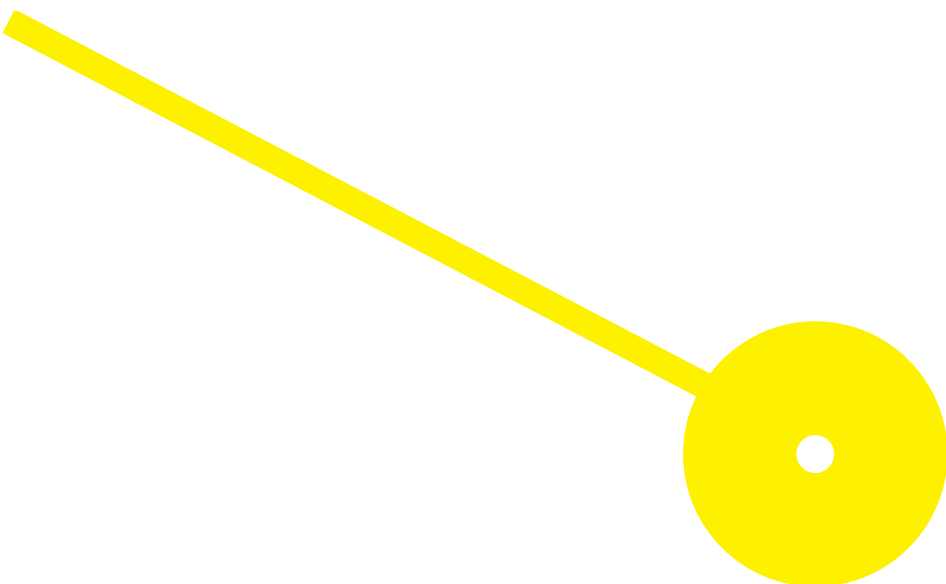




Estudo de Discrasias Plasmocitárias, por Citometria de Fluxo

Flávia Andreia Vieira Pinto

09/2024





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



ULS
SÃO JOÃO

Estudo de Discrasias Plasmocitárias, por Citometria de Fluxo

Autor

Flávia Andreia Vieira Pinto

Orientador(es)

Mestre Cláudio Araújo dos Reis/TSDT Análises Clínicas e Saúde Pública do Serviço de Patologia Clínica da ULS São João/Professor convidado Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Prof. Doutora Sandra Marlene Mota/REQUIMTE/LAQV, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Análises Clínicas e Saúde Pública** – Ramo em **Imunohemoterapia e Transplantação** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Aos meus pais pelo apoio incondicional ao longo deste percurso acadêmico. As suas palavras de encorajamento e o apoio financeiro foram fundamentais para a minha jornada.

Ao meu orientador, Professor Cláudio Reis, o meu mais profundo agradecimento, pela orientação incansável, dedicação e paciência demonstradas ao longo deste projeto.

A todos os professores que cruzaram o meu caminho durante a minha formação acadêmica, o conhecimento que me transmitiram foi fundamental para o meu percurso até aqui.

Ao Daniel pela constante motivação, compreensão e apoio emocional durante os momentos desafiadores deste percurso.

Por fim, o meu profundo reconhecimento a todos os colegas, amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

Obrigado a todos por fazerem parte desta jornada.

Resumo

As discrasias plasmocitárias (DP) são um conjunto de patologias, caracterizadas pela presença de plasmócitos monoclonais que secretam uma imunoglobulina monoclonal.

Este estudo teve como objetivo caracterizar o perfil imunofenotípico de DP por citometria de fluxo (CF), relacionando o fenótipo encontrado com o estadiamento do International Myeloma Working Group.

Foi realizado um estudo observacional analítico transversal através da consulta dos registos com indicação clínica para estudo imunofenotípico de DP durante o período de 01/04/2022 a 01/04/2024.

Dos 148 registos analisados, 73 apresentavam diagnóstico de Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado, 73 casos de Mieloma Múltiplo e 2 casos de Leucemia de Plasmócitos. A análise incluiu anomalias genéticas por FISH e a expressão de marcadores imunofenotípicos (CD19, CD45, CD56, CD28, CD27, CD117, CD81) por CF. Os marcadores CD19, CD45, CD56 e CD81, foram os mais úteis na identificação de plasmócitos anómalos.

Foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a expressão de CD117 e o estadiamento ISS ($p=0,038$) e entre o fenótipo CD56+/CD117+ com o estadiamento ISS e R-ISS ($p=0,001$ e $p=0,035$), indicando uma relação com estadios mais precoces.

A CF é útil para o diagnóstico e caracterização destas patologias, permitindo a identificação e quantificação de plasmócitos monoclonais, facilitando a deteção de marcadores celulares importantes na distinção entre células normais e aberrantes.

Palavras-chave: Paraproteína, Imunofenotipagem, Citometria de Fluxo, Mieloma Múltiplo

Abstract

Plasma cell dyscrasias (PCD) are a group of disorders characterized by the presence of monoclonal plasma cells that secrete a monoclonal immunoglobulin.

This study aimed to characterize the immunophenotypic profile of PCL through flow cytometry (FC), correlating the identified phenotype with the staging of the International Myeloma Working Group.

A cross-sectional analytical observational study was carried out by consulting analytical records with clinical indication for immunophenotypic study of PLC during the period from 04/01/2022 to 04/01/2024.

Of the 148 records analyzed, 73 presented a diagnosis of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, 73 cases of Multiple Myeloma and 2 cases of Plasma Cell Leukemia. The analysis included genetic abnormalities by FISH and the expression of immunophenotypic markers (CD19, CD45, CD56, CD28, CD27, CD117, CD81) by FC. The markers CD19, CD45, CD56, and CD81 were the most useful in identifying abnormal plasma cells.

A statistically significant association was observed between CD117 expression and ISS staging ($p=0.038$), and between the CD56+/CD117+ phenotype with ISS and R-ISS staging ($p=0.001$ and $p=0.035$), indicating a relationship with earlier stages.

FC is essential for the diagnosis and characterization of these disorders, allowing the identification and quantification of monoclonal plasma cells, facilitating the detection of important cell surface markers that help distinguish between normal and aberrant cells.

Keywords: Paraproteinemia, Immunophenotyping, Flow Cytometry, Multiple Myeloma

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Hematopoiese e linhagem linfoide B.....	1
1.1.1.	Resposta imunitária dos linfócitos B	4
1.2.	Síntese das imunoglobulinas.....	5
1.3.	Discrasias Plasmocitárias.....	7
1.3.1.	Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado.....	9
1.3.2.	Mieloma Múltiplo Indolente.....	10
1.3.3.	Mieloma Múltiplo.....	10
1.3.4.	Leucemia de Plasmócitos.....	12
1.3.5.	Fisiopatologia.....	13
1.3.5.1	Eventos epigenéticos.....	13
1.3.5.2	Evolução clonal e mutações secundárias	14
1.3.5.3	Microambiente tumoral.....	14
1.3.6.	Diagnóstico Laboratorial.....	15
1.3.6.1	Avaliação da MO.....	16
1.3.6.2	Citometria de Fluxo	17
1.3.6.3	Outras análises laboratoriais.....	21
1.3.7.	Estadiamento.....	22
2.	Objetivos	24
3.	Material e Métodos	24
3.1.	População e amostra em estudo.....	24
3.2.	Procedimentos	25
3.3.	Estatística.....	27
4.	Resultados	28
4.1.	Caraterização da amostra em estudo.....	28
4.2.	Alterações genéticas mais frequentes por discrasia plasmocitária.....	30
4.3.	Análise da expressão antigénica	31
4.4.	Associação entre os marcadores celulares e o estadiamento ISS e R-ISS	33
4.5.	Associação entre o padrão da expressão antigénica e as alterações citogenéticas presentes nos casos em estudo.....	34

4.6	Associação entre o padrão de expressão antigénica de conjunto de marcadores celulares com o estadio.....	35
5	Discussão.....	36
6	Conclusão.....	41
7	Referencias Bibliográficas.....	42
8	Anexos	51
	Anexo I	51

Índice de Tabelas

Tabela 1 Classificação de discrasias plasmocitárias segundo a Organização Mundial da Saúde..	8
Tabela 2. Critérios CRAB	9
Tabela 3 Critérios de Diagnóstico segundo o IMWG	16
Tabela 4 Alterações citogenéticas associadas ao prognóstico de MM	17
Tabela 5 Sistema Internacional de Estadiamento para MM	22
Tabela 6 Sistema Internacional de Estadiamento Revisto para MM	23
Tabela 7 Constituição do painel de anticorpos para discrasias plasmocitárias e respetivos fluorocromos, como descrito pelo consórcio da Euroflow	25
Tabela 8 Caraterização dos casos em estudo relativamente aos parâmetros analíticos e sociodemográficos.....	29
Tabela 9 Número de casos do estadiamento ISS e R-ISS.....	30
Tabela 10 Alterações genéticas por FISH.....	30
Tabela 11 Padrão de expressão antigénica nas discrasias plasmocitárias estudadas.....	31
Tabela 12 Associação entre o padrão antigénico no MM e o estadiamento ISS e R-ISS.....	33
Tabela 13 Associação entre o padrão de expressão fenotípica com alterações citogenéticas...	34
Tabela 14 Associação entre o padrão de expressão do CD56 e CD117 e o estadiamento ISS e R-ISS.....	35

Índice de Figuras

Figura 1 Diferentes etapas de maturação dos linfócitos B e principais eventos de cada etapa.....	3
Figura 2 Subpopulações de linfócitos B.....	3
Figura 3 Respostas de anticorpos T-dependentes e T-independentes.....	5
Figura 4 Processo de rearranjo génico na formação das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas	6
Figura 5 Constituição de anticorpo.....	7
Figura 6 Age-Standardize Rate	11
Figura 7 Esquema de deteção e processamento de sinais.....	18
Figura 8 Identificação dos plasmócitos numa amostra de MO, de um caso de plasmócitos anómalos.....	26
Figura 9 - Avaliação da expressão dos marcadores celulares estudados, num caso de plasmócitos mielomatosos.....	27
Figura 10 Avaliação da expressão dos marcadores celulares estudados, num caso de plasmócitos normais.....	51

Lista de siglas e abreviaturas

Ag	Antigénio
AID	<i>Activation-Induced Cytidine Deaminase</i>
BCR	<i>B cell antigen receptor</i>
CCND1	Ciclina D1
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDKN2C	<i>Ciclin D1 Inibidor 2C</i>
CF	Citometria de Fluxo
CH	Região constante da cadeia pesada
CKS1B	<i>Cyclin Kinase Subunit 1B</i>
CLL	Cadeias leves livres
CNV	<i>Copy Number Variations</i>
CR	Recetor do complemento
CT	Tomografia computadorizada
D17Z1	Região centromérica específica do cromossomo 17
Fab	Fragmento de ligação ao antigénio
Fc	Fragmento cristalizável
FGFR3	Recetor 3 do Fator de Crescimento de Fibroblastos
GMSI	Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado
HB	Hemoglobina
HSCs	Células estaminais hematopoiéticas
Ig	Imunoglobulina
IGH	Região Imunoglobulina Pesada (locus IGH)
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
ISS	Sistema Internacional de Estadiamento (<i>International Staging System</i>)
κ	Kappa
LDH	Lactato Desidrogenase
LP	Leucemia de Plasmócitos
LPP	Leucemia de Plasmócitos Primária
LPS	Leucemia de Plasmócitos Secundária
MAF	Fator de Transcrição Musculoaponeurótico

MM	Mieloma Múltiplo
MMI	Mieloma Múltiplo Indolente
MO	Medula Óssea
R-ISS	Sistema Internacional de Estadiamento Revisto (do inglês, <i>Revised-International Staging System</i>)
S	Desvio-Padrão
λ	Lambda
TP53	Gene supressor de tumores TP53
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VH	Região variável da cadeia leve
\bar{x}	Média

1. Introdução

As discrasias plasmocitárias representam um grupo heterogéneo de doenças, classificadas segundo a organização mundial de saúde (OMS) como gamapatias monoclonais, neoplasias de células plasmáticas, doenças com deposição de imunoglobulina monoclonal e doenças de cadeias pesadas (Tabela 1) ^(1,2). Estas patologias são caracterizadas pela presença de uma população de células plasmáticas monoclonais, secretoras de uma imunoglobulina (Ig) monoclonal denominada de proteína M ^(3,4). As imunoglobulinas são responsáveis por respostas imunológicas, reconhecendo e ligando-se a antígenos específicos. Cada imunoglobulina é constituída por: duas cadeias leves kappa (κ) ou lambda (λ), duas cadeias pesadas que podem ser do tipo γ , δ , α , μ e ϵ , que se unem às cadeias leves, uma região constante que determina a função do antígeno e uma região variável responsável pelo reconhecimento do antígeno ⁽³⁾.

Nas últimas décadas a citometria de fluxo tem desempenhado um papel extremamente importante no diagnóstico e caracterização destas patologias tendo um papel de destaque na gamapatia monoclonal de significado indeterminado, no mieloma múltiplo e a leucemia de plasmócitos⁽⁴⁾, sendo estas as patologias abordadas neste estudo.

1.1. Hematopoiese e linhagem linfóide B

A hematopoiese refere-se ao processo de formação das células sanguíneas. Durante a gestação, este processo ocorre inicialmente no saco vitelino, do 0º aos 2º mês. A partir do 2º até ao 7º mês de gestação, ocorre no fígado fetal e no baço, e posteriormente, ocorre na medula óssea (MO). As células estaminais hematopoiéticas tem capacidade de autorrenovação ou de originarem novas células diferenciadas. O processo inicia-se quando a célula sofre uma mitose originando duas células: uma autorrenova-se e a outra diferencia-se. Na idade adulta este processo realiza-se na MO, onde o ambiente medular reúne todas as condições favoráveis ao processo de autorrenovação e diferenciação devido ao estroma e a uma rede microvascular. O estroma medular é constituído por fibroblastos, adipócitos, células tronco mesenquimais, osteoblastos e macrófagos, que secretam além de fatores de crescimento, moléculas como colagénio e glicosaminoglicanos ⁽¹⁻³⁾. A linhagem celular é definida através de fatores de transcrição, que funcionam inibindo ou induzindo a produção de proteínas necessárias para a formação de novas células ⁽¹⁻³⁾. A linhagem celular linfóide dá origem aos linfócitos B (que se podem diferenciar em plasmócitos), linfócitos T, linfócitos *Natural Killer* e células dendríticas plasmocitoides. Enquanto

a linhagem mieloide origina os monócitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos, eritrócitos e megacariócitos, células dendríticas mieloides.

Ao longo do desenvolvimento dos linfócitos B na MO (figura 1) as células do estroma medular exibem duas funções. Inicialmente interagem com moléculas de adesão presentes nas células estaminais hematopoiéticas, retendo as populações em desenvolvimento em determinados nichos na MO, onde recebem os sinais apropriados e necessários para o seu desenvolvimento e diferenciação. Em seguida diversas populações de células do estroma expressam diferentes citocinas e quimiocinas, nos vários pontos de desenvolvimento dos linfócitos B fazendo com que estas células se movam, para diferentes locais dentro da medula óssea. Estes linfócitos são produzidos e sofrem maturação na MO, passando por uma seleção com base na sua autorreatividade⁽¹⁾.

A célula precursora mais imatura da linhagem linfóide B é a célula pró-B, caracterizada por não produzir imunoglobulinas (Ig) e expressar moléculas de superfície específicas de linhagem B, como CD19 e o CD10. Nesse período, a expressão de genes RAG-1 e RAG-2 leva à produção das proteínas RAG-1 e RAG-2, essenciais para a recombinação V(D)J, um processo crucial que cria a diversidade dos recetores de antígenos e permite ao sistema imunológico reconhecer uma ampla variedade de agentes patogénicos. As células pré-B sucedem as células pró-B, e iniciam a expressão da proteína μ da imunoglobulina (Ig) (cadeia pesada da imunoglobulina) na superfície celular. Esta proteína é apresentada em conjunto com outras proteínas, formando um complexo conhecido como pré-recetor da célula B (pré-BCR). O pré-BCR é constituído por um complexo de cadeias pesadas μ , cadeias leves substitutas e proteínas transdutoras de sinal. Os sinais provenientes do pré-BCR são fundamentais para a expansão das células B durante o seu desenvolvimento e para a regulação do rearranjo dos genes da cadeia leve da imunoglobulina. Quando uma célula pré-B produz a cadeia pesada μ e forma um pré-BCR funcional, o rearranjo do gene de cadeia pesada no outro cromossoma é inibido. Isso garante que cada célula B expresse apenas um tipo de recetor, mantendo sua especificidade⁽²⁾. Adicionalmente, se o rearranjo inicial da cadeia pesada não for bem sucedido, a célula tenta rearranjar o gene no outro cromossoma. Se ambos os rearranjos falharem, a célula é eliminada por apoptose. O pré-BCR também estimula o rearranjo do gene da cadeia leve κ . Se o rearranjo κ não for produtivo, a célula tenta rearranjar o gene da cadeia leve λ . Este processo garante que cada célula B expresse apenas uma cadeia leve, κ ou λ ⁽¹⁻³⁾.

A primeira célula a expressar IgM durante o desenvolvimento dos linfócitos B é chamada de célula B imatura, nessas células, as moléculas de IgM estão na superfície associadas a $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, atuando como recetores para antígenios. Em células B que não são fortemente autorreativas, o BCR envia sinais que ajudam a manter a célula viva e impedem o rearranjo adicional dos genes de Ig. Se as células B reconhecerem antígenios próprios na medula óssea com alta afinidade, podem sofrer edição de recetor ou morte celular para evitar autorreatividade. As células que não são autorreativas migram da MO podendo acabar o seu processo de maturação no baço e migrarem posteriormente para os órgãos linfoides periféricos ⁽¹⁾ (figura 1).

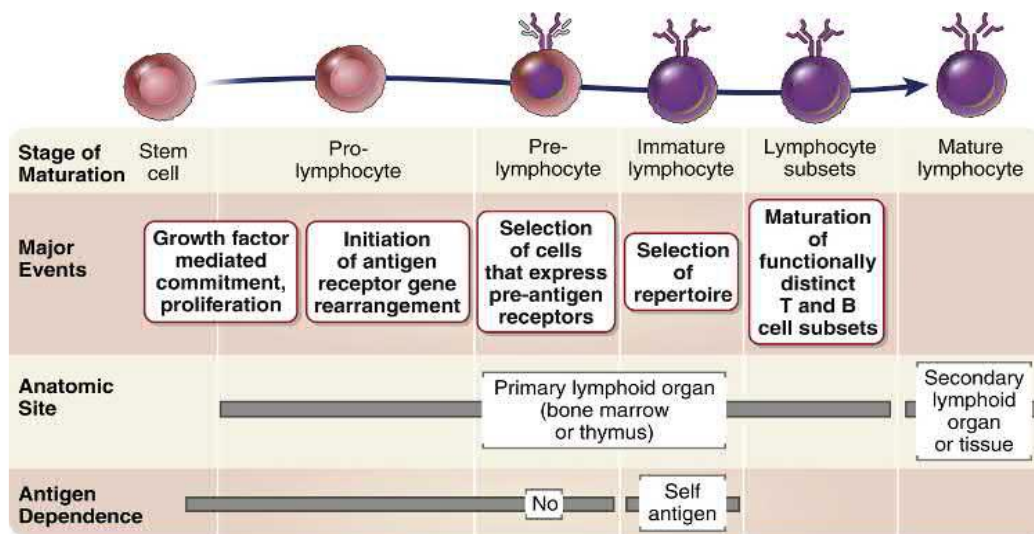


Figura 1 Diferentes etapas de maturação dos linfócitos B e principais eventos de cada etapa. ⁽³⁾

Os linfócitos B são constituídos por diferentes subpopulações, nomeadamente os linfócitos B da zona marginal e os linfócitos B foliculares, que apresentam na sua membrana o recetor da célula B (*BCR, do inglês B cell receptor*) já completamente formado. A maioria dos linfócitos B maduros são linfócitos foliculares, que expressam IgD e IgM . Esses linfócitos são recirculantes, migrando entre gânglios linfáticos e alojando-se nos folículos. Eles podem ser diferenciados dos linfócitos B da zona marginal pela presença de IgD , enquanto os linfócitos B da zona marginal, que estão localizados principalmente no baço e também nos gânglios linfáticos, expressam IgM e $CD21$, mas não expressam IgD ⁽²⁾ (figura 2).

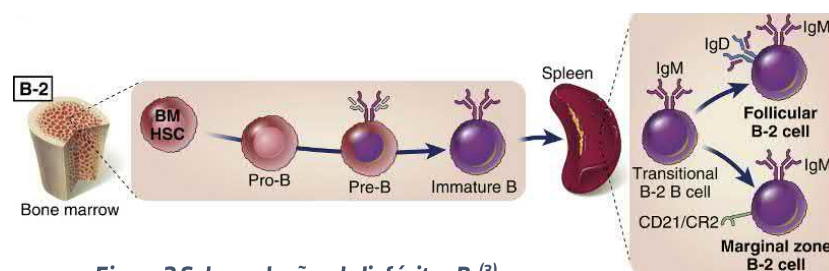


Figura 2 Subpopulações de linfócitos B. ⁽³⁾

1.1.1. Resposta imunitária dos linfócitos B

Os antígenos chegam aos linfócitos B *naive* (presentes nos órgãos linfoides) pelo sistema linfático, macrófagos, células dendríticas ou imunocomplexos. A ligação do antígeno ao BCR, em conjunto com proteínas do complemento e células T *helper*, induzem a sinalização para ativação dos linfócitos B. Os linfócitos B em proliferação podem diferenciar-se em plasmoblastos, estas células são secretoras de anticorpos, todavia continuam a dividir-se e a expressar várias características de linfócitos B ativados que permitem a sua interação com as células T. Após alguns dias, os plasmoblastos param de se dividir e morrem, ou sofrem diferenciação em plasmócitos. Alguns plasmócitos permanecem nos órgãos linfoides, onde têm vida curta, enquanto outros migram para a medula óssea e continuam a produção de anticorpos ⁽⁴⁾.

As respostas imunes dos linfócitos B podem ser T-independentes, mediadas por linfócitos B da zona marginal, ou T-dependentes, mediadas por linfócitos B foliculares, de acordo com a constituição do antígeno. As respostas T-independentes ocorrem quando o antígeno é composto por polissacarídeos, são respostas rápidas e simples sendo mediadas por anticorpos IgM presentes na membrana do linfócito B e plasmócitos de curta duração ⁽¹⁾, embora forneçam uma resposta rápida, não produzem imunidade de longo prazo com a mesma eficácia que as respostas T-dependentes.

As respostas T-dependentes acontecem quando o antígeno é de origem proteica e requerem a intervenção dos linfócitos T *helper*. A ativação dos linfócitos B em resposta à ligação de um antígeno ao seu recetor (BCR) resulta numa rápida divisão celular e na expansão clonal do linfócito B ativado, originando um número elevado de células progenitoras que podem diferenciar-se em plasmócitos, que secretam anticorpos, ou em linfócitos B de memória. Algumas células B ativadas começam a produzir anticorpos diferentes do IgM, num processo chamado troca de isótipo da cadeia pesada (*Class Switch Recombination, CSR*), resultando na produção de IgG, IgE ou IgA, de acordo com o anticorpo mais adequado para o antígeno em questão figura 3⁽¹⁾.

Este processo, realizado nos centros germinativos dos órgãos linfoides, é mediado pela interação com linfócitos T *helper* foliculares. Estas células fornecem sinais essenciais, incluindo CD40L e citocinas específicas, como IL-4, que induz troca para IgE ou IgG4, IFN- γ , que promove troca para IgG1, e TGF- β , que favorece IgA. A enzima AID (*Activation-Induced Cytidine Deaminase*), ativada por esses sinais, desempenha um papel central ao induzir alterações no DNA das regiões

constantes dos genes de Ig. Essa troca de isotipos permite que os linfócitos B se adaptem melhor às exigências do ambiente imunológico, conferindo maior funcionalidade à resposta imune⁽¹⁻³⁾.

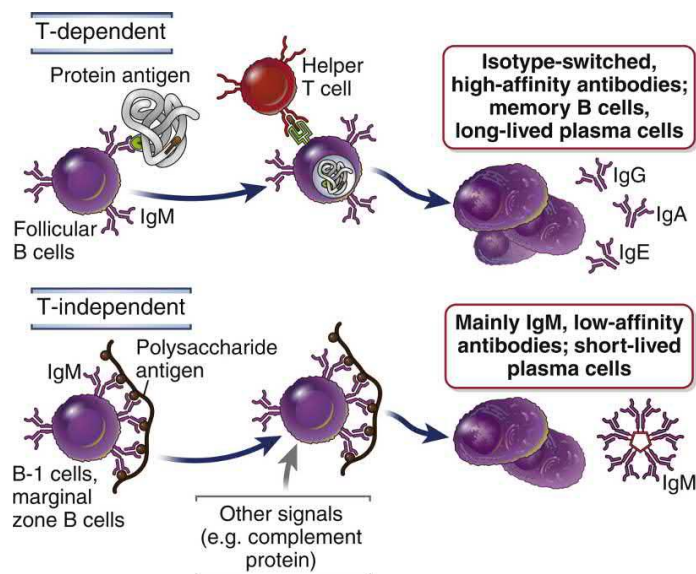


Figura 3 Respostas de anticorpos T-dependentes e T-independentes⁽³⁾

Os microrganismos são eliminados com recurso a vários mecanismos: através da ligação dos anticorpos a estes, impedindo-os de afetar as células do hospedeiro; recobrimo-os com anticorpos IgG, sinalizando-os para serem fagocitados, ou ainda, através da ativação do complemento⁽¹⁻³⁾.

1.2. Síntese das imunoglobulinas

As imunoglobulinas, também conhecidas como anticorpos, são desenvolvidas durante a maturação dos linfócitos, através de um processo designado de recombinação VDJ (variáveis, diversidade, junção). Este mecanismo resulta de uma recombinação genética, originando novas sequências de aminoácidos que possibilitam o reconhecimento de um alargado número de antígenos. O primeiro evento do processo ocorre entre um segmento D e um segmento J do locus da cadeia pesada, onde qualquer DNA entre segmentos é removido. Posteriormente ocorre a junção de um segmento V a montante do complexo DJ formado, originando o segmento VDJ, originando um transcrito primário de RNA. De seguida, ocorre a tradução do mRNA, produzindo a cadeia pesada da imunoglobulina. Relativamente às cadeias leves, o rearranjo acontece de forma semelhante. Inicialmente, os segmentos V e J são unidos, formando o complexo VJ,

posteriormente uma cadeia constante é adicionada durante a transcrição, ocorrendo de seguida a tradução do mRNA cujo resultado é a produção da cadeia leve κ ou λ cadeia leve ⁽²⁾ (Figura 4)

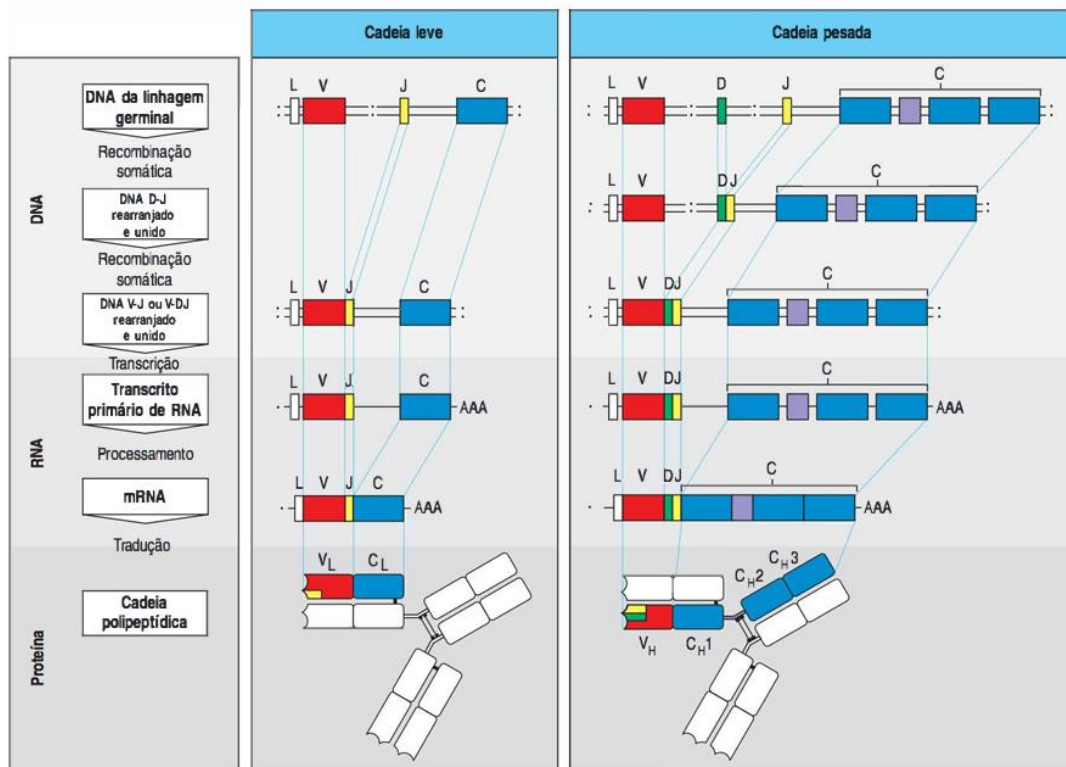


Figura 4 Processo de rearranjo gênico na formação das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas ⁽²⁾.

As imunoglobulinas possuem uma estrutura comum, no entanto apresentam grande variabilidade na região de ligação ao antígeno. Estas moléculas são formadas por um domínio Ig constituído por cerca de 110 aminoácidos, do qual fazem parte duas cadeias leves que podem ser do tipo kappa (κ) ou do tipo lambda (λ) e duas cadeias pesadas que podem ser da classe IgA, IgG, IgM, IgD e IgE.

As cadeias pesadas unem-se às cadeias leves por pontes de dissulfato e são constituídas por regiões aminoterminais variáveis, que são responsáveis pelo reconhecimento do antígeno, e por regiões carboxiterminais constantes que são responsáveis pelas funções protetoras e efetoras as do anticorpo e não participam no reconhecimento do antígeno ⁽²⁾ (Figura 5).

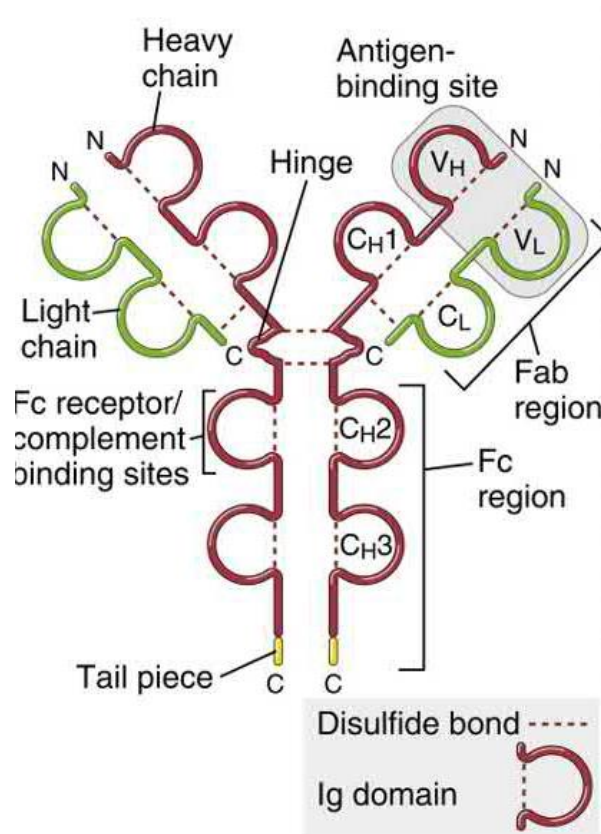


Figura 5 Constituição de anticorpo. ⁽³⁾

1.3. Discrasias Plasmocitárias

As discrasias plasmocitárias são um grupo de patologias que se caracterizam pela presença de uma população de plasmócitos monoclonais. O achado inicial característico de discrasias plasmocitárias é a presença de uma imunoglobulina monoclonal com cadeias pesadas ou leves predominantemente de um tipo, também conhecida como proteína M ou paraproteína. De acordo com a OMS estas condições incluem as gamapatias monoclonais, neoplasias de células plasmáticas, as doenças com deposição de imunoglobulina monoclonal e as doenças de cadeias pesadas (Tabela 1) ⁽⁵⁾.

Tabela 1 Classificação de discrasias plasmocitárias segundo a Organização Mundial da Saúde ⁽⁶⁾.

Classificação da Organização Mundial da Saúde 5ª edição	
Gamapatias Monoclonais	<ul style="list-style-type: none"> • Aglutininas a Frio • Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado IgM • Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado Não IgM • Gamapatia Monoclonal de Significado Renal
Neoplasias de células plasmáticas	<ul style="list-style-type: none"> • Plasmocitoma • Mieloma múltiplo • Neoplasias de células plasmáticas associadas a síndromes paraneoplásicas <ul style="list-style-type: none"> ○ Síndrome de POEMS (Polineuropatia, Organomegalia, Endocrinopatia, Gamapatia Monoclonal, Sintomas Cutâneos) ○ Síndrome de TEMPI (Trombocitose, Endocrinopatia, Gamapatia Monoclonal, Polineuropatia, Insuficiência cardíaca) ○ Síndrome de AESOP (Anemia, Esplenomegalia, Síndrome linfoproliferativa, Oligoclonalidade, Polineuropatia)
Doenças com deposição de imunoglobulina monoclonal	<ul style="list-style-type: none"> • Amiloidose • Doença da deposição de imunoglobulina monoclonal
Doenças de cadeias pesadas	<ul style="list-style-type: none"> • Doença das cadeias pesadas Mu • Doença das cadeias pesadas Gama • Doença das cadeias pesadas Alfa

Neste estudo, abordaremos a citometria de fluxo em três condições hematológicas específicas: a gamapatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI), o mieloma múltiplo (MM) e a leucemia de plasmócitos (LP). A citometria de fluxo tem um papel relevante e bem estabelecido na identificação das células neoplásicas e na monitorização das discrasias abordadas. Estas condições apresentam características adequadas à análise por citometria de fluxo, como a presença de populações de plasmócitos monoclonais que podem ser identificadas e quantificadas ⁽⁷⁾.

Além disso, existem diretrizes e protocolos que recomendam a citometria de fluxo como ferramenta para estas condições ⁽⁸⁻¹⁰⁾. Isso assegura que a técnica não apenas contribua para uma melhor caracterização da patologia, mas também para o acompanhamento da evolução e da resposta ao tratamento. Assim, o foco nestas três discrasias é justificado pela relevância clínica da citometria de fluxo na sua avaliação, permitindo um manejo mais eficaz e direcionado.

1.3.1. Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado

A gamapatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) é uma discrasia plasmocitária benigna, que se caracteriza pela presença de uma proteína monoclonal no soro ou urina produzida por uma população de plasmócitos anómalos ^(11,12). Aparenta ser uma condição dos plasmócitos do centro pós-germinativo, não apresenta sintomas ou sinais clínicos associados a outras patologias, e tem potencial para progredir para condições malignas como amiloidose, macroglobulinemia de *Waldenström* ou MM ^(12,13). É definida pela presença de plasmócitos na MO <10%; proteína monoclonal sérica <3g/dL, e ausência de critérios CRAB (*Calcium, Renal, Anemia, Bone*) (Tabela 2) ^(11,14).

Tabela 2. Critérios CRAB ^(11,15).

Critérios CRAB	Valores
Hipercalcémia (C)	Cálcio sérico > 0,25 mmol /L (>1 mg/dL) superior ao limite superior normal OU > 2,75 mmol/L (>11mg/dL)
Insuficiência Renal (R)	Creatinina sérica >177 µmol/L (>2 mg/dL) OU clearance da creatinina <40 mL/ min
Anemia (A)	Hemoglobina(Hb) <10 g/dL OU valor da Hb >2 g/dL abaixo do limite inferior da faixa normal
Lesões Ósseas (B)	Uma ou mais lesões osteolíticas diagnosticadas por radiografia, CT ou PET-CT

Vários estudos verificaram que há aumento do aparecimento da GMSI com a idade, estando presente em cerca de 3% das pessoas com idade superior a 50 anos, e em 5% com idade superior a 70 anos, afetando mais homens que mulheres⁽¹²⁾, cerca de 3% são caucasianos e 8% afro-americanos ^(16,17). Segundo estimativas, 15% dos doentes com GMSI progredirão para MM ao longo de 25 anos, sendo esta progressão direta ou precedida por um estado intermédio, designado mieloma múltiplo indolente (MMI). Estudos mostram que a taxa de progressão de GMSI para MM é de aproximadamente 1% ao ano, indicando que a progressão não é inevitável e depende de múltiplos fatores genéticos, epigenéticos e microambientais. A progressão de GMSI para MM envolve a aquisição de mutações genéticas adicionais. Apesar da evolução biológica parecer contínua, a progressão não é linear nem garantida, destacando a heterogeneidade desta condição. Um seguimento clínico inadequado pode levar a atrasos no diagnóstico de MM, especialmente em doentes com MMI que pode ser confundido com GMSI. Assim, a monitorização

regular, com exames laboratoriais e imagiológicos, são essenciais para identificar sinais precoces de progressão⁽¹⁸⁾.

1.3.2. Mieloma Múltiplo Indolente

O MMI desenvolve-se entre a GMSI e o MM. Segundo as guidelines do International Myeloma Working Group (IMWG) de 2014, o MMI caracteriza-se pela existência dos seguintes critérios: proteína monoclonal sérica $\geq 3\text{g/dL}$ ou proteína monoclonal urinária $\geq 500\text{mg}$ por 24h e/ou presença de plasmócitos na MO entre 10% – 60% e ausência de lesões em órgãos alvo/eventos definidores de MM^(11,19,20). A idade média do diagnóstico é entre os 50 e os 70 anos. Ao contrário da GMSI que está presente em cerca de 3% da população, o MMI é uma condição menos comum^(19,20), mas com uma alta taxa de progressão para malignidade ao final de 5 anos após o diagnóstico⁽²⁰⁾.

Os fatores de risco para progressão de MMI para MM incluem o tipo de proteína M, (doentes com proteínas do tipo IgA tem um risco de progressão mais rápido do que doentes com proteínas do tipo IgG), proteinúria de Bence Jones, células plasmáticas circulantes, lesões ósseas focais e o tipo de alterações citogenéticas^(19–21).

1.3.3. Mieloma Múltiplo

O MM, também designado por doença de Kähler, é uma neoplasia maligna de origem hematológica que envolve os plasmócitos. É caracterizada pela proliferação clonal desregulada de plasmócitos na MO que sintetizam e secretam Igs monoclonais anómalas, ou um fragmento destas, designado de proteína M^(18,22).

Foi descrito inicialmente em 1850 por William Macintyre, que em conjunto com Henry Bence Jones, observou que doentes com dores ósseas apresentavam proteinúria. A doença foi reconhecida apenas em 1889 por Otto Kähler que publicou um artigo sobre um caso que apresentava dores ósseas, albuminúria, anemia, infeções recorrentes, perda de peso e a proteína na urina com as mesmas características inicialmente identificadas por Bence Jones⁽²³⁾.

O MM é uma neoplasia originada pela GMSI, no entanto, nem todos os casos de GMSI evoluem para MM. O MM representa 1% de todos os cancros e é a segunda neoplasia hematológica mais comum^(22,24). Segundo a organização Global Cancer Today, em Portugal localiza-se na décima sétima posição no aparecimento de novos casos e é a terceira neoplasia hematológica mais comum, com cerca de 994 novos casos diagnosticados, sendo responsável por 662 óbitos em

2022 ⁽²⁵⁾. Globalmente, o aparecimento de casos varia por zona geográfica sendo mais alto nos países desenvolvidos devido aos meios de diagnóstico avançados e maior conhecimento sobre a doença (figura 6).

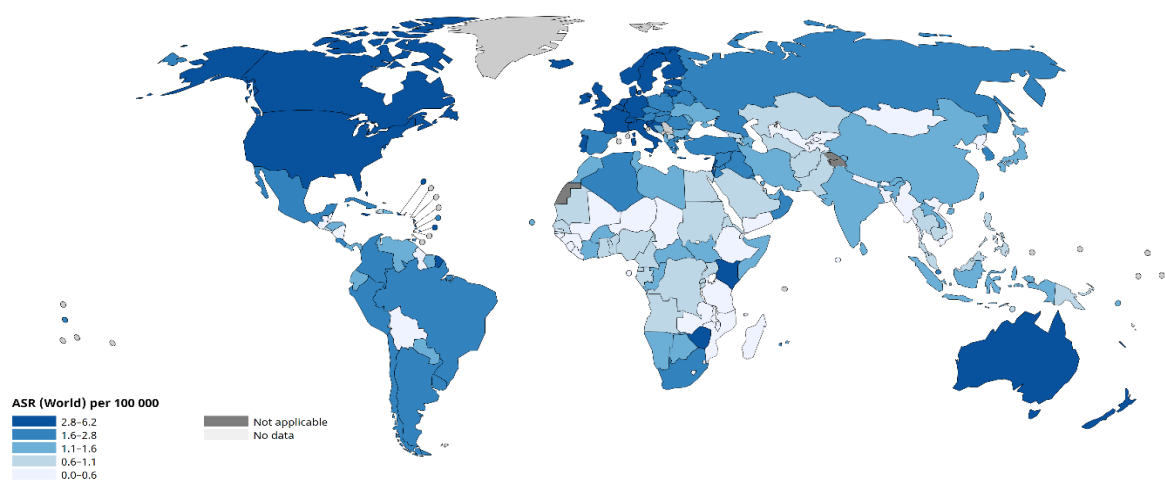
As manifestações clínicas do MM que resultam da proliferação dos plasmócitos neoplásicos, são consequência da produção excessiva de Igs monoclonais e da supressão da imunidade humoral, traduzindo-se em hipercalcémia, destruição óssea, insuficiência renal, supressão da hematopoiese e diminuição da imunidade com consequente aumento da predisposição para desenvolvimento de infeções. Aproximadamente 1% a 2% dos doentes apresentam envolvimento extramedular no momento do diagnóstico, enquanto 8% desenvolvem esta condição no decorrer da doença ⁽²²⁾.

Os critérios de diagnóstico incluem dois dos seguintes critérios:

- Plasmócitos monoclonais na MO $\geq 10\%$, ou existência de plasmocitoma comprovado por biópsia;
- Evidência de lesão de órgão-alvo atribuível ao distúrbio plasmocitário em causa nomeadamente, presença de critérios CRAB (Tabela 2).

Na ausência de lesões de órgão-alvo, a presença de eventos definidores de MM como plasmocitose medular $\geq 60\%$; relação CLL ≥ 100 ; >1 lesão focal observada por ressonância magnética ⁽²²⁾.

Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Both sexes, in 2022
Multiple myeloma



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

Cancer TODAY | IARC
<https://gco.iarc.who.int/today>
Data version: Globocan 2022 (version 1.1) - 08.02.2024
© All Rights Reserved 2024

International Agency
for Research on Cancer
World Health
Organization

Figura 6 Age-Standardize Rate (ASR) – taxa padronizada de incidência por idade permite comparar a incidência do mieloma múltiplo entre populações com diferentes distribuições etárias ⁽²⁵⁾

1.3.4. Leucemia de Plasmócitos

A leucemia de plasmócitos (LP) é uma forma agressiva de leucemia e de discrasia plasmocitária, caracterizada por uma baixa sobrevida e mau prognóstico. Esta condição pode ser dividida em leucemia de plasmócitos primária ou secundária ^(26,27). A LP é classificada como primária (LPP) quando se apresenta 'de novo' em doentes sem evidências de MM anterior e como secundária (LPS) quando é observada como uma transformação leucémica em doentes com MM previamente diagnosticados. Estima-se que a maioria dos casos sejam de LP primária (60–70%) ⁽²⁸⁾.

A morfologia e o imunofenótipo dos plasmócitos da LPP, MM e LPS não são facilmente distinguíveis. Todas expressam CD138 e CD38, uma das diferenças mais evidentes relatada é a ausência do CD56, que é mais expresso no MM ⁽²⁶⁾. Esta ausência de CD56 pode estar relacionada com a função desta molécula que promove a ancoragem dos plasmócitos ao estroma medular. Assim a falta de expressão de CD56 pode estar relacionada com a progressão para doença extramedular como é o caso da leucemia de plasmócitos. Esta patologia difere do MM por ter um nível mais elevado de LDH, citopenia severa e envolvimento extramedular, no entanto não apresenta uma osteólise tão evidente ^(26,27).

Inicialmente os critérios que definiam a LPP incluíam mais de 20% de plasmócitos circulantes ou uma contagem absoluta de plasmócitos superior a $2 \times 10^9/L$ no sangue periférico. No entanto, foi observado que níveis mais baixos de plasmócitos circulantes se relacionavam igualmente com um mau prognóstico ^(27,28). Posto isto, segundo o IMWG, todos os casos de MM com mais de $\geq 5\%$ de plasmócitos circulantes devem ser classificados como LPP, pois a presença de $\geq 5\%$ de plasmócitos circulantes em doentes com MM tem um impacto prognóstico adverso semelhante à LPP, aumentando entre 0,7% e 2,5% o número de doentes que seriam classificados como LPP, o mesmo não se aplica à LPS ⁽²⁸⁾.

Relativamente à citogenética, assim como no MM, as translocações que envolvem o cromossoma 14, t(11;14), t(14;16) e t(4;14) são comuns na LP ⁽²⁶⁾.

Apesar dos avanços recentes no tratamento para doentes com MM, o diagnóstico de LP continua a ser preocupante, devido à terapêutica ineficaz ⁽²⁶⁾.

1.3.5. Fisiopatologia

A compreensão do desenvolvimento das células B e da biologia dos plasmócitos é essencial para a compreensão das discrasias plasmocitárias. Os linfócitos B, passam por vários ciclos de diferenciação na medula óssea e nos órgãos linfoides secundários até se tornarem plasmócitos⁽¹⁸⁾.

Existem dois tipos de patogênese descritas envolvidas na alteração dos plasmócitos, nomeadamente, uma hiperploídia e uma translocação, que são considerados os eventos primários na gênese da GMSI. Aproximadamente metade dos casos do MM e GMSI são hiperdiplóides, geralmente com cópias extra dos cromossomas ímpares. A maior parte dos casos de GMSI e MM que não apresentam hiperdiplóidia são caracterizados por uma translocação primária que envolve o gene das cadeias pesadas das imunoglobulinas. Como apenas um evento não é o suficiente para causar uma neoplasia, é necessário um evento subsequente para a progressão da GMSI para MM. Esse evento inclui translocações secundárias, copy number variations (CNV), alterações epigenéticas e alterações no ambiente medular. Juntos, os eventos primários e secundários originam o fenótipo que caracteriza o curso da doença, o prognóstico e a resposta terapêutica⁽²⁹⁾.

1.3.5.1 Eventos epigenéticos

As alterações epigenéticas, que incluem as mudanças na metilação do DNA e na metilação e acetilação das histonas, são mais comumente observadas nos estádios avançados do MM. Essas modulações epigenéticas, juntamente com a expressão génica, contribuem para a progressão da GMSI para MM.

A metilação do DNA regula a expressão dos genes, inicialmente os níveis de hipermetilação são semelhantes na GMSI e no MM. No entanto observam-se, em fases mais tardias níveis de hipometilação aumentados em casos de MM, sugerindo que isto pode desempenhar um papel no desenvolvimento da doença^(18,29). Estas alterações conduzem à resistência a fármacos, alterações na adesão e sinalização celular. A desmetilação das histonas, que resulta no aumento da transcrição génica, também é mais comum na doença em estádios mais avançados e demonstrou aumentar a transcrição e expressão de vários oncogenes^(30,31).

1.3.5.2 Evolução clonal e mutações secundárias

A evolução clonal refere-se à acumulação de mutações genéticas nos plasmócitos neoplásicos, levando à formação de subclones com características diferentes. As alterações genéticas subsequentes mais frequentes são a mutação no gene KRAS (23% dos casos), NRAS (20%), FAM46C (11%), DIS3 (11%) e TP53 (8%)^(32,33). Outras menos frequentes incluem o gene BRAF, TRAF3, PRDM1, CYLD, RB1, IRF4, EGR1, MAX, HIST1H1E e ACTG1^(34,35). A comparação das alterações genéticas em casos de MM no momento do diagnóstico e após o tratamento apoia o conceito de desenvolvimento clonal ramificado. Em casos com desenvolvimento clonal ramificado, aparecem um ou mais subclones de plasmócitos, enquanto outros desaparecem. Outros padrões propostos de evolução clonal incluem: nenhuma mudança, mudança subclonal e evolução linear. Nos casos sem alteração, a composição subclonal encontrada no diagnóstico é a mesma na recidiva, sugerindo que diferentes subclones de plasmócitos responderam de forma semelhante ao tratamento. Em casos com mudança subclonal, os subclones no momento do diagnóstico também estão presentes na recidiva, mas a frequência dos subclones mudou e um clone tornou-se mais dominante que o outro. Em doentes com padrão linear, surge um novo subclone de plasmócitos entre o diagnóstico e a recidiva, que estava ausente no diagnóstico⁽³³⁾. Este fenómeno é crucial para entender a progressão da doença, a resistência ao tratamento e a recidiva.

1.3.5.3 Microambiente tumoral

A interação entre as células mielomatosas e o ambiente na MO é crucial para o desenvolvimento, tratamento e progressão do MM⁽¹⁸⁾. No microambiente medular existem vários tipos de células, incluindo células do estroma medular (CEM) e osteoblastos. Estas células secretam uma variedade de fatores como citocinas e fatores de crescimento que contribuem para a migração e proliferação do MM e para as lesões ósseas. As CEM são fundamentais para a criação de um nicho favorável para o crescimento do MM. A interação da proteína de adesão celular vascular 1 (VCAM1) na superfície celular das CEM e da integrina nas células do mieloma resulta na secreção de diversas citocinas, que favorecem a proliferação das células do mieloma e inibem a apoptose. O fator de crescimento endotelial (VEGF; que promove a angiogénese), produzido pelas CEM, leva à ativação de vias de sinalização como a Notch que reduzem a apoptose. Os fatores como o ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL; também conhecido como TNFSF11)

e o ligante 3 da quimiocina CC (CCL3) tem funções na diferenciação de osteoclastos precursores em osteoclastos maduros e estão envolvidos na destruição óssea causada pelo MM (36–38). A importância do microambiente tumoral é reforçada por estudos que referem a resistência a fármacos induzida pela ligação de células do MM a CEM⁽¹⁸⁾. O sistema imunológico desempenha um papel significativo no microambiente tumoral. No MM observa-se uma disfunção imunológica generalizada que contribui para o desenvolvimento e progressão da doença e alterações funcionais e quantitativas das células do sistema imune. Esta disfunção imunológica é um mecanismo chave da progressão da doença de GMSI para MM.

As células T reguladoras estão frequentemente aumentadas no MM, promovendo um estado imunossupressor que favorece a sobrevivência das células mielomatosas. Por outro lado, as células T citotóxicas e as células NK, que normalmente são capazes de eliminar células tumorais, têm as suas funções inibidas por citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β , libertadas tanto pelas células do MM quanto por células do estroma medular.

A imunossupressão também está diretamente relacionada à resistência a fármacos. Por exemplo, as citocinas secretadas no microambiente tumoral podem proteger as células do mieloma de tratamentos que visam induzir apoptose^(39,40).

1.3.6. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico das discrasias plasmocitárias é complexo e requer integração de dados clínicos, histológicos, radiológicos, imunológicos e genéticos⁽⁴¹⁾. Em doentes assintomáticos, estas patologias são frequentemente identificadas através de alterações laboratoriais, como hipercalcémia, anemia ou proteinúria⁽⁴²⁾.

Em 2014 os critérios de diagnóstico foram revistos pelo IMWG, incluindo o uso de biomarcadores específicos para definição da doença em conjunto com os critérios CRAB (Tabela 2 e 3). Aproximadamente 2% dos casos de MM não são secretores, o que significa que não apresentam evidência de proteína M. O diagnóstico correto é essencial para que doentes com GMSI e MMI não recebam uma terapêutica inapropriada e desnecessária⁽¹¹⁾.

Tabela 3 Critérios de Diagnóstico segundo o IMWG^(11,41).

Discrasia Plasmocitária	Critérios de Diagnóstico
GMSI IgM	<p>Todos os critérios devem ser cumpridos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Proteína monoclonal sérica IgM <3 g/dL • Plasmócitos clonais na MO <10% • Ausência de critério CRAB que possam ser atribuídos como consequência dos plasmócitos neoplásicos
GMSI não IgM	<p>Todos os critérios devem ser cumpridos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Proteína monoclonal sérica não IgM <3 g/dL • Infiltração linfoplasmocítica na MO <10% • Nenhuma evidência de anemia, sintomas constitucionais, hiperviscosidade, linfadenopatia ou hepatoesplenomegalia, que pode ser atribuída ao distúrbio linfoproliferativo subjacente.
MMI	<p>Devem ser cumpridos ambos os critérios:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Proteína monoclonal sérica (IgG ou IgA) ≥3 g/dL, ou proteína monoclonal urinária ≥500 mg por 24 horas e/ou células plasmáticas clonais da medula óssea 10% – 60% • Ausência de eventos definidores de mieloma ou amiloidose
MM	<p>Devem ser cumpridos ambos os critérios:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Plasmócitos clonais de medula óssea ≥10% ou plasmocitoma ósseo ou extramedular comprovado por biópsia. <p>Qualquer um ou mais dos seguintes eventos definidores de mieloma:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evidência de danos em órgãos-alvo que podem ser atribuídos ao distúrbio proliferativo de células plasmáticas (Tabela 2). • Percentagem clonal de células plasmáticas da medula óssea ≥ 60% • Razão de CLL séricas envolvidas/não envolvidas ≥100 (o nível de CLL envolvido deve ser ≥100 mg/L) • >1 lesão focal em estudos de ressonância magnética (pelo menos 5 mm de tamanho)

1.3.6.1 Avaliação da MO

A avaliação da morfologia das células plasmáticas na MO constitui uma técnica muito importante no diagnóstico de discrasias plasmocitárias. A contagem manual das células do aspirado de MO é considerado a técnica de “gold-standard” e permite aferir a percentagem de plasmócitos na MO. Além disso, o material aspirado também é utilizado para caracterização imunofenotípica das células neoplásicas, detecção da doença residual mensurável por citometria de fluxo e para realização da técnica de FISH de forma a detetar alterações citogenéticas.

As alterações genéticas têm um papel fundamental na caracterização da doença. A presença ou ausência de alterações citogenéticas específicas como t(4;14), t(14;16), t(14;20), ganho (1q) e a del(17p) influenciam o curso da doença, resposta à terapêutica e prognóstico, tornando a sua identificação de extrema importância (Tabela 4) ⁽⁴¹⁾.

Tabela 4 Alterações citogenéticas associadas ao prognóstico de MM^(11,43).

Risco	Alteração citogenética	Sobrevivida Geral
Risco Alto	<ul style="list-style-type: none"> • del (17p) • t(14;16) • t(14;20) 	3 anos
Risco Intermédio	<ul style="list-style-type: none"> • t(4;14) • Ganho (1q) 	4-5 anos
Risco Standard	<p>Todas as outras incluindo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Trissomias • t(11;14) • t(6;14) 	7-10 anos

1.3.6.2 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo (CF) é fundamental no diagnóstico diferencial de neoplasias hematológicas, contribuindo também para a avaliação do risco de progressão e de sobrevida da doença. É uma técnica multiparamétrica que utiliza os princípios da dispersão da luz e da emissão de fluorescência através de fluorocromos conjugados a moléculas específicas para análise e caracterização das populações celulares ⁽⁴⁴⁾.

Os citómetros de fluxo são constituídos por três sistemas: fluídico, ótico e eletrónico. O sistema fluídico é constituído por uma solução salina tamponada que provoca o fluxo laminar das células até a interseção por um laser. O sistema ótico é composto por lasers que tem como função a ativação dos fluorocromos originando sinais visíveis, que são recebidos por um sistema de deteção constituído por filtros que absorvem diferentes comprimentos de onda e que direcionam a luz fluorescente para detetores específicos, o que permite captar informação proveniente da dispersão da luz (*FSC – Forward Scatter Characteristics* e *SSC – Side Scatter Characteristics*) e da emissão de fluorescência (*PMT– Photo Multiplier Tubes*). Posteriormente, estes sinais são convertidos pelo sistema eletrónico em sinais digitais que permitem obter informações sobre o tamanho (*FSC*), complexidade (*SSC*) e intensidade de fluorescência (*FL*) ⁽⁸⁴⁾ (figura 7).

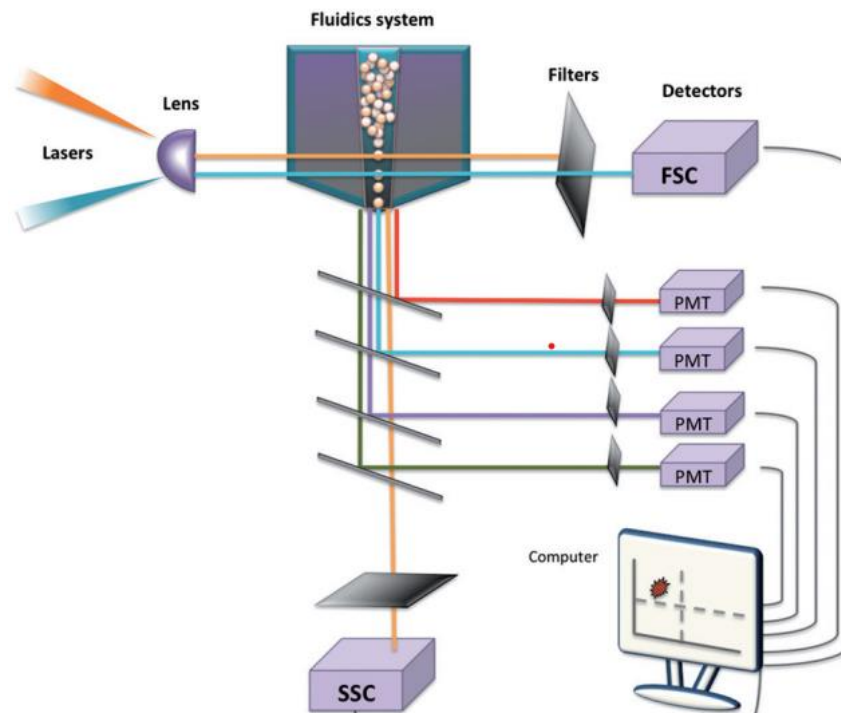


Figura 7 Esquema de detecção e processamento de sinais.⁽⁸⁴⁾

O diagnóstico de discrasias de células plasmáticas baseia-se numa combinação de métodos diagnósticos no qual a imunofenotipagem por CF tem um papel essencial, devido à descoberta de marcadores específicos que permitem identificar os plasmócitos, bem como detetar fenótipos aberrantes, possibilitando a caracterização e contagem destas células mesmo quando se encontram em pequenas quantidades na amostra.

Os métodos morfológicos tradicionais não conseguem distinguir células clonais de células normais, sendo essa característica a grande mais valia da CF⁽⁸⁾, no entanto, são o “gold standard” para apurar a percentagem de plasmócitos anómalos na MO.

De acordo com o consórcio da Euroflow, a avaliação da expressão de vários marcadores como o CD38, CD138, CD19, CD45 e CD56 por CF é capaz de identificar populações de células plasmáticas aberrantes⁽¹⁰⁾. Esta organização desenvolveu vários painéis de anticorpos úteis na identificação de neoplasias hematológicas.

Na avaliação das suspeitas de discrasias plasmocitárias é importante saber distinguir entre o fenótipo normal e aberrante dos plasmócitos.

O fenótipo normal dos plasmócitos é definido por uma expressão forte de CD38 e uma expressão positiva de CD138. Embora o CD38 não seja específico para estas células, os plasmócitos normais caracterizam-se por ter uma expressão de CD38 mais forte. Por ser uma molécula

expressa em plasmócitos normais e neoplásicos este marcador é utilizado para a identificação de plasmócitos, podendo a sua expressão estar diminuída em casos de MM⁽⁴⁵⁾. Além da expressão destes dois marcadores, os plasmócitos normais apresentam maioritariamente CD19 positivo e CD45 positivo, são maioritariamente negativos para CD56 e expressam cadeias leves policlonais, com uma maior expressão de cadeias kappa que lambda^(8,46,47).

Além destes marcadores, os plasmócitos normais expressam CD81 e apresentam uma expressão forte de CD27, sendo CD117 e CD28 negativos⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾ (Anexo I).

Estes CDs desempenham um papel importante e interagem entre si: os altos níveis de CD38 nos plasmócitos em relação a outras células identificaram essa proteína como um alvo para o tratamento. Estudos referem que os níveis mais baixos de CD38 nas células de MM sejam um dos mecanismos de progressão extramedular da doença e de resistência ao anti-CD38. No entanto, o CD38 não é frequentemente usado para fins de prognóstico no MM^(51,52).

O CD138 é uma glicoproteína expressa nas células pré-B, perdida durante a maturação dos linfócitos B e re-expressa nos plasmócitos. Assim como o CD38, a sua função a nível da caracterização por imunofenotipagem é a identificação de plasmócitos. Esta molécula tem na sua constituição sulfato de heparano, que interage com proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, promovendo a adesão celular. Desempenha um papel importante no MM, por ser um coreceptor versátil para quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, promovendo a sua sobrevivência, e consequentemente o crescimento e proliferação tumoral^(47,53).

O CD45 é uma molécula expressa em todas as células hematopoéticas nucleadas, a sua função está descrita como sendo um regulador de ativação mediada de linfócitos B e T, no entanto o seu papel no MM permanece controverso. Plasmócitos CD45+ são descritos como sendo mais proliferativos e associados a um pior prognóstico^(47,54). Assim como alguns autores defendem que casos CD45- estão associados a um prognóstico mais desfavorável⁽⁵⁴⁾.

O CD19 é um antigénio expresso na superfície da maioria dos linfócitos B, a sua expressão inicia-se durante o rearranjo do gene da imunoglobulina, e aumenta progressivamente ao longo da maturação do linfócito B até à sua diferenciação em plasmócitos⁽⁴⁷⁾. A sua expressão apresenta-se diminuída ou ausente nos casos aberrantes, e em plasmócitos normais caracteriza-se por ter uma expressão maioritariamente positiva⁽⁸⁾.

O CD56, ou molécula de adesão celular neuronal (NCAM), é uma glicoproteína membranar, e um membro da superfamília das imunoglobulinas, sendo expresso em várias células, incluído as células NK e nervosas. É expresso numa pequena percentagem em plasmócitos normais, mas

numa percentagem de cerca de 80% de plasmócitos aberrantes, especialmente no MM (55). A superexpressão de CD56 promove a transcrição de genes antiapoptóticos, o que leva à proliferação celular descontrolada e um efeito antiapoptótico. No entanto, autores referem que a negatividade do CD56 está associada a um pior prognóstico⁽⁵⁶⁾.

O CD28 é expresso em células T e atua como um recetor co-estimulatório junto ao recetor de células T, o que resulta numa proliferação aumentada e produção de citocinas. A expressão deste marcador é característica do MM porque este não é expresso em plasmócitos normais. Além disso, a expressão de CD28 está correlacionada com a progressão da doença, atingindo 93% a 100% de expressão no MM recidivado e leucemia de plasmócitos (LP), respetivamente⁽⁴⁷⁾.

O CD27 é um membro da superfamília dos recetores do fator de necrose tumoral, é expresso em linfócitos T, linfócitos B e células NK. A interação entre o CD27 e o CD70 (que é o seu ligando) promovem a produção de plasmócitos. Estudos descrevem que o CD27 exerce funções reguladoras no microambiente tumoral e a sua expressão em plasmócitos está intrinsecamente ligada à carga tumoral, à resposta ao tratamento e ao prognóstico geral em doentes com MM⁽⁵⁷⁾.

O CD117 ou ckit é um recetor de tirosina quinase e é normalmente expresso pelos mastócitos e precursores hematopoiéticos, incluindo as HSCs entre outras. A expressão aberrante de CD117 ocorre em cerca de 30% de todos os casos de mieloma múltiplo (MM). A sua expressão está descrita como conferindo um bom prognóstico no MM⁽⁵⁸⁾.

O CD81 é uma proteína de superfície celular, amplamente expressa em linfócitos B e plasmócitos maduros, do tipo tetraspanina que desempenha um papel importante na interação e comunicação entre as células B e T. Regula a expressão de CD19 nos linfócitos B e está envolvido no crescimento celular, na sinalização e na migração para a medula óssea. A expressão de CD81 é maioritariamente negativa no MM e positiva em plasmócitos normais, o que faz desta proteína um marcador conveniente para diferenciar células normais de neoplásicas^(47,50,59).

O imunofenótipo da GMSI é caracterizado pela existência de duas populações de plasmócitos: uma normal (CD19 positiva, CD56 negativa e policlonal) e outra anómala (CD19 negativa, CD56 negativa ou positiva, e monoclonal^(16,60).

O imunofenótipo dos casos de MM é caracterizado por uma população monoclonal CD138 e CD38 positiva, a maioria dos casos não expressa o CD45 ou apresenta uma fraca expressão, é CD19 negativa, CD27 negativa em cerca de 40-50% dos casos, CD81 negativa ou fraca, CD56 maioritariamente positiva, CD117 positiva em cerca de 40% dos casos, e CD28 positiva em cerca de 15-45% dos casos^(8,46,60-63).

A contribuição da CF para o diagnóstico diferencial de discrasias plasmocitárias passa por distinguir MM de plasmocitose reativa, linfomas de células B de baixo grau com grande diferenciação plasmocítica, linfomas B não Hodgkin, entre outras patologias. Além do auxílio no diagnóstico diferencial, a CF é utilizada na monitorização da doença residual mensurável e monitorização da resposta ao tratamento no MM, é um método rápido e fácil de executar, o que lhe confere a capacidade de ser utilizada de forma rotineira.

1.3.6.3 Outras análises laboratoriais

Além das técnicas de avaliação morfológica e citometria de fluxo, outras análises laboratoriais desempenham um papel fundamental no diagnóstico de discrasias plasmocitárias. Estas incluem análises bioquímicas para avaliar a função renal, níveis de cálcio, a presença de proteínas monoclonais no sangue e na urina e análises hematológicas:

- A eletroforese de proteínas no soro e na urina é utilizada para identificar a presença de proteína monoclonal. A imunofixação é então usada para confirmar o tipo de imunoglobulina envolvida (IgG, IgA, etc.) e a cadeia leve correspondente (kappa ou lambda)^(15,64).
- O doseamento de cadeias leves livres é importante para detetar cadeias leves livres kappa ou lambda. Níveis elevados de cadeias leves livres e uma relação anormal entre kappa e lambda são indicativos de MM e são úteis para o diagnóstico e monitorização da resposta ao tratamento^(15,64).
- A função renal é frequentemente comprometida em doentes com MM devido à deposição de proteínas monoclonais nos túbulos renais. Análises como creatinina sérica, ureia, e taxa de filtração glomerular (TFG) são essenciais para avaliar a gravidade do dano renal^(15,42,64).
- Os doentes com MM podem apresentar hipercalcémia devido à osteólise causada pela proliferação de células plasmáticas malignas, assim sendo o doseamento de cálcio sérico é uma análise relevante^(15,64).
- A análise de urina de 24 horas, utilizada para medir a quantidade de proteínas, especialmente cadeias leves livres, pode ser significativa no diagnóstico e monitorização do MM. A presença de proteínas de Bence Jones é característica do MM e indica envolvimento renal^(15,64).

- Hemograma completo, utilizado para avaliar a extensão da anemia e outras alterações hematológicas que são comuns em doentes com MM (42,64).

Estas análises laboratoriais, em conjunto com a avaliação clínica, radiológica e molecular, são cruciais para a confirmação do diagnóstico de MM, estratificação de risco e orientação terapêutica (42).

1.3.7. Estadiamento

O estadiamento do MM pode ser definido de acordo com os critérios *Durie-Salmon*, Sistema Internacional de Estadiamento (ISS, do inglês *Revised-International Staging System*) e mais recentemente do Sistema Internacional de Estadiamento Revisto (R-ISS) (43). A classificação do MM evoluiu ao longo do tempo para melhorar a precisão do estadiamento e do prognóstico.

O sistema de estadiamento *Durie-Salmon*, foi criado há mais de 40 anos e foi o sistema mais utilizado. No entanto, possui limitações porque correlaciona a massa tumoral estimada com os sintomas clínicos para obter o estadiamento.

Em 2005, o Sistema Internacional de Estadiamento (ISS) foi introduzido como uma abordagem atualizada para o estadiamento do MM, este sistema é mais simples, e é capaz de prever a progressão da doença de forma mais eficaz e confiável utilizando os níveis de albumina sérica e β 2-microglobulina como marcadores de prognóstico (15) (Tabela 5). Em 2015 foi estabelecido o Sistema Internacional de Estadiamento Revisto (R-ISS) que tem em consideração os mesmos parâmetros do ISS mas acrescentam os fatores da biologia da doença, nomeadamente as alterações citogenéticas e os níveis de LDH (Tabela 6) (11).

O R-ISS e ISS classificam os doentes em 3 estadios diferentes: estadio I, estadio II e estadio III (65) (Tabela 5 e 6).

Tabela 5 Sistema Internacional de Estadiamento para MM (15).

Estadio ISS	Critérios
Estadio I	<ul style="list-style-type: none"> • β2-microglobulina sérica <3,5 mg/l • Albumina sérica \geq3,5 g/dL
Estadio II	<ul style="list-style-type: none"> • Não cumpre os critérios do estadio I ou estadio III
Estadio III	<ul style="list-style-type: none"> • β2-microglobulina sérica >5,5 mg/l

Tabela 6 Sistema Internacional de Estadiamento Revisto para MM ⁽¹¹⁾.

Estadio R-ISS	Critérios
Estadio I	<ul style="list-style-type: none">• β2-microglobulina sérica <3,5 mg/l• Albumina sérica \geq3,5 g/dL• LDH normal• Ausência de alterações de alto risco por FISH
Estadio II	<ul style="list-style-type: none">• Não cumpre os critérios do estadio I ou estadio III
Estadio III	<ul style="list-style-type: none">• β2-microglobulina sérica >5,5 mg/l e• Alterações por FISH de alto risco (t(14;16), t(4;14) ou del(17p)) OU LDH aumentada

O prognóstico é afetado por características como o estadio, a idade, a presença de alterações citogenéticas e a resposta à terapêutica. A coexistência de diferentes alterações genéticas alteram o prognóstico da doença ⁽¹⁸⁾.

Na última década, as taxas de sobrevivência melhoraram significativamente para a população em geral, devido à disponibilidade de tratamentos mais eficazes que levaram a uma maior sobrevivência dos doentes com MM ⁽⁶⁶⁾.

2. Objetivos

O presente estudo tem como principal objetivo caracterizar os doentes diagnosticados com discrasias plasmocitárias na Unidade Local de Saúde de São João (ULS São João), nomeadamente com GMSI, MM e LP, utilizando a imunofenotipagem celular por citometria de fluxo. De forma a efetuar esta caracterização pretende-se:

- identificar os marcadores celulares mais relevantes no diagnóstico das discrasias plasmocitárias em estudo;
- avaliar os marcadores imunofenotípicos de prognóstico no MM, comparando-os com o estadiamento de acordo com o ISS e R-ISS.

Este estudo tem como finalidade aumentar o conhecimento da aplicabilidade da imunofenotipagem por CF no estudo de discrasias plasmocitárias, através de um painel de anticorpos desenvolvido pelo consórcio *EuroFlow*.

3. Material e Métodos

Foi realizado um estudo observacional analítico transversal através da consulta dos registos com indicação clínica para estudo imunofenotípico de discrasias plasmocitárias na ULS S. João.

Este estudo foi autorizado pela comissão de ética do ULS São João. Os dados presentes nos registos foram obtidos de forma anónima através do programa *CliniData*, um software que permite o registo e armazenamento de resultados analíticos de diversas áreas da patologia clínica.

3.1. População e amostra em estudo

Foi selecionada como amostra os registos com indicação clínica para estudo imunofenotípico de discrasias plasmocitárias na ULS São João de 01/04/2022 a 01/04/2024. Foram incluídos todos os registos que apresentavam diagnóstico inicial de Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado, Mieloma Múltiplo e Leucemia de Plasmócitos. As restantes discrasias plasmocitárias segundo a classificação da OMS foram excluídas do presente estudo.

3.2. Procedimentos

Após a seleção de registos através do diagnóstico foram consultados e registados os seguintes parâmetros:

3.2.1 Sociodemográficos:

- Sexo e idade.

3.2.2 Parâmetros analíticos com valores de referência:

- Hemoglobina (13 – 18 g/dL), β 2-microglobulina (1090 – 2530 μ g/L), cálcio total (4,1 – 5,2 mEq/L), ureia (10 – 50 mg/dL), creatinina (0,67 – 1,75mg/dL), imunoglobulinas séricas IgA (90 – 410 mg/dL), IgG (600 – 1560 mg/dL), IgM (30 – 360 mg/dL), LDH (135 – 225 U/L), cadeias leves kappa (200 – 400 mg/dL) e lambda (110 – 240 mg/dL), a razão cadeias leves kappa/lambda (1,35–2,65 mg/dL), as cadeias leves livres kappa (0,33–1,94 mg/dL) e lambda (0,57–2,63 mg/dL) e razão cadeias leves livres kappa/lambda (0,26–1,65 mg/dL).

3.2.3 Resultados de citogenética:

- A pesquisa por foi realizada por FISH e incluiu as alterações cromossômicas t(11;14)(q13;q32) CCND1-IGH, t(4;14)(p16;q32) FGFR3-IGH, t(14;16)(q32;q23) IGH-MAF, t(14;20)(q32;q12) IGH-MAF, deleção 17p (Del17p), e ganho de 1q associado a alterações na TP53.

3.2.4 Imunofenotipagem de plasmócitos por citometria de fluxo

O estudo imunofenotípico foi realizado em amostras de medula óssea. A preparação das amostras seguiu os protocolos instituídos pela ULS São João, que são baseados nos protocolos do consórcio do *Euroflow*⁽⁶⁷⁾. O painel utilizado para imunofenotipagem de discrasias plasmocitárias incluiu os marcadores recomendados pela *Euroflow*, registados na tabela 7.

Tabela 7 Constituição do painel de anticorpos para discrasias plasmocitárias e respetivos fluorocromos, como descrito pelo consórcio da Euroflow⁽¹⁰⁾.

Marcador (Tubo1)	CD38	CD138	CD19	CD45	CD56	cylgk	cylgλ	
Fluorocromo	FITC	V500-C	PECy7	V450	PE	APC	APC-H7	
Marcador (Tubo2)	CD28	CD27	CD117	CD81	CD19	CD45	CD138	CD38
Fluorocromo	PE	PerCPy5.5	APC	APCH7	PECy7	V450	V500-C	FITC

As amostras foram adquiridas no citómetro de fluxo *BD FACSCanto™ II* da *Becton Dickinson®* (*Cytognos, Salamanca, Spain*), no software *BD FACSDiva™* (*BD Pharmingen™, Salamanca, Spain*).

Na análise da imunofenotipagem foi utilizado o software *Infinicyt 2.0™* (*Cytognos, Salamanca, Spain*). Os plasmócitos foram identificados pela expressão positiva de CD38 e CD138, e as características *FSC* (*Forward Scatter Characteristics*) e *SSC* (*Side Scatter Characteristics*) (figura 8). O perfil antigénico dos plasmócitos aberrantes foi avaliado com base na presença ou ausência de expressão de antígenos, no padrão de expressão dos antígenos (homogéneo versus heterogéneo) e na percentagem de plasmócitos que mostraram expressão positiva para um determinado antígeno (figura 9). Assim, a expressão dos marcadores celulares de interesse, no caso CD19, CD27, CD28, CD45, CD56, CD81, CD117 e foi classificada como: homogénea (positiva e negativa) e heterogénea (positiva e negativa), conforme a sua dispersão. De forma a analisar o fenótipo e ser possível a utilização de estatística inferencial, os casos foram agrupados em duas categorias: casos positivos, que incluíram aqueles com positividade heterogénea/homogénea e casos negativos. Os casos com padrão de expressão heterogéneo foram considerados, para fins estatísticos, como positivos se apresentassem mais de 20% de células positivas, esta classificação em dois grupos foi realizada de acordo com o descrito na literatura⁽⁶³⁾.

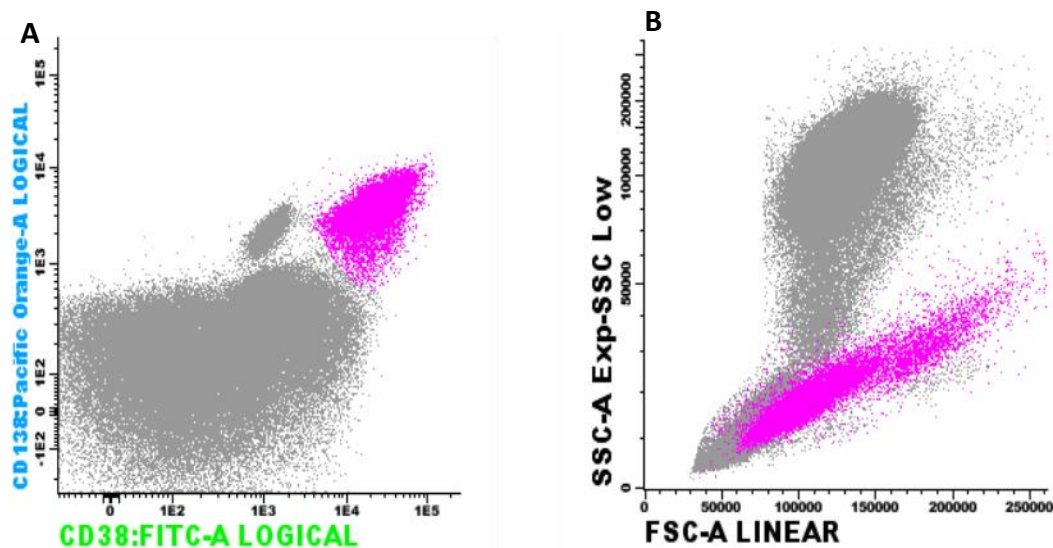


Figura 8 Identificação dos plasmócitos numa amostra de MO, de um caso de plasmócitos anómalo. Os plasmócitos foram identificados pela intensidade de expressão de CD38 e CD138 (A) e características FSC e SSC (B). Fonte: ULS S. João.

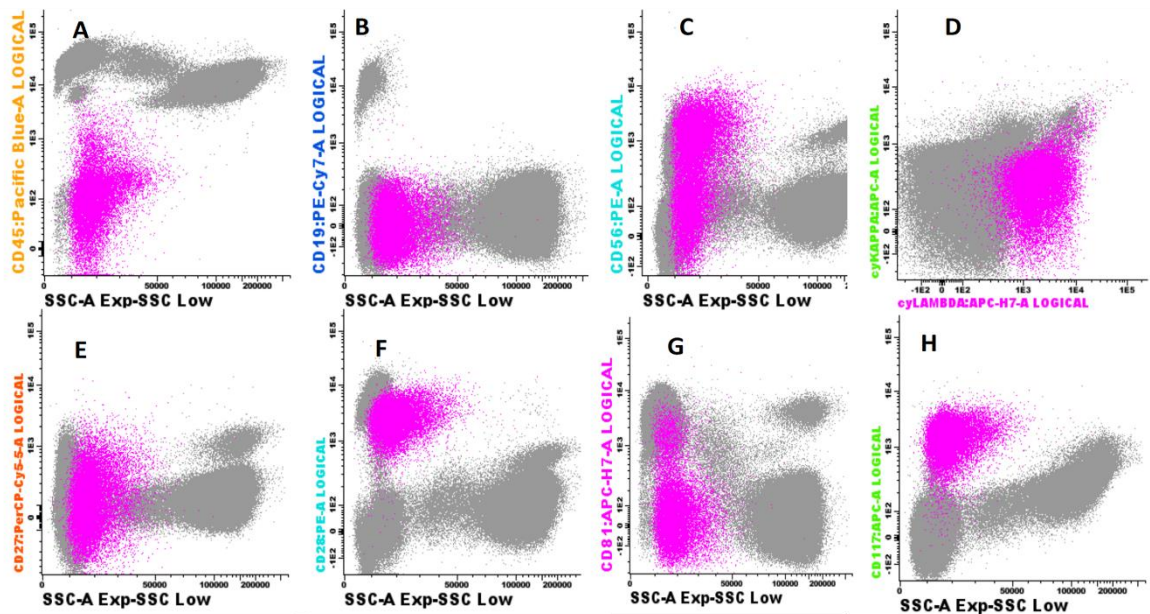


Figura 9 - Avaliação da expressão dos marcadores celulares estudados, num caso de plasmócitos mielomatosos: (A) Expressão heterogênea negativa de CD45 (CD45 versus SSC); (B) Expressão homogênea negativa de CD19 (CD19 versus SSC); (C) Expressão heterogênea positiva de CD56 (CD56 versus SSC); (D) Expressão monoclonal de cadeias lambda (kappa versus lambda); (E) Expressão heterogênea a negativa de CD27 (CD27 versus SSC); (F) Expressão homogênea positiva de CD28 (CD28 versus SSC); (G) Expressão heterogênea negativa de CD81 (CD81 versus SSC); (H) Expressão homogênea positiva de CD117 (CD117 versus SSC). Fonte: ULS S. João.

3.2.5 Estadiamento de doentes com MM

Com base nos critérios do ISS e R-ISS foi definido o estadiamento dos doentes com MM. Estes critérios englobam três estádios, a patologia foi inserida no estadio de acordo com os níveis de albumina, e β 2-microglobulina no ISS, e no R-ISS foi considerado além dos critérios ISS os níveis de LDH e a classificação das alterações citogénicas⁽¹¹⁾.

3.3 Estatística

A análise de dados foi realizada com recurso ao software de análise estatística IBM SPSS *Statistics 29.0.1.0*. Foram realizados testes de estatística descritiva: frequências absolutas e relativas, medidas de tendência central que incluíram a média; medidas de dispersão que incluíram o desvio padrão.

Para relacionar o fenótipo com o estadio, e com as alterações genéticas foram utilizados os testes não paramétricos Qui-Quadrado de Pearson ou Teste Exato de Fisher para duas amostras independentes. As diferenças estatisticamente significativas foram indicadas por um valor de $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Caracterização da amostra em estudo

No presente estudo, foram analisados 148 casos diagnosticados com uma discrasia plasmocitária (GMSI, MM e LP), que foram submetidos a imunofenotipagem na ULS São João. Os resultados apresentados na Tabela 8 refletem os valores médios dos parâmetros analíticos da amostra em estudo das diferentes discrasias plasmocitárias, bem como a distribuição relativamente à faixa etária e ao sexo.

Os casos em estudo apresentavam idades entre os 40 e 90 anos, com uma média de diagnóstico de 66,09 anos. A média de idade no diagnóstico foi de 65,68 anos para o sexo feminino e 66,80 anos para o sexo masculino. No sexo masculino, a idade mínima foi de 40 anos e a máxima de 90 anos, enquanto no sexo feminino, a idade variou de 41 a 86 anos.

Relativamente ao diagnóstico, observou-se um número igual de casos de GMSI (N=73) e MM (N=73), além de 2 casos de LP. O maior número de casos de MM, foi observado no sexo feminino representando 28,4% (N=42) dos casos com esta patologia, enquanto a LP foi registada em 1,4% (N=2).

Na avaliação dos parâmetros analíticos observaram-se alterações significativas em relação aos valores de referência, destacando-se o aumento da LDH na LP, com uma média elevada. A β 2-microglobulina apresentou valores aumentados em todos os grupos de discrasias, com médias de 3450 μ g/L no GMSI, 6001 μ g/L no MM e 19030 μ g/L na LP. Relativamente aos parâmetros dos critérios CRAB, que tem importância no diagnóstico, no que diz respeito à hemoglobina, verificou-se uma redução nos três grupos, com uma média de 12,78 g/dL no GMSI, 10,02 g/dL no MM e uma queda acentuada na LP, onde os valores atingiram 6,6 g/dL. A ureia mostrou-se elevada em todos os grupos, com médias de 54,87 mg/dL no GMSI, 60,49 mg/dL no MM e 167,5 mg/dL na LP. Já a creatinina apresentou valores médios aumentados no MM (2,20 mg/dL) e LP (2,28 mg/dL). Nas imunoglobulinas séricas, observou-se um aumento significativo da IgA no MM, com uma média de 815 mg/dL, enquanto a IgG esteve elevada em todos os grupos: 1568 mg/dL no GMSI, 2401 mg/dL no MM e 2745 mg/dL na LP com consequente aumento no rácio kappa/lambda em todos os grupos. É também importante referir os valores médios elevados das cadeias leves lambda (272 mg/dL no MM e 589 mg/dL na LP), bem como a kappa (627 mg/dL no MM).

Tabela 8 Caracterização dos casos em estudo relativamente aos parâmetros analíticos e sociodemográficos.

		GMSI		MM		LP	
Sexo	Masculino (N/%)	37 (25%)		31 (20%)		1 (0,7%)	
	Feminino (N/%)	36 (24,3%)		42 (28,4%)		1 (0,7%)	
Idade (N/ \bar{x})		73/68,9		73/63,37		2/71	
Parâmetros analíticos/VR		N	\bar{x} (s)	N	\bar{x} (s)	N	\bar{x} (s)
LDH (135 – 225 U/L)		70	175 (\pm 50)	73	192 (\pm 107,75)	2	353 (\pm 38,89)
B2-microglobulina (1090-2530 μ g/L)		49	3450 (\pm 2561)	55	6001 (\pm 7651)	2	19030 (\pm 22726)
Albumina (38-51g/dL)		69	54,51 (\pm 7,51)	73	42,58 (\pm 12,31)	2	34,3 (\pm 22,34)
Hemoglobina (13-18g/dL)		73	12,78 (\pm 1,99)	73	10,02 (\pm 5,24)	2	6,6 (\pm 0,56)
Ureia (10-50mg/dL)		73	54,87(\pm 32,95)	73	60,49 (\pm 40,93)	2	167,50 (\pm 79,90)
Creatinina (0,67-1,17mg/dL)		73	1,12(\pm 1,67)	73	2,20 (\pm 5,59)	2	2,28 (\pm 0,41)
Cálcio (4,1-5,2mEq/dL)		63	4,60(\pm 0,49)	70	4,54 (\pm 0,74)	2	5,55 (\pm 1,62)
Imunoglobulinas Séricas	IgA (90-419 mg/dL)	71	310 (\pm 383)	70	815 (\pm 1605)	2	38 (\pm 8,4)
	IgG (600-1560 mg/dL)	70	1568 (\pm 750)	70	2401 (\pm 2694)	2	2745 (\pm 2326)
	IgM (30-360mg/dL)	71	81 (\pm 110)	69	27 (\pm 33)	2	16 (\pm 14)
Cadeias Leves	K (200-400 mg/dL)	71	347 (\pm 214)	71	627 (\pm 763)	2	66 (\pm 48)
	λ (110-240mg/dL)	71	191 (\pm 165)	71	272 (\pm 401)	2	589 (\pm 764)
	K/ λ (1,35-2.65 mg/dL)	71	5,6 (\pm 8,67)	71	30,05 (\pm 52,92)	2	1,04 (\pm 1,42)
Cadeias Leves Livres	K (0,33-1,94 mg/dL)	72	8,06 (\pm 11,75)	69	111,55 (\pm 303,47)	1	1,13
	λ (0,57-2,63 mg/dL)	72	6,63 (\pm 16,28)	69	84,71 (\pm 253,61)	1	1419,53
	K/ λ (0,26-1,65 mg/dL)	72	6,36 (\pm 14,02)	68	162,12 (\pm 342,75)	1	0

Abreviaturas - VR: Valores Referência, GMSI: gamapatia monoclonal de significado indeterminado, MM: mieloma múltiplo, LP: Leucemia de Plasmócitos, LDH: Lactato Desidrogenase, N: Frequência absoluta.

Relativamente ao estadiamento, os casos de MM foram classificados de acordo com os sistemas ISS e R-ISS. Dos 73 casos de MM, apenas 55 puderam ser classificados segundo o ISS, devido à ausência de 18 resultados da β 2-microglobulina. Além disso, apenas 39 casos foram classificados de acordo com o R-ISS, devido à ausência combinada de resultados da β 2-microglobulina e análises de citogenética (FISH).

Segundo os critérios do ISS, a maioria dos casos classificados (38,2%) encontrava-se no estadiamento I no momento do diagnóstico, o que sugere um prognóstico relativamente mais favorável nesses casos. Já em relação ao R-ISS, que incorpora informações citogenéticas e de LDH, a maior parte dos casos (48,7%) foi classificada no estadiamento II, refletindo um perfil de risco intermédio (Tabela 9).

Tabela 9 Número de casos do estadiamento ISS e R-ISS.

Estadiamento	I	II	III	Total
ISS (N/%)	21 (38,2%)	16 (29,1%)	18 (32,7%)	55
R-ISS (N/%)	11 (28,2%)	19 (48,7%)	9 (23,1%)	39

4.2 Alterações genéticas mais frequentes por discrasia plasmocitária

A análise das alterações genéticas nos casos com MM e LP foi realizada utilizando a técnica de FISH. A Tabela 10 apresenta a distribuição das diferentes alterações genéticas observadas.

Tabela 10 Alterações genéticas por FISH.

DP	Alteração citogenética por FISH							Total
	SA	t(11;14)	Del(17p)	t(4;14)	Ganho(1q)	t(14;16)	Trissomia	
MM (N/%)	23 (45,1%)	7 (13,7%)	7 (13,7%)	3 (5,9%)	8 (15,7%)	2 (3,9%)	1(2%)	51(100%)
LP (N/%)	1 (50%)	0	1(50%)	0	0	0	0	2(100%)

Abreviaturas – SA: Sem alterações N: número de casos de patologia com a mutação, %: percentagem de casos por patologia com a mutação.

No MM, a maioria dos casos (45,1%) não apresentou alterações citogenéticas. As alterações mais frequentes foram o Ganho(1q), a t(11;14), observadas em 15,7% e 13,7% dos casos submetidos a FISH, respetivamente. É importante notar que essas alterações não são classificadas como de alto risco pelo sistema R-ISS. Em contraste, a deleção do 17p (Del(17p)), encontrada em 13,7% dos casos de MM, é identificada como uma alteração de alto risco de acordo com o R-ISS. Outras alterações citogenéticas detetadas incluíram a t(4;14) em 3 casos (5,9%) e a t(14;16) em 2 casos (3,9%), ambas também classificadas como de alto risco pelo sistema R-ISS. A trissomia foi observada em 1 caso (2%), mas não é considerada uma alteração de alto risco.

4.3 Análise da expressão antigénica

A tabela 11 sumariza os resultados dos marcadores CD19, CD45, CD56, CD28, CD27, CD117 e CD81, discriminando a percentagem de fenótipos homogéneos (positivos e negativos), heterogéneos (negativos e positivos).

Tabela 11 Padrão de expressão antigénica nas discrasias plasmocitárias estudadas.

Antigénio	DP	N	Homogéneo %		Heterogéneo%		Total%	
			+	-	+	-	+	-
CD19	GMSI	73	0	68,5	4,1	27,4	4,1	95,9
	MM	73	1,4	93,1	2,7	2,8	4,1	95,9
	LP	2	100	0	0	0	100	0
CD45	GMSI	73	5,5	71,2	16,4	6,9	21,9	78,1
	MM	73	9,6	76,7	9,6	4,1	19,2	80,8
	LP	2	0	50	50	0	50	50
CD56	GMSI	73	54,8	24,7	16,4	4,1	71,2	28,8
	MM	73	65,8	21,9	10,9	1,4	76,7	23,3
	LP	2	0	0	100	0	100	0
CD28	GMSI	69	34,8	56,5	5,8	2,9	40,6	59,4
	MM	71	41,7	50	8,3	0	50	50
	LP	2	100	0	0	0	100	0
CD27	GMSI	71	60,6	19,7	9,8	9,9	70,4	29,6
	MM	72	25	36,1	16,7	22,2	41,7	58,3
	LP	2	0	100	0	0	0	100
CD117	GMSI	72	63,9	19,4	13,9	2,8	77,8	22,2
	MM	73	37	34,2	26	2,8	63	37
	LP	2	0	50	0	50	50	50
CD81	GMSI	72	11,1	61,1	13,9	13,9	25	75
	MM	73	15,1	65,8	12,3	6,8	27,4	72,6
	LP	2	0	50	50	0	50	50

Abreviaturas – N: número de casos onde o antigénio foi testado, %: percentagem de casos, % total: Refere-se ao conjunto de casos com fenótipo positivo/negativo, independentemente da sua heterogeneidade. Casos heterogéneos com >20% de células positivas foram incluídos nos casos positivos, DP: discrasia plasmocitária, GMSI: gamapatia monoclonal de significado indeterminado, MM: mieloma múltiplo, LP: Leucemia de Plasmócitos, +: positivo, -: negativo.

No que diz respeito às expressões aberrantes na GMSI, o marcador CD19 exibiu uma expressão homogénea negativa em 68,5% dos casos, enquanto em 27,4% dos casos apresentou-se como heterogénea negativa. O CD45, por sua vez, revelou uma expressão homogénea negativa em 71,2% dos casos, 5,5% apresentou uma expressão homogénea positiva, 16,4% apresentou uma expressão heterogénea positiva e 6,9% uma expressão heterogénea negativa. Em relação ao CD56, 54,8% dos casos foram identificados com expressão homogénea positiva, e 16,4% com expressão heterogénea positiva. O CD28 apresentou uma expressão homogénea positiva em 34,8% dos casos, enquanto o CD27 mostrou uma expressão homogénea negativa em 19,7% dos casos e uma expressão heterogénea negativa em 9,9%. No caso do CD117, observou-se uma expressão homogénea positiva em 63,9% dos casos, e uma expressão heterogénea positiva em 13,9%. Já o CD81 apresentou uma expressão homogénea negativa em 61,1% dos casos, e 13,9% exibiu expressão heterogénea negativa.

No MM, o CD19 demonstrou uma expressão homogénea negativa em 93,1% dos casos, e 2,8% exibiram uma expressão heterogénea negativa. Quanto ao CD45, verificou-se uma expressão homogénea negativa em 76,7% dos casos, e uma heterogénea negativa em 4,1%. O CD56 apresentou uma expressão homogénea positiva em 65,8% dos casos, e uma expressão heterogénea positiva em 10,9%. Em relação ao CD28, observou-se uma expressão homogénea positiva em 41,7% dos casos e heterogénea positiva em 8,3%. A expressão do CD27 foi homogénea negativa em 36,1% dos casos e heterogénea negativa em 22,2% dos casos. O CD117 manifestou-se com uma expressão homogénea positiva em 37% dos casos, enquanto 26% exibiram expressão heterogénea positiva. Contrariamente, o CD81 apresentou uma expressão homogénea negativa em 65,8% dos casos, com 6,8% dos casos apresentando expressão heterogénea negativa.

Em relação à LP, verificou-se 100% de positividade homogénea no marcador CD19. Um dos casos não expressou CD45, enquanto outro apresentou um fenótipo heterogéneo positivo. No que concerne ao CD56, este marcador apresentou expressão heterogénea positiva em 100% dos casos. A expressão do CD28 foi homogénea positiva em todos os casos, enquanto o CD27 foi uniformemente homogéneo negativo. Quanto aos marcadores CD117 e CD81, ambos apresentaram expressão homogénea negativa em 50% dos casos, enquanto o CD117 apresentou expressão heterogénea negativa nos outros 50% dos casos, e o CD81 apresentou expressão heterogénea positiva nos restantes 50% dos casos.

4.4 Associação entre os marcadores celulares e o estadiamento ISS e R-ISS

Foi analisada estatisticamente a relação entre a expressão dos antígenos e o estadiamento do MM. Os resultados estão expressos na tabela 12, por frequência absoluta e relativa relativamente à negatividade e positividade em cada estadiamento.

Tabela 12 Associação entre o padrão antigénico no MM e o estadiamento ISS e R-ISS.

Antigénio	Sistema de estadiamento ISS (N=55)							Sistema de estadiamento R-ISS (N=39)							
	I		II		III		p	I		II		III		p	
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	N	%		
CD19	+	2	9,5	0	-	1	5,6	0,769	1	9,1	1	5,3	0	-	1,000
	-	19	90,5	16	100	17	94,4		10	90,9	18	94,7	9	100	
CD45	+	7	33,3	3	18,8	1	5,6	0,091	4	36,4	3	15,8	0	--	0,142
	-	14	66,7	13	81,3	17	94,4		7	63,6	16	84,2	9	100	
CD56	+	13	61,9	15	93,8	12	66,7	0,074	6	54,5	17	89,5	5	55,6	0,052
	-	8	38,1	1	6,3	6	33,3		5	45,5	2	10,5	4	44,4	
CD27	+	12	57,1	5	31,3	6	35,3	0,259	5	45,5	7	38,9	2	22,2	0,623
	-	9	42,9	11	68,8	11	64,7		6	54,5	11	61,1	7	77,8	
CD28	+	10	47,6	7	43,8	9	52,9	0,941	6	54,5	8	42,1	4	50	0,911
	-	11	52,4	9	56,3	8	47,1		5	45,5	11	57,9	4	50	
CD117	+	8	38,1	12	75	13	72,2	0,038*	4	36,4	15	78,9	5	55,6	0,075
	-	13	61,9	4	25	5	27,8		7	63,6	4	21,1	4	44,4	
CD81	+	7	33,3	2	12,5	7	38,9	0,193	4	36,4	5	26,3	4	44,4	0,678
	-	11	66,7	14	87,5	11	61,1		7	63,6	14	73,7	5	55,6	

Abreviaturas – I/II/III níveis de estadiamento, +: positivo, -: negativo, N: número de casos positivos/negativos, %: frequência relativa, *: estatisticamente significativo, p: valor de p.

A tabela apresenta a relação entre os padrões antigénicos e o estadiamento do MM de acordo com os sistemas ISS e R-ISS. A expressão dos marcadores CD19, CD45, CD27, CD28, CD81 e a sua relação com os diferentes estádios no ISS e R-ISS, não mostrou nenhuma significância estatística, sendo o valor de $p > 0,05$.

Relativamente ao CD117, o valor de p foi de 0,038 mostrando uma associação estatisticamente significativa entre a expressão de CD117 e o estadiamento ISS. Observando-se uma positividade em 38,1% dos casos no estadiamento I, 75% dos casos no estadiamento II e em 72,2% dos casos no estadiamento III. Em contraste apresentou negatividade em 61,9% dos casos no estadiamento I, 25% dos casos no estadiamento II e 27,8% dos casos no estadiamento III. No que concerne ao R-ISS não se observou nenhum valor estatisticamente significativo na relação do estadiamento com a expressão de marcadores

celulares estudados. No entanto, observou-se um valor de p de 0,052 no R-ISS, e de 0,074 no ISS associado ao CD56. Embora não seja estatisticamente significativo é de se notar a proximidade com o valor de p significativo. O CD56 apresentou positividade em 54,5% dos casos no estadio I, 89,5% dos casos no estadio II e 55,6% dos casos no estadio III na classificação R-ISS.

4.5 Associação entre o padrão da expressão antigénica e as alterações citogenéticas presentes nos casos em estudo

A tabela 13 apresenta os resultados de uma análise estatística para identificar possíveis associações entre a expressão de diferentes antigénios (CD19, CD56, CD45, CD27, CD28, CD117, CD81) e a presença de alterações citogenéticas específicas num grupo de 59 amostras. As alterações citogenéticas investigadas incluíram: t(11;14), del(17p), t(4;14), ganho(1q) e t(14;16).

Tabela 13 Associação entre o padrão de expressão fenotípica com alterações citogenéticas.

Antigénio	Alterações citogenéticas											
	N=59	t(11;14)	p	Del(17p)	p	t(4;14)	p	Ganho(1q)	p	t(14;16)	p	
CD19	+	3	0	0,690	0	0,356	0	0,360	0	0,748	0	0,360
	-	56	7 (12,5%)		8 (14,3%)		2 (1,18%)		10 (17,9%)		2 (3,6%)	
CD56	+	45	4 (8,9%)	0,445	8 (17,8%)	0,259	2 (4,4%)	0,072	9 (20,0%)	0,107	0	0,072
	-	14	3 (21,4%)		0		1 (7,1%)		1 (7,1%)		2 (14,3%)	
CD45	+	12	2 (16,7%)	0,799	1 (8,3%)	1,000	0	0,838	3 (25,0%)	0,732	0	0,848
	-	47	5 (10,6%)		7 (14,9%)		3 (6,4%)		7 (14,9%)		2 (4,3%)	
CD27	+	24	3 (12,5%)	0,613	1 (4,2%)	0,203	1 (4,2%)	0,558	6 (25,0%)	0,421	1 (4,2%)	0,558
	-	34	3 (8,8%)		7 (20,6%)		2 (5,9%)		4 (11,8%)		1 (2,9%)	
CD28	+	39	4 (13,3%)	0,596	4 (13,3%)	0,497	1 (3,3%)	0,415	6 (20%)	0,657	2 (6,7%)	0,415
	-	27	3 (11,1%)		3 (11,1%)		2 (7,4%)		4 (14,8%)		0	
CD117	+	40	3 (7,5%)	0,303	5 (12,5%)	0,800	1 (2,5%)	0,609	8 (20,0%)	0,455	2 (5,0%)	0,609
	-	19	4 (21,1%)		3 (15,8%)		2 (10,5%)		2 (10,5%)		0	
CD81	+	19	3 (15,8%)	0,846	2 (10,5%)	1,00	1 (5,3%)	0,152	2 (10,5%)	0,455	2 (10,5%)	0,152
	-	40	4 (10%)		6 (15%)		2 (5%)		8 (20%)		0	

Abreviaturas – SA: sem alteração, p: valor de p, +: positivo, -: negativo, N: número de casos, %: percentagem de casos positivos/negativos com a mutação, p: valor de p.

Todos os valores de p foram superiores a 0,05, indicando que não há evidências estatísticas suficientes para afirmar que a expressão dos antigénios analisados está significativamente associada à presença das alterações citogenéticas investigadas.

Associado ao CD56+ foi observada uma maior frequência de ganho de 1q, em (20% dos casos) e da del(17p) em 17,8% dos casos. Destaca-se também a associação entre o CD56- e a t(14;16) com um valor de p de 0,072, além da t(11;14) que corresponde a 21,4% dos casos. Embora este valor não atinja significância estatística, encontra-se muito próximo do limite convencional de 0,05.

4.6 Associação entre o padrão de expressão antigénica de conjunto de marcadores celulares com o estadio

O CD117 mostrou um valor estatisticamente significativo na sua relação com o ISS, enquanto o CD56 mostrou um valor de p aproximado do valor estatisticamente significativo. Posto isto, foram realizadas 4 combinações entre o CD117 e o CD56 (CD56+/CD117-, CD56+/CD117+, CD56-/CD117+, CD56-/CD117-), com o intuito de verificar a associação dos dois marcadores celulares com o estadio no momento do diagnóstico. Os resultados estão expressos na tabela 14.

Tabela 14 Associação entre o padrão de expressão do CD56 e CD117 e o estadiamento ISS e R-ISS.

Antigénios	N	ISS (N=55)			p	N	R-ISS (N=39)			p
		I	II	III			I	II	III	
CD56+/CD117-	10	5 (50%)	0	5(50%)	0,055	6	2 (33,3%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)	0,019*
CD56+/CD117+	25	3 (12%)	13 (52%)	9 (36%)	0,001*	20	2 (10%)	13 (65%)	5 (25%)	0,035*
CD56-/CD117-	5	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	0,611	5	3 (60%)	0	2 (40%)	0,031*
CD56-/CD117+	15	10 (66,7%)	2(13,3%)	3 (20%)	0,032*	8	4 (50%)	4 (50%)	0	0,150

Abreviaturas - N: Número de casos por estadio, I/II/III: diferentes estadios, *: valor estatisticamente significativo, p: valor de p.

No que respeita ao estadiamento pelo ISS, observou-se para o fenótipo CD56+/CD117- (N=10), uma distribuição equitativa de casos entre os estadios I e III (50%). Para o fenótipo CD56+/CD117+ (N=25), a maioria dos casos (52%) concentrou-se no estadio II. Já para os fenótipos CD56-/CD117- (N=5) e CD56-/CD117+ (N=15), foi no estadio I que se verificou a maior frequência de casos (60% e 66,7%, respetivamente).

Quanto ao estadiamento pelo R-ISS, o fenótipo CD56+/CD117- (N=6) apresentou uma distribuição equilibrada de casos entre os três estadios (33,3%). Para o fenótipo CD56+/CD117+ (N=20), o estadio II registou a maior frequência de casos (65%). Por sua vez, o estadio I concentrou o maior número de casos (60%) com o fenótipo CD56-/CD117- (N=5), enquanto para o fenótipo CD56-/CD117+ (N=8) revelou uma distribuição equivalente (50%) entre os estadios I e II.

Os valores de p demonstram uma associação estatisticamente significativa entre os fenótipos CD56+/CD117+ e o estadiamento pelo ISS e R-ISS ($p=0,001$ e $p=0,035$), bem como entre os fenótipos CD56-/CD117+ no estadiamento ISS ($p=0,032$). No estadiamento R-ISS verificaram-se alterações estatisticamente significativas no grupo CD56+/CD117- e CD56-/CD117-, com valores de p de 0,019 e 0,031 respetivamente.

5 Discussão

O presente estudo analisou 148 casos de discrasias plasmocitárias, abrangendo três patologias principais e bem caracterizadas pela imunofenotipagem por citometria de fluxo, nomeadamente a GMSI, o MM e LP. O estudo permitiu traçar um perfil dos casos diagnosticados na ULS de S. João, abrangendo parâmetros sociodemográficos, laboratoriais, citogenéticos e imunofenotípicos.

A média de idade dos casos diagnosticados com discrasias plasmocitárias foi de cerca de 68 anos para a GMSI, 63 anos no MM e 72 anos para LP, o que está em conformidade com os dados epidemiológicos descritos na literatura, sublinhando o fato de que estas condições afetam predominantemente uma população envelhecida^(68,69).

Além disso, verificou-se uma distribuição ligeiramente maior de casos de MM em mulheres. A predominância do sexo feminino nas discrasias plasmocitárias retrata uma informação contrária ao que é descrito habitualmente na literatura. A maioria dos estudos apontam uma frequência de mais casos no sexo masculino⁽⁶⁹⁾, neste contexto podemos considerar como causa destas diferenças o contexto demográfico ou geográfico⁽⁷⁰⁾.

No contexto das discrasias plasmocitárias, os parâmetros laboratoriais são cruciais para o diagnóstico e prognóstico. No presente estudo, verificou-se que os valores médios de hemoglobina, ureia e creatinina eram significativamente alterados nos casos de MM e LP. Os casos de MM apresentaram, em média, níveis de hemoglobina de 10,02 g/dL, enquanto aqueles com LP mostraram uma anemia mais pronunciada, com valores médios de 6,6 g/dL. Esta anemia pode ser explicada pela infiltração da medula óssea por células plasmáticas neoplásicas, um dos principais mecanismos patogénicos do MM, levando à supressão da eritropoiese. Por outro lado, os níveis elevados de ureia e creatinina, particularmente no MM, apontam para possíveis alterações na função renal dos casos estudados, uma condição frequente associada à deposição de cadeias leves de imunoglobulinas nos túbulos renais, que se encontram aumentadas no MM e na LP, o que culmina na síndrome de insuficiência renal. É de referir que estes dois parâmetros fazem parte dos critérios CRAB utilizados no diagnóstico destas patologias⁽⁷¹⁾.

Relativamente às alterações citogenéticas, através de FISH, embora na maioria dos casos não tenham sido observadas alterações, as existentes apresentaram concordância com a literatura(21,72). O ganho de 1q foi observado em 15,7% dos doentes com MM. Esta alteração citogenética é frequentemente identificada em casos de MM e é associada por vários autores a uma doença mais agressiva e pior prognóstico, uma vez que as alterações induzem instabilidade genética nas células do mieloma a resistência ao tratamento ^(21,73,74), portanto, a sua identificação precoce é essencial para ajustar a estratégia terapêutica ⁽⁷⁵⁾.

A t(11;14) é descrita como a alteração cromossômica mais frequente no MM, contudo no presente estudo foi a segunda alteração genética mais frequente (13,7% dos casos), estando relacionada segundo a maioria da literatura, com percurso indolente da doença e a uma resposta favorável ao tratamento, sendo classificada como uma alteração de risco *standard* ^(75,76). Contudo, alguns estudos tem vindo a associar esta alteração a um risco intermédio, devido à sua associação a uma menor sobrevida na era dos novos fármacos ⁽⁷⁴⁾. Neste estudo, quando estudada a sua associação com o fenótipo, 21,4% dos casos CD56 negativos apresentaram a t(11;14), embora o valor de p não tenha sido estatisticamente significativo, Shi e colaboradoras relacionaram a t(11;14) com a negatividade do CD56 ⁽⁷⁷⁾.

A presença de deleções no 17p foi identificada em 13,7% dos casos de MM. Esta alteração citogenética envolve a perda do gene TP53, conhecido por regular o ciclo celular e a apoptose, e é um dos fatores prognósticos adversos no MM ⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾. Os doentes com esta alteração tendem a ter uma doença mais agressiva, com menor resposta aos tratamentos convencionais e uma sobrevida global mais curta ⁽⁷⁵⁾. Outras alterações observadas com alto risco de progressão e baixa taxa de sobrevida foram as translocações t(4;14) e t(14;16). Narita et al. observou no seu estudo que todos os casos com t(14;16) eram CD56 negativos ⁽⁷¹⁾, assim como no nosso estudo. Ambas as translocações estão associadas, na literatura, a um mau prognóstico e baixa sobrevida ⁽⁷⁴⁾.

A expressão de marcadores antigénicos nas discrasias plasmocitárias é outro fator importante para caracterização da doença. Os marcadores utilizados para identificação de plasmócitos são o CD38 e CD138 ⁽⁹⁾, que foram 100% positivos em todos os casos no presente estudo.

Os plasmócitos normais/reativos podem expressar uma quantidade residual de células CD19 ou CD45 negativas, bem como CD56 positivas ⁽⁴⁸⁾. No entanto, o fenótipo normal expressa mais de 70% de células CD19 e CD45 positivas e menos de 15% de células CD56 ^(8,48). Os casos observados neste estudo apresentaram uma expressão de CD19 e CD45 negativa em mais de

70% dos casos, assim como uma expressão positiva de CD56, tanto na GMSI como no MM. As diferenças entre a expressão de CD19 e CD45 no MM e na GMSI foram menos evidentes do que as descritas na literatura ⁽⁷⁸⁾, pois foi observada uma expressão negativa na maioria dos casos independentemente da discrasia plasmocitária, enquanto a literatura refere uma maior percentagem de expressão CD19, e uma expressão equitativa de CD45 na GMSI face ao MM ^(49,79). Por sua vez, na LP observou-se 100% de positividade do CD19, a literatura refere uma expressão heterogénea ⁽⁶⁰⁾, contudo este resultado é de difícil discussão pelo facto da nossa amostra não ser representativa.

A relevância prognóstica do CD45 permanece um tema controverso. Alguns autores argumentam que a sua positividade está associada a um pior prognóstico, devido, em parte, à interação entre a interleucina-6 e as células CD45 positivas, o que promove a sua proliferação ⁽⁵⁴⁾. Por outro lado, outros autores defendem que a negatividade do CD45 pode estar ligada a um prognóstico desfavorável, exemplificado pela promoção do VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e o conseqüente aumento da angiogénese ⁽⁷⁹⁾. Neste estudo não obtivemos um valor com significância estatística que relacionasse o CD45 com o estadio da doença.

Embora a expressão de CD56 tenha sido positiva nas duas discrasias, a GMSI apresentou um fenótipo mais heterogéneo, e o MM uma percentagem mais elevada de casos CD56+ (65,8%), o que é concordante com a literatura ^(16,49). Já a LP apresentou dois casos heterogéneos positivos. O CD56 é uma molécula de adesão e normalmente não é expresso em plasmócitos normais, a sua relação com o prognóstico é controversa, embora vários estudos relacionem a expressão de CD56 com bom prognóstico ⁽⁸⁰⁾. A expressão de CD56 é considerada importante na formação de lesões líticas, pois as interações entre as células plasmáticas e as células estromais e osteoblásticas resultam numa diminuição na produção da matriz óssea. Apesar desta associação, a sua função como molécula de adesão promove a diminuição de doença extramedular ⁽⁸¹⁾. No estudo da relação entre o fenótipo com o estadio, embora o CD56 não tenha atingido o valor de significância estatística, mostrou um valor muito aproximado associado ao estadio R-ISS, ISS e na sua relação com as alterações citogenéticas, respetivamente. A maior concentração de casos associada ao marcador CD56+ distribuiu-se pelos estadios I/II tanto no R-ISS como o ISS. Uma maior amostra poderia confirmar se a expressão deste marcador está associado ao estadio da doença.

O CD27, pertencente à superfamília de recetores do fator de necrose tumoral, e é um antigénio altamente expresso nos plasmócitos normais. Tanto no MM quanto na GMSI, observou-se uma

expressão reduzida, com uma diferença marcante entre a expressão positiva na GMSI (60,6%) e no MM (25%). Estudos sugerem que essa variação de expressão pode atuar como um marcador diferenciador entre condições pré-malignas e malignas ^(57,78), além de servir como um indicador de prognóstico, dado o papel regulador do CD27 no microambiente tumoral ⁽⁵⁷⁾. No nosso estudo não se observou uma relação deste marcador com o estadió.

A literatura também destaca uma maior expressão de CD117 na GMSI quando comparada ao MM ⁽⁷⁸⁾, o que está em concordância com os dados do nosso estudo, que apresentou positividade em 63,9% dos casos de GMSI contra 37% dos casos de MM. Vale ressaltar que o CD117 é negativo nos plasmócitos normais, mas, quando positivo no MM, está frequentemente associado a um bom prognóstico ^(81,82). No nosso estudo a associação entre este marcador e o estadió pelo ISS foi estatisticamente significativo e a relação com o R-ISS foi quase estatisticamente significativa, podendo, provavelmente ser elucidativa com uma maior amostragem. A maioria dos casos de CD117+ concentram-se no estadió I/II no ISS e R-ISS. O CD117 é um recetor de tirosina quinase normalmente expresso em mastócitos. No nosso estudo a relação entre a expressão positiva de CD117 e um estadió mais baixo é concordante com o descrito na literatura. A hipótese formulada é que o CD117 atua como molécula de adesão, o que pode levar à ancoragem de plasmócitos na MO limitando-os à mesma ^(58,83).

Relativamente ao CD28 observou-se uma maior expressão nos casos de MM (41,7%) comparando com os casos de GMSI (34,8%). Este marcador é encontrado predominantemente em células T, tem baixa expressão em plasmócitos normais, mas em plasmócitos mielomatosos é expresso em níveis similares aos observados nas células T ^(84,85). Segundo a literatura este marcador é expresso apenas em alguns casos de GMSI e quando expresso no MM é associado a mau prognóstico ⁽⁴⁹⁾, mas no presente estudo não se observou nenhuma associação com o estadió da doença.

O CD81, por sua vez, é uma molécula presente em plasmócitos normais e desempenha um papel crucial na regulação da expressão do CD19, estando envolvido no crescimento celular e na sinalização, quando expresso em casos de MM está frequentemente associado a um pior prognóstico ^(48,59). No entanto, neste estudo não foi encontrada uma associação entre a sua expressão e um estadió mais avançado da doença. Observou-se uma expressão negativa de CD81 em 65,8% dos casos de MM e em 61,1% dos casos de GMSI. De acordo com a literatura, a expressão de CD81 nos casos de MM é observada em 13-40% dos casos, o que é coerente com os nossos resultados, que apontam uma positividade de 15,1% ⁽⁸⁶⁾.

Os marcadores mais úteis na distinção entre o fenótipo aberrante e o fenótipo normal foram o CD19, CD45, CD56 e CD81. Pois estes antigénios apresentaram uma maior frequência de casos com expressão alterada, a sua expressão em plasmócitos normais é definida, segundo a literatura, por: mais de 70% de plasmócitos CD19 positivos, menos de 15% de plasmócitos CD56 positivos e 100% de plasmócitos CD81 positivos⁽⁸⁾.

Relativamente à associação entre o CD56 e o CD117, no nosso estudo verificou-se que os casos com positividade dos dois marcadores, CD56+/CD117+, se enquadravam no estadio I/II de acordo com o estadiamento ISS e R-ISS. Alguns autores referem que a positividade destes dois marcadores estão relacionados com um melhor prognóstico e sobrevida, enquanto a negatividade está associada a um pior prognóstico⁽⁸⁷⁾. Apesar dos nossos resultados relativamente ao fenótipo CD56+/CD117+ serem concordantes com os de outros autores, os casos com fenótipo CD56-/CD117- apresentaram um resultado contrário ao apontado pela literatura^(81,87), visto que a maioria dos casos se encontrava no estadio I/II com um valor de p estatisticamente significativo. Esta discrepância de resultados do nosso estudo com o de outros autores pode estar associada à nossa baixa amostragem (N=5).

A análise realizada revelou que há áreas merecedoras de aprofundamento em futuras investigações sobre discrasias plasmocitárias. Recomenda-se a ampliação da amostragem para permitir uma análise mais robusta. A diversificação geográfica dos estudos poderia elucidar discrepâncias, como a predominância feminina observada em casos de mieloma múltiplo (MM). Além disso, uma análise mais aprofundada dos marcadores imunofenotípicos, como CD56 e CD117, pode ser pertinente para esclarecer as suas correlações com os estadios da doença e prognóstico.

6 Conclusão

Este estudo analisou 148 casos de discrasias plasmocitárias, fornecendo uma visão abrangente sobre o perfil sociodemográfico, citogenético e imunofenotípico de patologias como a GMSI, o MM e a LP. A média de idades dos doentes e a distribuição por sexo alinharam-se com dados da literatura, exceto pela predominância feminina no MM, que pode estar relacionada a fatores regionais ou comportamentais.

Alterações laboratoriais, como anemia e insuficiência renal, foram frequentes, especialmente no MM e LP, reforçando o seu papel central no diagnóstico e prognóstico.

As alterações citogenéticas confirmaram-se como fatores importantes para caracterização da doença, bem como os parâmetros laboratoriais.

Os anticorpos do consórcio da *Euroflow* mostram-se pertinentes na identificação das patologias estudadas. Os antígenos CD19, CD45, CD56 e CD81 foram aqueles cuja a expressão mais se distinguiu de um fenótipo normal.

A imunofenotipagem destacou a expressão de CD56 e CD117, como marcador associado a estádios mais precoces segundo a classificação ISS e R-ISS.

Por fim, a citometria de fluxo provou ser uma ferramenta crucial para o estudo das discrasias plasmocitárias, permitindo uma avaliação detalhada do perfil imunofenotípico das células. A sua capacidade de identificar marcadores específicos e de distinguir subtipos de doença contribuiu para o diagnóstico e prognóstico.

7 Referencias Bibliográficas

1. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Cellular and Molecular Immunology. 10th Edition. Elsevier; 2022. 544–756 p.
2. Abbas Abul, Lichtman Andrew, Pillai Shiv. CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY. 9th ed. Elsevier; 2019. 435–510 p.
3. Owen Judy, Punt Jenni, Stranford Sharon, Jones Pat. Kuby Immunology. In: Kuby Immunology. 7th ed. New York: Susan Winslow; 2013. p. 385–95.
4. Murphy K. Immunobiologia de Janeway. 8th ed. St. Louis: Artmed; 2014. 157–169 p.
5. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. Vol. 36, Leukemia. Springer Nature; 2022. p. 1720–48.
6. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. Vol. 36, Leukemia. Springer Nature; 2022. p. 1720–48.
7. Chatterjee G, Gujral S, Subramanian PG, Tembhare PR. Clinical Relevance of Multicolour Flow Cytometry in Plasma Cell Disorders. Vol. 33, Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion. Springer India; 2017. p. 303–15.
8. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. Vol. 93, Haematologica. Haematologica Journal Office; 2008. p. 431–8.
9. Caers J, Garderet L, Kortüm KM, O'dwyer ME, van de Donk NWCJ, Binder M, et al. European myeloma network recommendations on tools for the diagnosis and monitoring of multiple myeloma: What to use and when. Haematologica. 2018 Oct 31;103(11):1772–84.
10. Dongen JJM V, der Velden VHJ van, Tute de R, EuroFlow OA. ANTIBODY PANELS FOR DIAGNOSIS, CLASSIFICATION AND MONITORING OF HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES.
11. Rajkumar SV. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. 2016.

12. Abeykoon JP, Tawfiq RK, Kumar S, Ansell SM. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: evaluation, risk assessment, management, and beyond. *Fac Rev.* 2022 Nov 29;11.
13. Lemieux-Blanchard É. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and biological treatments: What should we do? Vol. 84, *Joint Bone Spine.* Elsevier Masson SAS; 2017. p. 651–3.
14. Fend F, Dogan A, Cook JR. Plasma cell neoplasms and related entities—evolution in diagnosis and classification. Vol. 482, *Virchows Archiv.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023. p. 163–77.
15. Gerecke C, Fuhrmann S, Strifler S, Schmidt-Hieber M, Einsele H, Knop S. The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma. *Dtsch Arztebl Int.* 2016 Jul 11;113(27–28):470–6.
16. Soh KT, Tario JD, Wallace PK. Diagnosis of Plasma Cell Dyscrasias and Monitoring of Minimal Residual Disease by Multiparametric Flow Cytometry. Vol. 37, *Clinics in Laboratory Medicine.* W.B. Saunders; 2017. p. 821–53.
17. Lemieux-Blanchard É. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and biological treatments: What should we do? Vol. 84, *Joint Bone Spine.* Elsevier Masson SAS; 2017. p. 651–3.
18. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, Van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Jul 20;3.
19. Mann H, Katiyar V, Varga C, Comenzo RL. Smoldering multiple myeloma – Past, present, and future. Vol. 52, *Blood Reviews.* Churchill Livingstone; 2022.
20. Rajkumar SV, Landgren O, Mateos MV. Smoldering multiple myeloma. Vol. 125, *Blood.* American Society of Hematology; 2015. p. 3069–75.
21. Stella F, Pedrazzini E, Agazzoni M, Ballester O, Slavutsky I. Cytogenetic alterations in multiple myeloma: Prognostic significance and the choice of frontline therapy. Vol. 33, *Cancer Investigation.* Taylor and Francis Ltd; 2015. p. 496–504.
22. Guedes A, Becker RG, Teixeira LEM. Multiple Myeloma (Part 1) – Update on Epidemiology, Diagnostic Criteria, Systemic Treatment and Prognosis. *Rev Bras Ortop (Sao Paulo).* 2022 Aug 9;58(3):361–7.
23. KYLE RA. Multiple Myeloma: How Did It Begin? *Mayo Clin Proc.* 1994;69(7):680–3.

24. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2020 May 1;95(5):548–67.
25. International Agency for Research on Cancer (IARC) [Internet]. 2024 [cited 2024 May 19]. p. 470–85 Portugal. Available from: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/620-portugal-fact-sheet.pdf>
26. Gundesen MT, Lund T, Moeller HEH, Abildgaard N. Plasma Cell Leukemia: Definition, Presentation, and Treatment. Vol. 21, *Current Oncology Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2019.
27. Gowin K, Skerget S, Keats JJ, Mikhael J, Cowan AJ. Plasma cell leukemia: A review of the molecular classification, diagnosis, and evidenced-based treatment. Vol. 111, *Leukemia Research*. Elsevier Ltd; 2021.
28. Fernández de Larrea C, Kyle R, Rosiñol L, Paiva B, Engelhardt M, Usmani S, et al. Primary plasma cell leukemia: consensus definition by the International Myeloma Working Group according to peripheral blood plasma cell percentage. *Blood Cancer J.* 2021 Dec 1;11(12).
29. Agirre X, Castellano G, Pascual M, Heath S, Kulis M, Segura V, et al. Whole-genome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell-specific enhancers. *Genome Res.* 2015 Apr 1;25(4):478–87.
30. Dimopoulos K, Gimsing P, Grønbaek K. The role of epigenetics in the biology of multiple myeloma. Vol. 4, *Blood Cancer Journal*. Nature Publishing Group; 2014.
31. Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, Smith EM, Boyd KD, Neri A, et al. LYMPHOID NEOPLASIA Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. 2011; Available from: www.bloodjournal.org
32. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. 2014;25(1):91–101.
33. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2014 Jan 16;5.

34. Nieuwenhuijzen N, Spaan I, Raymakers R, Peperzak V. From MGUS to multiple myeloma, a paradigm for clonal evolution of premalignant cells. Vol. 78, *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc.; 2018 May.
35. Brigle K, Rogers B. *Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma*. Vol. 33, *Seminars in Oncology Nursing*. W.B. Saunders; 2017. p. 225–36.
36. Bianchi G, Munshi NC. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. 2015;125:3049. Available from: www.bloodjournal.org
37. Guillerey C, Nakamura K, Vuckovic S, Hill GR, Smyth MJ. Immune responses in multiple myeloma: Role of the natural immune surveillance and potential of immunotherapies. Vol. 73, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2016. p. 1569–89.
38. Neumeister P, Schulz E, Pansy K, Szmyra M, Deutsch AJA. Targeting the Microenvironment for Treating Multiple Myeloma. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
39. Lagreca I, Riva G, Nasillo V, Barozzi P, Castelli I, Basso S, et al. The Role of T Cell Immunity in Monoclonal Gammopathy and Multiple Myeloma: From Immunopathogenesis to Novel Therapeutic Approaches. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
40. Hadjiaggelidou C, Katodritou E. Regulatory t-cells and multiple myeloma: Implications in tumor immune biology and treatment. Vol. 10, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2021.
41. Fitzpatrick MJ, Nardi V, Sohani AR. Plasma cell myeloma: role of histopathology, immunophenotyping, and genetic testing. Vol. 51, *Skeletal Radiology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022. p. 17–30.
42. Michels TC, Petersen KE. *Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment* [Internet]. Vol. 95. 2017. Available from: www.aafp.org/afp
43. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: Updated mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy (msmart) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc*. 2013;88(4):360–76.
44. McKinnon KM. Flow cytometry: An overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018 Feb 1;2018:5.1.1–5.1.11.

45. Deaglio S, Mehta K, Malavasi F. Millennium review Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors [Internet]. Vol. 25, Leukemia Research. 2001. Available from: www.elsevier.com/locate/leukres
46. Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, Perez JJ, Böttcher S, Wind H, et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. Vol. 90, Cytometry Part B – Clinical Cytometry. John Wiley and Sons Inc; 2016. p. 61–72.
47. Lebel E, Nachmias B, Pick M, Even-Zohar NG, Gatt ME. Understanding the Bioactivity and Prognostic Implication of Commonly Used Surface Antigens in Multiple Myeloma. Vol. 11, Journal of Clinical Medicine. MDPI; 2022.
48. Olteanu H. Role of Flow Cytometry in the Diagnosis and Prognosis of Plasma Cell Myeloma. Vol. 9, Surgical Pathology Clinics. W.B. Saunders; 2016. p. 101–16.
49. Raja KRM, Kovarova L, Hajek R. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. Vol. 149, British Journal of Haematology. 2010. p. 334–51.
50. Rath A, Panda T, Dass J, Seth T, Mahapatra M, Tyagi S. Immunophenotypic Profile of Multiple Myeloma: A Tertiary Care Centre Experience. J Lab Physicians. 2023 Sep;15(03):392–8.
51. Costa F, Palma BD, Giuliani N. CD38 expression by myeloma cells and its role in the context of bone marrow microenvironment: Modulation by therapeutic agents. Vol. 8, Cells. MDPI; 2019.
52. Saltarella I, Desantis V, Melaccio A, Solimando AG, Lamanuzzi A, Ria R, et al. Mechanisms of resistance to anti-cd38 daratumumab in multiple myeloma. Vol. 9, Cells. MDPI; 2020.
53. Ren Z, Spaargaren M, Pals ST. Syndecan-1 and stromal heparan sulfate proteoglycans: key moderators of plasma cell biology and myeloma pathogenesis [Internet]. 2021. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/137/13/1713/1803899/bloodbld2020008188c.pdf>
54. Gonsalves WI, Timm MM, Rajkumar SV, Morice WG, Dispenzieri A, Buadi FK, et al. The prognostic significance of CD45 expression by clonal bone marrow plasma cells in patients with newly diagnosed multiple myeloma. Leuk Res. 2016 May 1;44:32–9.

55. Miyazaki K, Suzuki K. CD56 for Multiple Myeloma: Lack of CD56 May Be Associated with Worse Prognosis. Vol. 140, *Acta Haematologica*. S. Karger AG; 2018. p. 40–1.
56. Zhang L, Huang Y, Lin Y, Zhang A, Zou R, Xu H, et al. Prognostic significance of CD56 expression in patients with multiple myeloma: a meta-analysis. *Hematology (United Kingdom)*. 2022;27(1):122–31.
57. Wang X, Luo K, Xu Q, Chi L, Guo Y, Jia C, et al. Prognostic marker CD27 and its micro-environmental in multiple myeloma. *BMC Cancer*. 2024 Dec 1;24(1).
58. Schmidt-Hieber M, Pérez-Andrés M, Paiva B, Flores-Montero J, Perez JJ, Gutierrez NC, et al. CD117 expression in gammopathies is associated with an altered maturation of the myeloid and lymphoid hematopoietic cell compartments and favorable disease features. *Haematologica*. 2011 Feb;96(2):328–32.
59. Binder M, Bacher U. The role of CD81 for plasma cell dyscrasias. Vol. 38, *Leukemia Research*. 2014. p. 292–3.
60. Falcão RP, Felipe L, Dalmazzo F, Roberto C, Falcão P. O valor da imunofenotipagem para o diagnóstico do Mieloma Múltiplo e na avaliação da doença residual mínima The value of immunofenotyping for the diagnosis of Multiple Myeloma and for the evaluation of minimal residual disease. Vol. 29, *bras. hematol. hemoter*. 2007.
61. Arthur L, Leite C, Almeida MS, Kimura ES, Bigonha JG, Colleoni GWB, et al. Caracterização imunofenotípica das células plasmáticas em pacientes portadores de mieloma múltiplo Immunophenotypic characterization of plasma cells in patients with multiple myeloma. 2010.
62. Awasthi NP, Mishra S, Gupta G, Kumari S, Bajpayee A, Singh P, et al. Immunophenotypic characterization of normal and abnormal plasma cells in bone marrow of newly diagnosed multiple myeloma patients. *Indian J Pathol Microbiol*. 2023 Apr 1;66(2):295–300.
63. Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB, Lahuerta JJ, Mateos M V., Gutiérrez N, et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: A study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(16):2737–44.
64. Willrich MAV, Katzmann JA. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. Vol. 54, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Walter de Gruyter GmbH; 2016. p. 907–19.

65. Cairns DA, José Lahuerta J, Wester R, Bertsch U, Waage A, Zamagni E, et al. Second Revision of the International Staging System (R2-ISS) for Overall Survival in Multiple Myeloma: A European Myeloma Network (EMN) Report Within the HARMONY Project [Internet]. Vol. 40, *J Clin Oncol*. 2022. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.15.2731>.
66. Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. Vol. 43, *Seminars in Oncology*. W.B. Saunders; 2016. p. 676–81.
67. STANDARD OPERATING PROCEDURE EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Sample preparation and staining SOP FOR SAMPLE PREPARATION AND STAINING Content [Internet]. Available from: www.EuroFlow.org
68. Hemminki K, Försti A, Houlston R, Sud A. Epidemiology, genetics and treatment of multiple myeloma and precursor diseases. Vol. 149, *International Journal of Cancer*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 1980–96.
69. Padala SA, Barsouk A, Barsouk A, Rawla P, Vakiti A, Kolhe R, et al. Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. Vol. 9, *Medical sciences (Basel, Switzerland)*. NLM (Medline); 2021.
70. Instituto Nacional de Estatística (INE). Censos 2021 – População. [Internet]. 2021 [cited 2024 Sep 8]. Available from: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpgid=censos21_populacao&xpid=CENSOS21
71. Heher EC, Rennke HG, Laubach JP, Richardson PG. Kidney disease and multiple myeloma. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2013 Nov 7;8(11):2007–17.
72. Clarke SE, Fuller KA, Erber WN. Chromosomal defects in multiple myeloma. Vol. 64, *Blood Reviews*. Churchill Livingstone; 2024.
73. Schmidt TM, Fonseca R, Usmani SZ. Chromosome 1q21 abnormalities in multiple myeloma. Vol. 11, *Blood Cancer Journal*. Springer Nature; 2021.
74. Cardona-benavides IJ, de Ramón C, Gutiérrez NC. Genetic abnormalities in multiple myeloma: Prognostic and therapeutic implications. Vol. 10, *Cells*. MDPI; 2021. p. 1–28.
75. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2022 Aug 1;97(8):1086–107.

76. Stella F, Pedrazzini E, Agazzoni M, Ballester O, Slavutsky I. Cytogenetic alterations in multiple myeloma: Prognostic significance and the choice of frontline therapy. Vol. 33, *Cancer Investigation*. Taylor and Francis Ltd; 2015. p. 496–504.
77. Shi L, Yan W, Xu J, Li L, Cui J, Liu Y, et al. Immunophenotypic profile defines cytogenetic stability and unveils distinct prognoses in patients with newly-diagnosed multiple myeloma (NDMM). *Ann Hematol* [Internet]. 2024;103(4):1305–15. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00277-023-05573-z>
78. Gupta S, Karandikar NJ, Ginader T, Bellizzi AM, Holman CJ. Flow cytometric aberrancies in plasma cell myeloma and MGUS – correlation with laboratory parameters. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018 May 1;94(3):500–8.
79. Kumar S, Rajkumar S V., Kimlinger T, Greipp PR, Witzig TE. CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: Clinical and biological correlations. *Leukemia*. 2005;19(8):1466–70.
80. Li L, Li X, Shang A, Zhao Y, Jin L, Zhao M, et al. Prognostic significance of CD56 antigen in newly diagnosed multiple myeloma: A real-world retrospective study. *Medicine (United States)*. 2022 Oct 7;101(40):E30988.
81. Ceran F, Falay M, Dağdaş S, Özet G. The Assessment of CD56 and CD117 Expressions at the Time of the Diagnosis in Multiple Myeloma Patients. *Turkish Journal of Hematology*. 2017;34(3):226–32.
82. Chen F, Hu Y, Wang X, Fu S, Liu Z, Zhang J. Expression of CD81 and CD117 in plasma cell myeloma and the relationship to prognosis. *Cancer Med*. 2018 Dec 1;7(12):5920–7.
83. Shin SY, Lee ST, Kim HJ, Kim SJ, Kim K, Kang ES, et al. Antigen Expression Patterns of Plasma Cell Myeloma: An Association of Cytogenetic Abnormality and International Staging System (ISS) for Myeloma. *J Clin Lab Anal*. 2015 Nov 1;29(6):505–10.
84. Bahlis NJ, King AM, Kolonias D, Carlson LM, Liu HY, Hussein MA, et al. CD28-mediated regulation of multiple myeloma cell proliferation and survival. 2007; Available from: www.bloodjournal.org
85. Arthur L, Leite C, Almeida MS, Kimura ES, Bigonha JG, Colleoni GWB, et al. Caracterização imunofenotípica das células plasmáticas em pacientes portadores

de mieloma múltiplo Immunophenotypic characterization of plasma cells in patients with multiple myeloma. 2010.

86. Paiva B, Gutiérrez NC, Chen X, Vídriales MB, Montalbán MÁ, Rosiö L, et al. Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2012;26(8):1862–9.
87. Pan Y, Wang H, Tao Q, Zhang C, Yang D, Qin H, et al. Absence of both CD56 and CD117 expression on malignant plasma cells is related with a poor prognosis in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Leuk Res*. 2016;40:77–82.

8 Anexos

Anexo I

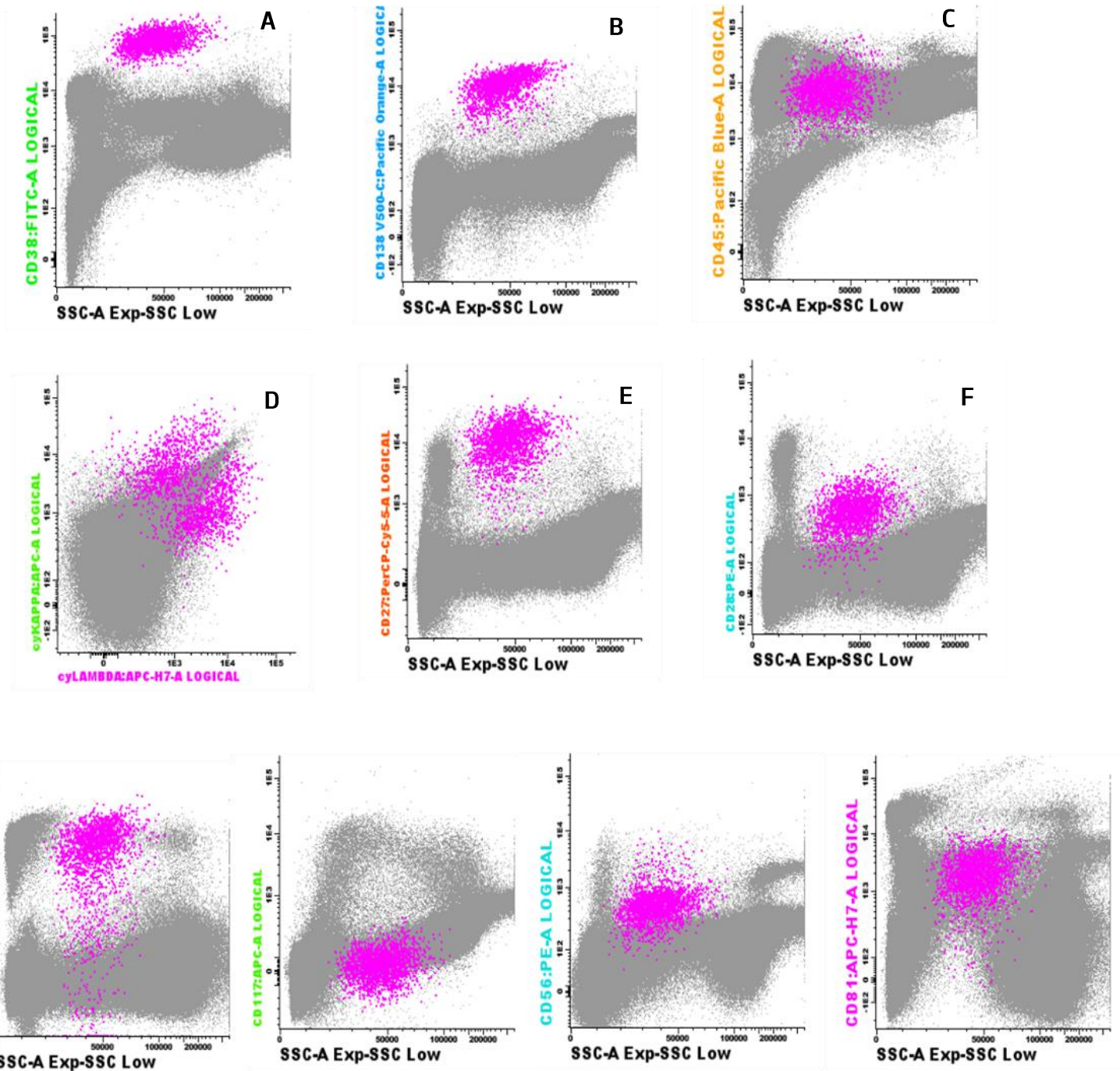


Figura 14 Avaliação da expressão dos marcadores celulares estudados, num caso de plasmócitos normais: (A) Expressão homogénea positiva de CD38 (CD38 vs SSC); (B) Expressão homogénea positiva de CD138 (CD138 vs SSC); (C) Expressão homogénea positiva de CD45 (CD45 vs SSC); (D) Expressão policlonal de cadeias kappa/lambda; (E) Expressão homogénea positiva de CD27 (CD27 versus SSC); (F) Expressão homogénea negativa de CD28 (CD28 versus SSC); (G) Expressão heterogénea positiva de CD19 (CD19 versus SSC); (H) Expressão homogénea negativa de CD117 (CD117 versus SSC); Expressão homogénea negativa de CD56 (CD56 versus SSC); Expressão homogénea positiva de CD81 (CD81 versus SSC); Fonte: ULS S. João.