

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas

Dissertação de Mestrado

**DETECÇÃO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR CITOMETRIA DE
FLUXO EM PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO SUBMETIDOS A
TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS**

Aluna: Suzane Dal Bó

Professora Orientadora: Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla

Porto Alegre, 2009

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas

Dissertação de Mestrado

**DETECÇÃO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR CITOMETRIA DE
FLUXO EM PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO SUBMETIDOS A
TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS**

Aluna: Suzane Dal Bó

Professora Orientadora: Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, 2009

A Idade de Ser Feliz

Existe somente uma idade para a gente ser feliz,
somente uma época na vida de cada pessoa
em que é possível sonhar e fazer planos
e ter energia bastante para realizá-los
a despeito de todas as dificuldades e obstáculos.

Uma só idade para a gente se encantar com a vida e viver apaixonadamente
e desfrutar tudo com toda intensidade
sem medo, nem culpa de sentir prazer.

Fase dourada em que a gente pode criar
e recriar a vida,
a nossa própria imagem e semelhança
e vestir-se com todas as cores
e experimentar todos os sabores
e entregar-se a todos os amores
sem preconceito nem pudor.

Tempo de entusiasmo e coragem
em que todo o desafio é mais um convite à luta
que a gente enfrenta com toda disposição
de tentar algo NOVO, de NOVO e de NOVO,
e quantas vezes for preciso.

Essa idade tão fugaz na vida da gente
chama-se PRESENTE
e tem a duração do instante que passa.

Autor desconhecido

Agradeço a Deus por tudo, à minha família pela paciência, à minha orientadora pelos ensinamentos, à equipe do Serviço de Hematologia Clínica pela ajuda em especial à Dra. Rosane Bittencourt que teve um papel muito importante na realização deste projeto, aos colegas da Unidade de Hematologia em especial à Dra. Christina M. Bittar pelo incentivo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASO	Oligonucleotídeo alelo específico
ASO RQ PCR	Reação da cadeia da polimerase quantitativa utilizando oligonucleotídeos alelo-específicos
cDNA	DNA – complementar
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDR	Regiões determinantes de complementaridade
CF	Citometria de fluxo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DRM	Doença residual mínima
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLC	Cadeias leves livres
Fr	Região conservada (frameworks)
FSC	Forward scatter – tamanho
GMSI	Gamopatia Monoclonal de significado indeterminado
HHV-8	Herpes vírus humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IgH	Cadeia pesada da imunoglobulina
IgL	Cadeia leve da imunoglobulina
IL	Interleucina
IMWG	International myeloma working group

INCA	Instituto Nacional do Câncer
JH	Região junção (junction) cadeia pesada
MMP	Matrix metaloproteinase
MM	Mieloma múltiplo
MO	Medula óssea
OAF	Fatores ativadores do osteoclasto
OPG	Osteoprotegrina
PCR	Reação em cadeia pela Polimerase
PE	Ficoeritrina
PECy5	Ficoeritrinacianina 5
PerCP	Proteína clorofila peridina
R	Recaída
RC	Remissão completa
RP	Remissão parcial
RqC	Remissão quase completa
RT-PCR	Reação da cadeia da polimerase através da transcriptase reversa
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SSC	Side scatter-granulosidade interna
SMM	Smoldering Mieloma (mieloma assintomático)
TCTH	Transplante de células progenitoras hematopóicas
TNF α	Fator de necrose tumoral α

VDJ	Região variável (V), diversidade (D) junção (J) da cadeia pesada da imunoglobulina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VH	Região variável da cadeia pesada da imunoglobulina
VDJ	Região variável (V), diversidade (D) junção (J) da cadeia pesada da imunoglobulina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Plasmócito (coloração May Grunwald-Giemsa).....	26
Figura 2- Imunofenótipo característico do plasmócito (marcado de verde) a) SSCxFSC característico dos plasmócitos normais e neoplásicos, b) CD45 ^{-/dim} característico dos plasmócitos neoplásicos. c) CD38 ^{+high} característico em plasmócitos normais e neoplásicos, d) CD138xCD38 característico em plasmócitos normais e neoplásicos e) CD56 ^{+high} característico em plasmócitos neoplásicos f) CD19 negativo característico em plasmócitos neoplásicos.	30
Figure 1- Immunophenotypic characteristic plasma cell (painted in green) a) SSCxFSC characteristics of normal PC and neoplastic PC b) CD45 ^{-/dim} characteristics neoplastic PC, c) CD38 ^{+high} characteristics of normal PC and neoplastic, d) CD138xCD38 characteristics of normal PC and neoplastic plasma cell e) CD56 ^{+high} characteristics of neoplastic PC f) CD19 negative characteristics neoplastic PC. * TSSC(Transformed SSC – Paint a Gate)	67
Figure 2. a) Overall Survival (OS), b) Disease-free Survival (DFS) c) Overall Survival curves according to the DRM evaluation d) Disease-free Survival curves according to the DRM evaluation.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Critérios de diagnóstico para mieloma múltiplo sintomático.....	33
Tabela 2 Critério de resposta ao tratamento para pacientes com Mieloma múltiplo conforme o International Myeloma Working Group (2006).....	36
Table 1. Characteristics of MM patients enrolled in the study between december 2005 and maio of 2009.....	68
Table 2 Results patients pre TCTH, 3 months, 12 months	69
Table 3 Results patients 3 months.....	70

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Epidemiologia	15
2.2 Etiologia.....	16
2.3 Patogênese e Alterações Genéticas	17
2.4 Citocinas	22
2.5 Plasmócito	25
2.5.1 Aspectos morfológicos do plasmócito.....	26
2.5.2 Avaliação da Medula óssea.....	27
2.5.3 Imunofenótipo do plasmócito.....	28
2.6 Aspectos Clínicos	30
2.7 Diagnóstico	32

2.8 Tratamento com Transplante de células tronco hematopoéticas	33
2.9 Doença Residual Mínima (DRM)	37
2.10 Estratégias moleculares para identificação da DRM.....	39
2.11 Citometria de fluxo na detecção da DRM.....	40
3. JUSTIFICATIVA.....	42
4. OBJETIVO	43
Referências	44
5. ARTIGO EM INGLÊS.....	58

1. INTRODUÇÃO

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma doença provavelmente tão antiga quanto o homem. Morse et al (1974) relataram quatro supostos casos de MM em esqueletos de índios americanos de AD 200± 1300 (1). Porém, na metade do século XIX é que surgiram as primeiras descrições de casos de mieloma denominado “mollities e fragiles ossium” (1). A insuficiência renal que acometia os pacientes com esta doença foi estudada por Jones que identificou uma proteína estranha na urina, conhecida como a proteína de Bence Jones (2). Esta doença permanece incurável (3, 4) e é caracterizada, frequentemente, por respostas parciais ou completas seguidas por recaída, devido à progressão da doença ou suas complicações.

A recente descoberta de várias drogas ativas contra o MM, assim como a terapia de altas doses seguida de transplante autólogo de células tronco hematopoéticas (TCTH), teve impacto significativo na sobrevida e na qualidade de vida destes pacientes. Neste cenário de obtenção de remissões completas mais duradouras, tem-se investigado a importância da doença residual mínima (DRM) na recidiva da doença. Neste estudo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA, referência para o tratamento de MM no Rio Grande do Sul, onde são transplantados aproximadamente 18 pacientes portadores de MM ao ano, investigamos o papel da DRM detectada por citometria de fluxo (CF) na evolução destes pacientes.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia

A mortalidade por MM aumentou em países industrializados nas décadas de 60-70. A incidência do MM é cerca de duas vezes maior na população de negros (5-7), e maior em homens do que em mulheres, é variada ao redor do mundo diferentemente de outras doenças hematológicas. Nos Estados Unidos a incidência é de aproximadamente quatro casos por 100.000, cerca de 45000-50000 pessoas vivem com esta doença (7-9), na Europa é menor, três por 100.000 no Reino Unido, Suécia e Holanda e 2.5 na França, Alemanha e Espanha, sendo menor ainda na Ásia, menos que 1 por 100.000 na China e Filipinas (6), 1,5-1,6 no Japão (10). Shang Yi estudando a incidência de MM em Taiwan encontrou 0,75 em 100.000 (11). Há poucos registros sobre a incidência e aspectos clínicos do MM em grupos étnicos da América Latina (12, 13). No Brasil não temos dados oficiais da incidência de MM, uma vez que esta doença não aparece nas estimativas anuais fornecidas pelo Instituto Nacional do Câncer (14).

Apesar da ausência de dados oficiais brasileiros (14), um estudo recente avaliou o perfil do MM em 16 instituições brasileiras. Dos 1112 pacientes avaliados no período de 1998 a 2004, 49,7% dos pacientes eram do sexo feminino e 50,3% do sexo masculino, com idade mediana de 60,5 anos, sendo que a maioria apresentava doença avançada (76,5% em estágio III de Durie e Salmon) (12, 13).

2.2 Etiologia

Fatores como idade, sexo, raça e história familiar positiva (8, 15), exposição ambiental à radiação (16-18) e agentes químicos estão associados com um aumento da incidência de mieloma (5, 19).

Ichimaru et al relataram aumento da incidência de mieloma, 15 a 20 anos depois da exposição à radiação em sobreviventes da bomba atômica (20), sendo este aumento de risco encontrado também por outros autores (21). Contudo, em análises mais recentes, os dados não foram estatisticamente significantes em sobreviventes da bomba atômica (22, 23). Já com relação à prevalência de gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI), Iwanaga e colaboradores (24) em análise multivariada, relataram um aumento de 2.1 vezes desta alteração, em indivíduos que sofreram a exposição à bomba atômica quando na ocasião da exposição, tinham idade inferior a 20 anos.

Embora controverso, agentes infecciosos (5) e doenças auto-imunes (25-28) já foram implicados na etiologia do MM (5). Dentre os vírus possíveis de estarem envolvidos no desencadeamento do mieloma figuram o vírus da hepatite B (5, 29) e C (5, 30, 31), Epstein-Barr (5), Streptococcus vírus (32), e o simian vírus 40 (33). Pacientes com HIV (34) (vírus da imunodeficiência humana) têm 4-5 vezes maior probabilidade de desenvolver mieloma (35). A associação do Herpes Vírus Humano (HHV-8) na patogênese do MM foi confirmada por alguns grupos, que trabalharam com células

dendríticas geradas de células tronco mobilizadas de sangue periférico (36, 37), outros pesquisadores relataram não terem encontrado dados estatisticamente relevantes para a associação de MM com este vírus (38, 39). A proposta do mecanismo da patogênese do HHV-8 em mieloma é única já que postula que a tumorigênese envolveria a infecção de linhagem de células normais, que iriam fornecer sinais promotores de crescimento (citocinas) às células tumorais (5, 40).

2.3 Patogênese e Alterações Genéticas

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas tanto a nível fenotípico quanto genético. O dano genético atinge três classes de gene os proto-oncogenes promotores do crescimento, os genes supressores do crescimento tumoral e mais recentemente descobertos, os genes que regulam a apoptose (41). Da mesma forma, um processo com várias etapas parece estar envolvido na transformação maligna que leva ao mieloma (42). Mutações precoces podem estar ocultas e envolver células B virgens e/ou de memória que no processo de reciclagem, através de folículos linfóides e de replicação induzida por antígenos acumulam danos genéticos (40). A expansão de células do mieloma ocorre na medula.

Muitas anormalidades citogenéticas são encontradas em frequência variada no MM, por exemplo: trissomias (cromossomos 3, 5, 7, 9, 11, 15, 18, 19, 21), monossomias (cromossomos 8, 13, 16, 14, 22), translocações do tipo t(11; 14), (43) entre outras. A

presença de hipodiploidia é geralmente considerada um fator prognóstico desfavorável em pacientes tratados com altas doses de quimioterapia (44).

A deleção parcial ou completa do cromossomo 13 representa um importante fator prognóstico desfavorável, independente, associado à menor sobrevida e resposta terapêutica, representando a primeira anormalidade cromossômica ligada a resultado clínico no MM. Uma verificação adicional do comprimento do cromossomo 13 por análise citogenética molecular na interfase celular revelou deleções em 90 % dos pacientes (45), porém estes dados não foram confirmados por outros autores (46, 47). Análise por FISH identificou alteração do cromossoma 13 entre 40-50% dos pacientes com MM. As regiões críticas do cromossomo aparecem nas bandas no 13q12, 13q14 e 13q21~22. Prevê-se que o gene supressor de tumor específico do mieloma logo será identificado no 13q (48-50).

Acredita-se que as translocações no gene da cadeia pesada da imunoglobulina, no MM, podem se originar de erros durante a recombinação fisiológica do DNA. Esta alteração ocorre principalmente na hora da troca de classe do isotipo na diferenciação terminal das células B. A maioria destas translocações resulta de quebras na extremidade 5' na troca da região μ no cromossomo 14, enquanto a quebra localizada na fita parceira 3' está geralmente em uma região constante do gene. No entanto, translocações envolvendo os cromossomos 11 e 14 (11q13 e 14q32) também têm quebras na região de junção do gene da cadeia pesada (JH) da imunoglobulina (51).

Várias translocações, expressão ou inativação de genes estão envolvidos no MM.

Os principais genes envolvidos no MM são:

a) **Aumento da expressão de Bcl-2** (40, 52, 53). O gene Bcl-2 é o mais conhecido gene regulador da apoptose, ele é um proto-oncogene humano localizado no cromossomo 18. A Bcl-2 é uma proteína de membrana localizada na bainha mitocondrial interna, na membrana nuclear externa e no retículo endoplasmático liso e rugoso. A associação com a membrana mitocondrial faz com que Bcl-2 exerça seu papel mantendo a polarização da membrana. O equilíbrio entre os membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 é crítico para a sobrevivência celular. O efeito protetor da Bcl-2 é geral, evitando a apoptose em diversos tipos de célula, tanto de modo direto (bloqueando complexos de caspases) quanto indireto (impedindo a liberação para o citoplasma de componentes da mitocôndria, capazes de ativar a caspase 3). O excesso de Bcl-2, embora não seja suficiente para causar câncer, favorece a ação de outros oncogenes (54). A hiper-expressão do Bcl-2 permite o surgimento de mutações que afetam os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor que se relacionam com a inibição do fenômeno da apoptose (55).

b) **Mutações dos oncogenes da família RAS (K, N-RAS)**. Mutações de ponto nos códons 12, 13 e 61, estas mutações são eventos muito raros em GMSI, mas estão presentes em 35-50% dos casos de MM, podendo aumentar a prevalência nos estágios mais avançados da doença (56-58). Mutações em K-Ras são mais frequentes (57) e estão associadas com menor sobrevida (58).

c) **Inativação da P53** (gene supressor de tumor) por mutação ou deleção da região 17p13 parece ser um evento raro em MM ao diagnóstico, sendo restrito aos últimos estágios da doença (59, 60). A del. 17q13 presente em 10% dos pacientes com

MM (61) é um fator prognóstico desfavorável e está associada com hipercalcemia, altos níveis de creatinina sérica e doença extramedular (61, 62).

d) **Mutações do FAS**, a apoptose mediada pelo sistema FAS (relacionado a um receptor da família TNF) e FAS ligante, exercida pelo sistema imune na manutenção da homeostasia, e envolvida particularmente na citotoxicidade celular mediada por células T citotóxicas e Natural Killer, pode estar alterada no MM. Mutações que levem à perda de função do antígeno FAS podem contribuir na patogênese e progressão das neoplasias por permitir que as células neoplásicas burlem o sistema imune (63).

Entre as translocações envolvidas no processo de tumorigênese do MM temos, as que envolvem tanto genes da cadeia pesada, quanto da leve. Estas translocações estão implicadas como eventos iniciais da patogênese do MM. Foi demonstrado que 50% dos casos de GMSI e mieloma assintomático (smoldering MM-SMM) e de 55-75% dos MM apresentam translocações no locus IgH (61, 64, 65). As alterações no locus da cadeia leve lambda são menos frequentes. As translocações IgL lambda estão presentes em aproximadamente 20% dos MM em estágios avançados. O envolvimento da cadeia kappa é muito mais raro, porém, a literatura é escassa no que se refere à translocações de cadeia leve em MM (65). Existe uma considerável quantidade de *loci* cromossômicos envolvidos nas translocações com as imunoglobulinas. Estas translocações resultam na co-localização dos *loci* IgH e IgL e proto oncogenes localizados nos cromossomos parceiros envolvidos.

t (4,14)(p16.3,q32) presente em aproximadamente 15 %, dos pacientes.

O ponto de quebra é na região 4p16 que está localizada entre os protoncogenes

FGFR3 e MMSET. Existe uma associação entre os pacientes com esta alteração e MM IgA ou de cadeia leve kappa (61, 66). Esta translocação é um fator prognóstico desfavorável independente (65, 66). A maioria dos pacientes com MM e GMSI com esta translocação apresentam também a deleção do cromossomo 13 (67).

t(14,16)(q32;q22~23) presente em aproximadamente 2-10 % dos pacientes (64, 68). Análise molecular desta translocação demonstrou, que o resultado na fusão da cadeia pesada da imunoglobulina é uma troca na região com a sequência próxima ao oncogene cMAF (49). Esta alteração está associada a prognóstico desfavorável (61).

t(11,14)(q13,q32) resulta na expressão ectópica da ciclina D1. Esta alteração é encontrada em aproximadamente 15% dos pacientes (65) e em 90% dos casos de MM IgM (69-71), e está associada a um aumento da sobrevida, sobretudo em pacientes tratados com altas doses de quimioterapia (66, 72).

t(6,14)(p21,q32) envolvendo a ciclina D3 está presente em aproximadamente 3-4 % dos pacientes (45). Não são conhecidas as implicações clínicas e prognósticas desta alteração (65).

t(8,14)(24,q32) o gene c-myc codifica um fator de transcrição que tem um importante papel na regulação da proliferação celular (73). Na translocação 8:14, que corresponde ao gene c-myc, este gene é translocado do cromossoma 8 para o locus da cadeia pesada no cromossoma 14 enquanto nas translocações variantes, parte das cadeias leves são translocadas para o cromossoma 8. Em ambos os casos, o gene c-myc está justaposto (40, 74).

2.4 Citocinas

São inúmeras as citocinas envolvidas na patogênese do MM, na sua maioria, relacionadas com as alterações ósseas observadas nesta malignidade.

Interleucina 6 (IL-6) é um fator crítico no controle dos sistemas imune e hematopoiético. IL-6 faz com que as células B iniciem a proliferação e diferenciação nas células formadoras de anticorpos. A IL-6 também atua em conjunto com o IL-3 para induzir a proliferação de progenitores hematopoiéticos. Adicionalmente, esta citocina induz a produção de proteínas de fase aguda. IL-6 é secretada pelas células T, B, macrófagos, monócitos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos e muitas linhagens de células tumorais (75).

A IL6 é um potente estimulador de formação de osteoclastos (OCL) e induz o crescimento de células do mieloma em aproximadamente 30% dos pacientes (76). IL-6 também está envolvida nas interações moleculares entre as células do MM e as do estroma, atuando de forma autócrina no aumento de sua produção pelas células do estroma da medula (77). Além disto, a IL-6 pode agir como um fator anti-apoptótico aumentando a sobrevivência das células do MM (78).

A IL 1b é um potente indutor formação de OCL e reabsorção óssea. Vários estudos têm relatado o envolvimento da IL-1b como um fator de ativação do osteoclasto (*osteoclastic activator factor* - OAF) em mieloma (77).

O fator de crescimento de hepatócito (HGF) induz secreção de Interleucina 11 pelas células *osteoclast-like*, e a IL-11 é um potente indutor de formação de OCL tanto in vivo como in vitro (79).

RANK (receptor de ativação nuclear kappa B) é expresso na superfície dos osteoclastos (80), seu ligante (RANKL) é um importante fator osteoclastogênico que em combinação com o fator estimulador de colônias de macrófagos, induz a formação de OCL (81). RANKL é um membro da família do fator de necrose tumoral, expresso na superfície dos osteoclastos, osteócitos e células do estroma da medula que se liga a seu receptor (RANK), gerando sinais de diferenciação e ativação em precursores osteoclásticos, promovendo assim a reabsorção óssea. Por outro lado, a osteoprotegrina (OPG) é um fator que ocorre naturalmente e que antagoniza os efeitos do RANKL, assim preservando a integridade óssea. A relação RANKL e OPG é primordial na regulação osteoclástica e reabsorção óssea. Estudos têm mostrado que as células do mieloma são capazes de induzir o aumento da expressão de RANKL, e diminuição da produção de OPG no microambiente da medula (82, 83).

O fator de necrose tumoral α (TNF α) é uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em diferentes partes do corpo. Ele é secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos (75). O TNF α e β ou linfotoxina são potentes estimuladores da formação de OCL tanto in vivo quanto in vitro, sendo a inibição do TNF α bem como da IL6 utilizada como alvo terapêutico (84, 85).

MIP-1 alfa e beta são quimiocinas que induzem a formação de RANK L em células estromais, e conseqüentemente aumentam a formação osteoclástica

promovendo a atividade de reabsorção. MIP-1 alfa que pode estar super produzida na medula de pacientes com mieloma, apesar de também ser observado aumento de MIP-1 beta elas agem como quimioattractantes e ativadores de monócitos (86). As quimioquinas MIP-1 alfa e beta também estão relacionadas como potentes reguladores da hematopoese, MIP-1 alfa inibição da eritropoese precoce (87) e MIP-1 beta aumenta a apoptose em células B (88). Portanto MIP-1 alfa e beta são quimioquinas pluripotentes que podem desempenhar papéis importantes na patogênese do MM, incluindo não somente lesões ósseas destrutivas como a supressão da eritropoese, da linfopoese B e da produção de imunoglobulina (86).

Matrix Metaloproteinase (MMP) - 2, -7 -9, as MMPs podem degradar a matrix óssea e expor a matrix mineral do osso para as OCLs, para subsequente reabsorção. As células do mieloma expressam MMP9, de forma independente da regulação pela IL-6 ou de outras citocinas que estão associadas à doença óssea. O estroma celular da medula expressa MMP1 e MMP2 ambas reguladas por citoquinas e produzidas pelas células do mieloma, tendo um importante papel no processo de destruição óssea (77). Estudos mostraram que a pro-MMP2 é ativada por uma metaloproteinase solúvel MMP7 que é produzida pelas células do mieloma, e MMP2 pode ter um papel na degradação da matrix óssea (89).

O Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um potente indutor da neurovascularização, produzido tanto pelas células do mieloma como pelas células do estroma da medula. VEGF pode agir como um fator de crescimento para as células do mieloma e pode aumentar a formação OCL (77).

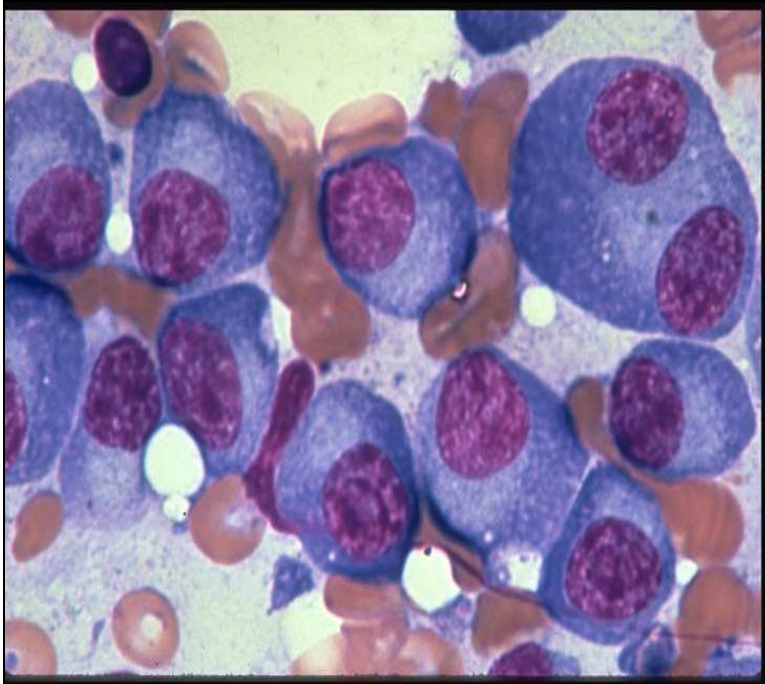
Em resumo, interações entre as moléculas de adesão das células do mieloma e o estroma da medula desempenham um importante papel na doença óssea no MM (77).

2.5 Plasmócito

O MM é uma neoplasia maligna clonal do plasmócito, caracterizada pelo aumento de plasmócitos na medula óssea e aumento de uma proteína monoclonal, componente M, no soro e/ou na urina (90). O plasmócito é o último estágio de diferenciação do linfócito B. O linfócito B está programado para a produção de imunoglobulinas (anticorpos) que exercem uma função vital na defesa do organismo contra agentes infecciosos externos (91). A estimulação antigênica da célula B madura resulta na proliferação e diferenciação em plasmoblasto. O plasmoblasto se diferencia em plasmócito de vida curta secretando uma imunoglobulina, geralmente IgM, sem mutação somática. Na ausência de estímulo ou na não migração ao centro germinativo, desencadeia a apoptose. Por outro lado, células B ativadas que entram nos centros germinativos são estimuladas à troca de isotipo e a hipermutar rearranjando as sequências da região variável da imunoglobulina. A afinidade com o antígeno seleciona as células mais efetivas (ou a mutação mais efetiva) enquanto as demais entram em apoptose. Os plasmócitos resultantes migram para a medula, onde interagem com as células do estroma diferenciando-se em plasmócitos de vida longa que sobrevivem por aproximadamente 30 dias (42, 91).

Os plasmócitos malignos no MM estão localizados na medula óssea (figura 1) associados com as células do estroma e, raramente são encontrados em outros locais.

Assim, parece que o evento oncogênico crítico nas células do MM ocorre em seguida, ou não interfere na geração e diferenciação do plasmócito de longa duração (92, 93).



**Figura 1 Plasmócito (coloração May Grunwald-Giemsa) 100x
María-Victoria Mateos University Hospital of Salamanca, Spain**

2.5.1 Aspectos morfológicos do plasmócito

O plasmócito normal é uma célula redonda ou ovóide, de núcleo excêntrico, cromatina em grumos, citoplasma basófilo, com retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi aumentados (94). O plasmócito mielomatoso tem uma morfologia bastante heterogênea (95). Greipp e colaboradores em 1985, definiram quatro tipos de plasmócitos: (i) maduro: núcleo pequeno e excêntrico, Golgi proeminente, denso grupamento de cromatina apresentando um citoplasma abundante; (ii) intermediário: não preencheu nenhum dos critérios dos outros subtipos; (iii) imaturo: grande núcleo

excentricamente localizado com um Golgi e uma cromatina difusa, com ou sem nucléolos e um abundante citoplasma; (iv) plasmoblasto: alta relação núcleo citoplasma, o núcleo está localizado centralmente e com um padrão escasso de cromatina, nucléolo proeminente e um Golgi quase inexistente. O valor prognóstico da morfologia dos plasmócitos está comprovado cientificamente (95-97).

2.5.2 Avaliação da Medula óssea

A avaliação da medula óssea (MO) (medulograma ou mielograma), através da coloração da distensão de medula com o corante May Grunwald-Giemsa, é um dos três critérios maiores para o diagnóstico do MM. O percentual de plasmócitos na medula é também um critério de diferenciação entre MM mais de 10%, GMSI menos de 10% (98). No MM, devido à distribuição heterogênea dos plasmócitos na MO, o percentual pode variar significativamente dependendo do local da aspiração e portanto, não é um fator prognóstico consistente. Apesar disto, a citomorfologia permanece como um método padrão para a avaliação da infiltração plasmocitária. A análise da biópsia de MO é provavelmente um método mais acurado da avaliação da infiltração plasmocitária, porém seria necessária uma padronização (96). A variação do número de plasmócitos na análise da medula não é um critério para avaliar a resposta ao tratamento, porém, a detecção de menos de 5% de plasmócitos na MO indica remissão completa (99).

2.5.3 Imunofenótipo do plasmócito

A maturação da célula B, como a de todas as células do sistema hematopoético, é acompanhada de uma sequência de perdas e ganhos de moléculas (antígenos) na superfície celular (100). Os plasmócitos são caracterizados pela presença de imunoglobulina citoplasmática e, na superfície celular os antígenos CD38 e CD138 (99, 101-104), entretanto é observada na literatura alguma discrepância em resultados que mostram o exato fenótipo do plasmócito e seu significado clínico (99, 105).

Embora o CD38 esteja amplamente expresso na linhagem hematopoética, a citometria de fluxo tem mostrado que a intensidade de fluorescência do CD38 nos plasmócitos é muito maior que nas demais células hematopoéticas, e esta forte reatividade foi convertida em um marcador específico dos plasmócitos. O CD138 (sindecan-1) é um marcador específico tanto para plasmócitos normais quanto para os neoplásicos, uma vez que ele não está presente nas demais células hematopoéticas. (105-107). A utilização da combinação do CD38 versus o CD138 na citometria de fluxo é amplamente utilizada na caracterização dos plasmócitos (102-105, 108-110). Outra característica bem estabelecida dos plasmócitos é suas propriedades de tamanho (*forward scatter* - FSC) e complexidade interna (*side scatter*- SSC) na análise por citometria de fluxo (99) (figura 2). Plasmócitos são células B que perderam os marcadores CD19, CD20, CD22 em aproximadamente 85% dos pacientes com MM (106, 107, 111).

Moléculas de adesão também estão envolvidas no processo da patogênese do MM como: β 1 integrinas VLA-1 (CD29-CD49a), VLA-4 CD29-CD49D), β 2 integrinas, incluindo LFA-1 (CD11a-CD18), proteoglicanos como o sindecan 1 (CD138) e CD44 e moléculas da superfamília das imunoglobulinas N-CAM (CD56), ICAM-1 (CD54), ICAM-

2 (CD102) e ICAM-3) CD50 (99). Destas muitos estudos tem demonstrado que a expressão do CD56 está presente em aproximadamente 70% (111) dos pacientes com MM e que usualmente está ausente nos estágios avançados da doença (112, 113). A baixa expressão ou ausência de CD45 ocorre nos plasmócitos mielomatosos em aproximadamente 90% dos casos (114). O CD117 (também conhecido como c-kit) está presente em aproximadamente um terço dos pacientes, outros antígenos mieloides como o CD13 e CD33 em 40% dos casos (101). A expressão do CD44 está associada ao mieloma extramedular (115), e a expressão do CD28 está associada com doença em atividade (116).

A imunofenotipagem multiparamétrica nos possibilita estudar a coexpressão de moléculas na superfície celular, tornando-se uma estratégia para identificar as células do MM com o objetivo de diferenciar esta patologia das outras gamopatias monoclonais. Baseada em características imunofenóticas bem estabelecidas, discrimina os plasmócitos normais onde temos o fenótipo CD19⁺, CD45⁺, CD38⁺⁺⁺, CD138⁺ e ausência de CD56 enquanto os plasmócitos neoplásicos são, na maioria dos casos, CD45^{-dim} CD38⁺⁺, CD138⁺, CD19⁻ e na maioria dos casos CD56⁺⁺ (107, 108, 117-119) (figura 2). A identificação deste imunofenótipo tem um valor na distinção entre MM e GMSI (111) e avaliação da doença residual mínima (DRM) (99, 108, 111, 120). Na GMSI temos duas populações de plasmócitos, uma com o imunofenótipo normal e outra com imunofenótipo neoplásico. A população normal é policlonal e representa 80% dos plasmócitos enquanto a população neoplásica que é monoclonal, não passa de 20% (117).

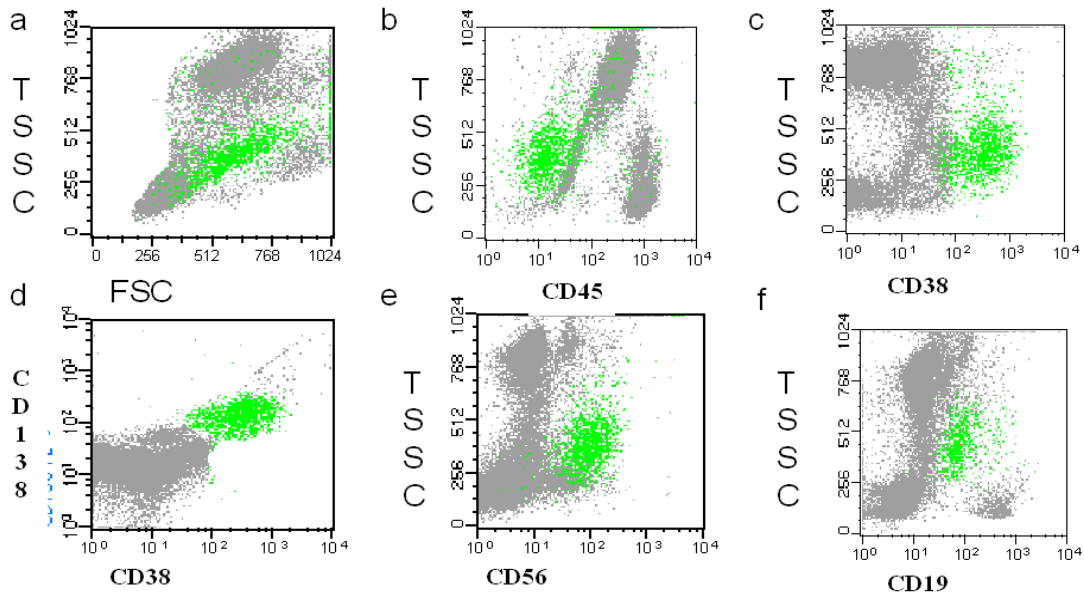


Figura 2- Imunofenótipo característico do plasmócito (marcado de verde) a) SSCxFSC característico dos plasmócitos normais e neoplásicos, b) CD45^{-dim} característico dos plasmócitos neoplásicos. c) CD38^{high} característico em plasmócitos normais e neoplásicos, d) CD138xCD38 característico em plasmócitos normais e neoplásicos e) CD56^{high} característico em plasmócitos neoplásicos f) CD19 negativo característico em plasmócitos neoplásicos. * TSSC (ssc-side scatter transformado- expandido) recurso do Paint a Gate

2.6 Aspectos Clínicos

Os sintomas do MM são resultantes da infiltração plasmocitária da medula óssea, da ação de citocinas produzidas pelo plasmócito maligno, com suas consequências na reabsorção óssea, de alterações na viscosidade sanguínea, pelo componente M do soro e por alterações tubulares renais decorrentes do excesso de cadeia leve na urina. A isto se associa um quadro de imunossupressão decorrente da diminuição das imunoglobulinas normais (6, 40). Na medula a invasão maciça de plasmócitos interfere na produção das células normais podendo causar anemia, leucopenia e plaquetopenia (121). Nos ossos os plasmócitos formam tumores com

atividade osteolítica (122), levando à destruição óssea e fraturas patológicas (123). A produção da proteína anormal (componente M) (121) pode levar a doenças de depósito e autoimunes (40).

Os rins são afetados em 30% dos doentes e as causas são múltiplas. A principal é quando os túbulos renais ficam obstruídos por coleções da proteína de Bence Jones. Causas adicionais incluem fatores metabólicos como hipercalcemia e a hiperirucemia. Em casos avançados uma complicação do MM, amiloidose, pode produzir lesão glomerular (40, 121).

A produção deficitária de anticorpos é responsável por um aumentado risco de infecções, especialmente bacterianas, que constituem uma das principais causas de morbi-mortalidade (124, 125).

O aumento das paraproteínas no plasma origina uma hiperviscosidade plasmática que pode ser sintomática (124).

A maior causa de morbidade e possível mortalidade associada com MM são as lesões osteolíticas. As lesões ósseas ocorrem em 70-80% dos pacientes são frequentemente associadas com dor óssea e fraturas (77). Aproximadamente um terço dos pacientes desenvolve hipercalcemia. A lesão óssea, como ressaltado acima, resulta do aumento da reabsorção óssea osteoclástica sem aumento da formação óssea (77). Estas lesões na coluna vertebral podem levar a sequelas irreversíveis (126).

2.7 Diagnóstico

Os critérios para o diagnóstico das gamopatias monoclonais, MM e doenças relacionadas foram revisados por Kyle e colaboradores em 2003 (127, 128) onde definiram que os critérios para o diagnóstico de MM assintomático consistem em medula óssea com mais de 10% de plasmócitos ou plasmocitoma, além de proteína monoclonal > 3 g/dL no sangue ou urina; sem presença de anemia, creatinina > 2 mg/dL, hipercalcemia, lesões ósseas líticas ou osteoporose com fraturas; e os critérios para MM sintomático (Tabela 1) compreendem os achados descritos e a presença de anemia e/ou creatinina > 2 mg/dL e/ou hipercalcemia e/ou lesões líticas ou osteoporose com fraturas.

Tabela 1 Critérios de diagnóstico para mieloma múltiplo sintomático.

Presença de um M-componente () no soro e/ou urina e plasmócitos clonais na medula ou plasmocitoma clonal.*

Um ou mais dos seguintes critérios

Elevação de cálcio (>11.5 mg/dl) [>2.65 mmol/l]

Insuficiência renal (creatinina >2 mg/dl) [177 mmol/l ou mais]

Anemia (hemoglobina <10 g/dl ou 2 g/dl <normal)

Doença óssea (lesões líticas ou osteopenia).

(*) Em pacientes em que o componente M não é detectável, uma relação anormal de FLC no soro pode substituir e satisfazer este critério. Para pacientes, sem componente M no soro ou urina e relação normal de FLC, o número basal de plasmócitos na medula óssea deve ser $\geq 10\%$ plasmócitos na medula óssea. Estes pacientes estão classificados como mieloma não secretório.

Durie BGM International Uniform response criteria for multiple myeloma 2006

O estadiamento clínico tem importante valor prognóstico e terapêutico em pacientes com MM. Em casos de MM assintomático não existem ainda evidências de que a instituição de tratamento precoce prolongue a taxa de sobrevida (129).

2.8 Tratamento com Transplante de células tronco hematopoéticas

Até meados da década de 80, o tratamento do MM era conservador baseado na combinação do melfalano com corticosteróides (prednisona) (130-132). Também no decorrer desta década o transplante autólogo único (133) foi introduzido como terapia para MM. Em 1996, um estudo prospectivo randomizado comprovou que o transplante autólogo era superior a terapia convencional em termos de sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG) (134). Embora sem potencial curativo altas doses de

quimioterapia seguidas pelo TCTH autólogo podem prolongar significativamente a sobrevida, propiciando a alternativa da terapia de manutenção, como uma possibilidade de manter por períodos mais prolongados a doença clinicamente inativa (plateau) (135, 136). Há, no entanto, muita controvérsia sobre o esquema e a duração da manutenção: interferon- α (137, 138), os corticóides (139) incluindo a dexametasona e a prednisona, e, mais recentemente, os antiangiogênicos talidomida e seus derivados (140), isoladamente ou em diversas combinações tem sido alvo de estudos em terapia de manutenção. Considerando as características da doença e de cada doente, a recomendação é de individualizar a necessidade da terapia de manutenção, (141) já que a manutenção parece ter benefício na SLD e na SG, naqueles pacientes com resposta parcial (RP) de qualquer grau. Aparentemente, a talidomida quando utilizada na manutenção pode converter a RP em resposta completa (RC).

Transplante duplo tandem (142) foi introduzido como terapia para o MM sendo utilizado no tratamento do MM (143) e posteriormente com estudos através de metanálise, foi comprovada a inexistência de benefício adicional do transplante autólogo duplo sobre o único (144, 145). O transplante alogênico elimina o problema de contaminação com as células do tumor, porém a alta taxa de mortalidade e significativa toxicidade causada pela doença do enxerto versus o hospedeiro têm limitado este procedimento nos casos de MM (6, 146).

Quanto aos esquemas terapêuticos utilizados que visam a obtenção da melhor resposta possível, antes do TCTH, dados recentes sugerem que novas associações de drogas podem ter resultados superiores aos do esquema clássico (vincristina,

adriamicina e dexametasona), entre elas: talidomida com dexametasona, bortesomibe (147) e mais recentemente lenalidomida com dexametasona (148).

Não existe tratamento curativo para o MM. O tratamento com esquemas poliquimioterápicos, sem o TCTH é capaz de induzir RC em cerca de 25% dos pacientes, com o TCTH autólogo, as taxas de RC e RP chegam, respectivamente, a 31%-51% e 41%-65% (149). No MM, existe, como já citado acima, períodos de doença estável, denominado de plateau cuja duração varia de indivíduo para indivíduo e influi significativamente na determinação da SG. O International Work Group of Myeloma em 2006 (128) padronizou o critério de avaliação de resposta ao tratamento em 5 categorias: (1) resposta completa estrita (2) resposta completa, (3) resposta quase completa (resposta parcial muito boa), (4) resposta parcial e (5) doença estável. (Tabela 2).

Tabela 2 Critério de resposta ao tratamento para pacientes com Mieloma múltiplo conforme o International Myeloma Working Group (2006).

<i>Sub-categoria de resposta</i>	<i>Critério de resposta</i>
Resposta Completa Estrita	<p>Critérios de resposta completa acrescido de:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Relação cadeias leve livres (FLC) normal ▪ Ausência de plasmócitos clonais na medula óssea por imunohistoquímica ou por imunofluorescência.
Resposta completa (RC)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Imunofixação negativa no soro e na urina ▪ desaparecimento de plasmocitomas em tecido mole ▪ $\leq 5\%$ de plasmócitos na medula.
Resposta quase completa (RqC) ou Resposta parcial muito boa	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Componente – M detectável por imunofixação, porém não por eletroforese, ou ▪ redução $\geq 90\%$ do Componente – M no soro e componente-M na urina <100 mg por 24 h.
Resposta Parcial (RP)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Redução $\geq 50\%$ do Componente – M no soro e redução do Componente – M $\geq 90\%$ na urina de 24 horas ou <200 mg por 24 h ▪ Se doença não mensurável (*), um decréscimo de $\geq 50\%$ da diferença entre os níveis com envolvimento e não envolvimento de FLC são necessários para este critério. <p>Se doença não mensurável e ensaio FLC no soro também não mensurável deve haver uma redução $\geq 50\%$ de plasmócitos na MO, Desde que ao diagnóstico, a percentagem de plasmócitos tenha sido $\geq a 30\%$. No caso de presença de plasmocitoma, em tecidos moles, este deve ter redução $\geq a 50\%$..</p>
Doença estável (SD)	<p>Não se encaixou nos critérios para RC, RqC, RP ou doença em progresso.</p>
Não indicado para ser usado como um indicador de resposta, estabilidade Da doença é melhor descrita por prover o tempo de estimativas de progressão.	

(*) Doença mensurável é definida com a presença de pelo menos um destes três medidas Componente M no soro ≥ 10 g dL; Componente M na urina ≥ 200 mg 24 horas; ensaio FLC no soro com nível de envolvimento ≥ 10 mg dL mostrando relação FLC anormal. RC (Resposta completa), RqC (Resposta quase completa) RP (Resposta parcial) sRC (Resposta completa estrita) SD (Doença estável)

Os plasmócitos neoplásicos podem ser identificados através da presença do componente M, por imunofixação ou por imunofluorescência utilizando estudos de

citometria de fluxo. Categorias específicas de RC com graus variados de severidade permitem maior precisão na definição de RC, possibilitando comparação da eficácia de vários tratamentos, inclusive novas drogas terapêuticas, favorecendo a descoberta e monitoramento de recaída mais precocemente. Ainda, este critério permite avaliação de resposta em pacientes com mieloma oligo-secretório e não secretório, a resposta nestes pacientes pode agora ser avaliada usando o teste Freelite. Incorporação da análise no soro da pesquisa de cadeias leves livres permite inclusão e avaliação destes pacientes em testes clínicos (128).

Muitos pacientes que recebem altas doses de quimioterapia para mieloma atingem uma remissão completa pelo critério convencional, porém uma minoria atinge uma remissão molecular. Acompanhar o comportamento dos plasmócitos neoplásicos residuais e desenvolver estratégias de tratamento eficazes salientam a importância do estudo da doença residual mínima (DRM). Monitorar a recuperação dos plasmócitos normais pode oferecer uma ajuda adicional preditiva para evolução do transplante autólogo (103, 150)

2.9 Doença Residual Mínima (DRM)

DRM são as células neoplásicas remanescentes, após o tratamento, as quais não são detectadas pelas técnicas convencionais. Desta maneira, torna-se fundamental o emprego de métodos mais sensíveis para que se possa detectar um número menor

possível de células (151, 152). Assim, a DRM pode ser definida como o limite mínimo de detecção de doença, em pacientes em remissão clínica completa, quando avaliados pelos métodos mais sensíveis(153). Métodos capazes de detectar células tumorais residuais ou recidivas precoces sem manifestações clínicas têm sido amplamente implementados, na tentativa de instituir a terapêutica adequada o mais rápido possível (154).

Muitos pacientes que recebem terapia de altas doses no tratamento do MM atingem o critério de remissão completa pelo critério tradicional, porém uma minoria atinge remissão molecular. Como consequência todos os pacientes recaem devido à doença residual (150).

Abordagens atuais para medir os níveis de doença residual em MM são baseadas na avaliação morfológica das biópsias de medula, análise dos níveis de paraproteínas, ou análise por reação em cadeia de polimerase (PCR) da região VDJ de cadeia pesada da imunoglobulina (102, 103, 110, 155, 156) e pela metodologia por Citometria de fluxo com a utilização de anticorpos monoclonais (99, 102, 103, 109, 119, 155, 157).

A RC é definida como ausência da paraproteína monoclonal no soro e urina, medida por imunofixação, assim como menos de 5% de plasmócitos na medula (158)

Usando este critério, muitos estudos têm mostrado que pacientes que atingem completa remissão têm melhor sobrevida livre de doença e maior possibilidade de sobrevida global quando comparado com pacientes que não atingem este critério (159). Contudo, a diferença de sobrevida é insuficiente para justificar uso do *status* de remissão pelo critério convencional como um meio de regular o tratamento (103).

2.10 Estratégias moleculares para identificação da DRM

A vantagem no uso de técnicas de biologia molecular para o estudo da DRM reside no fato que estas técnicas permitem alcançar uma alta sensibilidade, a ponto de detectar uma célula neoplásica entre 1.000 e 100.000 células normais (154). A habilidade para demonstrar os rearranjos clonais da VH varia entre as desordens linfoproliferativas e é também dependente da estratégia de PCR (reação em cadeia da polimerase) usada. A maior desvantagem das estratégias de PCR é a dificuldade em gerar rearranjos clonais de IgH específicos para cada paciente (156).

Estratégia de PCR usando primers específicos para a região VDJ neoplásica resulta em uma sensibilidade de até 10^6 células. Contudo, não são quantitativas, são trabalhosas, e somente 60% a 70% dos pacientes têm uma região VDJ amplificável (156).

A taxa de detecção em MM pode ser melhorada utilizando a técnica de PCR com o Fr2 e Fr1con. Também se tem sugerido que a impossibilidade de demonstrar o rearranjo clonal pode ser devido ao fato que alguns primers JH têm homologia insuficiente na extremidade 3' dos segmentos JH 3 e JH6 (156).

Em resumo, a utilização da ASO RQ PCR e da citometria de fluxo para detectar DRM em pacientes com MM pode discriminar em duas categorias de risco os pacientes com MM, baseado no nível clonotípico residual e plasmócitos aberrantes (110). A metodologia utilizando PCR se apresenta com uma sensibilidade superior à citometria, porém necessita de tecnologia que permita o sequenciamento dos segmentos variáveis, para que se possa construir *primers* específicos, o que dificulta sua utilização na rotina diária dos laboratórios (120).

2.11 Citometria de fluxo na detecção da DRM

A introdução da citometria de fluxo (CF) na década de 60, forneceu aos investigadores uma técnica que permite avaliar a fluorescência de uma única célula. Qualquer tipo celular que possa ser corado com um composto fluorescente ou ainda ligado a um anticorpo monoclonal ligado a um fluorocromo, pode ser quantificado especificamente usando esta metodologia. A citometria de fluxo mede características tanto óticas quanto fluorescentes de uma única célula (ou qualquer outra partícula com o tamanho entre 0,2 e 50 μm). Também fornece informações sobre as propriedades físicas como o tamanho conhecido como FSC e a complexidade interna SSC (160, 161).

Corantes fluorescentes podem se ligar ou intercalar com diferentes componentes celulares como DNA ou RNA. Adicionalmente, anticorpos conjugados com fluorocromos podem se ligar especificamente com proteínas ou da membrana celular ou intracitoplasmáticas. Quando as células marcadas passam pela fonte de luz (laser) as moléculas fluorescentes são excitadas para um estado mais alto de energia. Após o retorno ao seu estado de repouso, os fluorocromos emitem uma energia luminosa de alto comprimento de onda. O uso de múltiplos fluorocromos, cada um com diferentes comprimentos de onda de emissão, permitem estudos das propriedades celulares simultaneamente. Comumente os fluorocromos utilizados são iodeto de propídio (PI), isotiocinato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE) (160-162), ficoeritrinacianina 5 (PECY-5), proteína clorofila peridinina (PERCP) e aloficocianina (APC).

Baseada na sua fluorescência, as células podem ser separadas (sorted) e recuperadas para outras análises. Recentes avanços tecnológicos têm permitido que laboratórios de hospitais tenham citômetros e assim possam fazer as análises das células tumorais em suas rotinas. A informação fornecida pela citometria de fluxo tornou-se essencial no estudo e gerenciamento de algumas doenças hematológicas. Entretanto todos os estudos celulares realizados por citometria de fluxo podem ser realizados por outras metodologias, porém a vantagem da citometria é de ser de fácil realização, reprodutibilidade e fornecer uma análise multiparamétrica que permite avaliar diretamente a heterogeneidade celular (163, 164).

Plasmócitos são células B no último estágio de diferenciação, portanto, expressam antígenos da linhagem B e no caso de plasmócitos malignos, antígenos específicos destas células. Estes antígenos podem ser explorados pela citometria de fluxo, um método rápido e eficiente não apenas para quantificar baixas quantidades de células neoplásicas, mas também para identificar a reconstituição imune (155). Citometria é um método que possibilita a identificação de plasmócitos com uma sensibilidade de 0.01%. Este ensaio pode distinguir plasmócitos neoplásicos de seus equivalentes normais com base na expressão do CD38, CD138, CD45, CD19 e CD56 mesmo se ambos (normais e neoplásicos) tipos celulares estejam presentes na mesma amostra (103).

3. JUSTIFICATIVA

A importância da determinação da DRM por citometria de fluxo no MM tem sido estudada por uma série de autores (99, 102, 104, 108, 110, 119, 165, 166), porém os resultados ainda são controversos na literatura. O fato de ser o Hospital de Clínicas de Porto Alegre o único do SUS no sul do país a oferecer de forma consistente a possibilidade da terapia de altas doses para pacientes com MM, transplantando cerca de 18 pacientes por ano, oportuniza a possibilidade de correlacionar os resultados da pesquisa da DRM através da imunofenotipagem multiparamétrica em três cores, disponível na maioria dos centros brasileiros, com os desfechos clínicos avaliando desta forma a eficácia na detecção da DRM.

4. OBJETIVO

Determinar a capacidade da imunofenotipagem através da citometria de fluxo multiparamétrica utilizando 3 cores, em detectar a DRM e correlacionar com a evolução da doença em pacientes com MM, tratados no HCPA e submetidos à terapia de altas doses seguidas de TCTH autólogo.

Referências

1. Morse D, Dailey RC, Bunn J. Prehistoric multiple myeloma. *Bull N Y Acad Med.* 1974 Apr;50(4):447-58.
2. Jones HB. On a New Substance Occurring in the Urine of a Patient with Mollities Ossium Phil. *Phil Trans R Soc Lond.* 1848:55-62.
3. Fonseca R, Stewart AK. Targeted therapeutics for multiple myeloma: the arrival of a risk-stratified approach. *Mol Cancer Ther.* 2007 Mar;6(3):802-10.
4. Kyle RA. Five decades of therapy for multiple myeloma: a paradigm for therapeutic models. *Leukemia.* 2005 Jun;19(6):910-2.
5. Durie BG. The epidemiology of multiple myeloma. *Semin Hematol.* 2001 Apr;38(2 Suppl 3):1-5.
6. Rajkumar SV, Gertz MA, Kyle RA, Greipp PR. Current therapy for multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2002 Aug;77(8):813-22.
7. Tuscano JM. Multiple myeloma: epidemiology and therapeutic options. *Manag Care.* 2008 Jul;17(7 Suppl 6):9-15.
8. Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, Cole P, Mandel JS, Oken MM, et al. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer.* 2007;120 Suppl 12:40-61.
9. ACI. Trends in SEER Incidence and U.S. Mortality Using the Joinpoint Regression Program. American Cancer Institute; 2008 [updated 2008; cited 25/04/2009]; Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/results_merged/sect_18_myeloma.pdf.
10. Togawa A. [Epidemiology of multiple myeloma]. *Nippon Rinsho.* 2007 Dec;65(12):2155-9.
11. Huang SY, Yao M, Tang JL, Lee WC, Tsay W, Cheng AL, et al. Epidemiology of multiple myeloma in Taiwan: increasing incidence for the past 25 years and higher prevalence of extramedullary myeloma in patients younger than 55 years. *Cancer.* 2007 Aug 15;110(4):896-905.
12. Hungria VTM. Mieloma múltiplo no Brasil: Aspectos clínicos, demográficos e validação do Sistema de Estadiamento Internacional (ISS) em pacientes brasileiros. *Revista Brás Hemot e Hematol.* [Suplemento nº 1]. 2007;29.
13. Hungria VT, Maiolino A, Martinez G, Colleoni GW, Coelho EO, Rocha L, et al. Confirmation of the utility of the International Staging System and identification of a unique

pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. *Haematologica*. 2008 May;93(5):791-2.

14. Ministério_da_Saúde B. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Brasília: INCA; 2009 [updated 2009; cited 2009 02/04/2009]; Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>.

15. Landgren O. A role for ionizing radiation in myelomagenesis? *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1616-7.

16. Gilbert ES, Marks S. An analysis of the mortality of workers in a nuclear facility. *Radiat Res*. 1979 Jul;79(1):122-48.

17. Tolley HD, Marks S, Buchanan JA, Gilbert ES. A further update of the analysis of mortality of workers in a nuclear facility. *Radiat Res*. 1983 Jul;95(1):211-3.

18. Wing S, Richardson D, Wolf S, Mihlan G, Crawford-Brown D, Wood J. A case control study of multiple myeloma at four nuclear facilities. *Ann Epidemiol*. 2000 Apr;10(3):144-53.

19. Kyle RA, Rajkumar SV. Epidemiology of the plasma-cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(4):637-64.

20. Ichimaru M, Ishimaru T, Mikami M, Matsunaga M. Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: relationship to radiation dose absorbed by marrow. *J Natl Cancer Inst*. 1982 Aug;69(2):323-8.

21. Shimizu Y, Schull WJ, Kato H. Cancer risk among atomic bomb survivors. The RERF Life Span Study. Radiation Effects Research Foundation. *JAMA*. 1990 Aug 1;264(5):601-4.

22. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res*. 1994 Feb;137(2 Suppl):S68-97.

23. Ron E. Ionizing radiation and cancer risk: evidence from epidemiology. *Radiat Res*. 1998 Nov;150(5 Suppl):S30-41.

24. Iwanaga M, Tagawa M, Tsukasaki K, Matsuo T, Yokota K, Miyazaki Y, et al. Relationship between monoclonal gammopathy of undetermined significance and radiation exposure in Nagasaki atomic bomb survivors. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1639-50.

25. Anderson LA, Gadalla S, Morton LM, Landgren O, Pfeiffer R, Warren JL, et al. Population-based study of autoimmune conditions and the risk of specific lymphoid malignancies. *Int J Cancer*. 2009 Jul 15;125(2):398-405.

26. Brown LM, Gridley G, Check D, Landgren O. Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders. *Blood*. 2008 Apr 1;111(7):3388-94.

27. Linet MS, McLaughlin JK, Harlow SD, Fraumeni JF. Family history of autoimmune disorders and cancer in multiple myeloma. *Int J Epidemiol.* 1988 Sep;17(3):512-3.
28. Soderberg KC, Hagmar L, Schwartzbaum J, Feychting M. Allergic conditions and risk of hematological malignancies in adults: a cohort study. *BMC Public Health.* 2004 Nov 4;4:51.
29. Olatunji PO, Okpala IE, Sorunmu MA. Hepatitis B surface antigenaemia in patients with malignant lymphoproliferative disorders. *Tokai J Exp Clin Med.* 1991 Oct;16(3-4):171-3.
30. Dal Maso L, Franceschi S. Hepatitis C virus and risk of lymphoma and other lymphoid neoplasms: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Nov;15(11):2078-85.
31. De Rosa G, Gobbo ML, De Renzo A, Notaro R, Garofalo S, Grimaldi M, et al. High prevalence of hepatitis C virus infection in patients with B-cell lymphoproliferative disorders in Italy. *Am J Hematol.* 1997 Jun;55(2):77-82.
32. Durie BGM, Collins RA, Martin WJ. Positive streptococcal virus cultures in myeloma patients: A possible explanation for neuropsychiatric co-morbidity. *Blood.* 2000(suppl 1 abstr 1553).
33. Durie BG, Urovitz HB. Re: Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jul 7;91(13):1166-7.
34. Amara S, Dezube BJ, Cooley TP, Pantanowitz L, Aboulafia DM. HIV-associated monoclonal gammopathy: a retrospective analysis of 25 patients. *Clin Infect Dis.* 2006 Nov 1;43(9):1198-205.
35. Goedert JJ, Cote TR, Virgo P, Scoppa SM, Kingma DW, Gail MH, et al. Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet.* 1998 Jun 20;351(9119):1833-9.
36. Berenson JR, Vescio RA. HHV-8 is present in multiple myeloma patients. *Blood.* 1999 May 15;93(10):3157-9; discussion 64-6.
37. Rettig MB, Ma HJ, Vescio RA, Pold M, Schiller G, Belson D, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. *Science.* 1997 Jun 20;276(5320):1851-4.
38. Sadeghian MH, Katebi M, Ayatollahi H, Keramati MR. Immunohistochemical study association between human herpesvirus 8 and multiple myeloma. *Int J Hematol.* 2008 Oct;88(3):283-6.
39. Perna AM, Viviano E, Iannitto E, Marceno R, Romano N. No association between human herpesvirus type 8 infection and multiple myeloma. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Jul 1;90(13):1013-4.
40. Barlogie B, Schaughnessy J, Munshi N, Epstein J. Plasma cell Myeloma. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TI editors. *Williams Hematology.* 6 ed. New York: Mac Graw Hill; 2001. p. 1279-98.

41. Praxedes. CEEdS. [cited]; Available from: <http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=350>.
42. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*. 1998 Jan 1;91(1):3-21.
43. Nimura T, Miura I, Kobayashi Y. Cytogenetic Study of 48 Patients with Multiple Myeloma and Related Disorders. *JClinExpHematopathol*. 2003;43(2):53-60.
44. Athanasios BTF, Tray S, Jeffrey S, Maurizio Z, Choon-Kee L, Elias A, et al. Both hypodiploidy and deletion of chromosome 13 independently confer poor prognosis in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2002;118(4):1041-7.
45. Shaughnessy J, Jr., Gabrea A, Qi Y, Brents L, Zhan F, Tian E, et al. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood*. 2001 Jul 1;98(1):217-23.
46. Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A, Godon C, Rapp MJ, Harousseau JL, et al. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myelome. Cancer Res*. 1999 Sep 15;59(18):4546-50.
47. Fonseca R, Harrington D, Oken MM, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, et al. Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (delta13) in multiple myeloma: an eastern cooperative oncology group study. *Cancer Res*. 2002 Feb 1;62(3):715-20.
48. Barlogie B. High-dose therapy and innovative approaches to treatment of multiple myeloma. *Semin Hematol*. 2001 Apr;38(2 Suppl 3):21-7.
49. Claudio JO, Masih-Khan E, Tang H, Goncalves J, Voralia M, Li ZH, et al. A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma. *Blood*. 2002 Sep 15;100(6):2175-86.
50. Nomdedeu JF, Lasa A, Ubeda J, Saglio G, Bellido M, Casas S, et al. Interstitial deletions at the long arm of chromosome 13 may be as common as monosomies in multiple myeloma. A genotypic study. *Haematologica*. 2002 Aug;87(8):828-35.
51. Fonseca R, Blood EA, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Bailey RJ, et al. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3735-41.
52. Largo C, Alvarez S, Saez B, Blesa D, Martin-Subero JI, Gonzalez-Garcia I, et al. Identification of overexpressed genes in frequently gained/amplified chromosome regions in multiple myeloma. *Haematologica*. 2006 Feb;91(2):184-91.
53. Lombardi L, Poretti G, Mattioli M, Fabris S, Agnelli L, Biccato S, et al. Molecular characterization of human multiple myeloma cell lines by integrative genomics: insights into the biology of the disease. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007 Mar;46(3):226-38.

54. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1322-6.
55. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*. 1997 Jun;3(6):614-20.
56. Bezieau S, Avet-Loiseau H, Moisan JP, Bataille R. Activating Ras mutations in patients with plasma-cell disorders: a reappraisal. *Blood*. 2002 Aug 1;100(3):1101-2; author reply 3.
57. Bezieau S, Devilder MC, Avet-Loiseau H, Mellerin MP, Puthier D, Pennarun E, et al. High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat*. 2001 Sep;18(3):212-24.
58. Liu P, Leong T, Quam L, Billadeau D, Kay NE, Greipp P, et al. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood*. 1996 Oct 1;88(7):2699-706.
59. Corradini P, Inghirami G, Astolfi M, Ladetto M, Voena C, Ballerini P, et al. Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and Rb1, in plasma cell dyscrasias. *Leukemia*. 1994 May;8(5):758-67.
60. Mazars GR, Portier M, Zhang XG, Jourdan M, Bataille R, Theillet C, et al. Mutations of the p53 gene in human myeloma cell lines. *Oncogene*. 1992 May;7(5):1015-8.
61. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4569-75.
62. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Litzow MR, Henderson KJ, et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2837-40.
63. Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Dalton WS. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood*. 1997 Dec 1;90(11):4266-70.
64. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):2185-91.
65. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res*. 2004 Feb 15;64(4):1546-58.
66. Moreau P, Facon T, Leleu X, Morineau N, Huyghe P, Harousseau JL, et al. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1579-83.
67. Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N, Facon T, Brigaudeau C, Harousseau JL, et al. Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined

- significance to multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*. 1999 Oct 15;94(8):2583-9.
68. Chesi M, Nardini E, Lim RS, Smith KD, Kuehl WM, Bergsagel PL. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood*. 1998 Nov 1;92(9):3025-34.
69. Avet-Loiseau H, Garand R, Lode L, Harousseau JL, Bataille R. Translocation t(11;14)(q13;q32) is the hallmark of IgM, IgE, and nonsecretory multiple myeloma variants. *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1570-1.
70. Harrison CJ, Mazzullo H, Ross FM, Cheung KL, Gerrard G, Harewood L, et al. Translocations of 14q32 and deletions of 13q14 are common chromosomal abnormalities in systemic amyloidosis. *Br J Haematol*. 2002 May;117(2):427-35.
71. Hayman SR, Bailey RJ, Jalal SM, Ahmann GJ, Dispenzieri A, Gertz MA, et al. Translocations involving the immunoglobulin heavy-chain locus are possible early genetic events in patients with primary systemic amyloidosis. *Blood*. 2001 Oct 1;98(7):2266-8.
72. Fonseca R, Oken MM, Greipp PR. The t(4;14)(p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2001 Aug 15;98(4):1271-2.
73. Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ. *myc* function and regulation. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:809-60.
74. KLumb CS. *Biologia E Patogênese Dos Linfomas Não Hodgkin De Origem B Na Infância: Uma Revisão*. *Rev Bras Cancerologia*. 2001;47(3):291-01.
75. Abbas. AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 5 ed. Philadelphia: Saunders; 2003, 249-262.
76. Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol*. 1990 Jun 1;144(11):4226-30.
77. Roodman GD. Multiple Myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002.
78. Teoh G, Anderson KC. Interaction of tumor and host cells with adhesion and extracellular matrix molecules in the development of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1997 Feb;11(1):27-42.
79. Hjertner O, Torgersen ML, Seidel C, Hjorth-Hansen H, Waage A, Borset M, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) induces interleukin-11 secretion from osteoblasts: a possible role for HGF in myeloma-associated osteolytic bone disease. *Blood*. 1999 Dec 1;94(11):3883-8.
80. Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol*. 1999 Sep;141(3):195-210.

81. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):165-76.
82. Roux S, Meignin V, Quillard J, Meduri G, Guiochon-Mantel A, Ferman J, et al. RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) and RANKL expression in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2002 Apr;117(1):86-92.
83. Roger N, Pearce, Emilia M, Sordillo, Shmuel Yaccoby. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *PNAS*. 2001.
84. Anderson K, Barlogie B, Alexanian R, editors. Thalidomide: An emerging role in treatment of myeloma and others malignancies. A Corporate Friday Symposium The American Society of Hematology Annual Meeting; 1999.
85. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Citocinas. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p. 253-76.
86. Hungria VTM. Doença Óssea em Mieloma Múltiplo. *Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(1):60-6.
87. Su S, Mukaida N, Wang J, Zhang Y, Takami A, Nakao S, et al. Inhibition of immature erythroid progenitor cell proliferation by macrophage inflammatory protein-1alpha by interacting mainly with a C-C chemokine receptor, CCR1. *Blood*. 1997 Jul 15;90(2):605-11.
88. Tsujimoto T, Lisukov IA, Huang N, Mahmoud MS, Kawano MM. Plasma cells induce apoptosis of pre-B cells by interacting with bone marrow stromal cells. *Blood*. 1996 Apr 15;87(8):3375-83.
89. Barille S, Bataille R, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M. Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation. *J Immunol*. 1999 Nov 15;163(10):5723-8.
90. Bataille R, Harousseau JL. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1997 Jun 5;336(23):1657-64.
91. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 5 ed. Philadelphia: Saunders; 2003, 22-25; 210-211.
92. Bakkus MH, Heirman C, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K. Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood*. 1992 Nov 1;80(9):2326-35.
93. Klein B, Zhang XG, Lu ZY, Bataille R. Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood*. 1995 Feb 15;85(4):863-72.
94. Lee GRTC, Foerster J, et al. *Wintrobe's Hematologia clinica*. Manole; 1998; 361.

95. Greipp PR, Raymond NM, Kyle RA, O'Fallon WM. Multiple myeloma: significance of plasmablastic subtype in morphological classification. *Blood*. 1985 Feb;65(2):305-10.
96. Bartl R, Frisch B, Burkhardt R, Fateh-Moghadam A, Mahl G, Gierster P, et al. Bone marrow histology in myeloma: its importance in diagnosis, prognosis, classification and staging. *Br J Haematol*. 1982 Jul;51(3):361-75.
97. Greipp PR, Leong T, Bennett JM, Gaillard JP, Klein B, Stewart JA, et al. Plasmablastic morphology--an independent prognostic factor with clinical and laboratory correlates: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) myeloma trial E9486 report by the ECOG Myeloma Laboratory Group. *Blood*. 1998 Apr 1;91(7):2501-7.
98. Swerdlow SH. International Agency for Research on Cancer. In: Organization WH, editor. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4 ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
99. San Miguel JF, Gutierrez NC, Mateo G, Orfao A. Conventional diagnostics in multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006 Jul;42(11):1510-9.
100. Uckun FM. Regulation of human B-cell ontogeny. *Blood*. 1990 Nov 15;76(10):1908-23.
101. Almeida J, Orfao A, Mateo G, Ocqueteau M, Garcia-Sanz R, Moro MJ, et al. Immunophenotypic and DNA content characteristics of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Pathol Biol (Paris)*. 1999 Feb;47(2):119-27.
102. Lioznov M, Badbaran A, Fehse B, Bacher U, Zander AR, Kroger NM. Monitoring of minimal residual disease in multiple myeloma after allo-SCT: flow cytometry vs PCR-based techniques. *Bone Marrow Transplant*. 2008 May;41(10):913-6.
103. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT, et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood*. 2002 Nov 1;100(9):3095-100.
104. Zhao X, Huang Q, Slovak M, Weiss L. Comparison of ancillary studies in the detection of residual disease in plasma cell myeloma in bone marrow. *Am J Clin Pathol*. 2006 Jun;125(6):895-904.
105. San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Orfao A. Immunophenotype and DNA cell content in multiple myeloma. *Baillieres Clin Haematol*. 1995 Dec;8(4):735-59.
106. Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M, Mateo G, Corral M, Caballero MD, et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1999 Oct;107(1):121-31.
107. Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood*. 1993 May 15;81(10):2658-63.

108. 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. *Haematologica*. 2008 Mar;93(3):431-8.
109. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, Blade J, Lopez-Berges C, Caballero D, et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1853-6.
110. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, Martinez J, Mateo G, Martinez P, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005 Oct;90(10):1365-72.
111. Mateo Manzanera G, San Miguel Izquierdo JF, Orfao de Matos A. Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Methods Mol Med*. 2005;113:5-24.
112. Rawstron A, Barrans S, Blythe D, Davies F, English A, Pratt G, et al. Distribution of myeloma plasma cells in peripheral blood and bone marrow correlates with CD56 expression. *Br J Haematol*. 1999 Jan;104(1):138-43.
113. Van Camp B, Durie BG, Spier C, De Waele M, Van Riet I, Vela E, et al. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood*. 1990 Jul 15;76(2):377-82.
114. Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, Johnson RJ, Jones RA, Richards SJ, et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol*. 1997 Apr;97(1):46-55.
115. Pellat-Deceunynck C, Barille S, Puthier D, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R, et al. Adhesion molecules on human myeloma cells: significant changes in expression related to malignancy, tumor spreading, and immortalization. *Cancer Res*. 1995 Aug 15;55(16):3647-53.
116. Shapiro VS, Mollenauer MN, Weiss A. Endogenous CD28 expressed on myeloma cells up-regulates interleukin-8 production: implications for multiple myeloma progression. *Blood*. 2001 Jul 1;98(1):187-93.
117. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica*. 2001 Aug;86(8):837-43.
118. Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2004 Apr;121(4):482-8.
119. Liu H, Yuan C, Heinerich J, Braylan R, Chang M, Wingard J, et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: a retrospective study. *Leuk Lymphoma*. 2008 Feb;49(2):306-14.

120. Owen RG, Rawstron AC. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: flow cytometry is the method of choice. *Br J Haematol*. 2005 Mar;128(5):732-3; author reply 3-4.
121. Kyle RA. Multiple Myeloma. Diagnostic challenges and standard therapy. *Semin Hematol*. 2001 Apr;38(2 Suppl 3):11-4.
122. Mundy GR. Investigation, prophylaxis, and treatment of bone Disease. *Internacional Myeloma Gand Round. THE LANCET Oncology*. 2001;2:573-4.
123. Edwards CM, Zhuang J, Mundy GR. The pathogenesis of the bone disease of multiple myeloma. *Bone*. 2008 Jun;42(6):1007-13.
124. Durie BGM. International myeloma Foundation. 2009 [updated 2009; cited]; Available from: http://myeloma.org/pdfs/Portuguese_CR2003.pdf.
125. Oshima K, Kanda Y, Nannya Y, Kaneko M, Hamaki T, Suguro M, et al. Clinical and pathologic findings in 52 consecutively autopsied cases with multiple myeloma. *Am J Hematol*. 2001 May;67(1):1-5.
126. Durie BG, Salmon SE, Mundy GR. Relation of osteoclast activating factor production to extent of bone disease in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1981 Jan;47(1):21-30.
127. Kyle R, Cjild J. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*. 2003 Jun;121(5):749-57.
128. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Blade J, Barlogie B, Anderson K, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006 Sep;20(9):1467-73.
129. Pinho. ARd, PINHO. EAd, ALESSANDRI. EF, PEREIRA. LS. Tumor orbitário como primeira manifestação clínica de mieloma múltiplo. *Arq Bras Oftalmol*; 2009. p. 106.
130. Bergsagel DE. Is aggressive chemotherapy more effective in the treatment of plasma cell myeloma? *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1989 Feb;25(2):159-61.
131. Bergsagel DE. Myeloma: what have we learned? *Biomed Pharmacother*. 2001 Nov;55(9-10):548-9.
132. Sporn JR, McIntyre OR. Chemotherapy of previously untreated multiple myeloma patients: an analysis of recent treatment results. *Semin Oncol*. 1986 Sep;13(3):318-25.
133. McElwain TJ, Powles RL. High-dose intravenous melphalan for plasma-cell leukaemia and myeloma. *Lancet*. 1983 Oct 8;2(8354):822-4.
134. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *Intergroupe Francais du Myelome. N Engl J Med*. 1996 Jul 11;335(2):91-7.

135. Barlogie B, Kyle RA, Anderson KC, Greipp PR, Lazarus HM, Hurd DD, et al. Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup Trial S9321. *J Clin Oncol.* 2006 Feb 20;24(6):929-36.
136. Bittencourt R. O papel da terapia de manutenção no Mieloma Múltiplo. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(1):54-9.
137. Ahre A, Bjorkholm M, Mellstedt H, Brenning G, Engstedt L, Gahrton G, et al. Human leukocyte interferon and intermittent high-dose melphalan-prednisone administration in the treatment of multiple myeloma: a randomized clinical trial from the Myeloma Group of Central Sweden. *Cancer Treat Rep.* 1984 Nov;68(11):1331-8.
138. Mandelli F, Avvisati G, Amadori S, Boccadoro M, Gernone A, Lauta VM, et al. Maintenance treatment with recombinant interferon alfa-2b in patients with multiple myeloma responding to conventional induction chemotherapy. *N Engl J Med.* 1990 May 17;322(20):1430-4.
139. Palumbo A, Boccadoro M, Garino LA, Gallone G, Frieri R, Pileri A. Multiple myeloma: intensified maintenance therapy with recombinant interferon-alpha-2b plus glucocorticoids. *Eur Journal Haematol.* 1992;2:93-7.
140. Rajkumar SV, Fonseca R, Dispenzieri A, Lacy MQ, Lust JA, Witzig TE, et al. Thalidomide in the treatment of relapsed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2000 Sep;75(9):897-901.
141. Attal M, Harousseau JL, Leyvraz S, Doyen C, Hulin C, Benboubker L, et al. Maintenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma. *Blood.* 2006 Nov 15;108(10):3289-94.
142. Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH, Naucke S, Cheson B, Mattox S, et al. Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma. *Blood.* 1997 Feb 1;89(3):789-93.
143. Attal M, Harousseau JL, Facon T, Guilhot F, Doyen C, Fuzibet JG, et al. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2003 Dec 25;349(26):2495-502.
144. Kumar A, Kharfan-Dabaja MA, Glasmacher A, Djulbegovic B. Tandem versus single autologous hematopoietic cell transplantation for the treatment of multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Jan 21;101(2):100-6.
145. Moreau P, Hulin C, Garban F, Yakoub-Agha I, Benboubker L, Attal M, et al. Tandem autologous stem cell transplantation in high-risk de novo multiple myeloma: final results of the prospective and randomized IFM 99-04 protocol. *Blood.* 2006 Jan 1;107(1):397-403.
146. Barlogie B, Shaughnessy J, Tricot G, Jacobson J, Zangari M, Anaissie E, et al. Treatment of multiple myeloma. *Blood.* 2004 Jan 1;103(1):20-32.

147. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 2001 Apr 1;61(7):3071-6.
148. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood.* 2008;111(6):2962-72.
149. Falcão RP, Dalmazzo LFF. O valor da Imunofenotipagem para o diagnóstico do mieloma múltiplo e na avaliação da doença residual mínima. *RevBrasde Hematol e Hemoter.* 2007;29(1):3-9.
150. Zent CS, Wilson CS, Tricot G, Jagannath S, Siegel D, Desikan KR, et al. Oligoclonal protein bands and Ig isotype switching in multiple myeloma treated with high-dose therapy and hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 1998 May 1;91(9):3518-23.
151. Brandalise. 2009 [updated 2009; cited 27-07-2009]; Available from: http://www.aapcan.org.br/nt_290408.php.
152. Butturini A, Klein J, Gale RP. Modeling minimal residual disease (MRD)-testing. *Leuk Res.* 2003 Apr;27(4):293-300.
153. Foroni L, Harrison CJ, Hoffbrand AV, Potter MN. Investigation of minimal residual disease in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia by molecular analysis. *Br J Haematol.* 1999 Apr;105(1):7-24.
154. Simões BP. Avaliação de doença residual mínima pós transplante de medula óssea. *Medicina.* 2000;33:433-42.
155. Davies FE, Rawstron AC, Owen RG, Morgan GJ. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2002 Mar;15(1):197-222.
156. Owen RG, Johnson RJ, Rawstron AC, Evans PA, Jack A, Smith GM, et al. Assessment of IgH PCR strategies in multiple myeloma. *J Clin Pathol.* 1996 Aug;49(8):672-5.
157. Corradini P, Cavo M, Lokhorst H, Martinelli G, Terragna C, Majolino I, et al. Molecular remission after myeloablative allogeneic stem cell transplantation predicts a better relapse-free survival in patients with multiple myeloma. *Blood.* 2003 Sep 1;102(5):1927-9.
158. Blade J, San Miguel JF, Escudero ML, Fontanillas M, Besalduch J, Gardella S, et al. Maintenance treatment with interferon alpha-2b in multiple myeloma: a prospective randomized study from PETHEMA (Program for the Study and Treatment of Hematological Malignancies, Spanish Society of Hematology). *Leukemia.* 1998 Jul;12(7):1144-8.
159. Davies FE, Forsyth PD, Rawstron AC, Owen RG, Pratt G, Evans PA, et al. The impact of attaining a minimal disease state after high-dose melphalan and autologous transplantation for multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2001 Mar;112(3):814-9.
160. Orfao A, Ruiz-Arguelles A, Lacombe F, Ault K, Basso G, Danova M. Flow cytometry: its applications in hematology. *Haematologica.* 1995 Jan-Feb;80(1):69-81.

161. Shapiro. HM. Practical Flow Cytometry. New York: Wiley-Liss; 1995.
162. Watson JV. The early fluidic and optical physics of cytometry. *Cytometry*. 1999 Feb 15;38(1):2-14; discussion 1.
163. Bacal N. Aplicação Prática em Citometria de Fluxo. Ateneu; 2003.
164. Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinko B, Swartzendruber DE, et al. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res*. 1983 Sep;43(9):3982-97.
165. Bataille R, Jego G, Robillard N, Barille-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*. 2006 Sep;91(9):1234-40.
166. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J, Mateo G, Perez JJ, Montalban MA, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):4017-23.
167. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975 Sep;36(3):842-54.
168. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3412-20.
169. Iacobucci I, Saglio G, Rosti G, Testoni N, Pane F, Amabile M, et al. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2006 May 15;12(10):3037-42.
170. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, Zhou Y, Pui CH, Rivera GK, et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):97-102.
171. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, Garcia-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2586-92.

5. ARTIGO EM INGLÊS

DAL BÓ Suzane

BITTENCOURT, Rosane Isabel

SILLA, L. M. R

Detection of minimal residual disease by flow cytometry for patients with multiple myeloma submitted to autologous Hematopoietic stem cell transplantation

Abstrat

The best treatment strategy in Multiple Myeloma (MM) is to get complete remission (CR) followed by high-dose chemotherapy and autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT). By multiparametric immunophenotyping it is possible to study the coexpression of molecules on the cell surface. Plasma cells are CD45^{-dim}, CD38^{+high}, CD138⁺, CD19⁻, CD56^{+high} in most cases. The identification of this immunophenotype has substantial value in the distinction between MM and monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), as well as in the assessment of minimal residual disease (MRD). Samples from 44 were analyzed prospectively in this study. Median age at the time of autologous HSCT was 56 years, sixteen of the patients were evaluable before HSCT, 3 and 12 months after transplantation; four had MRD (>0.01% of cells with a characteristic phenotype of neoplastic plasma cells) in all three time points. The presence of MRD was not predictive of relapse or overall survival, 7/13 with FCM positive where in CR, or VGPR at the end of the study. We then analyzed if the presence of MRD at three months after HSCT was predictive of relapse or death. There were 40 evaluable patients of whom 16/40 patients had MRD at three months after

HSCT and there were none in cytological relapse. The mean overall survival (OS) was 34 months and, disease-free survival (DFS) was 28 months (Kaplan-Meier curve) after HSCT. There was no significant difference in the log rank analysis comparing OS and the presence of MRD ($p= 0,611$) and relapse-free survival (RFS) ($p=0,3106$). Although not all patients were evaluated for MRD in all time points, our results showed that three color flow cytometry (FCM) MDR evaluation to be more sensitive than BM, in none of these points, however, were MRD predictive of relapse or death of MM. **In conclusion**, our results could be attributed to a short follow up, small sample size, and over most to the inability of a three color parametric flow cytometry correctly detect the malignant plasma cell population.

Introduction

Multiple myeloma (MM) is a malignant disease characterized by an increase in the number of clonal plasma cells in the bone marrow (BM), and the presence of monoclonal protein, the M-protein, usually IgG or IgA, in blood, urine, or both (1). Clinical signs are different combinations of bone marrow plasma cell infiltration with or without impaired hematopoiesis (2); production of monoclonal immunoglobulin with decrease in the production of normal, polyclonal gammaglobulins; osteolytic lesions (3, 4), hypercalcemia and renal failure. Since the clinical picture is heterogeneous, diagnostic criteria are mandatory in routine clinical practice being the Durie and Salmon staging criteria the gold standard to diagnose and stage MM. This criteria combine hemoglobin concentration, serum calcium, M-protein concentrations and bone involvement (5, 6). A finding of 10% or more plasma cells in bone marrow aspirate (BMA) is one of the three major criteria for the diagnosis of MM. For risk stratification, apart from the Durie and

Salmon criteria, the International Myeloma Foundation has recently recommended the International Staging System (ISS), a new set of criteria based on the values of β_2 microglobulin and serum albumin (7). Because of the heterogeneous distribution in the BM, the variation of plasma cell percentage is not a criterion to evaluate response to treatment, but the detection of less than 5% of plasma cells, associated with the disappearance of other signs and symptoms of the disease, is generally accepted as complete remission (8).

Plasma cells are characterized by the presence of cytoplasmic immunoglobulin and, on the cell surface, CD38 and CD138 antigens (8-12). However, some discrepancies in results are found in the literature that describes the exact phenotype of the plasma cell and its clinical significance (8, 13). Although CD38 is widely expressed in the hematopoietic lineage, flow cytometry (FCM) has shown that the intensity of CD38 fluorescence in plasma cells is much higher than in the other hematopoietic cells, and this strong reactivity was converted into a specific marker for plasma cells. CD138 (sindecyan-1) is a specific marker, both for normal and neoplastic plasma cells since it is not found in the other hematopoietic cells (13-15). The CD38 and CD138 combination in flow cytometry is widely used to characterize both normal and neoplastic plasma cells (9-11, 16-18). At the same time, neoplastic plasma cells lose the CD19, CD20 and CD22 markers in about 85% of the patients with MM (14, 15, 19) and there is little or no expression of CD45 in about 90% of the cases (20). Adhesion molecules apparently involved in the pathogenesis of MM, such as the CD56 (8) are found in about 70% (19) of the patients with MM, and disappear in advanced stages of the disease (21, 22). Another well-established characteristic of plasma cells is their size properties (*forward scatter* - FSC) and internal complexity (*side scatter* - SSC), which are revealed in the

analysis by flow cytometry (8). The combination of these characteristics by multiparametric immunophenotyping allows us to study the coexpression of these molecules on the cell surface, to detect malignant plasma cells, and to differentiate MM from other monoclonal gammopathies. In summary, differently from other normal plasma cells (CD19⁺, CD45⁺, CD38^{high}, CD138⁺, CD56⁻, neoplastic plasma cells are CD45^{-dim}, CD38^{high}, CD138⁺, CD19⁻, CD56^{high} (Figure 1) in most cases. The identification of this immunophenotype has substantial value in the distinction between MM and monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), as well as in the assessment of minimal residual disease (MRD) (8, 16, 19, 23-25).

MRD may be defined as the presence of neoplastic cells in patients that are clinically in complete remission (CR), detected by more sensitive methods than light microscopy, such as FCM (10, 17) or polymerase chain reaction (PCR) (26, 27). Methods to detect residual tumor cells or early relapses without clinical signs have been widely used in an attempt to initiate adequate therapy for MRD as early as possible after transplantation (28). The role of the presence and amount of MRD is well established in chronic myeloid leukemia (CML) (29) and in acute lymphoid leukemia (ALL) in children (30). In both, the amount of MRD measured using quantitative PCR (CML and ALL) or FCM (ALL) is associated with disease relapse.

The best treatment strategy in MM is to get CR followed by high-dose chemotherapy and autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation HSCT (31). Thirty one to 51% of these patients achieve CR (32), and this is followed by higher rates of disease-free or progression-free survival when compared with patients that do not achieve CR (33). In this scenario, however, of the patients in CR only a few achieve molecular remission eventually relapsing as consequence of residual disease (34). The

International Myeloma Working Group has defined, stringent complete response (sCR), CR, very good partial remission (VGPR) and partial remission (PR) as a tool to compare and analyze treatment results (35). Briefly, sCR defined as CR plus normal free light chains (FLC ratio, and absence of phenotypically aberrant PC in bone marrow with a minimum of 3000 total PC analyzed by multiparametric flow cytometry (with >4 colors), CR is defined as absence of M component (serum and urine) and $\leq 5\%$ plasma cells in the BM; VGPR is serum and urine M component detectable by immunofixation but not on electrophoresis or 90% or greater reduction in serum M-protein plus urine M-protein level <100 mg per 24 h and PR $\geq 50\%$ reduction of serum M-protein and reduction in 24 h urinary M-protein by $\geq 90\%$ or to <200 mg per 24h.

Molecular (9, 10, 18, 36, 37) or FCM (9, 10, 17, 24, 26, 36) methods have been used to detect MRD in MM, but its clinical importance is still being evaluated since most studies included only a small number of patients (10, 18, 24).

This prospective study evaluated of MRD detection using FCM in patients with MM submitted to high-dose chemotherapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), at the Hematology and Bone Marrow Transplantation Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

PATIENTS AND TREATMENT

Patients with MM who achieved CR, VGPR or PR to high-dose chemotherapy (MEL 200 - melphalan 100 mg/m²/day [D-3] and melphalan 100 mg/m²/day [D-2]) followed by autologous HSCT between December 2005 and May 2009 were included in

this study. Before HSCT, at 3 and 12 months later, laboratory reevaluation was performed and bone marrow collected for cytological, and immunophenotypic studies.

Methods

Immunophenotypic Studies

The bone marrow samples were prepared and analyzed within 24 hours. Each test tube received 100 μ L of BM, which corresponded to about 10^6 leukocytes; samples were incubated with 5 μ L of each monoclonal antibody marked with fluorochromes (FITC, PE, PE-CY5/PERCP), according to the panel below, and incubated for 15 minutes in the dark, the lysis was performed using Facslyse (BD Dickinson, San Jose, CA) for 15 minutes, centrifuged washed twice with PBS (phosphate buffer saline) and resuspended with PBS plus paraformaldehyde. In the cells were acquired in a 3-color FacsCalibur BD Flow Cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA).

The monoclonal antibodies used were CD38, CD138, CD19, CD56 and CD45 in the following combination: CD45/CD138/CD38; CD19/CD138/CD38; CD38/CD56/CD138, and CD45/CD3. Samples were acquired twice: first, 20000 events, and second, using the Gates acquisition system, 50000 to 450000 events were acquired in the CD38 gate. The acquisition software used was Cellquest BD (Becton Dickinson, San Jose, CA). In the gate acquisitions, the total number of events acquired in the cytometer was recorded for the final calculation of the number of cells with phenotypes of interest. The analyses were performed using the Paint-A-Gate PRO software (Becton Dickinson, San Jose, CA). Neoplastic plasma cells were defined as CD45^{-dim} CD138⁺, CD38^{high}, CD19⁻ CD56^{+/-}. CD3 was utilized to exclude contaminating events and detect peripheral blood in the sample. The analytical strategy was to choose positive events for

CD38 and CD138 and to check the expression of CD45, CD56, and CD19. A minimum of 50 positive events, considering the sum of the three tubes under analysis, was required to ensure analysis. MRD was defined as the presence of neoplastic plasma cells higher than 0.01% of the sample as described in previous studies (8, 18, 25).

Cytological examination was done in BM cells smear stained with MayGrunwald Giemsa including at least 500 nucleated cells.

The end points of the study were to evaluate a possible relationship between the presence of MRD, relapse or death in relapse during the period of the study.

Statistical methods

It was accomplished a descriptive analysis of the data through median for the quantitative variables, while the categorical variables were represented through frequency and percentile. For evaluation of the overall survival (OS) and disease free survival (DFS) Kaplan-Meier was utilized, comparing the groups through the log rank test. The data was analyzed in SPSS 12.0 and the value of adopted alpha was 5%.

RESULTS

Samples from 44 patients (21 men) were analyzed prospectively in this study. Median age at the time of HSCT was 55 years [percentile-25 (52,25 years) and 75 (64 years)], (table I).

Sixteen of the patients were evaluable before HSCT, 3 and 12 months after transplantation; four had MRD (>0.01% of cells with a characteristic phenotype of neoplastic plasma cells) in all three time points; nine had MRD in at least once of the

points, and three had negative results in all assessments (table II). Only three patients had positive bone marrow aspirate (BMA) results (>5% plasma cells), one before HSCT and the other two at 12 months when they were found relapsed. BMA results identified 3/16 (18.8%) cases while FCM detected 13/16 (81.3%) ($p < 0,001$). Of this group of patients, there were seven relapses and five evolved the death during the study period. Only once patient died before 12 months after high dose therapy. The presence of MRD was not predictive of relapse or overall survival, 7/13 with FCM positive where in CR, or VGPR at the end of the study. We then analyzed if the presence of MRD at three months after HSCT was predictive of relapse or death. There were 40 evaluable patients of whom 16/40 patients had MRD at three months after HSCT and there were none in cytological relapse (table III). The mean overall survival (OS) was 34 months and, disease-free survival (DFS) was 28 months (Kaplan-Meier curve) after HSCT. There was no significant difference in the log rank analysis comparing OS and the presence of MRD ($p = 0,611$) and relapse-free survival (RFS) ($p = 0,3106$). Although not all the patients had were evaluate for MRD in all time points, our results showed FCM MDR evaluation to be more sensitive than BM, in none of these points, however, were MRD predictive of relapse or death of MM.

DISCUSSION

Perez-Persona et al. (38) demonstrated that the ratio between the proportion of abnormal and normal plasma cell as identified by FCM, significantly correlates with risk for disease progression. A better long term outcome was observed in patients with a low

level of MM plasma cells as detected by FCM prior to autologous HSCT (24). Early re-appearance of MM plasma cells after high dose chemotherapy was related to a shorter PFS (10, 33). Paiva et al (39) showed in a large number of uniformly treated MM, 297 patients, that FCM MRD status at day 100 after autologous HSCT was the most relevant prognostic factor for MM.

Here we showed that in spite of being significantly more sensitive than cytology to detect MRD in MM, FCM - measured by the identification of plasma cells CD45^{-dim} CD138⁺, CD38^{high}, CD19⁻ CD56⁺ (13-15, 23), did not predict for relapse or death from MM in our group of patients.

The correct quantification of plasma cells in bone marrow is fundamental for the diagnosis of MM (35). Multiparametric flow cytometry is a method to monitor minimal residual disease and to evaluate treatment results (16). The use of this method will eventually become more frequent in this context and, therefore, demand approaches that define specificity and sensitivity to ensure the use of an adequate quality control program. The combination of at least four colors is currently the best recommendation to monitor minimal residual disease in MM (39). However, for most laboratories in developing countries, equipment that reads four colors simultaneously is still uncommon due to high costs. Discrepancies between cytological evaluation and FCM and their impact as predictors of relapse in MM, could be attributed to the ability of FCM to detect malignant plasma cells as compared to BM cytology.

Our results could be attributed to a short follow up, small sample size, and possibly, to the inability of a three color parametric flow cytometry correctly detect the malignant

plasma cell population We showed however that in our hands, FCM is an high sensitive method for MRD detection. Augmenting the number of patients, the follow up period and the utilization of more then three colors combination for FCM, will likely improve our results. The use of MRD burden for the early institution of treatment, as well as the use of novel drugs with a better remission quality will likely be widely utilized in the treatment of MM.

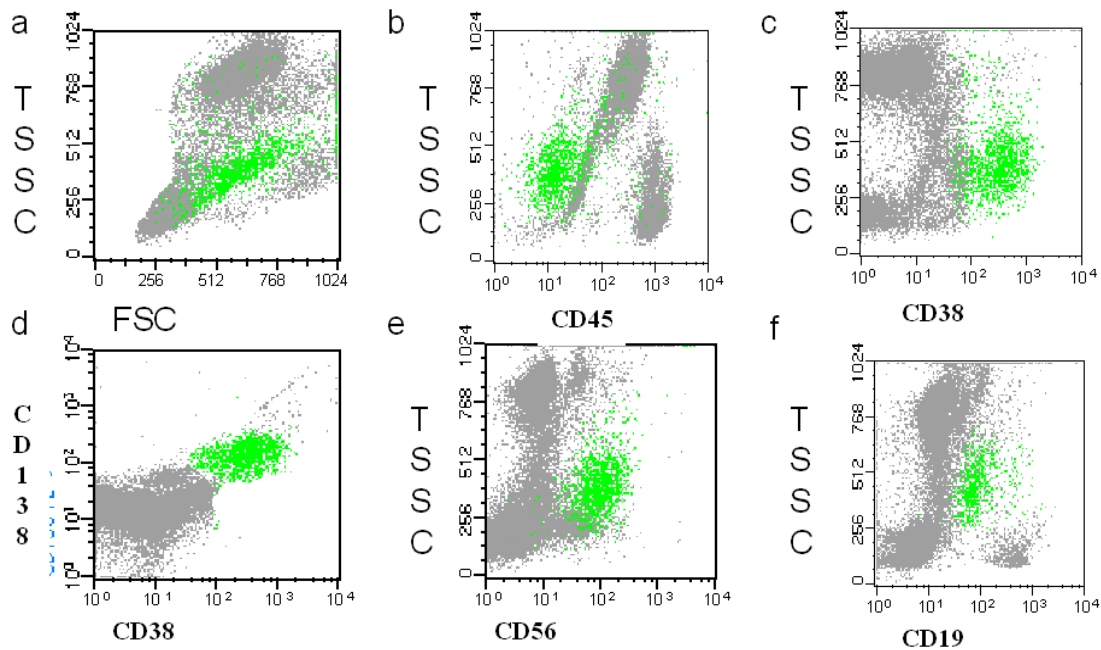


Figure 1- Immunophenotypic characteristic plasma cell (painted in green) a) SSCxFSC characteristics of normal PC and neoplastic PC b) CD45^{-dim} characteristics neoplastic PC, c) CD38^{high} characteristics of normal PC and neoplastic, d) CD138xCD38 characteristics of normal PC and neoplastic plasma cell e) CD56^{high} characteristics of neoplastic PC f) CD19 negative characteristics neoplastic PC. * TSSC(Transformed SSC – Paint a Gate)

Table 1. Characteristics of MM patients enrolled in the study between december 2005 and may of 2009.

Total patients (n)	44	
Age, years median (min-max)	55,5	52,2- 64
Sex, M/F	21/23	
Immunoglobulin isotype (%)		
IgG	61,4	
IGA	18,20	
kappa light chain	15,90	
lambda light chain	4,5	
Response before TCTH n (% of total)		
CR	12	27,3
VGPR	19	43,2
PR	13	29,5
Response after TCTH n (% of total)		
CR	14	32,6
VGPR	16	36,4
PR	2	4,7
no know	1	2,3
Relapse	3	7,0
Dead	8	18,6
Follow up time, months (mean)	18	9-43

Table 2 - Results patients before HSCT, 3 months, 12 months

Pat	MRD (preTCTH)	MRD (3 months)	MRD (12 months)	Status (preTCTH)	Status (end of study)
1	-	-	+	VGPR	D
3	+	-	+	CR	CR
4	-	-	-	VGPR	D
6	-	-	+	PR	D
7	+	+	+	PR	VGPR
8	-	-	+	PR	VGPR
9	-	-	+	CR	CR
10	+	-	-	VGPR	R
13	-	-	-	CR	CR
14	-	-	+	VGPR	PR
16	+	+	+	PR	R
18	+	+	+	VGPR	CR
19	-	+	-	CR	VGPR
22	-	+	+	VGPR	VGPR
32	-	-	-	VGPR	VGPR
41	+	+	+	PR	D

(D) Died; (R) Relapse; (PR) Partial remission; (VGPR) Very Good PR; (CR) Complete emission.

(+) FCM > 0,01% PC immunophenotype neoplastic

(-) FCM ≤ 0,01% PC immunophenotype neoplastic

Table 3 - Results patients 3 months.

	<i>MRD (3 months)</i>	<i>Status (preTCTH)</i>	<i>Status (end of study)</i>	<i>Immunoglobulin Type</i>
1	-	VGPR	D	IgG
2	-	CR	CR	IgG
3	-	CR	CR	IgG
4	-	VGPR	D	IgG
5	-	CR	CR	Kappa light chain
6	-	PR	D	IgA
7	+	PR	VGPR	IgG
8	-	PR	VGPR	IgA
9	-	CR	CR	Kappa light chain
10	-	VGPR	R	Lambda light chain
11	+	PR	D	IgG
12	-	CR	VGPR	IgG
13	-	CR	CR	IgG
14	-	VGPR	PR	IgG
15	+	PR	D	IgA
16	+	PR	R	IgA
17	-	CR	*	IgG
18	+	VGPR	CR	IgG
19	+	CR	VGPR	IgG
20	+	CR	CR	IgG
21	+	CR	CR	Lambda light chain
22	+	VGPR	VGPR	IgG
23	+	PR	VGPR	IgG
25	-	VGPR	VGPR	Kappa light chain
28	-	PR	D	IgG
30	-	VGPR	CR	IgG
31	-	CR	CR	IgG
32	-	VGPR	VGPR	IgG
33	-	CR	VGPR	IgG
35	+	PR	R	IgA
36	-	PR	VGPR	kappa light chain
37	-	PR	D	IgA
38	+	VGPR	VGPR	IgG
39	+	VGPR	VGPR	Kappa light chain
40	+	VGPR	VGPR	IgA
41	+	PR	D	IgA
42	+	PR	PR	IgA
43	-	VGPR	VGPR	IgG
44	-	VGPR	VGPR	IgA
45	-	VGPR	VGPR	IgG

(D) Died; (R) Relapse; (PR) Partial remission; (VGPR) Very Good PR;
(CR) Complete remission.

(+) FCM > 0,01% PC immunophenotype neoplastic
(-) FCM ≤ 0,01% PC immunophenotype neoplastic

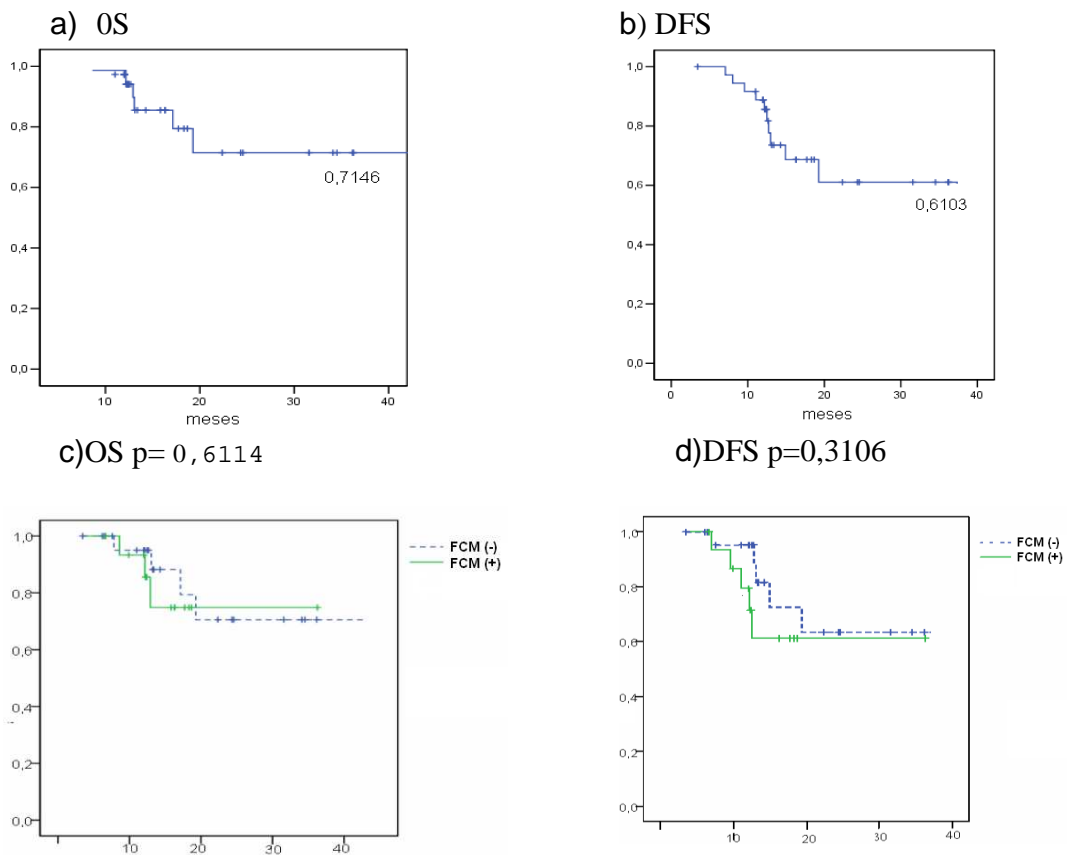


Figure 2. a) Overall Survival (OS), b) Disease-free Survival (DFS) c) Overall Survival curves according to the DRM evaluation d) Disease-free Survival curves according to the DRM evaluation.

REFERENCES

1. Bataille R, Harousseau JL. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1997 Jun 5;336(23):1657-64.
2. Barlogie B, Schaughnessy J, Munshi N, Epstein J. Plasma cell Myeloma. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TI editors. *Williams Hematology*. 6 ed. New York: Mac Graw Hill; 2001. p. 1279-98.
3. Rajkumar SV, Gertz MA, Kyle RA, Greipp PR. Current therapy for multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2002 Aug;77(8):813-22.
4. Mundy GR. Investigation, prophylaxis, and treatment of bone Disease. *Internacional Myeloma Gand Round. THE LANCET Oncology*. 2001;2:573-4.
5. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975 Sep;36(3):842-54.
6. Kyle R CJ. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*. 2003 Jun;121(5):749-57.
7. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3412-20.
8. San Miguel JF, Gutierrez NC, Mateo G, Orfao A. Conventional diagnostics in multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006 Jul;42(11):1510-9.
9. Lioznov M, Badbaran A, Fehse B, Bacher U, Zander AR, Kroger NM. Monitoring of minimal residual disease in multiple myeloma after allo-SCT: flow cytometry vs PCR-based techniques. *Bone Marrow Transplant*. 2008 May;41(10):913-6.
10. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT, et al. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood*. 2002 Nov 1;100(9):3095-100.
11. Zhao X, Huang Q, Slovak M, Weiss L. Comparison of ancillary studies in the detection of residual disease in plasma cell myeloma in bone marrow. *Am J Clin Pathol*. 2006 Jun;125(6):895-904.
12. Almeida J, Orfao A, Mateo G, Ocqueteau M, Garcia-Sanz R, Moro MJ, et al. Immunophenotypic and DNA content characteristics of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Pathol Biol (Paris)*. 1999 Feb;47(2):119-27.

13. San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Orfao A. Immunophenotype and DNA cell content in multiple myeloma. *Baillieres Clin Haematol*. 1995 Dec;8(4):735-59.
14. Almeida J, Orfao A, Ocqueteau M, Mateo G, Corral M, Caballero MD, et al. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1999 Oct;107(1):121-31.
15. Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, et al. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood*. 1993 May 15;81(10):2658-63.
16. 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. *Haematologica*. 2008 Mar;93(3):431-8.
17. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, Blade J, Lopez-Berges C, Caballero D, et al. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1853-6.
18. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, Martinez J, Mateo G, Martinez P, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005 Oct;90(10):1365-72.
19. Mateo Manzanera G, San Miguel Izquierdo JF, Orfao de Matos A. Immunophenotyping of plasma cells in multiple myeloma. *Methods Mol Med*. 2005;113:5-24.
20. Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, Johnson RJ, Jones RA, Richards SJ, et al. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *Br J Haematol*. 1997 Apr;97(1):46-55.
21. Rawstron A, Barrans S, Blythe D, Davies F, English A, Pratt G, et al. Distribution of myeloma plasma cells in peripheral blood and bone marrow correlates with CD56 expression. *Br J Haematol*. 1999 Jan;104(1):138-43.
22. Van Camp B, Durie BG, Spier C, De Waele M, Van Riet I, Vela E, et al. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood*. 1990 Jul 15;76(2):377-82.
23. Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2004 Apr;121(4):482-8.
24. Liu H, Yuan C, Heinerich J, Braylan R, Chang M, Wingard J, et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: a retrospective study. *Leuk Lymphoma*. 2008 Feb;49(2):306-14.
25. Owen RG, Rawstron AC. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: flow cytometry is the method of choice. *Br J Haematol*. 2005 Mar;128(5):732-3; author reply 3-4.

26. Corradini P, Cavo M, Lokhorst H, Martinelli G, Terragna C, Majolino I, et al. Molecular remission after myeloablative allogeneic stem cell transplantation predicts a better relapse-free survival in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2003 Sep 1;102(5):1927-9.
27. Foroni L, Harrison CJ, Hoffbrand AV, Potter MN. Investigation of minimal residual disease in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia by molecular analysis. *Br J Haematol*. 1999 Apr;105(1):7-24.
28. Simões BP. Avaliação de doença residual mínima pós transplante de medula óssea. *Medicina*. 2000;33:433-42.
29. Iacobucci I, Saglio G, Rosti G, Testoni N, Pane F, Amabile M, et al. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2006 May 15;12(10):3037-42.
30. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, Zhou Y, Pui CH, Rivera GK, et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):97-102.
31. Barlogie B, Kyle RA, Anderson KC, Greipp PR, Lazarus HM, Hurd DD, et al. Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup Trial S9321. *J Clin Oncol*. 2006 Feb 20;24(6):929-36.
32. Falcão RP, Dalmazzo LFF. O valor da Imunofenotipagem para o diagnóstico do mieloma múltiplo e na avaliação da doença residual mínima. *Rev Bras de Hematol e Hemoter*. 2007;29(1):3-9.
33. Davies FE, Forsyth PD, Rawstron AC, Owen RG, Pratt G, Evans PA, et al. The impact of attaining a minimal disease state after high-dose melphalan and autologous transplantation for multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2001 Mar;112(3):814-9.
34. Zent CS, Wilson CS, Tricot G, Jagannath S, Siegel D, Desikan KR, et al. Oligoclonal protein bands and Ig isotype switching in multiple myeloma treated with high-dose therapy and hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 1998 May 1;91(9):3518-23.
35. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Blade J, Barlogie B, Anderson K, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006 Sep;20(9):1467-73.
36. Davies FE, Rawstron AC, Owen RG, Morgan GJ. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002 Mar;15(1):197-222.
37. Owen RG, Johnson RJ, Rawstron AC, Evans PA, Jack A, Smith GM, et al. Assessment of IgH PCR strategies in multiple myeloma. *J Clin Pathol*. 1996 Aug;49(8):672-5.
38. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, Garcia-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance

and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2586-92.

39. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J, Mateo G, Perez JJ, Montalban MA, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):4017-23.