

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Facultad de Medicina ULL

“Implicación pronóstica del inmunofenotipo en el mieloma múltiple”: revisión de casos diagnosticados en el HUNSC de 2017 a 2020.

Alumna de la ULL:

Raquel García-Talavera Hernández

Investigadores principales:

Dr. Joaquín Breña Atienza

Dr. Pablo Ríos Rull

Investigadores colaboradores:

Dra. M^a Teresa Busnego Barreto

Dra. Cristina Notario McDonnell

Índice

1. Resumen / Abstract	3
2. Palabras clave	4
3. Introducción	
3.1 Mieloma múltiple	
3.1.1 Etiopatogenia	
3.1.2 Clínica	5
3.1.3 Diagnóstico	6
3.1.4 Estadificación	7
3.1.5 Tratamiento	9
3.1.6 Pronóstico	10
3.2 Epidemiología descriptiva	
3.3 Citometría de flujo	11
3.3.1 Fenotipo normal	12
3.3.2 Aberrancias	13
3.4 Inmunofenotipo en relación al pronóstico	14
4. Objetivos	15
5. Material y métodos	16
6. Resultados	17
7. Discusión	22
8. Conclusiones	25
9. ¿Qué he aprendido?	
10. Bibliografía	26

Resumen

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica caracterizada por la expansión de células plasmáticas clonales con inmunofenotipo aberrante. A día de hoy, existe evidencia de asociación entre dicho inmunofenotipo y el pronóstico del paciente que sufre la enfermedad. No obstante, con los avances en el tratamiento y los nuevos fármacos empleados (inhibidores del proteosoma e inmunomoduladores), dicha asociación podría verse modificada.

El objetivo de este proyecto fue describir si dicha asociación sigue siendo válida en la actualidad. Para ello, realizamos un estudio observacional descriptivo con una muestra compuesta por 77 pacientes diagnosticados de MM en el HUNSC, desde febrero de 2017 hasta febrero de 2020. Se clasificó a los pacientes según el inmunofenotipo presentado y se valoró la progresión de la enfermedad tras el tratamiento.

Finalmente, se concluyó que, aún incluyendo los nuevos fármacos en el tratamiento del MM, la asociación entre el inmunofenotipo y la evolución del paciente parece seguir guardando correlación. Sin embargo, sería necesario un tamaño muestral mayor para afirmar dicha asociación.

Abstract

Multiple myeloma (MM) is a hematologic neoplasm characterized by the expansion of clonal plasma cells with aberrant immunophenotype. To date, there is evidence of an association between immunophenotype and the prognosis of the patient suffering from the disease. However, with advances in treatment and new drugs used (proteasome inhibitors and immunomodulators), this association could be modified.

The objective of this project was to describe whether this association is still valid today. To do this, we carried out a descriptive observational study with a sample made up of 77 patients diagnosed with MM at the HUNSC, from February 2017 to February 2020. The

patients were classified according to the immunophenotype presented and the progression of the disease after the treatment.

Finally, it was concluded that, even including the new drugs in the treatment of MM, the association between the immunophenotype and the evolution of the patient seems to continue to be correlated. However, a larger sample size would be necessary to affirm this association.

Palabras clave

- Inmunofenotipo / immunophenotype
- Célula plasmática / plasma cell
- Citometría de flujo / flow cytometry
- Mieloma Múltiple / multiple mieloma

Introducción

3.1 Mieloma múltiple

3.1.1 Etiopatogenia

El Mieloma Múltiple es una neoplasia hematológica caracterizada por la proliferación atípica de células plasmáticas. Estas se consideran procedentes de linfocitos B, los cuales alcanzan la diferenciación morfológica a través de diversas fases madurativas intra y extrafoliculares, tras pasar por las etapas morfológicas inmediatamente precedentes denominadas inmunoblasto y célula linfoplasmocitoide (1).

Las células linfoplasmocitoides y las células plasmáticas son secretoras de inmunoglobulinas, que prácticamente en la totalidad de los casos aparecen revestidas de carácter monoclonal. En el caso del Mieloma Múltiple, la banda monoclonal puede ser del tipo IgG, IgA, IgD e IgE, o bien de fragmentos identificables con cadenas ligeras. Sea como

fuere, es la asociación del tipo celular proliferante con la presencia de un determinado tipo de banda monoclonal lo que define dicha enfermedad.

La proliferación plasmática propiamente dicha o Mieloma puede ubicarse en la médula ósea, siendo la localización más frecuente, o en el tejido extramedular, ya sea óseo o extraóseo, como en el caso de los ganglios linfáticos o el bazo.

No obstante, en la actualidad, se desconoce cuál es la causa primaria del Mieloma Múltiple. Como muchas neoplasias hematológicas, su desarrollo posiblemente se deba a una alteración de varios mecanismos genéticos que pueden condicionar una idiosincrasia individual en el metabolismo de las toxinas ambientales o en la exposición antigénica. A pesar de los recientes avances en los mecanismos biológicos del mieloma, no se han confirmado otros factores etiológicos aparte de la edad elevada, la raza negra, el sexo masculino, tener antecedentes familiares de cáncer hematológico y la presencia de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), lo cual se puede considerar como un estadio previo a la enfermedad.

3.1.2 Clínica

Esta neoplasia hematológica cursa con una serie de alteraciones clínicas muy llamativas y características. De todas ellas, el dolor óseo causado por la osteopenia y las lesiones líticas, es el síntoma más frecuente. Aparece en el 60-70% de los pacientes en el momento del diagnóstico y las zonas más afectadas suelen ser la columna vertebral o la parrilla costal, pero también puede afectar a las extremidades. Como estos síntomas son de características mecánicas, se agudizan con los movimientos y mejoran con el reposo. Dentro de este apartado incluiríamos los dolores articulares, las deformidades óseas y las fracturas patológicas.

La astenia y la fatiga aparecen en el 32% de los pacientes y tienen relación con la anemia. Además, se observa pérdida involuntaria de peso en más del 20% de los pacientes. La fiebre

raramente es de causa primaria y, en la mayoría de los casos, está relacionada con las infecciones que pueda padecer el paciente al avanzar la enfermedad.

Así bien, los síntomas característicos de esta enfermedad, detectados mediante la anamnesis del paciente en el momento del diagnóstico, dependen de las complicaciones que presente este, sin embargo, los más frecuentes suelen ser la palidez de piel y mucosas. También aparece dolor con la movilización o a la presión en los huesos con lesiones líticas, así como una disminución de la talla corporal relacionada con la pérdida de altura de los cuerpos vertebrales. Otros síntomas menos frecuentes son la hepatomegalia, la esplenomegalia o las adenomegalias.

Otras manifestaciones clínicas que se asocian son las neurológicas, más relacionadas con fases avanzadas de la enfermedad y las renales, debidas a la eliminación por el riñón de cadenas ligeras de inmunoglobulinas.

3.1.3 Diagnóstico

La certeza diagnóstica es fácil en la mayoría de los mielomas debido a los típicos datos clínicos mencionados, así como a los criterios radiológicos, citológicos y urinarios que, en mayor o menor medida, contribuyen tanto a su identificación como a su estadificación.

Tras esta visión general, vamos a comentar las pruebas complementarias que nos sirven de utilidad, así como los criterios diagnósticos del MM.

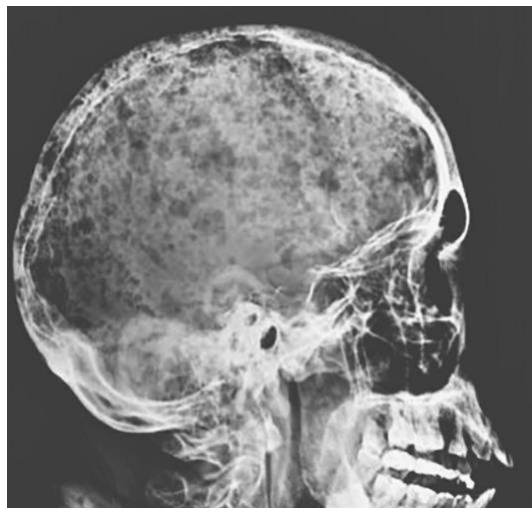
En primer lugar, es fundamental solicitar un hemograma, así como la determinación de la velocidad de sedimentación globular (VSG). Lo característico es que exista una anemia desproporcionada en relación con el resto de las series además de una VSG muy elevada (>100 en la primera hora).

Seguidamente, es fundamental la valoración del proteinograma, el cual mostrará un pico monoclonal. Para precisar el tipo de inmunoglobulina implicada, solicitaremos una

cuantificación de inmunoglobulinas, con esto, seremos capaces de identificar el subtipo de mieloma (IgA kappa, IgA lambda, etc.). En casos dudosos o con pequeño componente, será una prueba inestimable la inmunofijación, considerándose hoy por hoy el “gold estándar” para la identificación de un pico monoclonal.

Además, todos los enfermos deberán tener un aspirado medular. En el aspirado, se estudiará la morfología con tinción panóptica, con especial interés en el recuento celular, su aspecto y si forman acúmulos (dato de malignidad); se hará un estudio citogenético (esencial por su valor pronóstico).

Finalmente, en cuanto a las pruebas de imagen, la realización de un mapa óseo completo es de gran relevancia. En él, podremos observar la osteopenia y las osteólisis (en cráneo pueden verse lesiones osteolíticas en sacabocados o rarefacción ósea con imagen en sal y pimienta). Sin embargo, hay que tener en cuenta que el diagnóstico de afectación ósea por radiología es tardío. Por eso cada vez más se recomienda TAC de cuerpo entero de baja dosis o RMN o PET-TC (1,2).



Radiografía de cráneo. Lesiones “en sal y pimienta”.

3.1.4 Estadificación

La primera estadificación para el MM, y todavía hoy utilizada, es la propuesta por Durie y Salmon en 2003 (3). En ella se pueden identificar 3 estadios de la enfermedad en relación a la masa tumoral.

Estadio I: (Masa celular baja). Se cumplen todos los criterios siguientes:

- Hemoglobina mayor de 10 g/dl.
- Nivel de calcio en sangre (calcemia) normal o < 10.5 mg/dl.

- Componente M (nivel de inmunoglobulina): IgG menor de 5 g/dl; IgA menor de 3 g/dl o cadenas ligeras en orina menor de 4 g/24 horas.
- Ausencia de lesiones osteolíticas (escala 0), o una sola lesión lítica (en radiología).

Estadio II: (Masa celular intermedia). No se cumplen los criterios ni de I ni de III.

Estadio III: (Masa celular alta). Se cumplen uno o varios de los criterios siguientes:

- Hemoglobina menor de 8.5 g/dl
- Nivel de calcio en sangre (calcemia) elevado (mayor de 12 mg/dl).
- Componente M (nivel de inmunoglobulina): IgG mayor de 7 g/dl; IgA mayor de 5 g/dl o cadenas ligeras en orina mayor de 12 g/24 horas.
- Lesiones osteolíticas múltiples (escala 3) y generalizadas en radiología (severas).

Categoría A: creatinina en suero menor de 2 mg/dl.

Categoría B: creatinina en suero mayor de 2 mg/dl.

A pesar de que los estadios de Durie y Salmon se siguen utilizando, en mayo de 2003 se presentó el Índice Pronóstico Internacional para el mieloma, que al publicarse en 2005 cambió su nombre a Sistema de Estadificación Internacional (ISS). El ISS más que estadificar en el aspecto de localización anatómica o extensión, clasifica a los enfermos en tres grupos de riesgo utilizando la albúmina y la beta-2 microglobulina (4).

ISS		
Estadio	Criterios	SV mediana (meses)
I	B2M < 3,5 mg/L Albúmina ≥ 3,5 g/dl	62
II	Ni estadio II, ni III [†]	44
III	B2M ≥ 5,5 mg/L	29

[†]El estadio II tiene dos categorías: B2M < 3,5 mg/L con albúmina < 3,5 g/dl; o B2M de 3,5 a < 5,5 mg/L independientemente del valor de albúmina

Por último, se propuso el ISS revisado (R-ISS), el cual también incluía la citogenética y la LDH.

R-ISS	
Factor pronóstico	Criterios
Estadio ISS	
I	β_2 -microglobulina < 3,5 mg/L y albúmina \geq 3,5 g/dl
II	Ni estadio II, ni III
III	β_2 -microglobulina \geq 5,5 mg/L
Citogenética por FISH	
Alto riesgo	Presencia de t(4:14) y/o t(14;16) y/o del(17p)
Riesgo estándar	Sin citogenética de alto riesgo
LDH	
Normal	LDH < límite superior de la normalidad
Elevada	LDH > límite superior de la normalidad
Nuevo estadio R-ISS	
I	ISS estadio I y citogenética de riesgo estándar y LDH normal
II	Ni R-ISS I, ni R-ISS II
III	ISS III y (tanto citogenética de alto riesgo o LDH elevada)

3.1.5 Tratamiento

El Mieloma Múltiple se considera una enfermedad incurable, salvo excepciones. No obstante, existen formas de tratamiento que al menos logran controlar la enfermedad durante un tiempo.

Hay ciertas medidas generales que son realmente importantes para estos enfermos, las cuales se resumen en: beber tres litros de agua al día, mantenerse activo y evitar en medida de lo posible el tiempo encamado, así como evitar las caídas.

En cuanto al tratamiento específico, es importante clasificar a los pacientes en menores y mayores de 65 años, ya que generalmente es el criterio que se utiliza para diferenciar los que son candidatos a trasplante de los que no lo son. No obstante, también se tienen en cuenta ciertos aspectos como las comorbilidades del paciente, ya que pacientes mayores de 65 años con buen estado general pueden ser candidatos a recibir TAPH y viceversa.

Los pacientes menores de 65 años y candidatos a trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH), se tratan inicialmente con un régimen de inducción, habitualmente VTD (bortezomib, dexametasona y talidomida), o bien VRD (bortezomib, lenalidomida y dexametasona), seguido del TAPH, para finalizar con dos ciclos de consolidación y posteriormente, el tratamiento de mantenimiento.

En los mayores de 65 años o no candidatos a trasplante, la principal combinación de fármacos es VMP (bortezomib, melfalán y prednisona). En estos casos, el tratamiento continuaría directamente con la fase de mantenimiento.

Otras medidas terapéuticas que pueden ser útiles son la radioterapia, para el control local de las posibles fracturas patológicas y de los plasmocitomas sintomáticos; y la eritropoyetina oral, la cual puede ser útil para la anemia.

3.1.6 Pronóstico

La historia natural de la enfermedad está cambiando. Aunque en Europa la tasa de supervivencia a los 5 años del diagnóstico es del 32%, la introducción de nuevos fármacos está suponiendo una mejora en la supervivencia global que se traducirá en un futuro en grandes cambios en la prevalencia de la enfermedad.

3.2. Epidemiología descriptiva

Se trata de la segunda neoplasia hematológica más frecuente, representando el 10% de estas y el 1% del total de neoplasias a nivel global. La incidencia es de aproximadamente 4-

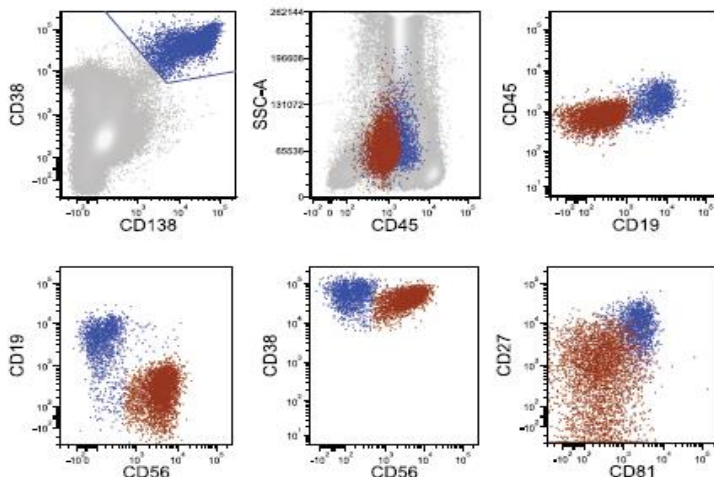
5 casos por cada 100.000 habitantes/año, lo que se traduce en España en unos 2.400 nuevos diagnósticos cada año. Además, se sitúa como la décima causa de muerte por cáncer a nivel mundial en números absolutos (3,8 casos de muerte por cada 100.000 habitantes/año).

La edad de aparición más habitual es entre los 60 y los 70 años, siendo la media de 69 años en los hombres y de 71 en las mujeres. En el momento del diagnóstico, más del 70% de los pacientes son mayores de 60 años, mientras que menos del 5% de los pacientes tienen menos de 40 años.

En relación al género, hay una mayor incidencia entre los varones de raza negra (9/100.000 habitantes) en comparación con las mujeres de la misma raza (6/100.000 habitantes). Estas diferencias por sexo son muchos menores en la raza blanca, con una incidencia en hombres de 4/100.000 habitantes y de 3/100.000 habitantes en las mujeres (5).

3.3 Citometría de flujo

El estudio inmunofenotípico por citometría de flujo (CMF) es una herramienta fundamental para un correcto diagnóstico y un adecuado seguimiento en las neoplasias hematológicas en general y en el Mieloma Múltiple en concreto. Esta técnica se basa en el marcaje de las células a estudio con anticuerpos monoclonales que tienen anclado un fluorocromo. Si la célula a estudio presenta el antígeno (clúster de diferenciación o CD) en su superficie, el anticuerpo se une y, mediante la estimulación con un rayo láser que emite en la longitud de onda adecuada para estimular el fluorocromo, desprende un brillo que es recogido por los fotorreceptores (6). Esta señal es transformada en impulso eléctrico y se visualiza en los diagramas como los que se muestran en la imagen.

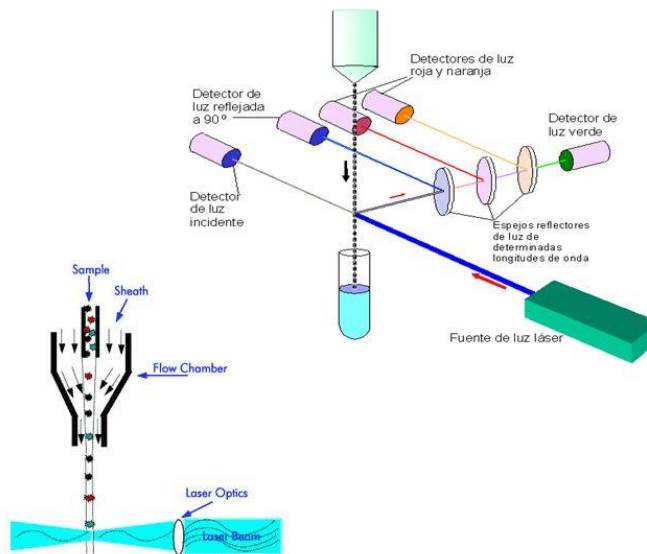


En la actualidad, los citómetros más usados suelen tener 3 láseres que emiten en diferentes longitudes de onda y los anticuerpos monoclonales vienen unidos a 8 fluorocromos diferentes, lo que nos permite obtener información sobre 8 marcadores a la vez, además del tamaño (Forward Scatter o FSC) y complejidad de la célula (Side Scatter o SSC).

Citometría de Flujo

Fundamento:

- Estructura Básica:
 - Sistema Fluídrico (inyección de la muestra)
 - Sistema Óptico (Fuentes de luz)
 - Sistema Eléctrico



En el Mieloma Múltiple la citometría de flujo se ha convertido en una herramienta imprescindible para el diagnóstico, para predecir la evolución de gammapatías monoclonales de significado incierto a mieloma y de mieloma indolente a mieloma sintomático, así como para el seguimiento de la respuesta al tratamiento con el estudio de la Enfermedad Mínima Residual (EMR). Como comentaremos en los apartados siguientes la citometría puede ayudar a conocer el pronóstico de los pacientes con MM (6,7).

3.3.1 Fenotipo normal

La célula plasmática normal se caracteriza por una expresión intensa de CD38; es una ecto-enzima multifuncional que también está implicada en la adhesión celular, transducción de la señal y señalización del calcio (8). CD38 es común a otras líneas celulares

hematológicas (progenitores mieloides y linfoides entre otras) expresada en células CD34+ sobre todo en precursores linfoides B. Durante la maduración linfoide B la expresión de CD38 empieza a disminuir hasta hacerse negativa en los linfocitos B naïve. Más tarde en los linfocitos B activados vuelve a expresarla alcanzando niveles altos en células B del centro germinal; la maduración posterior en células B de memoria disminuye su expresión mientras que la diferenciación a célula plasmática se asocia con una intensidad única muy fuerte (CD38+hi). Es por esto un marcador muy fiable para la selección de las células plasmáticas. El CD138 es un antígeno que se expresa muy selectivamente en la célula plasmática y por tanto el uso combinado de CD38 con CD138 es el recomendado para la selección de células plasmáticas (9,10).

La célula plasmática además se caracteriza por la pérdida de expresión de marcadores pan-B como el CD20 y CD22 e inmunoglobulina de superficie (SmIg).

Las células plasmáticas de la médula ósea muestran además expresión heterogénea de CD19, CD45^{lo} y CD56^{-/lo}. A pesar de estos marcadores inmunofenotípicos generales las células plasmáticas están formadas por diferentes subpoblaciones fenotípicamente bien caracterizadas que muestran características de maduración (11,12).

3.3.2 Aberrancias

Las células plasmáticas de pacientes con mieloma muestran fenotipos que se desvían de las típicas células plasmáticas normales. La expresión de perfiles antigénicos aberrantes incluye: CD19, CD56, CD45, CD38, CD27 y en menor frecuencia CD20, CD28, CD33, CD117 y SmIg (13,14). Así la combinación de estos marcadores junto con la expresión citoplasmática de cadenas ligeras kappa y lambda contribuye a establecer la naturaleza clonal de una población sospechosa de células plasmáticas (15,16).

A pesar de todo lo descrito las frecuencias específicas de los marcadores individuales expresados de forma aberrante en las células plasmáticas de pacientes con mieloma varía de

forma significativa dependiendo de la heterogeneidad de la enfermedad y de las diferencias asociadas al paciente (17,18).

Existe una regla para la EMR por CMF y es que no hay un marcador fenotípico único que por sí mismo sea capaz de distinguir células normales/reactivas de células tumorales y esto también es válido para las células plasmáticas del mieloma (19).

Marcadores más frecuentemente utilizados en la detección de fenotipos asociados a la célula plasmática del mieloma en nuestro Hospital y frecuencia de aparición.

Antígeno	Patrón aberrante	% de casos con expresión aberrante
CD19	-	96%
CD27	- o dim +	40-68%
CD28	+	15-45%
CD38	dim+	80%
CD45	-	73%
CD56	++	60-75%
CD81	- o dim +	55%
CD117	+	30-32%

3.4 Inmunofenotipo en relación al pronóstico

La cuestión que se plantea es si el inmunofenotipo de la célula plasmática aberrante puede tener relación con el pronóstico de los pacientes con Mieloma Múltiple.

Para responder a esta pregunta ya se realizaron trabajos hace años (20,21). Así, en estos estudios, se observó que la expresión de CD19 y CD28 así como la ausencia de expresión de CD117 se asoció con una menor supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG). La expresión de CD28 se vio asociada a t(14;16) y del(17p), ambas alteraciones

de mal pronóstico en el Mieloma Múltiple mientras que la ausencia de expresión de CD117 se asoció con t(4;14) y del(13q), de buen pronóstico.

De tal manera que el estudio simultáneo de CD28 y CD117 permitía una clasificación del riesgo en tres categorías:

- CD28+ y CD117-, mal pronóstico (SLP 30 meses y SG 45 m).
- CD28 y CD 117 ambos positivos o ambos negativos, pronóstico intermedio (SLP 37 meses y SG 68 m).
- CD28- y CD117+, buen pronóstico (SLP 45 meses y SG no alcanzada).

En otro trabajo también del GEM, el Dr. Paiva et al referían como la expresión de CD81 suponía un factor de riesgo independiente para la SLP y la SG. (22)

Sin embargo, el tratamiento del Mieloma Múltiple ha experimentado y sigue experimentando una mejoría con la incorporación de nuevas moléculas como los inhibidores del proteosoma, fármacos inmunomoduladores (IMiDs) y anticuerpos monoclonales que se han ido añadiendo a la primera línea de tratamiento.

La cuestión sobre el significado pronóstico del inmunofenotipo de la célula plasmática aberrante sigue siendo en la era de los nuevos tratamientos un motivo de debate.

Teniendo en cuenta los trabajos ya publicados nos planteamos el objetivo de nuestro trabajo.

Objetivos

- Evaluar si con la introducción de los nuevos tratamientos para el MM, sigue existiendo una correlación entre el inmunofenotipo de la célula plasmática aberrante y el pronóstico de los pacientes diagnosticados de Mieloma Múltiple en el HUNSC, en el periodo de estudio definido mediante la estimación del tiempo hasta la progresión.

Material y métodos

Para este trabajo, se ha llevado a cabo un estudio observacional descriptivo de tipo retrospectivo. Para ello, se han recogido los datos de todos los pacientes diagnosticados de mieloma múltiple en el Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria (HUNSC) desde febrero de 2017 y hasta febrero de 2020.

Toda la información se ha obtenido de los datos clínicos recogidos en los registros informáticos de dicho hospital, salvaguardando la confidencialidad de los pacientes. Se han recopilado datos de tipo epidemiológicos (sexo y edad), el tipo de enfermedad subyacente (subtipo de mieloma múltiple, en función de si era IgG kappa, IgG lambda o MM de cadenas ligeras), la fecha de diagnóstico, la edad del paciente al diagnóstico, el inmunofenotipo correspondiente a la enfermedad (presente en los informes hematopatológicos del servicio), el tratamiento elegido para cada caso y la evolución del paciente (revisando las historias clínicas), para determinar si ha progresado favorablemente o por el contrario, ha tenido un mal curso de la enfermedad.

Los datos se han agrupado en una tabla de Excel, la cual se utilizó como base de datos para la realización de los cálculos estadísticos.

Las variables principales que se asignaron fueron:

1. La presencia o no de factores de riesgo, considerándose estos los siguientes inmunofenotipos: CD81-, CD117- y CD28+. Estos factores de riesgo se agruparon, según si el paciente presentaba 0, 1, 2 ó más de 2.
2. La supervivencia libre de progresión o tiempo hasta la progresión o éxitus.

Con estas variables, se realizó una curva de Kaplan-Meier en el programa SPSS, teniendo en cuenta que esta analiza el comportamiento de la enfermedad en relación a la variable

tiempo. Este comportamiento puede verse alterado por el tipo de inmunofenotipo que presenta el paciente, siendo este, el principal objetivo a demostrar en el trabajo.

Los análisis fueron llevados a cabo con el SPSS v.25 (IBM SPSS Statistics) y Microsoft Excel 2016, considerando que los resultados son estadísticamente significativos cuando p-valor es menor a 0,05.

Se realizó una propuesta de protocolo para la realización del estudio que fue aprobada por el Comité Ético del HUC en fecha 20/01/21.

Resultados

La muestra a estudio se compone de 77 pacientes diagnosticados de mieloma múltiple. De todos ellos, 38 son varones y 39 son mujeres, representando el 49.4% y el 50.6% del total, respectivamente. La edad media se situó en 65.2 años. De la muestra, 29 pacientes fueron tratados con VMP, mientras que 48 pacientes lo hicieron con VTD/VRD.

Los pacientes fueron tratados con dos esquemas diferentes; los candidatos a trasplante autólogo con VTD/VRD x 6-8 ciclos, seguido del trasplante de progenitores hematopoyéticos (el acondicionamiento se realizó con Melfalán 200). Los no candidatos, con protocolo VMP x 9 ciclos. Así bien, la edad media en los no candidatos a trasplante autólogo es de 76.1 años, mientras que la de los candidatos es de 58.6.

Por otro lado, si nos centramos en grupos de edad, diferenciando los pacientes <55 años (14 pacientes, 18.2% del total), entre 55 y 65 años (39 pacientes, 50.6% del total) y los >65 años (41 pacientes, 53.2% del total), podríamos decir que el 100% de los pacientes mayores de 65 años fue tratado con VMP, no obstante, de los tratados con VTD/VRD, 14 de ellos son menores de 55 años, 20 de ellos con una edad comprendida entre 55 y 65, y 12 mayores de 65 años; representando el 29.2%, 45,8% y 25%, respectivamente.

Finalmente, atendiendo al sexo dentro de los subgrupos de tratamiento, se puede afirmar que de los 38 pacientes hombres (49.4% del total), 10 de ellos fueron tratados con VMP, mientras que 28 de ellos lo hicieron los VTD/VRD. En cuanto a porcentajes, obtendríamos un resultado de un 34.5% de hombres tratados con VMP y un 58.3% con VTD/VRD. En las mujeres (siendo 39 el total), se observó que 19 de ellas fueron tratadas con VMP y 20 de ellas con VTD/VRD. Si lo planteamos en porcentajes, correspondería a un 65.5% de mujeres tratadas con VMP y 41.7% tratadas con VTD/VRD.

Tabla 1. Características demográficas y en función del tratamiento.

	Tratamiento		
	VMP (N = 29)	VTD/VRD (N = 48)	Total (N = 77)
Sexo			
Hombre	10 (34,5%)	28 (58,3%)	38 (49,4%)
Mujer	19 (65,5%)	20 (41,7%)	39 (50,6%)
Edad (años)	76,1 ± 5,6	58,6 ± 7,3	65,2 ± 10,9
Edad			
< 55	-	14 (29,2%)	14 (18,2%)
55-65	-	22 (45,8%)	22 (28,6%)
≥ 65	29 (100%)	12 (25,0%)	41 (53,2%)

Asimismo, y también clasificando a los pacientes en los dos subgrupos de tratamiento, podemos observar que para aquellos que recibieron VMP, un 44.8% fueron CD81 positivos y un 55.4% fueron negativos, lo cual hace referencia a 13 y 16 pacientes, respectivamente. En relación a la expresión de CD28 en las células plasmáticas aberrantes, 11 pacientes fueron positivos y 18 fueron negativos, 37.9% y 62.1%, mientras que en cuanto a expresión de CD117, 13 pacientes fueron positivos y 12 negativos, 50% y 46.2% respectivamente, y un

3.8% presentaban expresión heterogénea, no obstante, podemos incluir este último grupo dentro de los positivos.

En el grupo tratado con VTD/VRD 22 pacientes fueron CD81 positivos (47.8%), 17 negativos (37%) y 7 con expresión heterogénea (15.2%). En el caso del marcador CD28, 16 pacientes fueron positivos (33.3%), 31 fueron negativos (64.6%) y un único paciente fue heterogéneo (2.1%). Finalmente, para CD117, 25 pacientes fueron positivos, 18 fueron negativos y uno fue heterogéneo, representando un 56.8%, un 40.9% y un 2.3% respectivamente.

En relación al total de pacientes, 35 fueron positivos para CD81 (46.7%), 33 fueron negativos (44.0%) y 7 fueron heterogéneos (9.3%). En el caso de CD28, 27 pacientes fueron positivos (35.1%), 49 fueron negativos (63.6%) y 1 fue heterogéneo (1.3%). Por último, para CD117, 38 fueron positivos (54.3%), 30 fueron negativos (42.9%) y 2 fueron heterogéneos (2.9%).

Cabe señalar que en todos los casos decidimos incluir a los pacientes heterogéneos en el grupo de positivos, ya que igualmente expresaban el marcador pronóstico que queríamos valorar.

Tabla 2. Inmunofenotipos presentados en grupos de tratamiento.

	VMP (N = 29)	Tratamiento VTD/VRD (N = 48)	Total (N = 77)
CD81			
Positivo	13 (44,8%)	22 (47,8%)	35 (46,7%)
Negativo	16 (55,2%)	17 (37,0%)	33 (44,0%)
Heterogéneo	-	7 (15,2%)	7 (9,3%)
CD28			
Positivo	11 (37,9%)	16 (33,3%)	27 (35,1%)
Negativo	18 (62,1%)	31 (64,6%)	49 (63,6%)

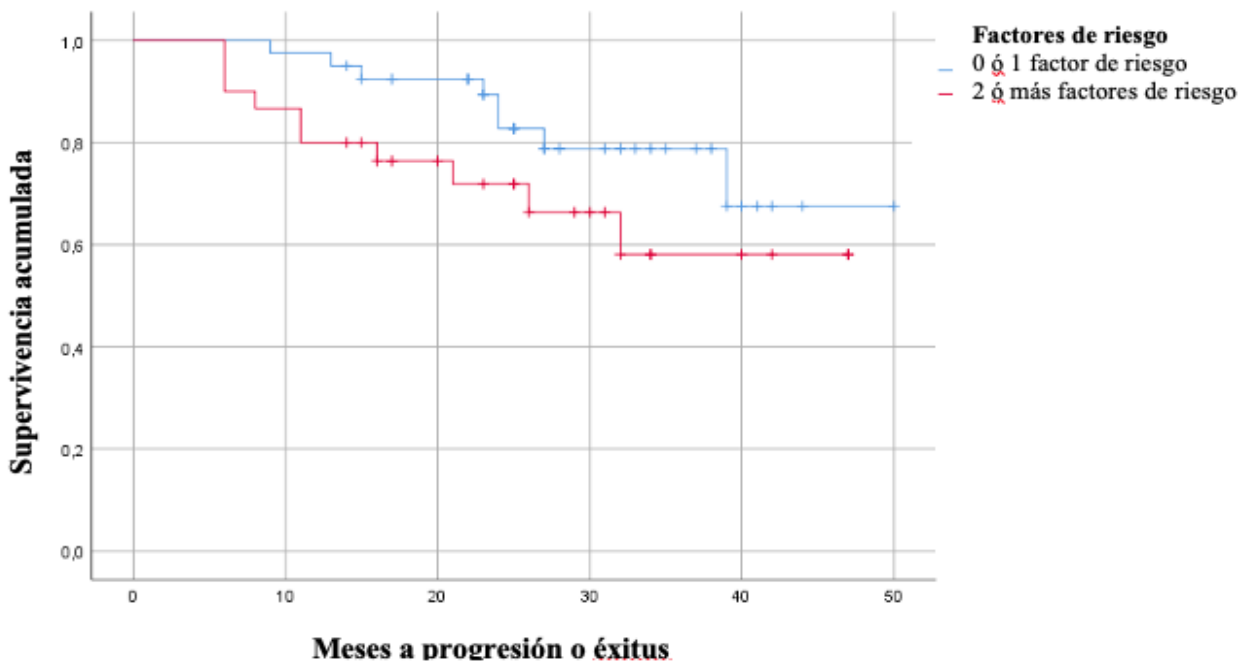
Heterogéneo	-	1 (2,1%)	1 (1,3%)
CD117			
Positivo	13 (50,0%)	25 (56,8%)	38 (54,3%)
Negativo	12 (46,2%)	18 (40,9%)	30 (42,9%)
Heterogéneo	1 (3,8%)	1 (2,3%)	2 (2,9%)

De esta manera, se nos plantea la necesidad de valorar los meses a progresión o éxitus teniendo en cuenta el inmunofenotipo presentado, objetivo principal de este estudio. Para ello, clasificaremos a los pacientes en dos grupos, siendo estos: grupo de bajo riesgo (0 ó 1 factor de riesgo) y grupo de alto riesgo (2 ó más factores de riesgo). Dichos factores de riesgo serían:

- CD28 positivo.
- CD117 negativo.
- CD81 negativo.

En esta ocasión se decidió realizar una curva de supervivencia Kaplan-Meier con el programa SPSS v.25, obteniéndose la siguiente gráfica:

Gráfica 1. Curva de supervivencia en relación a los factores de riesgo.



La curva azul corresponde a los pacientes de bajo riesgo (0 ó 1 factor de riesgo), mientras que la curva roja corresponde al grupo de pacientes considerado de alto riesgo (2 ó más factores de riesgo).

Se observa una tendencia de separación entre ambas curvas, siendo la supervivencia libre de progresión de los pacientes de bajo riesgo mayor que el de los pacientes de alto riesgo. Es decir, los pacientes que tuvieron 0 ó 1 factor de riesgo, tardaron más tiempo (en meses) de sufrir una progresión de su enfermedad, lo que se traduce como una mayor cantidad de meses libres de progresión.

En cuanto a las medias de ambos grupos, se realizó una comparación mediante la prueba Chi-cuadrado para datos independientes, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 3. Comparación de medias.

	Media	DE	LI	LS
Bajo riesgo	42,454	2,336	37,876	47,033
Alto riesgo	34,500	3,181	28,265	40,735
Global	39,847	2,032	35,864	43,829

*Intervalo de confianza al 95%.

En el grupo de pacientes de alto riesgo, la media en cuanto a progresión o éxitus fue de 34.5 meses, siendo el límite inferior de 28.265 y el superior de 40.735. La desviación estándar fue de 3.181, con un intervalo al 95% de confianza. Por otro lado, en el grupo de bajo riesgo, la media fue de 42.454 meses a progresión o éxitus, siendo el límite inferior 37.876 y el

superior 47.033. La desviación estándar en esta ocasión fue de 2.336, con un intervalo de confianza también al 95%.

De esta forma, podríamos afirmar que el tiempo (medido en meses a progresión o éxitus) fue mayor en los pacientes de bajo riesgo que en los pacientes de alto riesgo. No obstante, la significación estadística o p-valor fue de 0.129, por lo tanto, al ser mayor que 0.05, no se consideraría estadísticamente significativo.

Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,306	1	,129

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de V25.

Discusión

La citometría de flujo multiparamétrica es una herramienta muy útil en el diagnóstico y seguimiento de las neoplasias hematológicas. En el estudio de las discrasias de células plasmáticas, nos permite distinguir las células plasmáticas normales de aquellas patológicas, así como su cuantificación. Gracias a ello, podemos identificar a los pacientes que cumplen criterios diagnósticos de MM.

El valor pronóstico de las características inmunofenotípicas de la célula plasmática ha sido estudiado en diversos trabajos. El grupo cooperativo español de Mieloma Múltiple (GEM) estudió en profundidad el fenotipo de la célula plasmática aberrante en pacientes con MM y su correlación con el pronóstico (23).

En este trabajo, se identificaron algunos marcadores asociados a pronóstico adverso (menor supervivencia libre de progresión y supervivencia global), como es la expresión de CD28+; junto a otros de mejor pronóstico, como la expresión de CD117+. Además, la pérdida de expresión de CD81 se asoció a una menor supervivencia libre de progresión y

supervivencia global. En algunos incluso se vio una correlación con las alteraciones genéticas encontradas en esos pacientes. Así, la expresión de CD28 se correlacionó con la presencia de t(14;16) y del(17p), asociadas a mal pronóstico en el mieloma.

Asimismo, también se valoró la influencia de CD19 y CD45. En cuanto a CD19, el estudio demostró que un número considerable de pacientes CD19 positivos tuvieron un resultado más desalentador en comparación con los pacientes CD19 negativos, con aproximadamente 1 año de diferencia en cuanto a la SLP. En contraposición, se ha observado que el marcador CD45 negativo podría estar relacionado con un peor pronóstico, no obstante, no se obtuvieron datos significativos para afirmar dicha influencia.

Cabe mencionar que, el estudio anteriormente mencionado, se realizó hace varios años (2008), siendo entonces la quimioterapia el principal tratamiento para el MM. En la actualidad, el protocolo de tratamiento de los pacientes con MM ha evolucionado mucho gracias a la incorporación de los nuevos fármacos (inhibidores del proteasoma, IMiDs y anticuerpos monoclonales), por lo que la relación entre el pronóstico del paciente y el inmunofenotipo de la célula plasmática aberrante podría verse modificado.

Teniendo en cuenta los estudios anteriormente mencionados, hemos realizado este trabajo retrospectivo, revisando las historias clínicas y los informes hematopatológicos de los 77 pacientes diagnosticados de Mieloma Múltiple en el HUNSC (entre febrero de 2017 y febrero de 2020), obteniendo las características epidemiológicas de cada uno de ellos y seleccionando los fenotipos más frecuentemente implicados en el pronóstico.

A cada marcador aberrante asociado a mal pronóstico se le ha dado un punto:

- CD81 negativo - 1 punto.
- CD117 negativo - 1 punto.
- CD28 positivo - 1 punto.

Seguidamente, hemos agrupado a los pacientes en dos grupos, considerando de bajo riesgo a los que tienen 0 ó 1 punto, y de alto riesgo a los que presenten 2 o más puntos.

Al contar con poco tiempo de estudio para valorar la respuesta total alcanzada por los pacientes (ya que esto precisaría de años de seguimiento), hemos decidido estudiar la supervivencia libre de progresión, es decir, el tiempo (en meses) que transcurrió sin que los pacientes presentaran alguna recaída en su enfermedad.

Para evaluar esta supervivencia libre de progresión en cada uno de los grupos previamente definidos, utilizamos el programa estadístico SPSS v.25, con el que obtuvimos una curva de supervivencia Kaplan-Meier. Esta curva reflejó que la supervivencia libre de progresión de los pacientes de bajo riesgo fue mayor que el de los pacientes de alto riesgo. Es decir, los pacientes que tuvieron 0 ó 1 factor de riesgo, tardaron más tiempo (en meses) de sufrir una progresión de su enfermedad.

Por otro lado, para valorar la media de tiempo (en meses) que tardó cada grupo en sufrir una progresión de la enfermedad, se utilizó la prueba estadística Chi-cuadrado para datos independientes, y se obtuvo (con un 95% de confianza) que la media en meses de progresión para los pacientes de bajo riesgo fue de 42,454, mientras que para el grupo de alto riesgo fue de 34,5. No obstante, la potencia estadística fue de 0,129 ($p > 0,005$), por lo que la prueba resultó no ser estadísticamente significativa.

A pesar de no haber obtenido resultados estadísticamente significativos, sí que se observa cierta tendencia a una mayor supervivencia libre de progresión en los pacientes de bajo riesgo frente a los de alto riesgo. Afirmando, por lo tanto, que la presencia de los inmunofenotipos descritos anteriormente en los trabajos mencionados, parecen seguir guardando correlación con el pronóstico de la enfermedad hoy día, incluso con la introducción de los nuevos tratamientos empleados para el MM.

Por lo tanto, esto nos lleva a pensar que, si pudiéramos reproducir el mismo estudio, esta vez con un tamaño muestral mayor, los resultados que obtendríamos serían estadísticamente significativos, reafirmando de esta manera, que sí existe correlación entre el inmunofenotipo de la célula plasmática en el MM y el pronóstico de la enfermedad, no viéndose modificado este hecho con la aplicación de los avances terapéuticos.

Finalmente, cabe señalar la posibilidad de añadir la valoración de los marcadores CD45 y CD19 en los futuros estudios ya que, como se ha mencionado anteriormente, también podrían estar estrechamente relacionados con el pronóstico de la enfermedad.

Conclusiones

- El inmunofenotipo de la célula plasmática aberrante podría tener influencia en la supervivencia libre de progresión de los pacientes con Mieloma Múltiple y, por tanto, en el pronóstico y la supervivencia global.
- El uso de los nuevos fármacos (inhibidores del proteasoma, inmunomoduladores y anticuerpos monoclonales) para el tratamiento del MM parece no modificar la correlación previamente descrita entre el inmunofenotipo de la célula plasmática y la supervivencia libre de progresión.
- Particularmente, en nuestro estudio, esta diferencia no alcanzó el nivel estadístico significativo necesario.
- Sería necesario aumentar el tamaño muestral para intentar alcanzar una mayor potencia estadística.
- En un futuro, podrían plantearse trabajos similares con una población mayor a estudio para intentar valorar dicha correlación y obtener una potencia estadística significativa.

¿Qué he aprendido realizando el TFG?

- I. Realizar búsquedas bibliográficas. Se trata de uno de los puntos clave para poder llevar a cabo un trabajo de investigación. Así bien, es fundamental saber manejar los diferentes buscadores como por ejemplo Pubmed, Scielo, Google Académico, etc.
- II. Análisis crítico de los artículos e integración de los mismos. Si bien es importante saber encontrar la información necesaria, también es fundamental realizar una buena lectura crítica de la bibliografía.

- III. Interpretación de artículos científicos. En determinadas ocasiones, la interpretación de ciertos artículos científicos no es fácil debido a los posibles tecnicismos que puede presentar, para ello, es vital consultar cada palabra que se escape del conocimiento.
- IV. Sistemática de recogida de datos. Se trata de la primera vez que realizo una recogida de datos, por lo que he tenido que adecuar un sistema para ello que sea rápido y eficaz, en este caso ha sido mediante tablas de Excel.
- V. Uso del programa DRAGO del HUNSC. Ha sido mi fuerte principal a la hora de obtener la información necesaria de los pacientes, por lo que ha sido fundamental conocer cómo se utiliza para poder manejarlo de forma independiente para la recogida de datos.
- VI. Manejar el programa SPSS. He adquirido conocimientos básicos para realizar cálculos sencillos con el programa. Además, he refrescado los conocimientos de bioestadística para poder ponerlos en práctica y conseguir los valores de los resultados, así como saber interpretarlos.
- VII. Sintetizar la información obtenida y poder obtener conclusiones concretas del estudio realizado.
- VIII. Resolver problemas y contrastar opiniones. Junto con mis tutores y colaboradores, hemos podido llegar a una conclusión final en diferentes ocasiones cuando ha habido disparidad de opiniones.
- IX. Adquirir capacidades para realizar una exposición oral de lo estudiado, con claridad y sabiendo comunicar de la mejor manera todo el trabajo realizado.

Bibliografía

1. Sans- Sabrafen J, Castillo Cofiño R, Lafuente Rodéz R, Pardo-Peret R, Vives Corrons JL, Woesnner Casas S. Hematología Clínica. Barcelona: Ediciones Doyma; 1992.
2. García-Sanz R, Mateos J. Mieloma múltiple. Universidad de Salamanca. Servicio de Hematología. Salamanca; 2017.

3. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. Durie BG, Salmon SE. 1975 Sep;36(3):842-54.
4. International staging system for multiple mieloma (ISS). Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al.). *J Clin Oncol*. 2005;23:3412–3420.
5. JM. Calvo-Villas. Mieloma múltiple. Actualización. Madrid: Momento Médico; 2009.
6. Rincón-Vásquez NJ, Jaramillo-Albeláez PE, Llanos-Albornoz CM. Morphology and Immunophenotype of plasma cells in multiple mieloma. *Medicina y Laboratorio*; 2017.
7. Flow Cytometric Immunophenotypic Analysis in the Diagnosis and Prognostication of Plasma Cell Neoplasms. Wang H , Lin P. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 96B:338–350 (2019).
8. Flow cytometry "Ogata score" for the diagnosis of myelodysplastic syndromes in a real-life setting. A Latin American experience. Grille Montauban S, Hernández Pérez CR, Velloso E, Novoa V, Solari L, Serrano JC. *Clinical Trial* 536-541 (2019).
9. Circulating tumor cells for comprehensive and multiregional non-invasive genetic characterization of multiple myeloma. Garcés JJ, Bretones G, Burgos L, Valdes-Mas R, Puig N, Cedena MT, Alignani D, Rodriguez I, Puente DÁ, Álvarez MG, Goicoechea I, Rodriguez S, Calasanz MJ, Agirre X, Flores-Montero J, Sanoja-Flores
10. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: The relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT, Owen RG, Jack AS, Child JA Morgan GJ.. *Blood*;100:3095–3100 (2002).
11. Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: A tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, Blade J, Lopez-Berges C, Caballero D, Hernandez J, Moro MJ, Fernandez-Calvo J, Diaz-Mediavilla J, et al.. *Blood* 99:1853–1856 (2002).

12. Report of the European myeloma network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D, et al. *Haematologica* 93: 431–438 (2008).
13. Comparison of cross-platform flow cytometry minimal residual disease evaluation in multiple myeloma using a common antibody combination and analysis strategy. Mathis S, Chapuis N, Borgeot J, Maynadie M, Fontenay M, Bene MC, Guy J, Bardet V. *Cytometry B Clin Cytom* 2015;88:101–109.
14. A new method for the analysis of plasma cell DNA content in multiple myeloma samples using a CD38/propidium iodide double staining technique. Orfao A, Garcia-Sanz R, Lopez-Berges MC, Belen Vidriales M, Gonzalez M, Caballero MD, San Miguel JF. *Cytometry* 1994;17:3322339.
15. Immunophenotype of normal and myelomatous plasma-cell subsets. Robillard N, Wulleme S, Moreau P, Bene MC. *Front Immunol* 2014; 5:137.
16. Clinical significance of sensitive flow-MRD monitoring in elderly multiple myeloma patients on the pethema/GEM2010MAS65 trial. Paiva B, Montalban MA, Puig N, Cordon L, Martinez-Lopez J, Ocio EM, Hernandez M, Teruel AI, Gironella M, Echeveste MA, et al. *Blood* 2014;124:3390.
17. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. Mateo G, Castellanos M, Rasillo A, Gutierrez NC, Montalban MA, Martin ML, Hernandez JM, Lopez-Berges MC, Montejano L, Blade J, et al. *Clin Cancer Res* 2005;11:3661–3667.
18. Cell surface markers in multiple myeloma. Ruiz-Arguelles GJ, San Miguel JF. *Mayo Clin Proc* 1994;69:684–690.
19. SAR650984, a novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD381 hematologic malignancies. Deckert J, Wetzel MC, Bartle LM, Skaletskaya A, Goldmacher VS, Vallee F, Zhou-Liu Q, Ferrari P, Pouzieux S, Lahoute C, et al. *Clin Cancer Res* 2014;20: 4574–4583.

20. Utility of Flow Cytometry Immunophenotyping in Multiple Myeloma and Other Clonal Plasma Cell-Related Disorders. Paiva B, Almeida J, Pérez-Andrés M, Mateo G, López A, Rasillo A, Vidriales MB, López-Berges MC, San Miguel JF, Orfao A. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 78B:239–252 (2010)
21. Immunophenotype of Normal vs. Myeloma Plasma Cells: Toward Antibody Panel Specifications for MRD Detection in Multiple Myeloma. Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, Pérez JJ, Bottcher S, Wind H, Sanoja L, Puig N, Lecomte Q, Vidriales MB, Jacques J, Van Dongen M, Orfao A. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 90B:61–72 (2016).
22. A New criteria for response assessment: Role of minimal residual disease in multiple myeloma. Paiva B, van Dongen JJ, Orfao. *Blood* 125:3059–3068 (2015).
23. “Prognostic Value of Immunophenotyping in Multiple Myeloma: A Study by the PETHEMA/ GEM Cooperative Study Groups on Patients Uniformly Treated With High-Dose Therapy”. Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB. *Journal of Clinical Oncology*. (2008).