



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Avaliação das Gamopatias Monoclonais seguidas no Centro Hospitalar Cova da Beira por Citometria de Fluxo

Introdução de Novos Marcadores

Daniela Sofia Pereira Coelho

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Medicina

(Ciclo de Estudos Integrado)

Orientador: Professora Doutora Ana Mafalda Fonseca
Co-Orientadores: Dr^a Andreia Monteiro e Dr^a Patrícia Amantegui

Covilhã, Maio de 2014

Dedicatória

Dedico esta Dissertação de Mestrado aos meus pais, José Alexandre da Silva Coelho e Isaurinda da Encarnação Pereira Bernardo Coelho, pelo incentivo e apoio em todas as minhas decisões. A minha formação só foi possível graças ao seu esforço.

Agradecimentos

À Professora Ana Mafalda Fonseca, minha orientadora nesta Dissertação, pelo interesse desde logo demonstrado e toda a disponibilidade, preocupação e dedicação a este trabalho.

À Dr^a Andreia Monteiro pela incansável ajuda nas técnicas laboratoriais necessárias a todo o processo de Citometria de Fluxo, no fornecimento de bibliografia, na estruturação do estudo e pela divulgação do mesmo no Congresso da Sociedade Ibérica de Citometria de Fluxo na impossibilidade de estar presente.

Dr^a Patrícia Amantegui interesse demonstrado no planeamento do estudo, a sua disponibilidade para esclarecimento de dúvidas e apoio na recolha de dados.

A Dr^a Rosa Saraiva pela orientação nas burocracias necessárias ao planeamento da minha dissertação e pelo fornecimento de alguns artigos científicos.

A todos os doentes com GM do CHCB que consentiram participar neste estudo.

Aos meus pais pelo apoio incondicional.

Às minhas colegas de casa Cristiana Borrego e Luciana Alegre pela paciência, incentivo e ajuda nas tarefas domésticas quando o meu tempo era precioso

À minha colega Ana Santos pelo lembrar constante que tinha que trabalhar na Dissertação, bem como a sua ajuda com a formatação da bibliografia.

Ao meu amigo Cláudio Sequeira pela paciência e pela preciosa ajuda na formatação do texto.

Às minhas amigas de sempre Ana Vasconcelos, Sara Santos, Cláudia Rodrigues, Ângela Magalhães e Sónia Julião, por mais longe que estejam, estão sempre presentes quando preciso de distrair ou de uma injeção de confiança.

Resumo

Introdução: As Gamopatias Monoclonais são um grupo de doenças caracterizado pela proliferação monoclonal de plasmócitos. A forma mais comum é a Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado e a mais agressiva o Mieloma Múltiplo. A taxa de progressão de Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado para Mieloma Múltiplo é de aproximadamente 1% ao ano.

Estudos recentes sugerem que o uso de anticorpos monoclonais CD27 e CD117 é promissor para prognóstico e caracterização da doença. O CD27 é expresso nos plasmócitos normais, ao contrário do CD117, frequentemente expresso em plasmócitos aberrantes. A perda de CD117 e CD27 parece estar associada à progressão para Mieloma Múltiplo. Contudo, a expressão de CD117 em Mieloma Múltiplo está associada a um prognóstico favorável.

Este estudo tem por objectivo avaliar se a expressão de CD27 e CD117 em plasmócitos pode contribuir para a caracterização e prognóstico da Gamapatia Monoclonal e analisar a possibilidade destes marcadores serem integrados em painéis de rotina.

Material e Métodos: Foram processadas 25 amostras de medula óssea de doentes com Gamapatia Monoclonal, com idade média de 73,8 anos (51-86 anos). Por Citometria de Fluxo quantificou-se a percentagem de plasmócitos normais e aberrantes, segundo a expressão dos marcadores CD19, CD20, CD27, CD38, CD45, CD56, CD117, CD138, Kappa e Lambda intracitoplasmático. A aquisição dos dados foi efectuada pelo FACSCalibur, tendo sido utilizado o software Infinicyt para a análise e caracterização das células.

Resultados: Observaram-se em 21 amostras de medula óssea plasmócitos com fenótipo compatível com Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado, 2 com Mieloma Múltiplo Assintomático e 2 com Mieloma Múltiplo, e estes diagnósticos encontravam-se confirmados clinicamente. Em 12 amostras de medula óssea, plasmócitos aberrantes foram positivos para CD27, o que se correlacionou com resultados favoráveis de outros exames complementares de diagnóstico. A positividade do CD27 diminuiu consoante a gravidade da doença, enquanto a positividade para CD117 diminuiu nos estádios finais da doença. Ambos os marcadores permitiram uma melhor divisão de plasmócitos normais de patológicos, particularmente em 6 amostras.

Conclusões: Em 19 amostras das 25 analisadas, o CD27 e CD117 forneceram novos dados, relativamente ao risco de progressão da doença e distinção de plasmócitos anormais e normais, sendo por isso recomendada a integração destes marcadores em painéis de rotina. A Citometria de Fluxo demonstra-se uma ferramenta importante no diagnóstico, monitorização e prognóstico dos doentes com Gamapatia Monoclonal, contudo necessita de mais investigação, para que se encontrem marcadores mais sensíveis, capazes de distinguir doença estável de evolutiva.

Palavras-chave

Gamopatias Monoclonais, Imunofenotipagem, Citometria de Fluxo, CD27, CD117

Abstract

Introduction: Monoclonal Gammopathies are a group of diseases characterized by monoclonal proliferation of plasma cells. The most common is Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and the most aggressive is Multiple Myeloma. The progression rate of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance to Multiple Myeloma is approximately 1 % per year.

Recent studies suggest that the use of monoclonal antibodies CD27 and CD117 is promising for characterization and prognosis of the disease. The CD27 is expressed on normal plasma, unlike CD117, frequently expressed in aberrant plasma cells. The loss of CD117 and CD27 appears to be associated with progression to Multiple Myeloma. However, the expression of CD117 in Multiple Myeloma is associated with a favorable prognosis.

This study aims to evaluate if the expression of CD27 and CD117 in plasma cells may contribute for the characterization and prognosis of Monoclonal Gammopathies and analyze the possibility of integration of these markers into routine panels.

Material and Methods: We processed 25 samples of bone marrow from patients with Monoclonal Gammopathy, mean age 73.8 years (51-86 years). By Flow Cytometry we quantified the percentage of aberrant and normal plasma cells in the expression of the markers CD19, CD20, CD27, CD38, CD45, CD56, CD117, CD138, Kappa and Lambda intracytoplasmic. Data acquisition was performed by FACSCalibur and the Infinicyt software was used for the analysis and characterization of the cells.

Results: In 21 bone marrow samples were observed plasma cells with phenotype compatible with Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, 2 with Smoldering Multiple Myeloma, and 2 with Multiple Myeloma, Myeloma, and these diagnosis were clinically confirmed. In 12 bone marrow samples, aberrant plasma cells were positive for CD27, which is correlated with favorable results of other diagnostic procedures. The CD27 positivity was decreased depending on the severity of the disease, while positivity of CD117 decreased in the later stages of the disease. Both markers resulted in a better division of normal plasma cells from pathological, particularly in 6 samples.

Conclusions: In 19 of the 25 samples analyzed, CD27 and CD117 provided the new data, concerning the risk of disease progression and distinguishing normal and abnormal plasma cells, so it is recommended to integrate these markers in the routine panel. Flow Cytometry demonstrated to be an important tool in the diagnosis, monitoring and prognosis of patients with Monoclonal Gammopathy, but more research is needed in order to be found more sensitive markers able to distinguish progressive from stable disease.

Keywords

Monoclonal Gammopathies, Immunophenotyping, Flow Cytometry, CD27, CD117

Índice

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Palavras-chave	viii
Abstract.....	ix
Keywords	x
Índice	xi
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Gráficos	xiii
Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Acrónimos.....	xv
1 Introdução	1
1.1 Objectivo Geral	5
1.2 Objectivos Específicos	5
2 Material e Métodos	6
2.1 Selecção de Amostras	6
2.2 Material.....	6
2.3 Métodos.....	7
2.3.1 Preparação da amostra	7
2.3.2 Marcação de Plasmócitos	7
2.3.3 Aquisição de Dados	8
2.3.4 Análise dos Dados.....	8
2.3.5 Integração dos Resultados com Outros Meios Complementares de Diagnóstico	9
3 Resultados	10
3.1 Caracterização da Amostra	10
3.2 Análise da Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo	12
3.3 Outros Meios Complementares de Diagnóstico	16
4 Discussão	19
Bibliografia.....	25
Anexos	28
Anexo 1 - Autorização do estudo pela Comissão de Ética	28
Anexo 2 - Declaração de Consentimento Informado.....	29
Anexo 3 - Sistemas de Classificação Mieloma Múltiplo	30
Anexo 4 - Critérios de Estratificação de Risco de MM pelo Grupo Mayo Clinic.....	31
Anexo 5 - Critérios de Estratificação de Risco de MM pelo Grupo Espanhol.....	32

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Esquema da Estrutura de uma Imunoglobulina	1
Figura 1.2 - Esquema representativo do funcionamento de um Citómetro de Fluxo	3
Figura 3.1 - Citometria de Fluxo de MO de Doente com GMSI, 63 anos, género feminino	15
Figura 3.2 - Citometria de Fluxo de MO de Doente com MMA, 77 anos, género feminino	16

Lista de Gráficos

Gráfico 3.1 - Distribuição da amostra por idade.....	10
Gráfico 3.2 - Apresentação clínica inicial.....	11
Gráfico 3.3 - Expressão Média de Marcadores de Plasmócitos Anormais	13
Gráfico 3.4 - Frequência dos novos marcadores por tipo de GM.....	13
Gráfico 3.5 - Utilidade de Marcadores Aberrantes na identificação de população de plasmócitos patológicos	15

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Critérios de Diagnóstico de GM	2
Tabela 3.1 - Distribuição da Amostra por Patologia e Componente Monoclonal	11
Tabela 3.2 - Resumo da Análise das Amostras de MO	14
Tabela 3.3 - Estratificação do risco segundo grupo Mayo Clinic para doentes com GMSI	17
Tabela 3.4 - Estratificação do risco segundo grupo Mayo Clinic para doentes com MMA	17
Tabela 3.5 - Resumo de Meios Complementares de Diagnóstico utilizados no estudo de MMA e MM	18
Tabela 4.1 - Lista representativa da expressão dos marcadores mais usados	21

Lista de Acrónimos

CF	Citometria de Fluxo
CHCB	Centro Hospitalar Cova da Beira
CM	Componente Monoclonal
FL	Intensidade de Fluorescência
FSC	<i>Forward Scatter Characteristics</i>
GM	Gamopatias Monoclonais
GMSI	Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado
Ig	Imunoglobulina
MC	Morfologia Convencional
MM	Mieloma Múltiplo
MMA	Mieloma Múltiplo Assintomático
MO	Medula Óssea
PBS	Filtrado de solução salina tamponada com fosfato
PMT	<i>Photo Multiplier Tubes</i>
SSC	<i>Side Scatter Characteristics</i>
κ	Kappa
λ	Lambda

1 Introdução

As Gamopatias Monoclonais (GM) são um grupo de distúrbios relacionados com a proliferação monoclonal de plasmócitos, também denominadas de Paraproteinémias, Disproteínemias ou Imunoglobulinopatias. São caracterizadas pela secreção monoclonal de uma proteína - Imunoglobulina (Ig) ou um fragmento de Ig, denominado componente M (CM). Cada CM é composto por duas cadeias pesadas da mesma classe e subclasse (IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE), bem como duas cadeias leves do mesmo tipo: Kappa (κ) ou Lambda (λ) (1, 2).

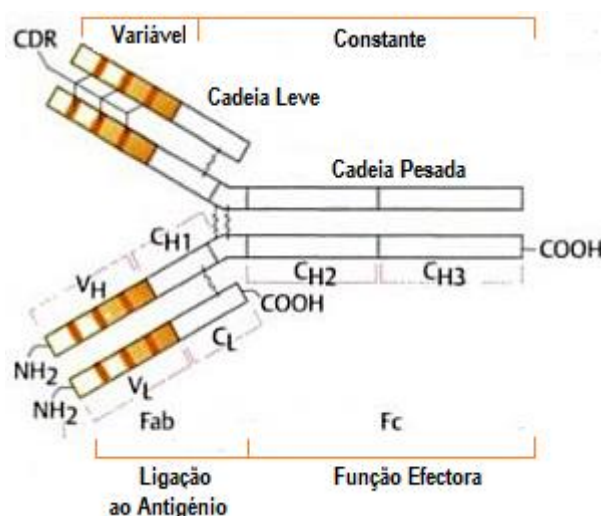


Figura 1.1 - Esquema da Estrutura de uma Imunoglobulina (Adaptada de Burmester e Pezzutto, 2003 (3))

De entre todas as GM, a mais frequente é a Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI). Num estudo sistemático de revisão do grupo Mayo Clinic (2010) utilizando 14 trabalhos publicados, foi estimada uma prevalência de 3,2% numa população com mais de 50 anos e maioritariamente caucasiana (4, 5). A prevalência aumenta com a idade e é afectada por factores como raça, género, história familiar, imunossupressão e exposição a pesticidas. Cerca de 25% dos portadores de GMSI desenvolvem uma patologia de carácter maligno, com probabilidade cumulativa de progressão de 16%, 33% e 45%, aos 10, 20 e 30 anos, respectivamente(6).

O Mieloma Múltiplo Assintomático (MMA) constitui a condição pré-clínica de 15% dos casos de Mieloma Múltiplo (MM) recém-diagnosticados. A maioria dos doentes progride para MM sintomático entre 2 e 3 anos(7). A taxa de progressão anual é, deste modo, superior à GMSI, correspondendo a cerca de 10% (6).

Por sua vez, a forma mais agressiva é o MM, que corresponde à segunda entidade maligna hematológica mais comum nos Estados Unidos da América, possuindo uma incidência anual de 4 para 100.000 habitantes (8). A taxa de progressão da GMSI para MM é de 1% ao ano(6).

A tabela 1.1 descreve as GM os critérios de diagnóstico das GM abordadas nesta Dissertação: a GMSI, o MMA e o MM.

Tabela 1.1 - Critérios de Diagnóstico de GM

Critérios GMSI	Critérios MMA	Critérios MM
Necessário 3 presentes:	Necessário ambos critérios presentes:	Necessário 3 presentes
CM sérica e/ou urinária de baixa concentração: <3g/dl	CM sérica (IgG ou IgA) >3g/dl e/ou	CM sérica e/ou urinária (excepto em doentes com MM não secretório)
Plasmócitos na Medula óssea (MO) < 10%	Plasmócitos na MO ≥ 10%	Plasmócitos monoclonais presentes na MO ≥ 10%
Ausência de lesões de órgão alvo, tais como hipercalcémia, insuficiência renal, anemia, lesões ósseas, que possam ser atribuídas a distúrbio proliferativo de plasmócitos.	Ausência de lesões de órgão alvo, tais como hipercalcémia, insuficiência renal, anemia, lesões ósseas, que possam ser atribuídas a distúrbio proliferativo de plasmócitos.	Dano orgânico relacionado ao MM (presença de 1 ou mais) [C] Cálcio sérico > 11,5 mg/dl [R] Insuficiência renal: creatinina > 2 mg/dL [A] Anemia: Normocrômica, normocítica, hemoglobina < 2 g/dl do valor normal ou < 10 g/dL [B] Lesões ósseas: lesões líticas, osteopenia severa ou fraturas patológicas

Adaptado de Dimopolus *et al.*, 2011(9)

A presença de CM tem sido reportada também em outras patologias, tornando-se, deste modo, importante a pesquisa de uma causa secundária, perante o diagnóstico de GM. Estas patologias associadas poderão ser de origem hematológica, neurológica, reumatológica, imunossupressora, entre outras(2).

Nos últimos anos, a Citometria de Fluxo (CF) demonstrou-se fundamental na caracterização diagnóstica das células neoplásicas e monitorização terapêutica das GM (10, 11). A CF é uma técnica de análise celular multiparamétrica que permite a identificação e análise de populações e fragmentos de células, utilizando os princípios da dispersão da luz e da emissão de fluorescência através fluorocromos conjugados a moléculas específicas (12).

O Citómetro de Fluxo é constituído por um sistema de fluidos que possibilita a passagem de células através de uma corrente contínua e um sistema de detecção que permite captar informação proveniente da dispersão da luz (FSC - *Forward Scatter Characteristics* e SSC - *Side Scatter Characteristics*) e da emissão de fluorescência (PMT- *Photo Multiplier Tubes*). Posteriormente, esta informação é transformada num sinal electrónico que irá ser processado

e armazenado no computador, gerando parâmetros de tamanho (FSC), complexidade (SSC) e intensidade de fluorescência (FL) apresentados sob a forma de gráfico (12).

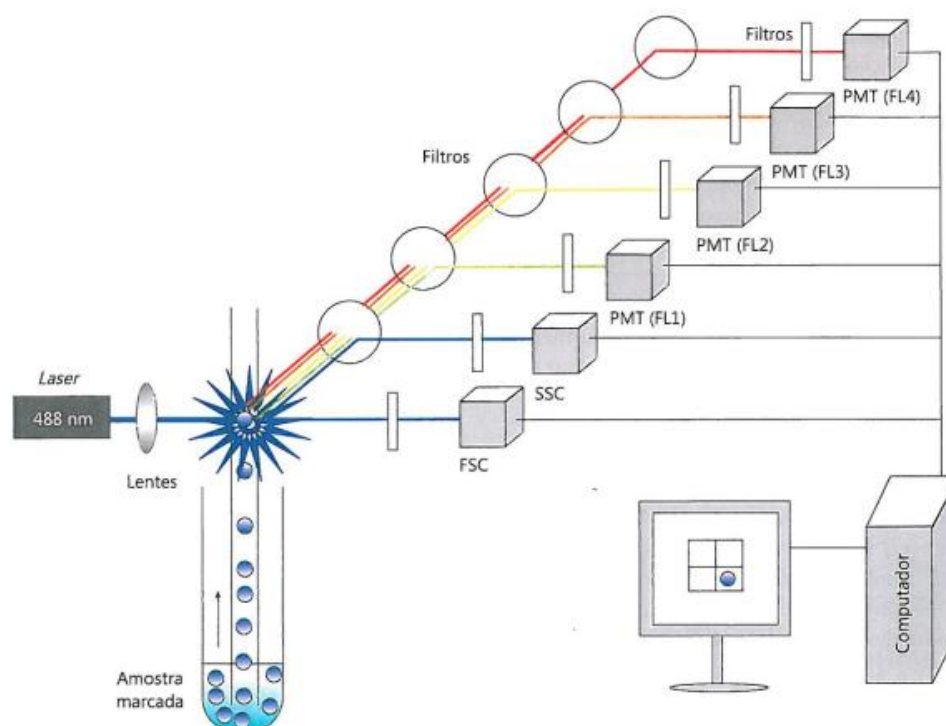


Figura 1.2 - Esquema representativo do funcionamento de um Citômetro de Fluxo (Adaptado de Arosa, Cardoso e Pacheco, 2012 (12))

Recentemente, a identificação de marcadores que permitem o reconhecimento de plasmócitos entre as outras células hematopoiéticas, bem como a identificação de fenótipos aberrantes de plasmócitos, possibilitou a caracterização e enumeração de plasmócitos mesmo quando poucas células estão presentes (10, 13-15).

Estas são características únicas da CF, visto que as técnicas morfológicas convencionais falham em distinguir células clonais de células normais e as técnicas moleculares focam-se essencialmente na utilização de marcadores genéticos em toda a amostra de MO e não somente em células singulares (14).

Para além disto, a CF permite a análise simultânea de múltiplos parâmetros numa única célula; o estudo de elevado número de células num curto período de tempo, o armazenamento de informação acerca de células individuais para posterior análise; avaliação quantitativa da expressão de antígenos; e a detecção combinada de antígenos de superfície e antígenos intracelulares (14).

Neste contexto, um número crescente de estudos têm aplicado a imunofenotipagem por CF na avaliação das GM, existindo cada vez mais evidências no que respeita ao potencial

benefício clínico em doentes diagnosticados com GM (10). Porém, verifica-se ainda uma necessidade de marcadores mais sensíveis com os objectivos de deter a doença maligna numa fase mais precoce de danos citogenéticos a fim de tratar ou prolongar substancialmente o tempo de progressão, bem como prevenir lesões de órgãos-alvo, de forma a melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevivência. O desenvolvimento contínuo da CF poderá melhorar a capacidade de distinguir uma condição assintomática estável de uma doença progressiva(16).

Segundo Rwastron *et al.*(10) devem ser incluídos para estudo de GM os anticorpos monoclonais CD38, CD138, CD19, CD56, CD45, bem como avaliada a expressão citoplasmática de cadeias K e λ . Este painel já se encontra implementado para todas as amostras processadas para estudo de GM no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB), com ainda a adição de CD20. Um painel ideal incluiria também CD20, CD117 e CD27, para além de outros marcadores (10). De modo a aumentar o potencial de informação das amostras, tornou-se pertinente avaliar o papel de outros anticorpos monoclonais. Em estudos recentes, os marcadores CD27 e o CD117 têm-se demonstrado promissores na caracterização e prognóstico das GM (10, 11, 13).

O CD27 é uma glicoproteína homodimérica transmembranar da família dos receptores TNF com um papel importante na diferenciação de células B para plasmócitos. A perda deste marcador parece estar relacionada com a progressão para Mieloma Múltiplo. Essa perda é habitualmente simultânea à perda de CD19. Todavia, a expressão negativa de CD19 nem sempre está associada à perda de CD27 (11, 13, 14, 17).

A ausência de expressão de CD27 tem sido encontrada no estágio II e III de MM. A fraca expressão em plasmócitos de MM contrasta com a alta expressão em plasmócitos normais(11). Segundo Canizzo *et al.* quando a expressão de CD27 é elevada, a probabilidade de desenvolver MM é baixa (17). Um estudo Coreano aponta também no mesmo sentido, demonstrando que a ausência de expressão de CD27 possuía impacto prognóstico negativo e estava associado a risco citogenético elevado (18).

Por sua vez, o CD117 é um receptor de factor de crescimento, com actividade tirosina-cinase fortemente expressado por mastócitos, células estaminais e precursores mielóides. A sua expressão é frequente na GMSI, sendo menos comum em MMA e menor ainda em MM. O facto de a sua expressão ir diminuindo suporta a hipótese de que a sua perda marque a progressão para o MM. Por outro lado, a expressão de CD117 pelos plasmócitos monoclonais está associada à diminuição da produção de neutrófilos e à persistência de plasmócitos residuais normais na MO, conferindo, deste modo, um prognóstico favorável em doentes com MM. Num estudo comparativo, doentes com MM e expressão positiva de CD117 apresentaram melhor evolução clínica que doentes com expressão negativa de CD117(11, 19). O CD117 demonstra-se ainda um marcador útil para distinguir plasmócitos normais de anormais (13).

1.1 Objectivo Geral

- Avaliar a importância da determinação da expressão dos anticorpos monoclonais CD27 e CD117 no estudo das GM.

1.2 Objectivos Específicos

- Caracterizar fenotipicamente as GM seguidas no CHCB no período de Novembro de 2012 a Abril de 2014.
- Quantificar a expressão de CD27 e CD117, destacando a sua expressão percentual na população de plasmócitos fenotipicamente anormais.
- Avaliar a pertinência dos marcadores CD27 e CD117 como indicadores de gravidade.
- Interpretar os dados da imunofenotipagem, relacionando-os com as informações clínicas do doente.

2 Material e Métodos

O projecto foi aprovado pela Comissão de Ética do CHCB e os doentes que participaram no mesmo foram informados de forma livre e esclarecida, tendo assinado o respectivo consentimento informado.

2.1 Selecção de Amostras

No Serviço de Patologia Clínica foram seleccionados todos os utentes do CHCB no período compreendido entre Fevereiro 2013 e Abril 2014 com pico Monoclonal e orientação clínica para imunofenotipagem por Citometria de Fluxo. As amostras de MO foram colhidas pelos Médicos Assistentes dos Serviços de Medicina Interna e Hematologia, consoante o seu julgamento clínico e procedimento habitual. Para além da análise dos dados da imunofenotipagem por Citometria de fluxo com o painel de rotina para GM do CHCB, foram utilizados excedentes da amostra, entre 50 a 100 µl, para acrescentar um tubo com nos novos marcadores.

2.2 Material

Para este estudo foi utilizado material do laboratório de Patologia Clínica do CHCB, à excepção dos anticorpos monoclonais CD27 e CD117 previamente adquiridos. Os materiais necessários para o estudo laboratorial foram os seguintes:

- Citómetro de Fluxo FACS Calibur™;
- Computador com software para aquisição de dados, transferência e análise;
- Centrifugador adaptado para tubos de ensaio de 5 ml;
- Frigorífico a cerca de 4°C para armazenamento do reagente;
- Tubos de ensaio de poliestireno (12x75 ml);
- Micropipetas calibradas de precisão ajustável, capazes de dispensar na gama dos 5 a 10 µl e em volumes de 100 a 1000 µl;
- Pontas de pipetas apropriadas;
- Misturador Vortex;
- Agulha 25G;
- Seringa de 2 ml;
- Anticorpos monoclonais directamente conjugados com fluorocromos, optimizados para a detecção de antigénios na superfície celular e intracelular, da Becton Dickinson Biosciences;
- Filtrado de solução salina tamponada com fosfato (PBS) para lavagem celular (FACSFlow solution Becton Dickinson Biosciences)
- Solução de lise de glóbulos vermelhos;

- Solução de fixação e permeabilização para a coloração de antigénios intracelulares, da Becton Dickison Biosciences (Soluções A e B);
- Amostras de MO a serem estudadas.

2.3 Métodos

A metodologia seguida baseou-se no protocolo de *Manzanera et al.* (20) com ligeiras mudanças adoptadas no Serviço de Patologia Clínica. Os procedimentos e técnicas usadas para a análise fenotípica de plasmócitos podem ser divididos em cinco passos sequenciais:

1. Preparação da amostra;
2. Marcação das células;
3. Aquisição de dados;
4. Análise dos dados;
5. Integração dos resultados.

2.3.1 Preparação da amostra

Para uma melhor interacção entre anticorpo e antigénio foi efectuada uma desagregação mecânica dos aglomerados celulares existentes, fazendo passar a amostra repetidas vezes por uma agulha 25G, com auxílio de uma seringa. A amostra foi diluída previamente com cerca de 1 ml de solução de PBS para facilitar o processo.

Antes de iniciar os procedimentos de marcação, as células deverão ser contabilizadas e a concentração foi ajustada para uma contagem final de 10^5 leucócitos.

2.3.2 Marcação de Plasmócitos

As amostras de MO foram divididas em 6 tubos, com os seguintes anticorpos monoclonais, marcados com os respectivos fluorocromos:

- Tubo 1- Controlo negativo (sem anticorpos monoclonais)
- Tubo 2 - CD38 FITC/CD19 PE/CD56 perCP/CD45 APC
- Tubo 3 - CD20 FITC/CD138 PE/CD38 perCP/CD45 APC
- Tubo 4 - CD38 FITC/CD117 PE/ - /CD27 APC
- Tubo 5 - Controlo Intra Citoplasmático (sem anticorpos monoclonais)
- Tubo 6 - K FITC / λ PE/ CD19 perCP/CD38 APC intra citoplasmático

A marcação com anticorpos monoclonais difere no seu processo consoante sejam antigénios de superfície ligados à membrana ou os antigénios intracitoplasmáticos (20).

Para o primeiro caso, foram adicionados 10 μ l de cada anticorpo e 5 μ l de CD45 a cada tubo, à excepção dos tubos de controlo. Posteriormente foram colocados 50 a 100 μ l de amostra,

consoante a contagem das células, nos respectivos tubos de ensaio. De seguida, procedeu-se à homogeneização da solução com auxílio do Vortex por cerca de 10 segundos. Foi ainda necessário adicionar 2ml de solução de lise por tubo e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente no escuro. Para finalizar, foi realizado um duplo processo de centrifugação por 5 min a 2000 rotações, com desperdício de sobrenadante e adição de 2 ml de solução de PBS entre elas. Por fim, foi desperdiçado novamente o sobrenadante e analisada a amostra através do Citómetro de fluxo.

Para a detecção das cadeias K e λ intracelulares é necessária uma permeabilização das membranas celulares para permitir que o anticorpo alcance o alvo desejado. O fixante deverá ser aplicado antes do permeabilizante de forma a evitar um extenso dano celular (20).

A cada tubo para estudo intracitoplasmático foram adicionadas 50 μ l de amostra de MO e 100 μ l da solução A (fixante), com posterior incubação a temperatura ambiente, durante 15 minutos no escuro. Posteriormente foram adicionados 2 ml de solução PBS, seguida de centrifugação por 5 min a 2000 rotações. Após a centrifugação foi desperdiçado o sobrenadante e adicionado 100 μ l da solução B (permeabilizante), 10 μ l de CD19 e 5 μ l de CD38 e 5 μ l anticorpos monoclonais para cadeias K e λ . Este tubo sofre novo processo de incubação, centrifugação e descarte do sobrenadante.

2.3.3 Aquisição de Dados

A aquisição das amostras foi realizada por um Citómetro de fluxo - BD FACSCalibur™, utilizando o software CellQuest e a análise dos dados com o programa Infinicyt™.

2.3.4 Análise dos Dados

Em primeiro lugar, o gráfico FSC/SSC é usado para eliminar detritos e células mortas (20). A janela SSC/CD38 é utilizada para identificação de plasmócitos, células CD38 fortemente positivas(21). Após a selecção destas células, é identificada a presença de plasmócitos de fenótipo normal ou anormal. Os plasmócitos normais são definidos pela forte expressão de CD38, negatividade para CD56 e CD20, e a maioria com expressão positiva para CD19 e CD45(10, 11, 13-15).

Por sua vez, a ausência de CD19 e/ou CD45, a diminuição da expressão de CD38 e a sobreexpressão CD56 foram usados para a identificação de fenótipos aberrantes (10, 11, 13-15).

De seguida foram analisados os dois novos marcadores introduzidos, o CD27 e o CD117, e interpretado o seu valor de acordo com as referências bibliográficas.

Para cada tubo analisado, os seguintes dados foram registadas as respectivas percentagens:

- Total de plasmócitos identificados na amostra de MO
- Plasmócitos anormais pelo total de plasmócitos.
- Plasmócitos anormais com CD27⁻ e CD117⁺
- Cadeias K e λ

2.3.5 Integração dos Resultados com Outros Meios Complementares de Diagnóstico

De forma a integrar toda a informação clínica relevante, foram consultados todos os processos clínicos dos respectivos doentes, respeitando a confidencialidade exigida, registando sistematicamente os seguintes dados:

- Idade
- Género
- Apresentação clínica
- Resultados analíticos de outros meios complementares de diagnóstico (hemograma, velocidade de sedimentação, lactatos desidrogenase, beta2-microglobulina, imunoglobulinas séricas, creatinina, albumina sérica, proteinúria Bence-Jones, imunofixação sérica e urinária, mielograma, Raio-X ao esqueleto).

3 Resultados

Em primeiro lugar é importante referir que o número de amostras recolhidas foi inferior ao número de amostras expectável ($n \geq 40$) conforme análise casuística prévia, mesmo após um prolongamento do prazo para a realização do estudo.

3.1 Caracterização da Amostra

No total foram recebidas no Laboratório de Patologia Clínica do CHCB um total de 29 amostras de doentes que apresentavam um pico monoclonal. Foram excluídas para o respectivo estudo 4 amostras por não apresentarem evidência de GM.

Os doentes incluídos no estudo apresentaram idades compreendidas entre 51 e 86 anos, situando-se a mediana em 77 e a média em 73,8 anos. A faixa etária predominante foi dos 70 aos 79 anos.

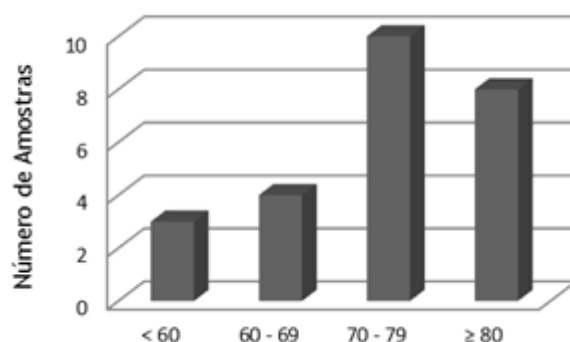


Gráfico 3.1 - Distribuição da amostra por idade

No que respeita à distribuição por género, a amostra revelou um ligeiro predomínio de indivíduos do género masculino (56%).

Os doentes provieram maioritariamente dos serviços de Medicina Interna do CHCB (64%), sendo que os restantes foram encaminhados pelo serviço de Hematologia (36%).

A maioria dos doentes não referia qualquer sintoma à apresentação (55%). Contudo 28% dos doentes revelavam dores ósseas, 10% emagrecimento recente e 7% referiam fadiga, como se pode observar no gráfico 3.2. De notar que os doentes mais sintomáticos não correspondiam aos doentes com GM mais avançada, uma vez que estes doentes apresentam concomitantemente outras doenças que poderão explicar os sintomas, como patologia cardiovascular, patologia oncológica, patologia ortopédica ou do foro gastrointestinal. No entanto, apenas dois doentes tinham antecedentes patológicos de doença relacionada com GM, como é o caso de Polineurite Aguda e Síndrome Mielodisplásico.

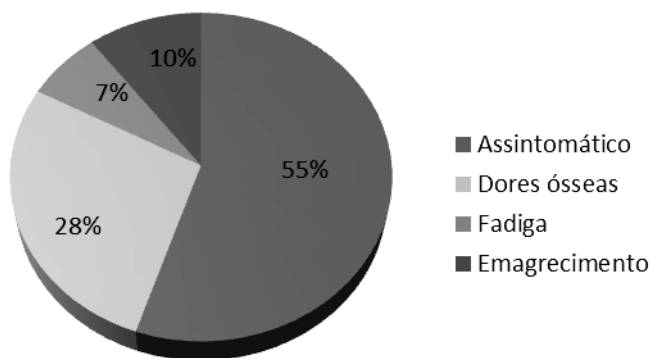


Gráfico 3.2 - Apresentação clínica inicial

Relativamente ao diagnóstico, a GMSI prevalece, correspondendo a 84% da amostra, seguido do MMA e MM, prevalente em igualmente 8%.

No que respeita ao CM, a IgG apresenta-se como mais comum com 56%, seguida da IgA presente em 40%. Um doente manifestava duplo pico monoclonal com IgA e IgG, ambos com cadeia λ .

A distribuição da amostra por tipo de GM e CM apresenta-se detalhada na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Distribuição da Amostra por Patologia e Componente Monoclonal

		n	%
Patologia Diagnosticada	GMSI	21	84%
	MMA	2	8%
	MM	2	8%
Componente Monoclonal	IgG K	10	40%
	IgG λ	4	16%
	IgA K	6	24%
	IgA λ	4	16%
	IgA e IgG λ	1	4%

3.2 Análise da Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo

As amostras analisadas apresentaram um mínimo de 0,5% plasmócitos e máximo de 23%, com uma média de 3,8 % de plasmócitos.

Na maioria das amostras verificou-se a existência de duas populações de plasmócitos: uma de células normais, outra de células patológicas. Nas amostras em que são identificadas duas populações, a população patológica era inferior a 95% da totalidade de plasmócitos. Porém em 5 amostras foi apenas possível identificar uma única população - a população patológica. Essas amostras correspondiam aos MMA e MM diagnosticados e uma delas a GMSI.

Dentro dos marcadores utilizados previamente no Serviço de Patologia Clínica do CHCB, o marcador que mais vezes permitiu distinguir populações foi o anticorpo monoclonal CD38. A expressão mais fraca de CD38 esteve presente em 64% das amostras. O marcador menos presente foi o CD20⁺, permitindo a distinção de população aberrante em apenas 8% das amostras. Em 32% das amostras apenas um dos marcadores de plasmócitos anormais do painel clássico identificava células anormais, necessitando dos novos marcadores para auxílio na sua interpretação.

Todos estes dados apresentados estão sumarizados e poderão ser consultados na tabela 3.2, página 16.

No gráfico 3.3, são apresentados os valores médios de expressão dos diversos marcadores de plasmócitos anormais utilizados neste estudo. A ausência de expressão de CD45 e CD19 foram as alterações que apresentaram maior relevo, com uma média de 58,4% e 49% respectivamente. Os novos marcadores evidenciaram uma média de expressão muito semelhante entre si, com 35,2% para a expressão positiva de CD117 e 35,1% para ausência de expressão de CD27. O CD56 evidenciou expressão positiva em média em 34,8% dos plasmócitos. Já o CD20⁺ apresenta-se em média em apenas 4,8% dos plasmócitos analisados (desvio padrão \pm 17%).

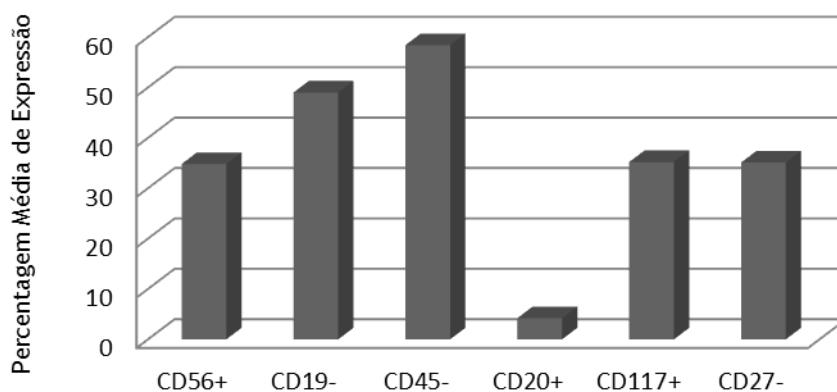


Gráfico 3.3 - Expressão Média de Marcadores de Plasmócitos Anormais

No gráfico 3.4, foi realizada uma separação dos dados obtidos por tipo de GM, para melhor se perceber a expressão destes novos marcadores. No que respeita à ausência de expressão de CD27, ela é menos frequente na GMSI com 27,8%, e maior no MMA e MM, com 50% e 97%, respectivamente. Já a expressão de CD117, é também menor na GMSI, com 30,8%, maior no MMA, com 66,5%, mas de apenas 50% no MM.

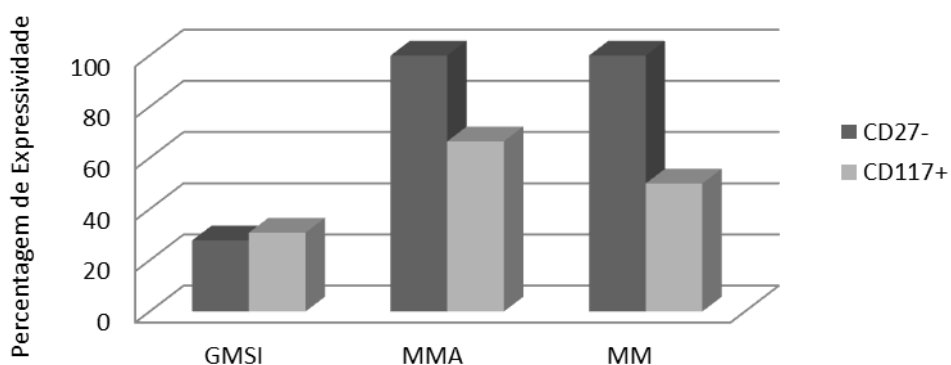


Gráfico 3.4 - Frequência dos novos marcadores por tipo de GM

Tabela 3.2 - Resumo da Análise das Amostras de MO

	Idade	Género	Serviço	Plasmócitos %	CM	Nº de Pop.*	Subpopulação Aberrante				K/λ %
							%	Marcadores aberrantes	CD27 %	CD117 %	
1	65	M	M. Interna	1,5	IgA K	2	48	CD38 fraco, CD56 ⁺ , CD19 ⁻ , CD45 ⁻	100	88	73/26
2	63	F	M. Interna	1,6	IgA K	2	55	CD38 fraco, CD56 ⁺ , CD19 ⁻	7	100	85/15
3	63	M	Hematologia	1,4	IgGK	2	30	CD56 ⁺	100	70	60/40
4	77	F	Hematologia	12	IgG L	1	100	CD38 fraco, CD56 ⁺ , CD19 ⁻ , CD45 ⁻	0	90	3/97
5	72	F	Hematologia	0,5	IgA K	2	60	CD38 fraco	0	100	70/30
6	76	M	Hematologia	7,5	IgA L	1	100	CD38 fraco, CD19 ⁻ , CD45 ⁻	100	30	3/97
7	59	M	M. Interna	2,3	IgG K	2	60	CD38 fraco, CD19 ⁻	25	50	80/20
8	51	F	Hematologia	0,6	IgG L	2	63	CD38 fraco	100	57	35/65
9	81	M	Hematologia	3	IgG K	2	73	CD20 ⁺	40	80	80/20
10	66	M	M. Interna	2	IgG K	2	85	CD19 ⁻ , CD45 ⁻	6	0	89/11
11	77	M	M. Interna	1,5	IgG K	2	50	CD56 ⁺	100	100	82/18
12	82	M	M. Interna	9	IgG K	1	100	CD38 fraco, CD56 ⁺ , CD45 ⁻	0	33	92/8
13	79	F	M. Interna	2	IgA L	2	65	CD38 fraco, CD56 ⁺ , CD19 ⁻ , CD45 ⁻	0	100	82/18
14	79	F	M. Interna	2	IgG e IgA L	2	38	CD56 ⁺ , CD19 ⁻ , CD45 ⁻	100	0	47/63
15	82	F	Hematologia	14	IgA K	1	100	CD38 fraco, CD19 ⁻ , CD45 ⁻	0	0	82/18
16	81	M	Hematologia	3	IgA K	2	46	CD20 ⁺	0	100	84/17
17	81	F	Hematologia	1,2	IgG K	2	42	CD38 fraco, CD56 ⁺ , CD19 ⁻ , CD45 ⁻	0	100	68/32
18	79	F	M. Interna	1,1	IgG K	2	75	CD38 fraco, CD19 ⁻	100	100	85/15
19	75	M	M. Interna	0,7	IgG L	2	44	CD45 ⁻ , CD19 ⁻	100	0	40/60
20	78	M	M. Interna	1,7	IgA L	2	47	CD38 fraco, CD56 ⁺ , CD19 ⁻ , CD45 ⁻	100	68	34/66
21	71	M	M. Interna	0,7	IgA K	2	20	CD56 ⁺	15	100	68/32
22	86	M	M. Interna	1	IgA L	2	50	CD38 fraco, CD56 ⁺ e CD45 ⁻	100	0	38/62
23	59	M	M. Interna	1,2	IgG K	2	35	CD56 ⁺	100	100	68/32
24	84	F	Hematologia	23	IgG L	1	100	CD38 fraco, CD56 ⁺ , CD45 ⁻	0	100	0/100
25	80	F	M. Interna	0,5	IgG K	2	40	CD38 fraco, CD19 ⁻	100	0	70/30

* Número de Populações de Plasmócitos Identificadas

Na tabela 3.2 encontram-se destacados os marcadores do painel habitual no CHCB que permitiram a identificação de células patológicas. No gráfico 3.5, estes marcadores são avaliados de forma individual para facilitar a análise. Quase todos os marcadores se demonstraram úteis na identificação de células patológicas em 12 a 16 amostras, à excepção do CD20+ presente em apenas duas amostras.

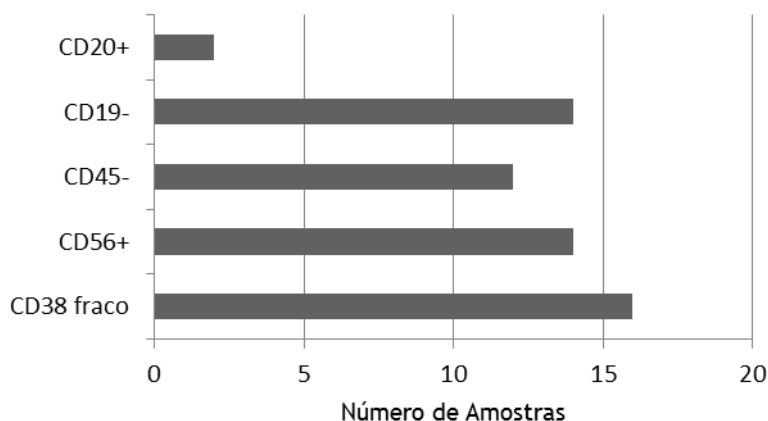


Gráfico 3.5 - Utilidade de Marcadores Aberrantes na identificação de população de plasmócitos patológicos

As figuras 3.1 e 3.2 foram obtidas durante a imunofenotipagem por CF utilizando os novos marcadores e exemplificam a evolução das GM, nos estudos realizados. No primeiro caso, um doente com GMSI, distinguimos duas populações, com expressão fraca de CD38, com negatividade para CD27 e positividade para CD117 e uma segunda população de características normais, com CD38 mais forte, positiva para CD27 e negativa para CD117. Na figura 3.2, um doente com MMA, observa-se uma única população de células patológicas predominantemente CD27 negativas e CD117 positivas.

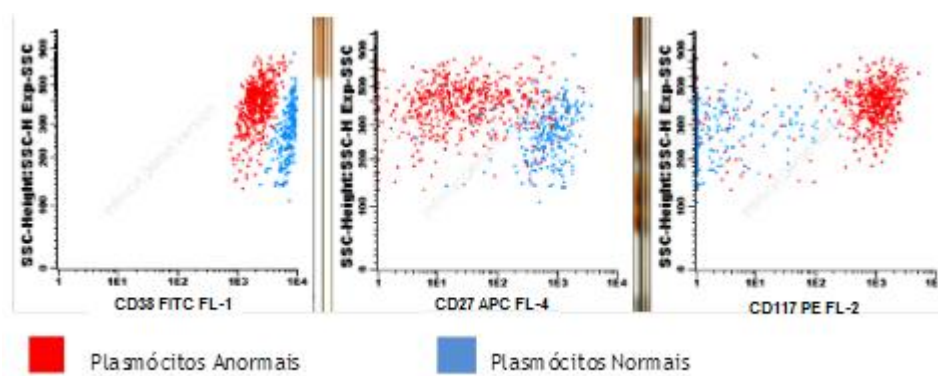


Figura 3.1 - Citometria de Fluxo de MO de Doente com GMSI, 63 anos, género feminino

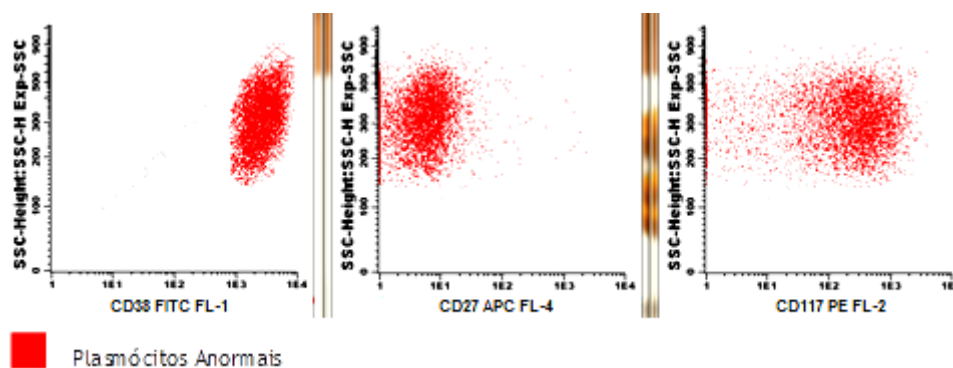


Figura 3.2 - Citometria de Fluxo de MO de Doente com MMA, 77 anos, género feminino

3.3 Outros Meios Complementares de Diagnóstico

Os meios complementares de diagnóstico realizados em doentes com GMSI não foram os mesmos em todos os doentes, o que dificultou a análise. Ao contrário dos casos MMA e MM, onde os exames complementares de diagnóstico pedidos foram semelhantes.

A hemoglobina apresentou-se diminuída em 11 doentes, porém somente inferior a 10g/dl em 3, um deles diagnosticado concomitantemente com síndrome mielodisplásico, restantes dois com MM. Em média o valor da hemoglobina foi de 12,3 g/dl (6,9 g/dl - 16,2 g/dl).

Relativamente à creatinina, a mesma apresentava-se elevada em 7 doentes, apenas 2 com valor igual ou superior a 2,0 mg/dl. Estas alterações não se verificaram nos doentes com MM. Em média o valor de foi de 1,07 mg/dl (0,4 -2,4mg/dl).

No que respeita à calcémia, 6 apresentavam aumento deste valor. O valor mínimo encontrado foi de 8,9 e máximo de 10,6 mg/dl, que correspondia a doente com GMSI.

Já a morfologia convencional (MC) revelou uma média de plasmócitos de 5,7% superior à verificada por CF (4,3%), só se verificou o oposto em apenas 2 amostras. Contudo, 4 dos mielogramas analisados foram inviáveis, por diluição da amostra, tendo sido excluídos.

O raio X ao esqueleto foi realizado em 13 doentes, identificando lesões osteolíticas em apenas 1 doente com MM (amostra 6 - tabela 3.2), e osteopenia em 3 doentes: diagnosticados um com MM (amostra 27 -tabela 3.2) e dois com GMSI (amostras 6 e 16 - tabela 3.2).

A tabela 3.3 e 3.4 descrevem a estratificação do risco segundo grupo Mayo Clinic, respectivamente para GMSI e MMA. No caso de GMSI apenas 1 doente se apresentava como de baixo risco. A maioria encontrava-se num estágio intermédio, já com um risco considerável de progressão para MM.

Tabela 3.3 - Estratificação do risco segundo grupo Mayo Clinic para doentes com GMSI (ver Anexo 4) (6, 22)

	Factores de Risco			
	0	1	2	3
Risco previsto de progressão para MM em 20 anos	5%	21%	37%	58%
N	1	15	5	0

No que respeita aos doentes com MMA, ambos apresentam um risco intermédio, que corresponde a probabilidade de 51% de progressão para MM em 5 anos.

Por sua vez, o grupo Espanhol apresenta também um método de estratificação de risco de progressão para MM (ver anexo 5), tanto para GMSI e MMA(6, 21). Por falta de alguns dados não se torna possível analisar o risco para doentes com GMSI. Os doentes com MMA apresentavam um risco elevado, com plasmócitos anormais >95% e imunoparesia. Segundo esta estratificação os mesmo doentes apresentavam um risco de 72% de evolução para MM em 5 anos.

Tabela 3.4 - Estratificação do risco segundo grupo Mayo Clinic para doentes com MMA (ver Anexo 4)(6, 22)

	Factores de Risco		
	1	2	3
Risco previsto de progressão para MM em 5 anos	25%	51%	76%
n	0	2	0

Os doentes com MMA e MM, foram estudados de forma mais exaustiva, o que permite uma análise mais pormenorizada, que se encontra resumida na tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Resumo de Meios Complementares de Diagnóstico utilizados no estudo de MMA e MM

	Mieloma Múltiplo Assintomático		Mieloma Múltiplo	
	MMA - 1	MMA - 2	MM - 1	MM - 2
Hemoglobina g/dl	10,8	11,3	11,4	8,6
Cálcio Sérico mg/dl	9,1	9,6	9,7	9,3
Albumina Sérica g/dl	4,17	3,9	4,06	3,72
Creatinina Sérica mg/dl	0,6	1,1	0,7	1,2
Beta2- microglobulina mg/dl	2,83	6,85	4,4	4,47
VS* mm/h	50	47	110	120
LDH** u/l	452	434	446	168
CM	2,44	2,33	2,24	>5,0
Relação k/ λ	0,1	40,7	17,5	0,1
Imunofixação sérica	IgG λ	IgG K	IgA K	IgG λ
Proteinúria BJ*** mg/24h	Negativo	19,23	20-50	38
Raio X esqueleto	Normal	Normal	Lesões osteolíticas frontais e úmero esquerdo	Osteopenia 33,5%
Mielograma	18% Plasmócitos; Células binucleadas	23% Plasmócitos Células destruídas abundantes	24% Plasmócitos Células binucleadas	Plasmócitos Infiltração plasmócitos grandes
Citometria de Fluxo	12% Plasmócitos População patológica • >95% • CD38 fraco, CD56 ⁺ , CD19 ⁻ , CD45 ⁻ • 100% CD117 ⁺ • 100% CD27 ⁻	9% Plasmócitos População patológica • >95% • CD38 fraco, CD56 ⁺ , CD45 ⁻ • 33% CD117 ⁺ , • 100% CD27 ⁻	14% Plasmócitos População Patológica • >95% • CD38 fraco, CD19 ⁻ , CD45 ⁻ • 0% CD117 ⁺ • 100% CD27 ⁻	23% Plasmócitos População patológica • >95% • CD38 fraco, CD56 ⁺ , CD45 ⁻ • 100% CD117 ⁺ • 100% CD27 ⁻

*Velocidade de Sedimentação

** Lactato Desidrogenase

*** Proteinúria Bence Jones

4 Discussão

A imunofenotipagem por CF progrediu consideravelmente durante a última década, adquirindo uma capacidade cada vez maior para rastrear grande número de eventos e para detectar vários antígenos, ao mesmo tempo. Adicionalmente, uma melhor compreensão da heterogeneidade fenotípica dos plasmócitos clonais em diferentes distúrbios, tornou a imunofenotipagem numa ferramenta indispensável ao diagnóstico, prognóstico, classificação e gestão das GM (13, 23).

Os presentes dados demonstram a utilidade diagnóstica e clínica da caracterização e quantificação de plasmócitos: normais e anormais.

Este estudo foi inicialmente planeado para incluir amostras de mais de 40 doentes diagnosticados com GM, sendo posteriormente analisados por tecnologia de quatro cores, de acordo com as recomendações actuais, adicionando dois novos marcadores ao padrão utilizado habitualmente no CHCB, o CD27 e o CD117.

Apesar da amostra real ter sido inferior à amostra esperada, inviabilizando resultados estatisticamente significativos, a análise destes resultados será útil como pré-estudo para uma avaliação da continuação do mesmo. Uma das razões para esta diminuição de amostras, poderá ter sido a implementação das *guidelines* do International Myeloma Group de 2010, particularmente pelo Serviço de Hematologia, segundo as quais, está indicada uma estratificação prévia do risco para MM a todos os doentes com GMSI, através dos critérios de estratificação de risco de MM do grupo Mayo Clinic e só avançar para estudo mais aprofundado, com colheita de MO, se risco for intermédio ou alto(6).

As GM assintomáticas são caracterizadas pela presença de CM sem evidência de lesões de órgão alvo, sendo a GMSI o paradigma destes distúrbios. Múltiplos esforços têm sido desenvolvidos para identificar variáveis que predigam a sua progressão, visto existir um risco de transformação maligna ao longo de toda a vida, conduzindo a uma necessidade de monitorização destes doentes. Assim, um melhor conhecimento de factores de risco associados com a progressão ajudaria a individualizar as estratégias de acompanhamento (24).

No presente estudo a GMSI correspondeu ao tipo mais frequente de GM, tal como os dados epidemiológicos apontam. A idade mínima foi de 51 anos, com frequência maior na década dos 70 anos, reflectindo um aumento da prevalência com a idade. De realçar que os casos de MM correspondem à faixa etária de mais de 80 anos, que poderá representar a evolução final de um quadro mais prolongado.

No que respeita ao género, verificou-se um ligeiro predomínio do sexo masculino, numa relação de 1,27:1, próxima a outros estudos que apontam para uma relação de 1,25:1(4).

O CM mais frequente também está igualmente de acordo com a revisão bibliográfica, verificando-se maior frequência de IgG, com cerca de 54% das amostras. A frequência de IgA é superior com 41,7%, bem como o tipo misto com IgA e IgG, que representa 4,17%. Estas diferenças são provavelmente causadas pelo escasso tamanho da amostra (6).

A imunofenotipagem por CF tem provado ser uma técnica vantajosa no estudo das GM, particularmente por permitir a discriminação de plasmócitos normais e anormais, útil para diagnóstico diferencial de GMSI e MM. Adicionalmente possibilita uma avaliação do risco de progressão de GMSI e MMA, bem como o estudo de doença residual mínima em MM, que não será abordada neste trabalho (24).

Como esperado, a percentagem média de plasmócitos da amostra de MO medido por morfologia convencional (MC) foi significativamente maior do que o obtido por CF. A contagem de plasmócitos foi apenas superior em 2 dos doentes.

Esta diferença de plasmócitos detectados por CF pode ser explicada pela diferente qualidade de amostras MO usadas nas duas técnicas: maior contaminação com sangue periférico nas amostras usadas para CF, pela existência de grupos de pequenos microagregados de plasmócitos. Por outro lado, amostras avaliadas por MC contém plasmócitos associados a espículas enriquecidas com lípidos, enquanto a CF é realizada no fluido da MO, pobre em plasmócitos aderentes a lípidos. Sugerem ainda que possivelmente a MC pode focar-se neste microagregados onde os plasmócitos são abundantes, em vez de uma área escolhida aleatoriamente (25). Segundo Johnsen (23), esta diferença também poderá estar relacionada com o processamento efectuado na preparação das amostras para CF.

Deste modo, a identificação de menos de 10% plasmócitos nas amostras não tem sido usada para distinguir uma GMSI de um MM. Contudo, Johnsen apoia a viabilidade da CF na discriminação entre o GMSI e MM. Os dados deste estudo revelam que a diferença causada entre as amostras se deve à presença de CD56, caracterizado pela sua ligação célula a célula homofílica e capacidade de aglutinação(23).

Rwastron *et al.* (10) também considerou que a enumeração de plasmócitos por CF poderá ser mais reprodutível e fiável na avaliação da evolução para MM do que a MC, uma vez que mais células estão a ser analisadas e há menos viés relacionado com o operador. Paiva *et al.* encontrou também uma correlação positiva entre as contagens das duas técnicas (25).

Todavia a característica distintiva de maior utilidade entre GMSI e MM é a identificação de uma proporção significativa de plasmócitos fenotipicamente normais misturados com plasmócitos anormais (23), como representado nas figuras 3.1 e 3.2.

Como é possível constatar nos resultados apresentados, nenhum dos marcadores de células anormais é 100% eficaz na identificação de células patológicas. Apenas com uma conjugação de vários marcadores se poderá definir a mesma.

Para além da presença de uma população com CD38 mais fraco, o marcador aberrante que identificou plasmócitos patológicos com maior frequência foi o CD56⁺, seguido respectivamente da ausência de expressão de CD19 e CD45. Contudo, no gráfico 3.4 pode-se constatar que a ausência de expressão dos marcadores aberrantes CD19 e CD45 é alteração mais presente, o que indica que coexistem também em células normais em menor frequência, não sendo tão específicos para a separação de células. De realçar que o CD117⁺, CD27⁻ e CD56⁺ apresentam uma frequência muito semelhante o que conduz a uma possível melhor correlação com a identificação de células patológicas. Plasmócitos CD20⁺ foram encontrados apenas em 2 amostras, porém este marcador foi fundamental para identificar a população de células aberrantes nessa mesma amostra.

Em 6 amostras essa divisão tornou-se difícil, principalmente, quando utilizado apenas os marcadores do painel habitual, tendo que recorrer ao CD27 e CD117 para definir com maior segurança qual a população patológica, tendo em conta os resultados publicados por Rawstron *et al.* e Paiva *et al.*, adaptados na tabela 4.1 (10, 14).

Tabela 4.1 - Lista representativa da expressão dos marcadores mais usados (Adaptado de Paiva *et al.* 2010 e Rawstron *et al.*, 2008)

Anticorpo Monoclonal	Plasmócitos Normais	
	Paiva <i>et al.</i> , 2010	Rawstron <i>et al.</i> , 2008
CD19	Positivo (~ 33% negativos)	Positivo (>70%)
CD56	Negativo (~10% diminuído)	Negativo (<15%)
CD20	Negativo (~4% diminuído)	Negativo (0%)
CD45	Positivo (~6% negativos)	Não avaliado
CD27	Positivo	Positivo (100%)
CD117	Negativo	Negativo (0%)

Num estudo de Cannizzo *et al.* o marcador CD27 demonstrou possuir um papel semelhante ao CD56 na detecção de doença. Já o CD117 continuou a não ser encontrado em plasmócitos normais(26).

Visto que os plasmócitos normais demonstram ser sempre positivos para CD27 e sempre negativos para CD117 acabam por ser marcadores especialmente úteis na diferenciação de tipos de plasmócitos.

De acordo com Paiva *et al.*, em apenas 10% dos casos são necessários marcadores como o CD20, CD27 e CD117, contudo neste estudo verificou-se uma percentagem superior de cerca de 33%(14).

No total, plasmócitos patológicos de 12 amostras de MO foram positivos para CD27, o que se correlaciona com um bom prognóstico. Estas amostras apresentavam como CM maioritariamente IgG (58,3%) e uma média de plasmócitos de 1,73%, enquanto as amostras negativas para CD27 apresentavam uma média de plasmócitos superior, de 5,72% e uma percentagem inferior de CM IgG (53,8%), incluindo 60% das amostras com CM IgA. Maior percentagem de plasmócitos está associada a uma maior carga tumoral e por sua vez IgA está associada a mau prognóstico, o que está de acordo com correlação positiva de expressão de CD27 e evolução benigna(6, 17, 27). Contudo, uma das amostras de GMSI positivas para CD27 apresentava mais de 95% de plasmócitos aberrantes, facto este de prognóstico desfavorável(21).

Por outro lado, tanto os plasmócitos patológicos de MMA como de MM não expressam CD27, o que não acontece na maioria das GMSI. Tal como Canizzo *et al.* constatou a perda deste marcador parece estar relacionada com a progressão para MM(17).

No que concerne ao anticorpo monoclonal CD117, a sua expressão teve uma apresentação diferente do CD27. Segundo Shimidt-hieber a sua expressão é frequente na GMSI, diminuindo com a evolução do quadro para MMA e MM, suportado a hipótese de que a sua perda marque a progressão para o MM(19). Contudo neste estudo verificou-se uma menor expressão deste marcador nas GMSI, havendo 30% com expressão negativa de CD117. Por outro lado, obteve uma maior expressão no MMA e novamente uma diminuição no MM. Comparativamente ao CD27, o CD117 parece ter uma evolução mais tardia.

O valor prognóstico do CD117 é particularmente importante no caso de MM. A persistência da expressão positiva de CD117 está associada a um prognóstico mais favorável(19). Nos dois casos de MM apresentados, é possível observar diferenças quanto este marcador. Em MM-1 os plasmócitos são CD117- enquanto em MM-2 permanecem positivos. O doente MM-1 para além deste indicador possui outros factores de mau prognóstico como CM IgA e a Lactato Desidrogenase mais elevada(28). É também o doente que apresenta lesões osteolíticas no Raio X de esqueleto.

No que respeita ao estadiamento (ver anexo 3), segundo o International Staging System, MM-1 e MM-2 encontram-se no mesmo estágio, o estágio II, devido ao valor da beta2-

microglobulina(22). No entanto, aplicando o Durie-Salmon Staging System, o doente MM-1 enquadra-se no estágio III, enquanto o MM-2 permanece no estágio II(22).

Tudo isso nos demonstra que o doente MM-1 apresenta uma situação clínica mais avançada. No caso do MM-2, o CD117 continua positivo, o que apesar de apresentar maior quantidade de plasmócitos, é um indicador favorável de prognóstico. A seu favor tem ainda o tipo de CM - IgG.

Contudo, apenas conjugando toda a informação do doente: sintomatologia, imunofenotipagem e outros exames complementares de diagnóstico, é possível avaliar verdadeiramente um doente com GM, pois nenhum marcador é infalível.

A maioria dos doentes encontrava-se assintomático a apresentação, pelo que os exames complementares de diagnóstico assumem particular importância. Segundo as *guidelines* do International Myeloma Group (2010) deverá se estratificar o risco para MM a todos os doentes de acordo os critérios da Mayo Clinic apresentados no anexo 4, para posterior orientação e monitorização com base na sua categoria. De acordo com estas *guidelines*, os doentes de baixo risco não necessitam de uma avaliação aprofundada inicial, devendo ser seguidos apenas com electroforese sérica de proteínas, hemograma completo, cálcio e creatinina séricas em 6 meses. Se se verificar estável, serão repetidas a cada 2-3 anos. Nos doentes com risco intermediário ou alto risco, deverá ser realizado o exame de MO com estudos de citogenética e hibridização fluorescentes *in situ* (FISH), além da radiografia simples ao esqueleto. Estes doentes devem realizar electroforese de proteínas séricas cada 6 meses no primeiro ano e anualmente nos seguintes anos, juntamente com exames laboratoriais de rotina(6).

Na população estudada 95% dos doentes com GMSI apresentava um risco intermédio para MM, o que justificava os exames de diagnóstico acima descritos, no entanto, nem sempre foram realizados. Por esta razão, a escala defendida pelo Grupo Espanhol não pode ser aplicada às GMSI, devido a não se analisar o DNA plasmocitário no CHCB.

No que respeita a MMA ambos apresentavam riscos intermédios com a escala de Mayo Clinic, no entanto segundo a escala do Grupo Espanhol, o risco destes doentes era consideravelmente mais elevado.

Os doentes com MMA deverão ser seguidos de entre 3 a 6 meses consoante o risco de evolução para a doença sintomática(7).

O MM é uma doença incurável, com uma alta taxa de incidência em idosos. Apesar de grandes avanços no tratamento, a sua resposta varia amplamente entre os doentes, devido à heterogeneidade da patologia. A decisão de qual o melhor tratamento tem sido uma questão difícil. O tratamento personalizado consoante a condição do doente parece ser a chave,

contudo é necessária mais investigação neste campo. Para esta finalidade, o diagnóstico precoce e a iniciação de tratamentos atempado tornam-se especialmente importantes (29).

Em suma, a CF no diagnóstico de GM assume um papel de destaque na caracterização de células tumorais e na determinação da frequência de células normais. Significantes características prognósticas identificadas nas GM melhoram a marcação de plasmócitos malignos e a estratégia de tratamento específica (11). Já nas GMSI, irá permitir uma melhor definição da frequência de monitorização. Relativamente ao MMA, um estudo recente demonstrou que o tratamento precoce de MMA de alto risco com lenalodomic e dexametasona retarda a progressão para a doença activa e aumenta a sobrevida dos doentes(30). Neste contexto, uma melhoria na caracterização fenotípica das GM, utilizando o potencial da CF como ferramenta de diagnóstico e prognóstico torna-se particularmente importante.

Neste estudo, a análise do CD27 e do CD117, acrescentou informação pertinente ao painel habitual de anticorpos monoclonais utilizados no CHCB, particularmente em 17 amostras estudadas. A positividade do CD27 foi diminuindo consoante a gravidade da doença, enquanto a positividade para CD117 diminuí nos estádios finais da doença, já em MM. Estes factos favorecem a importância destes dois marcadores no prognóstico da doença. Os exames complementares de diagnóstico, em geral apresentavam mais alterações nos doentes que fenotipicamente demonstravam características mais desfavoráveis. Para além disto permitiram uma melhor divisão de plasmócitos normais de patológicos, particularmente em 6 amostras.

Deste modo, sugere-se a inclusão destes marcadores no painel de marcadores habituais do CHCB para estudo das GM e dar continuidade a este estudo. Dado o valor prognóstico do CD27 e CD117, consideramos útil avaliar a expressão destes marcadores no seguimento do doente, realizando um estudo ao longo do tempo.

Apesar do CD20 não ser considerado essencial por alguns autores e de apresentar expressividade positiva em apenas 2 amostras, demonstrou-se fundamental na caracterização das mesmas, pelo que consideramos que se deva manter. Contudo dadas algumas dificuldades encontradas na definição dos plasmócitos patológicos através do CD19 no tubo de estudo intracitoplasmático para cadeias κ e λ , sugerimos retirar este marcador e substituir por CD56, CD27 ou CD117, uma vez que demonstraram ser mais específicos.

Bibliografia


1. International Myeloma Working G. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British journal of haematology*. 2003;121(5):749-57.
2. Faria RMD, Silva ROPE. Gamopatias monoclonais: critérios diagnósticos e diagnósticos diferenciais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2007;29:17-22.
3. Burmester G-R, Pezzutto A. *Color Atlas of Immunology*. Stuttgart: Thieme; 2003. 322 p.
4. Wadhera RK, Rajkumar SV. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance: a systematic review. *Mayo Clinic proceedings*. 2010;85(10):933-42.
5. Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering myeloma: new insights into pathophysiology and epidemiology. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2010;2010:295-302.
6. Korde N, Kristinsson SY, Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies. *Blood*. 2011;117(21):5573-81.
7. Blade J, Dimopoulos M, Rosinol L, Rajkumar SV, Kyle RA. Smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: current diagnostic criteria, new predictors of outcome, and follow-up recommendations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(4):690-7.
8. Multiple Myeloma: Cancer of the Bone Marrow [Internet]. 2011/2012 [cited 20-01-2014]. Available from: www.myeloma.org.
9. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, Rajkumar SV, San Miguel J, Chanan-Khan A, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*. 2011;117(18):4701-5.
10. 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;93(3):431-8.
11. Raja KR, Kovarova L, Hajek R. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. *British journal of haematology*. 2010;149(3):334-51.
12. Arosa FA, Cardoso EM, Pacheco F. Técnicas de Imunologia. In: Lidel, editor. *Fundamentos da Imunologia*. 2ª ed 2012. p. 565-97.
13. Kumar S, Kimlinger T, Morice W. Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best practice & research Clinical haematology*. 2010;23(3):433-51.
14. Paiva B, Almeida J, Perez-Andres M, Mateo G, Lopez A, Rasillo A, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2010;78(4):239-52.

15. Kovarova L, Varmuzova T, Zarbochova P, Suska R, Muthu Raja KR, Stossova J, et al. Flow cytometry in monoclonal gammopathies. *Klinicka onkologie : casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti*. 2011;24 Suppl:S24-9.
16. Merlini G, Palladini G. Differential diagnosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2012;2012:595-603.
17. Cannizzo E, Carulli G, Del Vecchio L, Ottaviano V, Bellio E, Zenari E, et al. The role of CD19 and CD27 in the diagnosis of multiple myeloma by flow cytometry: a new statistical model. *American journal of clinical pathology*. 2012;137(3):377-86.
18. Cho YU, Park CJ, Park SJ, Chi HS, Jang S, Park SH, et al. Immunophenotypic characterization and quantification of neoplastic bone marrow plasma cells by multiparametric flow cytometry and its clinical significance in Korean myeloma patients. *Journal of Korean medical science*. 2013;28(4):542-9.
19. Schmidt-Hieber M, Perez-Andres M, Paiva B, Flores-Montero J, Perez JJ, Gutierrez NC, et al. CD117 expression in gammopathies is associated with an altered maturation of the myeloid and lymphoid hematopoietic cell compartments and favorable disease features. *Haematologica*. 2011;96(2):328-32.
20. Manzanera GM, Izquierdo JFSM, Matos AÓ. Immunophenotyping of Plasma Cells in Multiple Myeloma. In: Brown R, Ho PJ, editors. *Multiple Myeloma: Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press; 2005. p. 5-24.
21. 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;110(7):2586-92.
22. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009;23(1):3-9.
23. Johnsen HE, Bogsted M, Klausen TW, Gimsing P, Schmitz A, Kjaersgaard E, et al. Multiparametric flow cytometry profiling of neoplastic plasma cells in multiple myeloma. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2010;78(5):338-47.
24. Perez-Persona E, Mateo G, Garcia-Sanz R, Mateos MV, de Las Heras N, de Coca AG, et al. Risk of progression in smoldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. *British journal of haematology*. 2010;148(1):110-4.
25. Paiva B, Vidriales MB, Perez JJ, Mateo G, Montalban MA, Mateos MV, et al. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica*. 2009;94(11):1599-602.
26. Cannizzo E, Bellio E, Sohani AR, Hasserjian RP, Ferry JA, Dorn ME, et al. Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in multiple myeloma: The diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2010;78(4):231-8.

27. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering multiple myeloma: emphasis on risk factors for progression. *British journal of haematology*. 2007;139(5):730-43.
28. Munshi NC, Anderson KC, Bergsagel PL, Shaughnessy J, Palumbo A, Durie B, et al. Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2. *Blood*. 2011;117(18):4696-700.
29. Suzuki K. Current therapeutic strategy for multiple myeloma. *Japanese journal of clinical oncology*. 2013;43(2):116-24.
30. Mateos M-V, Hernández M-T, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, Corral LL, et al. Lenalidomide plus Dexamethasone for High-Risk Smoldering Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(5):438-47.

Anexos

Anexo 1 - Autorização do estudo pela Comissão de Ética

 <p>Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E.</p>		<p>ENVIADO A Gabinete de Investigação 07 FEV. 2013</p>	<p>Centro Hospitalar Cova da Beira Presente em reunião de C.A. Em 08/02/2013 02.01</p> <p>Despacho</p> <p>Presidente do C.A. Prof. Doutor Miguel Caselato Branco</p> <p>Vogal do C.A. Prof.ª Dra. Anabela Almeida</p> <p>Vogal do C.A. Técnica Superior Orminda Sucena</p> <p>Directora Clínica Dra. Rosa Maria Ballesteros</p> <p>Enfermeiro Director Enf.ª Ana Maria João Rodrigues</p>
Parecer:	Despacho: 1.2.2013		
ASSUNTO: Projecto de Investigação nº105/2012 - "Avaliação das gammapatias monoclonais seguidas no CHCB por citometria de fluxo: introdução de novos marcadores"			
PARA: Exmo. Sr. Presidente do Conselho de Administração		N.º 118/GII	
DE: Gabinete de Investigação e Inovação		Data 17/12/2012	
<p>Em relação ao assunto em epígrafe, junto envio o pedido de autorização de Daniela Sofia Pereira Coelho, aluna do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, para a realização de um estudo subordinado ao tema "Avaliação das gammapatias monoclonais seguidas no CHCB por citometria de fluxo: introdução de novos marcadores" a realizar nos Serviços de Medicina 1, Medicina 2, Medicina 3, Patologia Clínica e Hematologia deste Centro Hospitalar.</p> <p>Envio ainda o parecer favorável nº 57/2012, emitido pela Comissão de Ética</p> <p>Informo que se encontram reunidos todos os requisitos necessários de acordo com o Regulamento e Normas do Gabinete de Investigação e Inovação.</p> <p>Com os melhores cumprimentos, <i>perceira</i></p> <p>? O Gabinete de Investigação e Inovação</p> <p><i>Rosa Saraiva</i> (D.ª Rosa Saraiva)</p> <p>Nota: Solicita-se aos investigadores a entrega de um exemplar do trabalho final.</p>			

Anexo 2 - Declaração de Consentimento Informado

Consentimento Livre e Informado

Daniela Sofia Pereira Coelho, estudante de Mestrado Integrado em Medicina na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, a realizar um trabalho de investigação no âmbito da sua Dissertação de Mestrado, subordinado ao tema “*Avaliação das Gamapatias Monoclonais seguidas no Centro Hospitalar Cova da Beira por Citometria de Fluxo: Introdução de Novos Marcadores*”, vem solicitar a sua colaboração no estudo, autorizando o uso de excedente da amostra de medula óssea e consulta de informação do seu processo clínico. Informo que a sua participação é voluntária, podendo desistir a qualquer momento sem que por isso venha a ser prejudicado nos cuidados de saúde prestados pelo CHCB, EPE; informo ainda que todos os dados recolhidos serão confidenciais.

Consentimento Informado – Investigador

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- * Entregou esta informação
- * Explicou o propósito deste trabalho
- * Explicou e respondeu a todas as questões e dúvidas apresentadas pelo doente.

Nome do Investigador (Legível)

(Assinatura do Investigador)

____/____/____
(Data)

Consentimento Informado - Doente

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- * O Sr. (a) leu e compreendeu todas as informações desta informação, e teve tempo para as ponderar;
- * Todas as suas questões foram respondidas satisfatoriamente;
- * Se não percebeu qualquer das palavras, solicitou ao investigador que lhe fosse explicado, tendo este explicado todas as dúvidas;
- * O Sr. (a) recebeu uma cópia desta informação, para a manter consigo.

Nome do Doente (Legível)

(Assinatura do Doente ou Representante Legal)

____/____/____
(Data)

Anexo 3 - Sistemas de Classificação Mieloma Múltiplo

Durie and Salmon Staging System	International Staging System
<u>Estádio I (Pequena massa de células – 600 biliões)</u> Todos os seguintes: <ul style="list-style-type: none">• Valor de hemoglobina <10 g/dl• Cálcio sérico valor normal ou <10,5 mg/dl• Raio X do esqueleto com estrutura óssea normal ou plasmocitoma solitário• Baixa taxa de produção de PM<ul style="list-style-type: none">- IgG <5,0 g/dl- IgA <3,0 g/dl- PM de cadeias leves na urina <4g/24h	<u>Estádio I</u> <ul style="list-style-type: none">• Beta2-microglobulina sérica <3,5 mg/dl• Albumina sérica ≥ 3,5 g/dl
<u>Estádio II (Massa de células intermédia -600 a 1200 biliões)</u> <ul style="list-style-type: none">• Não preenchem os critérios nem dos estádio I, nem do estádio II	<u>Estádio II</u> <ul style="list-style-type: none">• Beta2-microglobulina sérica <3,5 mg/dl• Albumina sérica < 3,5 g/dl Ou <ul style="list-style-type: none">• Beta2-microglobulina sérica entre 3,5 e 5,5 mg/dl
<u>Estádio III (elevada massa de células – mais de 1200 biliões)</u> Um ou mais dos seguintes <ul style="list-style-type: none">• Hemoglobina <8,5 g/dl• Cálcio sérico >12 mg/dl• Lesões osteolíticas avançadas (escala 3)• Alta taxa de produção de PM<ul style="list-style-type: none">- IgG >7,0g/dl- IgA >5,0 g/dl- PM de cadeias leves na urina na electroforese >12g/24h	<u>Estádio III</u> <ul style="list-style-type: none">• Beta2-microglobulina sérica > 5,5 mg/dl
<u>Subclassificação</u> <ul style="list-style-type: none">• A: Função renal relativamente normal (creatinina sérica <2.0mg/dl)• B: Função renal anormal (creatinina sérica > 2.0 mg/dl)	

Adaptado de International Myeloma Foundation, 2011 (8)

Anexo 4 - Critérios de Estratificação de Risco de MM pelo Grupo Mayo Clinic

Factores de risco GMSI	Número de Factores de Risco Presentes	% de Progressão em 20 anos
• CM >1,5g/dl	0	5
• Não IgG	1	21
• Rácio cadeias leves	2	37
livres <0,26 ou >0,65	3	58

Adaptado de Korde *et al.*, 2011; Kyle e Rajkumar, 2009(6, 22)

Factores de risco MMA	Número de Factores de Risco Presentes	% de Progressão em 5 anos
• Plasmócitos na MO >10%	1	25
• CM \geq 3g/dl	2	51
• Rácio cadeias leves livres <0,125 ou >8	3	76

Adaptado de Korde *et al.*, 2011; Kyle e Rajkumar, 2009(6, 22)

Anexo 5 - Critérios de Estratificação de Risco de MM pelo Grupo Espanhol

Factores de risco GMSI		Número de Factores de Risco Presentes	% de Progressão em 5 anos
• $\geq 95\%$ Plasmócitos Anormais		0	2
		1	10
• Aneuploidia		2	46

Adaptado de Korde *et al.*, 2011; Perez-Persona *et al.*, 2007(6, 21)

Factores de risco GMSI		Número de Factores de Risco Presentes	% de Progressão em 5 anos
• $\geq 95\%$ Plasmócitos Anormais		0	4
		1	46
• Imunoparésia		2	72

Adaptado de Korde *et al.*, 2011; Perez-Persona *et al.*, 2007(6, 21)