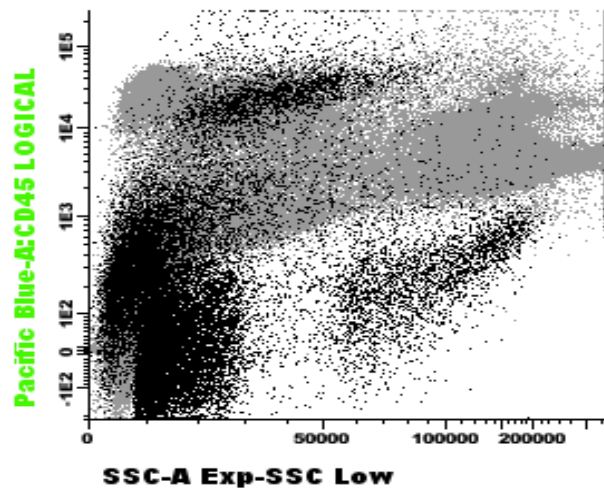


Figura 1b - Dot-plot SSC/CD45.

Depois de retirados os restos celulares, delimitaram-se os plasmócitos no dot-plot SSC/CD38 fazendo um gate nas células que expressavam CD38 mais forte (figura 2).

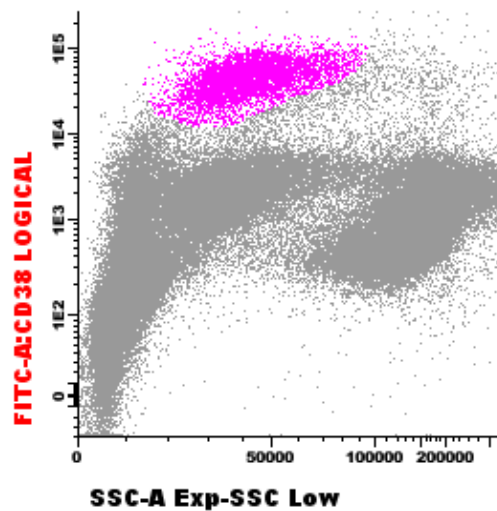


Figura 2:- Dot-plots CD38/SSC

Nos dot-plots CD56/CD38 , Kappa/ Lambda e CD19/SSC, verificou-se se as células CD38+ expressavam CD56,(Figura 3), se eram policlonais ou monoclonais(Kappa ou Lambda), (Figura 4), e se expressavam CD19 (Figura 5).

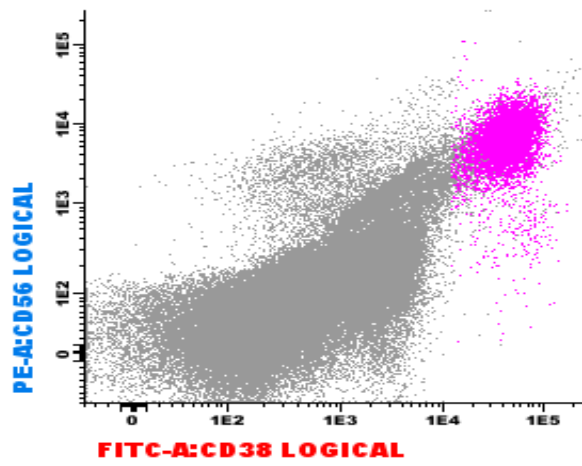


Figura 3: Dot-plots CD56/SSC

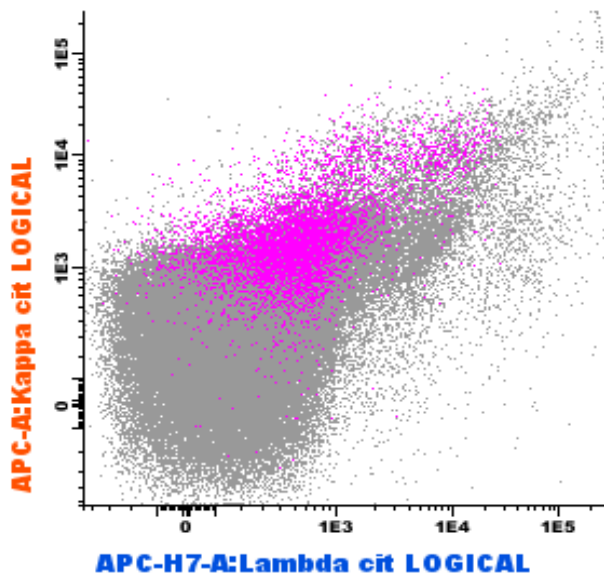


Figura 4: Dot-plot Kappa/ Lambda

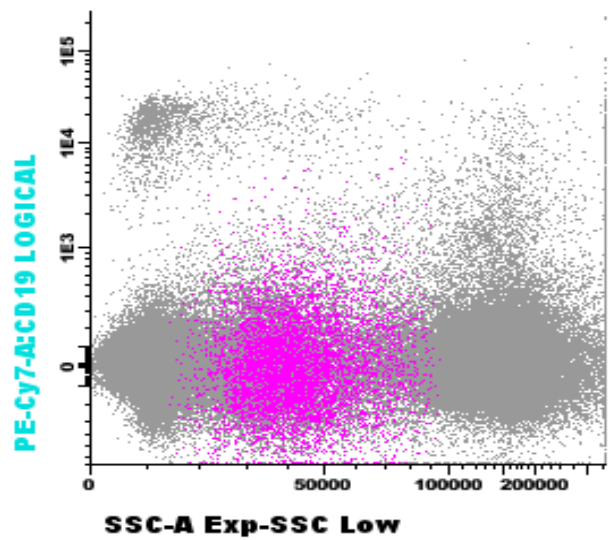


Figura 5: Dot-plot CD19/SSC

Ao efetuar uma região de análise no dot-plot SSC/CD38 registou-se a intensidade média de fluorescência da β 2-m nestas células. (Figura 6).

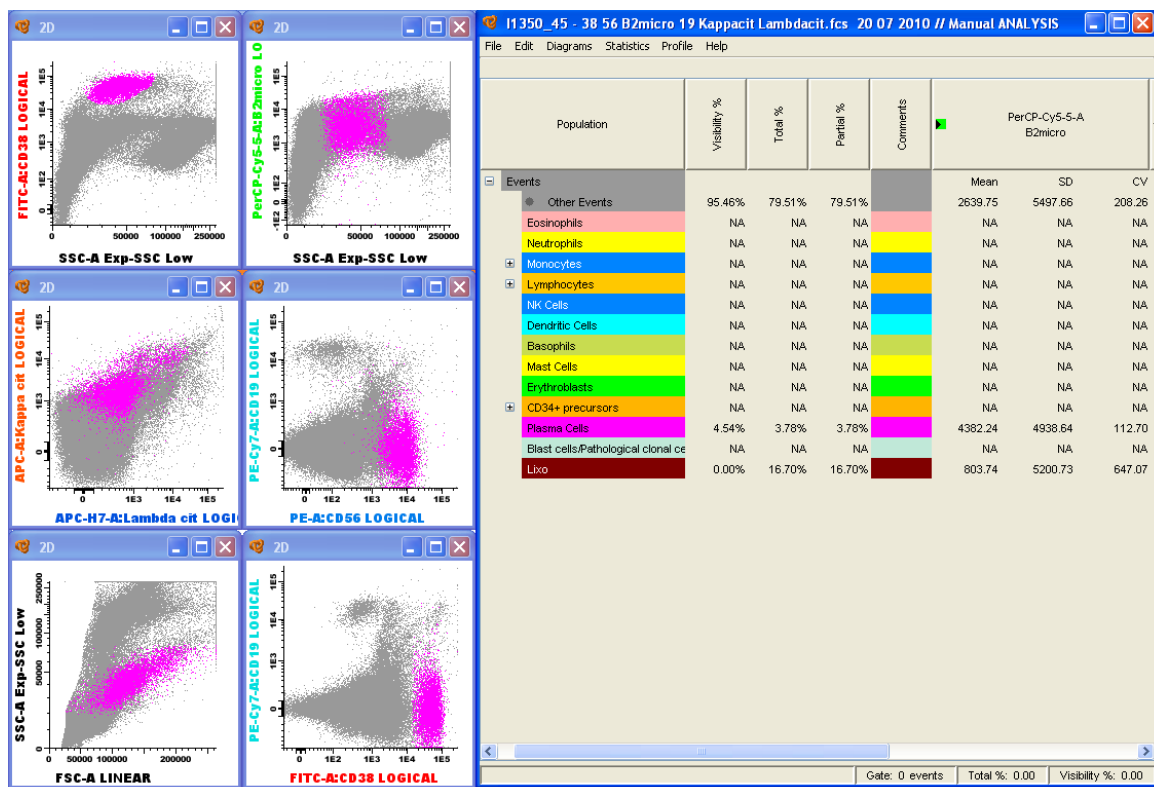


Figura 6: Identificação dos plasmócitos (marcados a rosa) e a respectiva intensidade média de fluorescência da β 2-m.

Na MO as células que expressam CD38+ com maior intensidade são plasmócitos. Normalmente, por citometria de fluxo, estas células aparecem em pequena percentagem, porque a distribuição dos plasmócitos na MO é “focal”, isto é, os plasmócitos tendem a aderir às espículas ósseas, existindo por isso em menor quantidade na suspensão de células e porque são células relativamente frágeis que se perdem durante o procedimento. É muito comum haver uma discrepância de 5 para 20 entre a citometria e o esfregaço de MO (14).

Os plasmócitos anormais são CD38+, CD19-, CD45-, CD56+/- e são monoclonais (só expressam cadeias Kappa ou Lambda). Os SSC e FSC são altos. (14)

Os plasmócitos normais são CD38⁺⁺, CD19⁺, CD45⁺, CD56⁻ e são policlonais (expressam cadeias Kappa e Lambda, numa razão de 60% e 40% respectivamente). Os SSC e FSC são baixos. (14,15). (Figura 7)

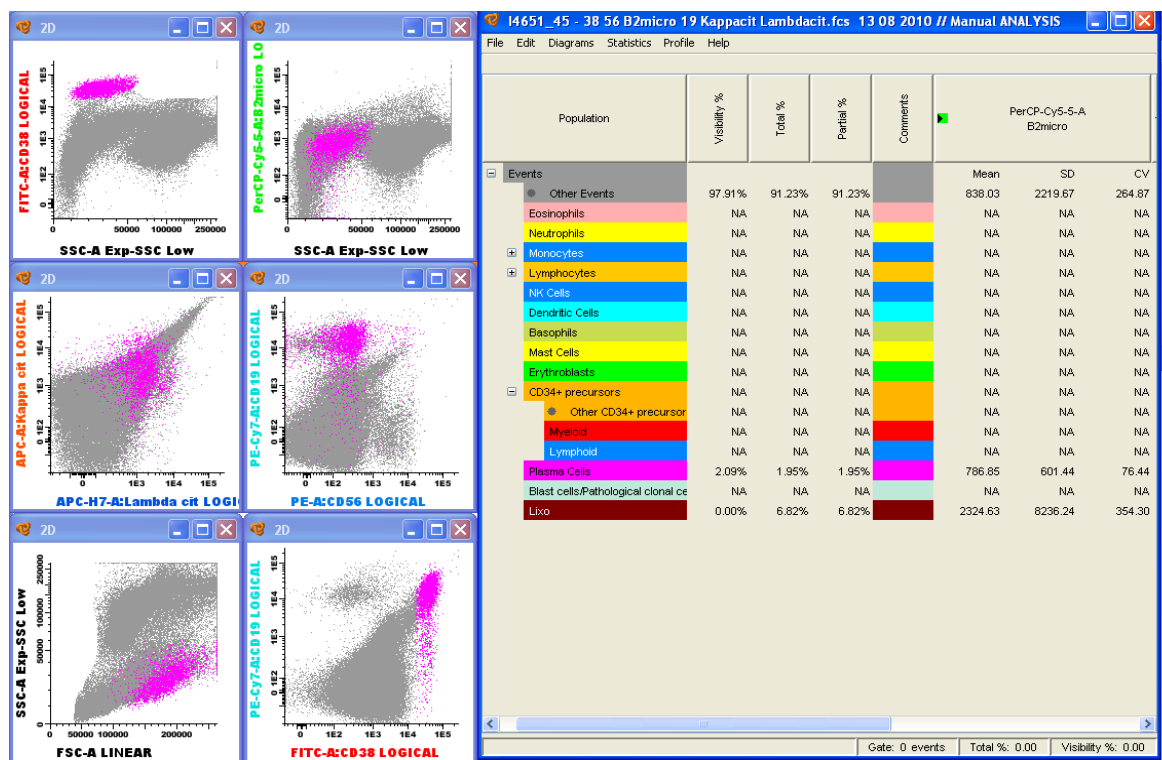


Figura 7: Plasmócitos normais marcados a rosa e intensidade média de fluorescência da β2-m nestas células

Análise estatística das amostras:

Os resultados obtidos foram posteriormente analisados estatisticamente no programa Microsoft® Excel e SPSS®.

Foi avaliada a normalidade das variáveis em estudo, utilizando o teste Shapiro-Wilk. Foi efetuado o teste não paramétrico de amostras emparelhadas - Teste Wilcoxon.

Para a correlação da β2-m pelos dois métodos utilizou-se o teste de Pearson e efectuou-se a regressão linear simples.

Foram efetuados estudos imunofenotípicos iniciais em 88 amostras de MO, por citometria de fluxo. Destas, 69 apresentavam plasmócitos anormais e 19 plasmócitos normais. Das 69 amostras com plasmócitos anormais, 44 tinham fenótipo compatível com Mieloma Múltiplo e as outras 25 tinham fenótipo compatível com outro tipo de Gamapatia Monoclonal.

Foram estudadas algumas variáveis como sexo, idade, a creatinina, β 2-m sérica, a percentagem de plasmócitos, a positividade para alguns marcadores como o CD56, as cadeias Kappa e Lambda e a intensidade de fluorescência da β 2-m nos plasmócitos por citometria de fluxo.

Na tabela 3 apresenta-se a distribuição por sexo das amostras com plasmócitos normais e anormais. Nestas amostras observou-se uma predominância de casos do sexo feminino: com fenótipo compatível com MM foram registados 61,3%, com outras Gamapatias Monoclonais 64,0% e 52.6% nas amostras com plasmócitos normais.

		Mieloma Múltiplo nº de casos (%)	Outras Gamapatias Monoclonais nº de casos (%)	Normal nº de casos (%)	Total
Sexo	Feminino	27 (61,3%)	16 (64,0%)	10 (52.6)	53 /60.2%)
	Masculino	17 (38,6%)	9 (36,0%)	9 (47.4)	35 (39.8%)
Total		44 (100%)	25 (100%)	19 (100%)	88 (100%)

Tabela 3: Distribuição por sexo nas patologias plasmocitárias e nos normais.

Na tabela 4 encontra-se representada a estatística descritiva (média, desvio padrão, idade mínima e máxima) das idades das amostras analisadas. A idade média observada foi de 65,49 anos.

	Amostras (Nº)	Idade Mínima	Idade Máxima	Média	Desvio Padrão
Idade	88	37	87	65,49	12,015

Tabela 4: Estatística descritiva das idades das amostras analisadas

Na tabela 5 encontra-se esquematizado a estatística descritiva (média, desvio padrão, idade mínima e máxima) referente à idade dos casos patológicos e normais. A idade média observada nas amostras patológicas (MM E GM) foi cerca de 66 anos.

Diagnóstico	Amostras (Nº)	Idade Mínima	Idade Máxima	Média	Desvio Padrão
GM	25	43	87	66.36	10.099
MM	44	37	85	66.57	12.347
Normal	19	40	84	61.84	13.402

Tabela 5: Estatística descritiva das idades nas amostras patológicas e normais

Na tabela 6 apresenta-se em esquema a distribuição por faixas etárias das amostras com plasmócitos normais e anormais. Nas amostras com fenótipo compatível com MM foi observada uma predominância na faixa etária superior ou igual a 71 anos (50%). Nas outras Gamopatias Monoclonais a predominância observada foi nas idades compreendidas entre 51 e 70 anos (56%). No total de amostras com plasmócitos anormais (MM e GM) observou-se uma ligeira predominância na faixa etária superior ou igual a 71 anos com 31 casos (44.9%), verificando-se 29 casos nas idades compreendidas entre 51 e 70 anos (42,0%) e 9 casos em idades inferiores ou iguais a 50 anos (13,0%).

	Classe Etária			Total
	<50 n° de casos (%)	51-70 n° de casos (%)	>71 n° de casos (%)	
Mieloma Múltiplo	7 (15,9%)	15 (34,1%)	22 (50,0%)	44 (100%)
Outras Gamapatias Monoclonais	2 (8%)	14 (56%)	9 (36%)	25 (100%)
Normais	4 (21,0%)	10 (52,6%)	5 (26,4%)	19 (100%)
Total	13 (14,8%)	39 (44,3%)	36 (40,9%)	88 (100%)

Tabela 6: Distribuição por faixa etária e discrasia plasmocitária e normais

A caracterização dos casos de MM, em relação às cadeias leves kappa e lambda, e o marcador CD56, encontra-se esquematizada na tabela 7.

	Cadeias Kappa	Cadeias Lambda	Total
CD56+	25	8	33
CD56-	9	2	11
Total	34	10	44

Tabela 7: Cadeias K/L e CD56 nos MM

Das 19 amostras normais estudadas por citometria de fluxo todas tinham doseamento sérico de β 2-m e creatinina. Destas, 3 casos tinham creatinina no soro superior a 2 mg/dl e β 2-m aumentada. A β 2-m sérica estava aumentada em 9 das amostras normais.

Na tabela 8 encontra-se em esquema os resultados de creatinina e β 2-m sérica nas amostras de MM e GM. Nos doentes com MM, 9 tinham creatinina superior a 2mg/dl, e, destas 6 tinham β 2-m aumentada. A β 2-m sérica estava aumentada em 24 das amostras de MM, das quais 15 eram monoclonais Kappa e CD56+, 4 eram monoclonais Kappa CD56-, 3 monoclonais Lambda e CD56+ e 1 monoclonal Lambda e CD56-.

	Mieloma Múltiplo	Gamapatias Monoclonais
β2-m sérica		
normal	13	12
> 2530 μg/l.	24	10
Não doseada	7	3
Creatinina		
normal	33	22
> 2 mg/dl	9	3
Não doseada	2	0

Tabela 8: Distribuição da β2-m sérica e creatinina nos MM e GM

Nas 25 amostras de GM, 3 casos tinham creatinina superior a 2 mg/dl e β2-m sérica aumentada em 2 deles, em 10 casos a β2-m estava aumentada.

Correlacionamos os resultados obtidos nas amostras com plasmócitos anormais (as 59 com doseamento de β2-m sérica) e nas amostras com plasmócitos normais (19), pelos dois métodos: nefelometria e citometria de fluxo a partir de amostras de soro e MO, respectivamente.

Foi avaliada a normalidade das variáveis em estudo, utilizando o teste de Shapiro-Wilk e verificou-se que não assumia uma distribuição normal para um $p < 0,05$. Recorreu-se assim ao teste não paramétrico para amostras emparelhadas - Teste Wilcoxon.

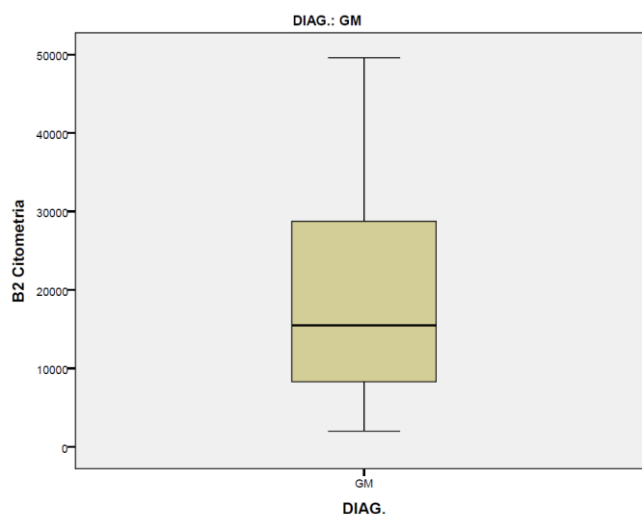


Gráfico 1: Distribuição da β2-m celular nas GM

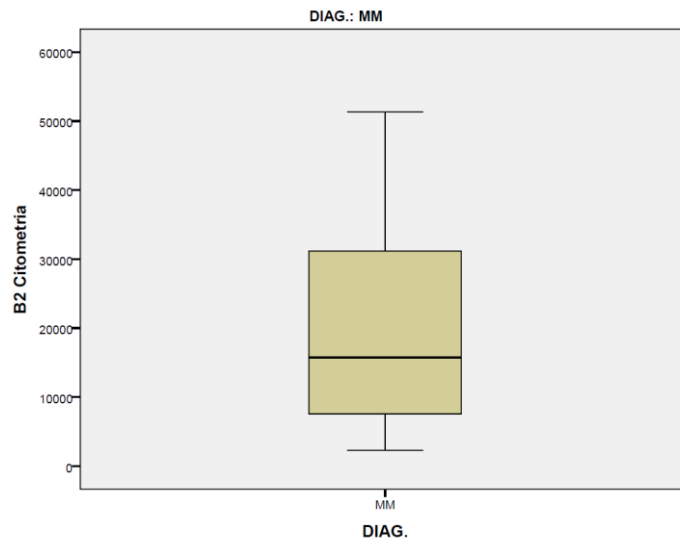


Gráfico 2: Distribuição da β 2-m celular nas MM

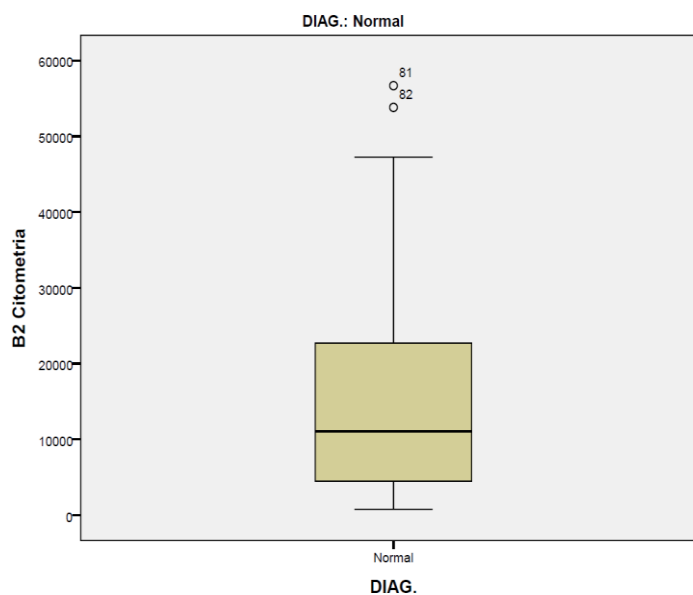


Gráfico 3: Distribuição da β 2-m celular nas Normais

Em cima encontram-se representados os diagramas de caixa, que nos mostra a distribuição dos resultados obtidos por citometria de fluxo, da β 2-m nos plasmócitos anormais, GM (gráfico 1) e MM (gráfico 2) e nos plasmócitos normais (gráfico 3). Os gráficos 4, 5 e 6 mostram a distribuição dos resultados da β 2-m sérica.

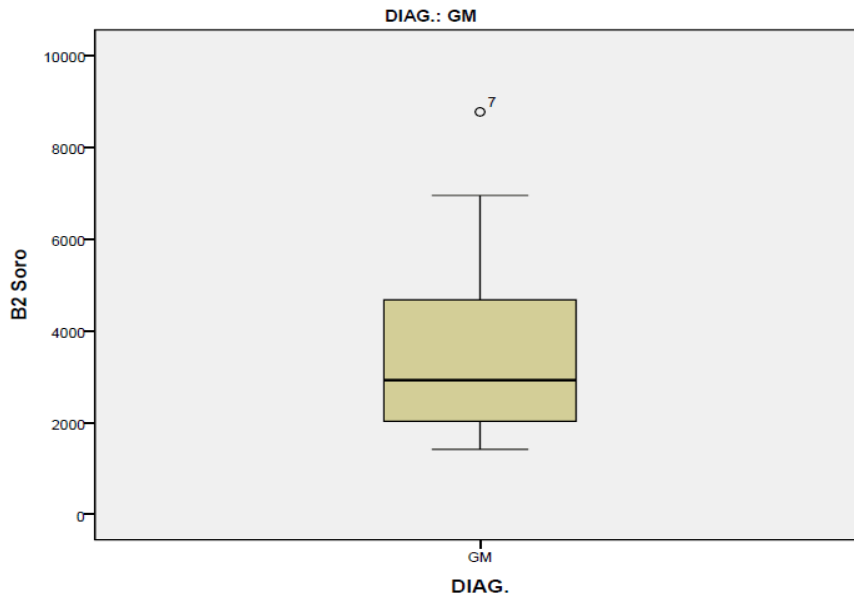


Gráfico 4: Distribuição da β 2-m sérica nas GM

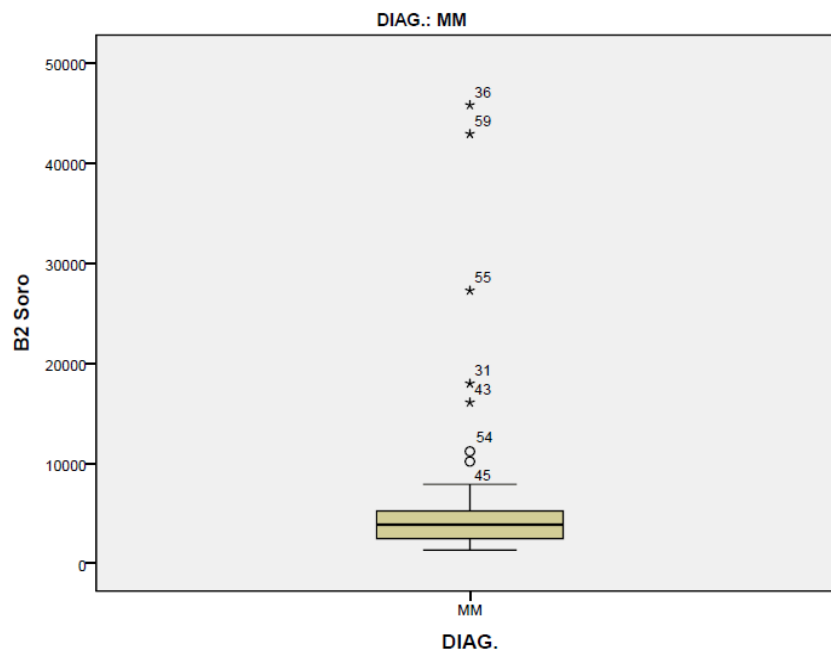


Gráfico 5: Distribuição da β 2-m sérica nos MM

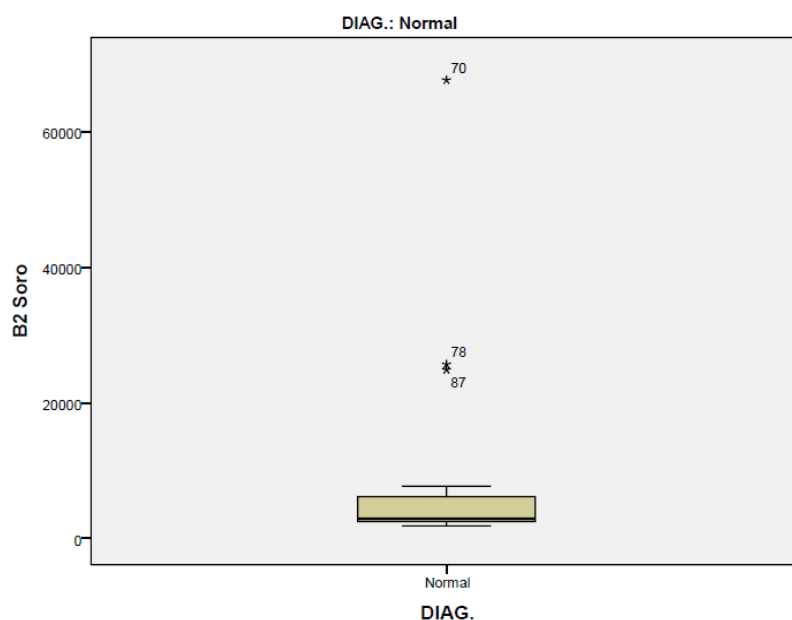


Gráfico 6: Distribuição da β 2-m sérica nos Normais

Na tabela 9 encontram-se as medianas obtidas para cada um dos métodos (nefelometria e citometria de fluxo) nos plasmócitos normais, anormais e no soro. Foi observada uma intensidade média de fluorescência da β 2-m superior nos plasmócitos anormais comparativamente com os plasmócitos normais. A β 2-m sérica estava mais aumentada nos casos de MM em comparação com as GM e amostras normais. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a β 2-m sérica e a β 2-m celular nos MM ($p < 0,001$) e nas GM ($p < 0,001$). Nos normais não há evidência de que sejam estatisticamente diferentes ($p < 0,064$).

	β 2-m celular	β 2-m sérica	p
MM	14998.50	3870.00	$p < 0,001$
GM	16007.00	2929.00	$p < 0,001$
Normais	11052.00	2911.00	$p < 0,064$

Tabela 9: Comparação da β 2-m celular e sérica nos casos de MM, GM e normais.

Na correlação (Bivariate) de Pearson obteve-se , para todas as amostras, uma correlação negativa fraca, muito próxima de zero (para haver correlação o valor encontrado tinha que estar próximo de 1 ou -1) e uma significância de 0,2 (para ter significado estatístico o $p < 0,05$). (tabela 10)

	β2-m soro
β2-m celular	- 0,144
Significância	0,208
N	78

Tabela 10: Correlação (Pearson) entre a β 2-m celular e a β 2-m sérica para todas as amostras analisadas

Verificou-se, também, que havia correlação negativa fraca entre os dois métodos nos MM, nas GM e nos normais. (Tabela 11)

	β2-m soro
GM β 2-m celular	- 0,121
Significância	0,593
N	22
MM β2-m celular	- 0,015
Significância	0,929
N	37
Normal β2-m celular	- 0,332
Significância	0,165
N	19

Tabela 11: Correlação (Pearson) entre a β 2-m celular e a β 2-m sérica nos MM, GM e Normais

Quando efetuada a regressão linear simples com duas variáveis (variável dependente β 2-m celular e variável independente β 2-m sérica), o valor de β (coeficiente da regressão) encontrado foi - 0,198, o intervalo de confiança] - 0,508 - 0,112 [e a significância de 0,208.

Neste estudo pretendeu-se avaliar a β 2-m em doentes com MM, determinada por dois métodos: doseamento sérico por nefelometria e doseamento celular por citometria de fluxo.

Segundo as recomendações da OMS, a partir de 2008 passou a ser utilizado o ISS que classifica o MM em três estadios, utilizando a β 2-m como critério de estadiamento (tabela 2). Esta proteína constitui um bom marcador para o prognóstico. Níveis elevados da β 2-m sérica estão associados com características clínicas e biológicas adversas ao diagnóstico e com pior prognóstico(16,17)

Quando avaliadas as amostras de plasmócitos anormais (MM e GM) e de plasmócitos normais (sem discrasia plasmocitária), relativamente ao sexo e idade, verificou-se que contrariamente aos estudos publicados (4,5) foram encontrados um maior número de doentes do sexo feminino. A média de idades ao diagnóstico foi ligeiramente mais baixa, do que nos estudos publicados (4,5), sendo 66 anos nos MM e GM. A maioria dos casos observados tinham idade superior a 50 anos (84% nos MM e 92% nas GM) o que está de acordo com a literatura existente(2,5).

Segundo Perez-Andres *et al.*(16), a β 2-m sérica é considerada um dos mais importantes factores usados para o prognóstico do MM. O aumento desta proteína no plasma estava associada a uma evolução clínica mais agressiva e avançada desta doença e a uma maior percentagem de plasmócitos anormais na MO. Nesse estudo foi ainda observado que o aumento da β 2-m celular estava associada a uma clínica mais favorável.

Neste estudo observou-se que existiam diferenças estatisticamente significativas entre a β 2-m celular e β 2-m sérica no MM ($p < 0,001$), quando efectuado o teste não paramétrico para amostras emparelhadas Wilcoxon.

Recentemente, verificou-se que a expressão de β 2-m celular se correlacionava negativamente com a β 2-m sérica (16,20).

No estudo efectuado obteve-se uma correlação negativa fraca entre os dois métodos estudados, no MM ($p < 0,015$). Estes resultados estão concordantes com o estudo de Perez-Andres *et al.*(16), que observaram que o aumento da β 2-m sérica estava associado a características clínicas mais agressivas da doença, a um pior prognóstico e menor taxa de sobrevivência. A β 2-m celular analisada por citometria de fluxo, torna-se assim, um marcador adicional para o prognóstico do MM (16).

A citometria de fluxo, pela intensidade de fluorescência de alguns anticorpos monoclonais e/ou pela sua presença ou ausência, é importante para o diagnóstico e prognóstico das discrasias plasmocitárias. Quando se analisou a expressão das cadeias K e L e CD56, verificou-se que a maior parte das amostras eram monoclonais K, CD56+ e β 2-m sérica aumentada, de acordo com Johansen, Hans E et al (19), a ausência de CD56 confere um pior prognóstico. Outros estudos referem a razão K/L, por citometria de fluxo uma mais valia para o diagnóstico das discrasias plasmocitárias (18), independentemente de os plasmócitos expressarem cadeias K ou L, se a razão delas for < 0.75 ou > 1.5 têm pior prognóstico(18). Neste estudo a maioria das amostras eram CD56+ e K+, o que contraria os estudos mencionados anteriormente. A determinação de β 2-m celular, por citometria de fluxo, num só tubo com outros anticorpos monoclonais, fornece informação importante para o diagnóstico e prognóstico dos MM e outras GM, mesmo com pequenas percentagens de plasmócitos.

Segundo Bataille R.et al (21), existe uma clara correlação entre a β 2-m sérica e os níveis de creatinina, no nosso estudo foram observados apenas 9 casos de doentes com MM em que a creatinina era $> 2\text{mg/dl}$, destes, 3 não tinham doseamento de β 2-m sérica e 6 tinham esta proteína muito aumentada, neste estudo não foi possível efectuar a correlação entre estas duas variáveis pois os valores de referência da creatinina utilizados não foram sempre os mesmos ao longo do estudo.

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, 2009;
2. KYLE RA; RAJKUMAR SV. - Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* Vol.23 (2009), p. 3-9;
3. DIMOPOULOS, Meletios; KYLE, Robert; FERNAND, Jean-Paul; et al. – Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*, Vol 117, nº 18 (2011).
4. FARIA, Rosa Malena D.; PAULO e SILVA Roberto O. - Gamopatias monoclonais – critérios diagnósticos e diagnósticos diferenciais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* Vol. 29, nº 1 (2007), p.17-22.
5. PAULO e SILVA, Roberto O.; BRANDÃO, Kamilla M. A.; PINTO, Paula V. M.; et al.- Mieloma múltiplo: características clínicas e laboratoriais ao diagnóstico e estudo prognóstico. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, Vol. 31, nº2 (2009), p. 63-68.
6. HAROUSSEAU J. L.; DREYLING M.- Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, Vol 21 Sup.5 (2010) p. 155-157.
7. GREIPP, Philip R.; SAN MIGUEL Jesus; DURIE Brien G. M.; et al. – International Staging System for Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 23 nº 15 (2005), p. 3412-3420.
8. SAN MIGUEL, J. F.; GARCIA-SANZ, R.; GONZALEZ M.; et al. - A New Staging System for Multiple Myeloma Based on the Number of S-Phase Plasma Cells. *Blood* Vol. 85, nº 2 (1995), p. 448-455.
9. GRUPO ACCION MÉDICA, MADRID; Mieloma múltiplo, gamapatia monoclonal de significado incierto y amiloidosis primaria: criterios de diagnósticos, pronóstico y utilidad de la determinación de cadenas ligeras libres en suero. *Haematologia*, Vol.95, sup. 14 (2010). ISSN 1138-0381.
10. KYLE R. A. – Prognostic factors in multiple myeloma. *Stem Cells*, 13, sup. 2 (1995), p. 56-63,
11. BETHEA M. ; FORMAN D.T.. - β_2 - microglobulin: its significance and clinical usefulness. *Ann Clin Sci* 20 (1990), p 163-168.

12. DONGEN van J.J.M.; LHERMITTE L.; BONCHER S.; et al. – Euroflow antibody panels for standardization n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 26 (2012), p. 1908-1975.
13. NGUYEN Doyen; DAMOND Lawrence W.; BRAYLON Raul C. **Flow Cytometry in Haematopathology, A visual approach to data analysis and Interpretation**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007. p. 209-213. ISBN 978-1-59745-162-8.
14. STUART, Carlton C.; NICHOLSON, Janet K. A; . **Immunophenotyping**. Canada: Wiley- Liss, 2000. p. 105-107. ISBN 0-471-23957-7.
15. PERES-ANDRES, Martin; ALMEIDA Júlia; MARTIN-AYUSO, Marta; et al. – Soluble and membrane levels of molecules involved in the interaction between clonal plasma cells and the immunological microenvironment in multiple myeloma and their association with the characteristics of the disease. *Int. J. Cancer* 124 (2008), p.367-375.
16. ROSSI, Davide; FANGAZIO, Marco; De PAOLI, Lorenzo; et al. – Beta-2-Microglobulin is an independent predictor of progression in asymptomatic multiple myeloma. *Cancer* (2010), p. 2188-2199.
17. NAKAYAMA, Shoco; YOCOTE, Taiji; HIRATA, Yuji; et al. - An approach for diagnosing plasma cell myeloma by three-color flow cytometry based on kappa/lambda ratios of CD38-gated CD138+ cells.
18. PESSOA-MAGALHÃES, Roberto J.; VIDRIALIS, Maria-Belen; PAIVA, Bruno; et al.- Analysis of immune system, of multiple myeloma patients achieving long-term disease control, by multidimensional flow cytometry. *Haematologica* (2012), Julho 6 [Epub ahead of print]
19. JOHENSEN, Hans F.; BOGSTED, Martin; KLAUSEN, Tobias W.; et al. – Multiparametric Flow cytometry profiling of neoplastic plasma cells in multiple myeloma. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* Vol.78B (2010) p.338–347).
20. BATAILLE, R.; GRENIER J.; SARRY J.- Beta-2-microglobulin in myeloma: optimal use for staging, prognosis, and treatment – a prospective study of 160 patients. *Blood*, Vol. 63 n° 2 (1984), p. 468-476. ISSN 1528-0020.