

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E IMUNOFENOTÍPICA DE PACIENTES COM
MIELOMA MÚLTIPLO**

Ana Luiza Carvalho da Silva

Porto Alegre, junho de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E IMUNOFENOTÍPICA DE PACIENTES COM
MIELOMA MÚLTIPLO**

Trabalho apresentado como
requisito parcial para aprovação na
Disciplina de Trabalho de
Conclusão do Curso de Farmácia
da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.

Ana Luiza Carvalho da Silva

Professor Orientador: Diogo André Pilger

Co-orientador: Mariela Granero Farias

Porto Alegre, junho de 2015.

Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Anexo I) na qualidade de "Artigo Original". A versão em língua inglesa será elaborada após as correções e sugestões da banca revisora.

Caracterização bioquímica e imunofenotípica de pacientes com Mieloma Múltiplo

Ana Luiza Carvalho da Silva¹, Ana Paula Alegretti², Mariela Granero Farias², Priscila Aparecida Correa Freitas², Marcelo Ferreira Paiva², Fabiane Pedrazzani Spagnol², Diogo André Pilger¹

¹Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

²Unidade de Diagnóstico Personalizado (Citometria de Fluxo) do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Autor correspondente:

Prof. Dr. Diogo André Pilger

Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Avenida Ipiranga, 2752, sala 304E, Porto Alegre, RS, Brasil. CEP 90.610-000

E-mail: diogo.pilger@ufrgs.br

Resumo

Introdução: O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia heterogênea, caracterizada pela proliferação clonal de células plasmáticas. A identificação de biomarcadores que auxiliem no diagnóstico e prognóstico é necessária para o tratamento e monitoramento destes pacientes.

Objetivo: O propósito deste estudo foi avaliar o perfil imunofenotípico e clínico de pacientes com MM no momento do diagnóstico correlacionando a expressão destes marcadores com outras variáveis bioquímicas laboratoriais.

Materiais e Métodos: Trinta pacientes com MM foram incluídos neste estudo, no momento do diagnóstico. O perfil imunofenotípico foi analisado por citometria de fluxo e a expressão dos antígenos foi correlacionada com características laboratoriais dos pacientes.

Resultados: A presença dos antígenos CD117_($p=0,020$) e CD56_($p=0,012$) nos plasmócitos mostrou correlação com níveis elevados de cálcio sérico e a expressão de CD28_($p=0,026$) foi associada a presença de lesões líticas.

Conclusão: Este estudo sugere que a expressão de CD117, CD56 e CD28 possam ser utilizados como biomarcadores de predisposição à lesão óssea quando analisados no momento do diagnóstico. A Citometria de Fluxo demonstra um papel fundamental na identificação de tais antígenos, o que pode contribuir na investigação laboratorial global do MM. O número amostral deve ser ampliado para uma melhor investigação e estabelecimento de correlação destes marcadores em diferentes estágios da doença.

Palavras-chave: mieloma múltiplo; imunofenotipagem; biomarcador

Introdução

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia heterogênea, caracterizada pela proliferação clonal de células plasmáticas (CP)^{1; 2} e alterações citogenéticas complexas.^{3; 4} Nos Estados Unidos, é mais frequentemente diagnosticado entre pessoas com idade entre 65 e 74 anos.⁵ Segundo dados do Ministério da Saúde, a ocorrência do MM no Brasil ocorre mais cedo, sendo em média aos 60 anos.⁶ Em conjunto com dados clínicos, radiológicos, bioquímicos e hematológicos, a imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF) fornece informações relevantes, possibilitando o diagnóstico e a classificação de desordens de CP⁷.

Recomendações de consensos atuais para a identificação e contagem das CP incluem os antígenos CD38, CD138 e CD45 como a melhor combinação de marcadores de identificação (*backbone*). A expressão de CD19, CD56, CD117, CD20, CD28, CD27 e CD81 estão associadas com padrões fenotípicos únicos que permitem uma clara diferenciação entre CP clonais normais e malignas⁷, uma vez que o padrão de expressão destes antígenos mostra-se diferente.⁸

Vários marcadores individuais e perfis imunofenotípicos têm sido associados com alterações genéticas específicas, assim como com a evolução do MM⁷. Segundo van Dongen *et al.*, um número cada vez maior de marcadores imunofenotípicos tem fornecido informações relevantes em CP⁷.

As CP do MM podem ser identificados pela presença do antígeno CD138, e as anormalidades fenotípicas incluem: ausência de CD19 (95%), presença de CD56 (75%), CD117 (30%), CD20 (30%), a superexpressão de CD28 (15%-45%) e CD200, além da diminuição de CD27 (40%-50%) e CD81. .⁶

Diversos estudos na literatura têm demonstrado que a CF possui valor prognóstico no MM^{3; 4; 9}, podendo auxiliar no entendimento do risco de progressão da doença. Segundo alguns autores a expressão de CD117 nos plasmócitos confere prognóstico favorável^{4; 10}, enquanto a presença de CD28 está associada a pior desfecho clínico^{4; 11}. Quanto à expressão de CD56, ainda há controvérsias, sendo citado como bom fator prognóstico⁴ e também associado a moléculas de adesão de células neurais e presença de lesões ósseas.¹² Além disso, é possível prever a sobrevida global e analisar a remissão da doença após transplante autólogo de células tronco hematopoéticas¹³.

Contudo, a associação do perfil imunofenotípico das CP com as variáveis hematológicas e bioquímicas no MM ainda precisa ser melhor elucidada para o entendimento do prognóstico destes pacientes. Assim, o objetivo deste estudo foi

avaliar o perfil imunofenotípico e clínico de pacientes com MM no momento do diagnóstico, correlacionando a expressão destes marcadores com outras variáveis laboratoriais buscando estabelecer possíveis biomarcadores.

Materiais e Métodos

Amostra

Foi realizado um estudo retrospectivo que incluiu pacientes diagnosticados com MM conforme recomendações do *International Myeloma Working Group* (IMWG) para o diagnóstico de neoplasias de células plasmáticas.^{3; 6; 14}

Os pacientes foram selecionados no período de janeiro de 2014 a fevereiro de 2015 em um hospital universitário em Porto Alegre/RS. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do hospital para utilização destes dados (14-0503).

Inicialmente, um total de 45 pacientes com suspeita de MM foram incluídos no estudo. Pela análise dos dados laboratoriais, 15 pacientes foram excluídos por não cumprirem os critérios de inclusão, diagnóstico de outras doenças de células plasmáticas (fase pré-maligna assintomática de significado indeterminado (MGUS), amiloidose ou plasmocitoma secundário) ou pacientes sem acompanhamento clínico no hospital.

Ao final, foram avaliados um total de 30 pacientes, que foram categorizados conforme seu estadiamento clínico de acordo com a classificação Durie&Salmon (D&S) para MM¹⁵.

Análises bioquímicas e hematológicas

Os valores de creatinina (Cre), cálcio total (Ca) e albumina (Alb) foram determinados em amostras de soro por método colorimétrico automatizado (Cobas C 501, Roche Diagnostics GmbH, Alemanha); β 2 microglobulina (β 2M) por quimioluminescência (Liaison, DiaSorin, Itália). A hemoglobina foi analisada em sangue total com K₂EDTA por método fotométrico no equipamento Sysmex XE-5000 (Sysmex Corporation, Japan).

A determinação de células plasmáticas foi realizada por análise microscópica do exame medulograma. O proteinograma foi determinado por eletroforese de proteínas utilizando o equipamento Capillarys 2 (Sebia, França), no qual as proteínas foram separadas em frações (albumina, α 1, α 2, β e γ) e a quantificação das bandas foi realizada por escaneamento com o programa Sebia, utilizando o *software* Phoresis, (Sebia, França). Para a imunofixação utilizou-se o equipamento Hydrasys (Sebia,

França). As imunoglobulinas monoclonais detectadas na eletroforese apresentam-se como bandas anormais situadas nas zonas da beta e gama-globulina. Para identificação das bandas monoclonais foi utilizado anti-soros monoespecíficos.

Citometria de Fluxo

Em 100 µL de amostra de medula óssea foram adicionados os anticorpos monoclonais em volumes validados e incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A seguir, os eritrócitos foram lisados e realizadas lavagens com PBS (tampão Fosfato Salino). As células foram ressuspensas com PBS e 300.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCanto II® (BD São José, CA, EUA). Para análise dos dados foi utilizado o *software* Infinicyt (Cytognos SL, Salamanca, Espanha).

O painel de anticorpos utilizado foi CD19APC (clone HIB19; BD), CD38FITC (clone HIT2; ExBIO), CD138PE (clone B-A38;ExBIO), CD117PE (clone104D2; ExBIO), CD28 PE (clone CD28.2;ExBIO), CD27 APC (clone MT271;BD), CD56 PE (clone MEM-188;ExBIO), CD45PerCO (clone MEM-28;ExBIO), CD81 APCH7 (clone JS-81;BD), Kappa PE (A8B5;ExBIO) e Lambda FITC (4C2;ExBIO). A seleção dos antígenos a serem avaliados foi baseado nas recomendações do *European Myeloma Network*.¹⁶

Os plasmócitos foram identificados com base na forte expressão de CD38 e CD138 e pela dispersão lateral (SSC) intermediária. A discriminação entre CP clonais e normais foi realizada pelo reconhecimento de perfis de expressão fenotípica e avaliação das cadeias leves Kappa e Lambda citoplasmáticas (Figura 1).

Como controles foram utilizadas células normais do próprio paciente positivas ou negativas para os marcadores.

Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP), mediana (interquartil) ou frequência (%), quando apropriados. Os testes t *Student* e Mann-Whitney foram utilizados para comparar as variáveis contínuas dos antígenos estudados; o Teste Exato de Fischer foi utilizado para as variáveis categóricas. As análises foram realizadas no *software* SPSS versão 22.0 considerando uma significância de 5%.

Resultados

Um total de 30 pacientes (21 homens e 9 mulheres) com MM foram analisados no momento do diagnóstico. A média de idade foi $60,6 \pm 12,7$ anos sendo que 21 (70,0%) dos pacientes pertenceram ao sexo masculino.

As características clínicas e demográficas, bem como a classificação/categorização dos grupos encontram-se na Tabela 1. Os pacientes foram classificados conforme o escore D&S, sendo que 86,7% pertencente ao grupo III, 3,3% ao grupo 2 e 10,0% ao grupo I.

O resultado da eletroforese de proteínas mostrou que o pico monoclonal na região das gamaglobulinas foi o mais prevalente (63,3%), seguido da betaglobulina (16,7%). Alguns pacientes apresentaram ausência de pico em qualquer fração (13,3%). Não foi possível obter o resultado do pico monoclonal de dois pacientes pela ausência deste dado no prontuário.

Os dados da imunofixação apresentaram maior prevalência de cadeia Kappa, observado em 15 pacientes (50,0%) e Lambda em 3 pacientes (10,0%); 5 pacientes (16,6%) apresentaram ausência de banda e 7 (23,3%) não realizaram o teste (a ausência da realização deste teste ocorreu devido a positividade na eletroforese, não sendo necessário para confirmação diagnóstica pelos critérios de D&S. A Imunoglobulina IgG foi a mais prevalente (56,7%), seguida de IgA (16,7%). Não houve paciente com pico em IgM e IgD.

O medulograma mostrou ampla variação de plasmócitos, entre 0% a 82%, com mediana de 21% (5,5 – 50,0). Apenas um paciente não realizou o exame devido à amostra inadequada (dados não apresentados na tabela).

As características laboratoriais dos pacientes estão apresentadas na Tabela 2. A frequência de cada um dos marcadores utilizados para a caracterização imunofenotípica dos 30 pacientes com MM foi: CD28 (60,0%), CD117 (66,7%), CD27 (70,0%), CD56 (80,0%) e CD81 (30,0%). A análise da associação entre o conjunto de todos os marcadores imunofenotípicos e os diferentes graus de estadiamento da doença não foi considerada significativa.

A frequência de expressão de cada um dos marcadores imunofenotípicos, classificados como presente (+) ou ausente (-), foi analisada frente aos dados bioquímicos, hematológicos e lesões ósseas. Para ser classificado como presente (+) foi considerado qualquer intensidade de marcação positiva para o antígeno e ausente (-) quando houve a ausência completa de expressão. A presença dos antígenos CD117 e CD56 apresentou associação com níveis elevados de cálcio ($p=0,020$ e

p=0,012, respectivamente). O CD28 foi associado com a presença de lesões líticas (p=0,026)

Discussão

A citometria de fluxo é um método essencial no diagnóstico de MM e contribui para a estratificação prognóstica, além da monitorização de doença residual mínima nesses pacientes, a partir da combinação de marcadores imunofenotípicos.⁷ Neste contexto, este estudo buscou analisar o perfil imunofenotípico de pacientes diagnosticados com MM e a possível associação entre esses antígenos com as variáveis clínicas e laboratoriais dos pacientes.

Em sua grande maioria, o nível médio de expressão de cada marcador foi considerado alto, permitindo inferir que o painel escolhido apresenta poder discriminatório para investigação dos clones aberrantes.⁷ Entretanto, observa-se que um número considerável de pacientes não expressam, eventualmente, algum marcador presente no painel, sendo que a utilização de um painel amplo, como este, permite a caracterização da população celular doente através da associação de antígenos celulares múltiplos. Essa lógica de associação de painéis mais amplos já é demonstrada por diferentes pesquisadores na investigação do MM.^{10; 17}

Dentre os pacientes com MM, cerca de 80 a 90% sofrem lesões osteolíticas durante o curso da doença,¹⁸ e a manifestação de hipercalcemia varia entre 15% a 40% dos casos.^{18; 19} Portanto, a destruição óssea está associada com lesões líticas e hipercalcemia,²⁰ o que representa uma complicação grave ocorrida devido a reabsorção óssea acelerada e ao elevado número de osteoclastos.¹⁹

Neste trabalho, foi evidenciado que 60% dos pacientes apresentaram expressão de CD28, tendo, ainda, associação estatisticamente significativa com a presença de lesões líticas. Entretanto, nenhum outro marcador apresentou ao menos uma tendência de associação a uma condição clínica desfavorável. Conforme *European Myeloma Network*, a expressão de CD28 é útil como indicador prognóstico.¹⁶ O CD28 age como co-estimulador de células T¹¹, atuando sobre CP normais e malignas.¹¹ No MM está presente em cerca de 15 a 45% dos casos e correlaciona-se com a progressão da doença.^{4; 11} Provavelmente devido à importante interação deste antígeno com as CP e células dendríticas na MO,¹⁷ pode desempenhar um papel importante na sobrevivência de células neoplásicas na MO, sendo apontado como potencial alvo terapêutico no tratamento do MM.¹¹ Segundo Paiva *et al.*, o fenótipo aberrante de CP mostra super expressão de CD28⁴, e a via de sinalização estimulada por este antígeno resulta em proliferação aumentada de células

T e da função efetora, causando um aumento de sobrevivência, via *up regulation*, do gene anti-apoptose.¹¹

Na análise de associação entre os antígenos celulares e as demais variáveis laboratoriais e clínicas analisadas, observamos que a expressão do antígeno CD117 mostrou-se relacionada com níveis mais elevados de cálcio no sangue periférico. O CD117 é uma proteína de membrana que age como um fator de crescimento hematopoético e não é encontrado em células plasmáticas normais.⁸ Está expresso em mastócitos e em um subgrupo de células precursoras da medula óssea. Apesar de todas as células B serem tipicamente CD117 negativas na medula óssea prematura¹⁰, as CP de MM podem apresentar forte expressão deste antígeno,²¹ ocorrendo em cerca de 30% de pacientes com MM.¹⁰ Diferentes autores têm relacionado o nível de expressão do CD117 com o prognóstico dos pacientes com MM. Segundo Schmidt-Hieber *et al.*, a expressão de CD117 pode estar associada com o bom prognóstico, visto que CD117 pode contribuir para a manutenção homeostática, redirecionando neutrófilos e alterando seu *homing* na medula óssea, sugerindo que resíduos de CP normais na MO se mantenham superior às CP neoplásicas enquanto ocorre a propagação.¹⁰

Ainda, Robillard *et al.* identificaram a associação deste marcador com o CD28, sugerindo duas categorias de risco: pior prognóstico (CD28+/CD117-) e bom prognóstico (CD28-/CD117+).²¹ Nosso estudo mostrou que a expressão de CD117 está relacionada com hipercalcemia, talvez indicando um paciente em pior estado geral. Além disso, não houve associação entre o CD28 e CD117. Outros trabalhos têm demonstrado que alguns perfis de antígenos, como CD28 e CD117, estão associados com a presença de anormalidades citogenéticas específicas.¹⁷

Outro antígeno que mostrou associação com hipercalcemia foi o CD56, porém sem associação com presença de lesões líticas. Neste estudo, 80% dos pacientes apresentaram expressão de CD56. Este antígeno apresenta papel importante como molécula de aderência, o que poderia estar relacionado a eventos que permitam a disseminação de células malignas em demais compartimentos biológicos.²¹ Sabe-se que existe uma correlação significativa entre a forte expressão de molécula de adesão de células neurais (NCAM) e CD56 nas células de MM com a presença de lesões líticas. O NCAM/CD56 está expresso em osteoblastos, observando-se uma diminuição da atividade destes e um aumento na função dos osteoclastos. No entanto, pouco se sabe sobre este mecanismo,¹² que supõe que o cálcio aumentado possa estar correlacionado com manifestações de lesões ósseas. Este antígeno é encontrado em CP de MM²¹ (cerca de 75% dos casos).⁸ Portanto, diversos trabalhos têm evidenciado que a expressão do CD56 está associada a um fator de risco biológico e pior

prognóstico para MM.^{8; 21; 22} Com base nos achados de Ely *et al.*¹², podemos supor que o cálcio aumentado possa estar correlacionado com manifestações de lesões ósseas.

Analisando o perfil imunofenotípico dos pacientes incluídos neste estudo, foi evidenciado que não houve expressão do antígeno CD81 na maioria dos casos (63,33%). O CD81 é uma molécula que age como co-receptor de célula B, também envolvida na sinalização e ativação destas células. Estudos recentes descrevem que a expressão CD81 em células plasmáticas de MO de MM está associada a um aumento do índice de proliferação.¹⁷ Já é conhecida que a expressão de CD81 é rara em MM.²³. Segundo Rawstron *et al.*, na análise do perfil de expressão desse antígeno em CP anormais, observaram que a mesma foi fraca ou negativa, enquanto em na população de CP normais foi positiva.¹⁶ Nosso resultado corrobora com este trabalho, reafirmando a aplicação deste marcador na diferenciação de populações neoplásicas e normais.

Em desordens de CP clonais, geralmente há um excesso na produção de cadeias leves Kappa ou Lambda, sendo que mais de 90% dos pacientes com MM apresentam essa alteração. Além disso, 27% destes pacientes desenvolvem insuficiência renal aguda.³ CP monoclonais frequentemente secretam quantidades elevadas de imunoglobulinas de cadeias leves livres e podem induzir danos teciduais.²⁴ Nossos resultados mostram que a cadeia leve Kappa foi a mais prevalente (50,0%), enquanto lambda esteve presente em 10,0% dos casos. Foi observada ausência destas em cinco pacientes (16,7%); estudos mostram que alguns pacientes com MM podem ter eletroforese de proteínas séricas normal porque a imunoglobulina está ausente ou presente em um nível muito baixo.²⁵

A eletroforese de proteínas sérica comumente é um método realizado quando há suspeita de MM,²⁵ visto que um aumento do nível de proteína monoclonal no soro esta associado a esta doença.³ Encontramos que o pico monoclonal na região das gama-globulinas foi o mais prevalente (63,3%), seguido da beta-globulina (16,7%). Além disso, 56,7% dos pacientes apresentou pico em Imunoglobulina G. No MM, espera-se um aumento na região gamaglobulina, assim como predominância de anticorpos IgG.²⁵

Um exame da medula óssea mostrando presença de 10% ou mais plasmócitos é um critério para o diagnóstico do MM.³ A mediana de 21% (5,5–50,0%) encontrada nos medulogramas analisados está dentro do esperado ainda que haja grande variação entre os pacientes.

O MM é, na maioria das vezes, de difícil detecção precoce e os pacientes são geralmente identificados no estágio avançado da doença. Os resultados deste estudo indicam uma média de idade de 60,6 anos, corroborando com a literatura, já que se

trata de uma doença crônica e com início insidioso, atrasando o diagnóstico inicial. Em adição, mais de 80% dos pacientes deste estudo foram classificados na fase de estadiamento III da doença pela classificação D&S. Este dado demonstra a dificuldade de identificação da doença e retardo no início do seu tratamento, o que contribui para a piora dos demais achados laboratoriais.

Na análise de gênero, observou-se uma maior frequência de pacientes do sexo masculino (70%). Este dado chama a atenção já que, ainda que existam poucos dados epidemiológicos no Brasil, sabe-se que nos EUA a incidência da doença é somente 1,5 vezes maior em homens do que mulheres.⁶

Um fator limitante para este estudo foi o baixo número de pacientes analisados, especialmente aqueles em estágios mais precoces da doença. Embora tenha sido utilizado um período amostral longo, diversos pacientes não preencheram todos os critérios para diagnóstico confirmatório, achado comum no MM. Uma característica da doença é ser precedida por uma fase pré-maligna assintomática de significado indeterminado (MGUS), além disso, há um estágio intermediário entre MGUS e MM. Este fato pode ter contribuído para o menor grau de associação entre os marcadores imunofenotípicos e as demais variáveis analisadas, ou então eventualmente associações espúrias, sem relação de causa e efeito. Certamente a ampliação do número amostral permitirá a análise conclusiva de qual antígeno permite uma melhor avaliação do prognóstico da doença.

Conclusão

O MM é uma doença complexa que provoca manifestações hematológicas, imunológicas e bioquímicas diversas. A investigação de biomarcadores celulares pode contribuir no momento do diagnóstico proporcionando melhor manejo dos pacientes.

Este estudo demonstrou uma associação entre a presença dos antígenos CD117 e CD56 e os níveis séricos de cálcio, bem como do CD28 e a presença de lesões líticas. Tais marcadores podem ser úteis no momento do diagnóstico para avaliar a susceptibilidade em relação aos parâmetros analisados.

A CF demonstra um papel fundamental na detecção de biomarcadores celulares, o que pode contribuir na investigação laboratorial por ser um método rápido, sensível e reprodutível. Contudo a ampliação da amostra e a inclusão de pacientes em estágios mais precoces da doença permitirá confirmação dos achados.

Referências

- ¹ Hengeveld, P. J.; Kersten, M. J. B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy? **Blood Cancer J**, v. 5, p. e282, 2015. ISSN 2044-5385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25723853> >.
- ² Auner, H. W.; Cenci, S. Recent advances and future directions in targeting the secretory apparatus in multiple myeloma. **Br J Haematol**, v. 168, n. 1, p. 14-25, Jan 2015. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25296649> >.
- ³ Rajkumar, S. V. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. **Lancet Oncol**, v. 15, n. 12, p. e538-48, Nov 2014. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25439696> >.
- ⁴ Paiva, B. et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 78, n. 4, p. 239-52, Jul 2010. ISSN 1552-4957. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20155853> >.
- ⁵ Ashjian, E.; Redic, K. Multiple myeloma: Updates for pharmacists in the treatment of relapsed and refractory disease. **J Oncol Pharm Pract**, Feb 2015. ISSN 1477-092X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25694345> >.
- ⁶ **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde; Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Mieloma Múltiplo. 2014.**
- ⁷ van Dongen, J. J. et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1908-75, Sep 2012. ISSN 1476-5551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22552007> >.
- ⁸ Shin, S. Y. et al. Antigen Expression Patterns of Plasma Cell Myeloma: An Association of Cytogenetic Abnormality and International Staging System (ISS) for Myeloma. **J Clin Lab Anal**, Oct 2014. ISSN 1098-2825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25277787> >.
- ⁹ Paiva, B. et al. The prognostic value of multiparameter flow cytometry minimal residual disease assessment in relapsed multiple myeloma. **Haematologica**, v. 100, n. 2, p. e53-5, Feb 2015. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25381128> >.
- ¹⁰ Schmidt-Hieber, M. 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**, v. 96, n. 2, p. 328-32, Feb 2011. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20971816> >.

- 11 Bahlis, N. J. et al. CD28-mediated regulation of multiple myeloma cell proliferation and survival. **Blood**, v. 109, n. 11, p. 5002-10, Jun 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311991> >.
- 12 Ely, S. A.; Knowles, D. M. Expression of CD56/neural cell adhesion molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation. **Am J Pathol**, v. 160, n. 4, p. 1293-9, Apr 2002. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943714> >.
- 13 Tembhare, P. R. et al. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. **Leuk Res**, v. 38, n. 3, p. 371-6, Mar 2014. ISSN 1873-5835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24462038> >.
- 14 Sabattini, E. et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. **Pathologica**, v. 102, n. 3, p. 83-7, Jun 2010. ISSN 0031-2983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21171509> >.
- 15 <http://www.uptodate.com/contents/staging-and-prognostic-studies-in-multiple-myeloma>.
- 16 Rawstron, A. C. et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. **Haematologica**, v. 93, n. 3, p. 431-8, Mar 2008. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18268286> >.
- 17 Paiva, B. et al. Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. **Blood**, v. 122, n. 22, p. 3591-8, Nov 2013. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24072855> >.
- 18 Hameed, A. et al. Bone disease in multiple myeloma: pathophysiology and management. **Cancer Growth Metastasis**, v. 7, p. 33-42, 2014. ISSN 1179-0644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25187738> >.
- 19 Nosaka, K. et al. Mechanism of hypercalcemia in adult T-cell leukemia: overexpression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on adult T-cell leukemia cells. **Blood**, v. 99, n. 2, p. 634-40, Jan 2002. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781248> >.

- ²⁰ Talamo, G. et al. Beyond the CRAB symptoms: a study of presenting clinical manifestations of multiple myeloma. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 10, n. 6, p. 464-8, Dec 2010. ISSN 2152-2669. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156463> >.
- ²¹ Robillard, N. et al. Immunophenotype of normal and myelomatous plasma-cell subsets. **Front Immunol**, v. 5, p. 137, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24744760> >.
- ²² T Narita¹, A. I., T Kobayashi³, Y Kuroda⁴, T Fukushima⁵, et al. t(14;16)-positive multiple myeloma shows negativity for CD56 expression and unfavorable outcome even in the era of novel drugs. **Blood Cancer Journal**, v. 5, e285; doi:10.1038/bcj.2015.6, 2015.
- ²³ Luo, R. F. et al. CD81 protein is expressed at high levels in normal germinal center B cells and in subtypes of human lymphomas. **Hum Pathol**, v. 41, n. 2, p. 271-80, Feb 2010. ISSN 1532-8392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004001> >.
- ²⁴ Di Noto, G. et al. Immunoglobulin Free Light Chains and GAGs Mediate Multiple Myeloma Extracellular Vesicles Uptake and Secondary NfκB Nuclear Translocation. **Front Immunol**, v. 5, p. 517, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25386176> >.
- ²⁵ O'Connell, T. X.; Horita, T. J.; Kasravi, B. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. **Am Fam Physician**, v. 71, n. 1, p. 105-12, Jan 2005. ISSN 0002-838X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15663032> >.

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos pacientes com Mieloma Múltiplo

		n (%)
Sexo	Feminino	9 (30,0%)
	Masculino	21 (70,0%)
Classificação D&S	I	3 (10,0%)
	II	1 (3,3%)
	III A	15 (50,0%)
	III B	11 (36,7%)
Imunoglobulina	IgG	17 (56,7%)
	IgM	0 (0,0%)
	IgA	5 (16,7%)
Imunofixação	Cadeias lambda	3 (10,0%)
	Cadeias kappa	15 (50,0%)
	Ausência	5 (16,7%)
	Não realizaram	7 (23,3%)
Pico Monoclonal	Gama	19 (63,3%)
	Beta	5 (16,7%)
	Ausência	4 (13,3%)

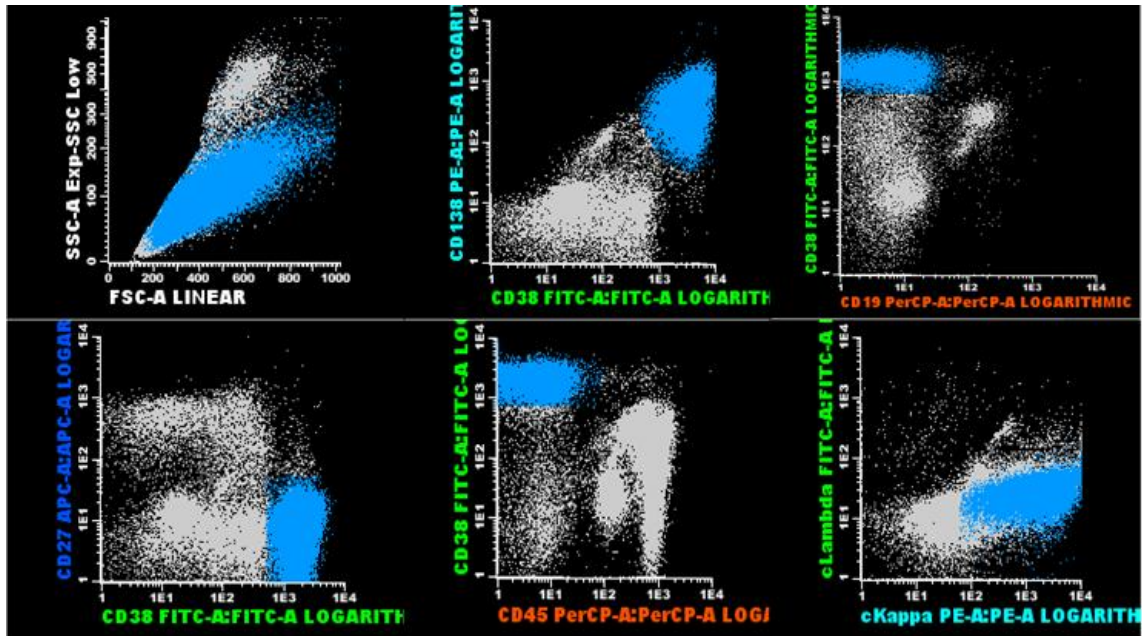


Figura 1: Imunofenotipagem representativa do primeiro *gating* de células plasmáticas e expressão padrão de antígenos. Em azul, a identificação da CP e a expressão dos antígenos característicos.

Tabela 2. Características laboratoriais dos pacientes com Mieloma Múltiplo

	CD 28		CD 117		CD 27		CD 56		CD 81							
	-	+ p	-	+ p	-	+ p	-	+ p	-	+ p						
Frequência(n)	12 (40%)	v 18 (60%)	10(33,33%)	v 20 (66,67%)	9(30%)	v 21 (70%)	6(20%)	v 24(80%)	19(63,33)	v 9 (30%)						
Ca (mg/dL)	9,4 ±1,1	v 9,5±1,3	0,927	8,9±1,0	v 9,9±1,2	0,020*	0,679	9,3±1,2	v 9,5±1,2	0,679	8,7±0,9	v 9,8±1,2	0,012*	9,6± 1,0	v 9,4±1,6	0,823
Hb (g/dL)	9,5 ±2,1	v 10,3±2,5	0,414	10,2± 2,6	v 9,9±2,2	0,717	0,694	10,4±2,2	v 10,0±2,4	0,694	10,8±2,0	v 9,7±2,5	0,191	10,1±2,1	v 9,6±2,6	0,629
Alb (mg/dL)	3,6±0,6	v 3,8±0,9	0,534	3,7±0,8	v 3,8±0,8	0,842	0,435	3,5±0,9	v 3,8±0,8	0,435	3,8±0,7	v 3,8±0,8	0,962	3,9± 0,7	v 3,4±0,8	0,094
Cre (mg/dL)	1,1(0,9-4,6)		0,409	0,99(0,92-2,275)		0,614	1,0 (0,7-2,6)		0,484	0,9(0,7-2,1)		0,155	1,1(0,9-3,3)		0,826	
	v		v		v		v		v		v		v			
B2M (mg/dL)	6308,0(3089,0 -35975,5)		0,247	4311,5(2913,0-7580,0)		0,643	3160(2749,5-47614,5)		0,820	2988(2148,2-6299,7)		0,065	5220(1983-7019)		0,543	
	v		v		v		v		v		v		v			
	4330,0(2348,0-6893,5)			87305(1460-2064,5)			5220(2603-7019)			5398,5 (3215-50001)			5243(2656-30794)			
L.lítica (%)	0,0	v 44,4	0,026*	9,1	v 43,8	0,090	16,7	v 33,3	0,633	25	v 31,6	1,000	28,6	v 27,3	1,000	
B2M>2500 (%)	88,9	v 76,5	0,628	91,7	v 71,4	0,330	80	v 81	1,000	70	v 87,5	0,340	69,2	v 90,9	0,327	
Alb>3,5 (%)	80,0	v 65,0	0,657	69,2	v 70,6	1,000	66,7	v 70,8	1,000	60	v 75	0,431	81,3	v 50,0	0,114	
Cre>2,0 (%)	50,0	v 31,6	0,432	30,8	v 43,8	0,702	16,7	v 43,5	0,362	40	v 36,8	1,000	40,0	v 41,7	1,000	

Legenda: Os valores nas colunas acima correspondem a ausência ou presença dos antígenos de superfície celular estudados (- v +). Os dados estão expressos como média ± DP ou mediana (intervalo interquartil) ou frequência (%). **Ca:** cálcio; **Hb:** hemoglobina; **Alb:** =albumina; **Cre:** creatinina; **B2M:** beta-2-microglobulina; **LL:** presença de lesões líticas. Os valores de cálcio, albumina e β2M foram também categorizados considerando os seguintes pontos de corte: β2M acima de 2500mg/dL (B2M>2500); albumina acima de 3,5 mg/dL (Alb>3,5) e creatinina >2,0 mg/dL (Cre>2 *diferença significativa entre os grupos (P <0.05).

Anexo I

Guideline - Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Information for authors Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy

The *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, ISSN 1516 8484, the official scientific publication of the Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea, Associazione Italo-Brasiliana di Ematologia and Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica aims to promote scientific development in Hematology, Transfusion Medicine and related areas. All manuscripts, after initial acceptance by the editors, will be sent for analysis by two peer reviewers. Anonymity is guaranteed throughout the evaluation process. When considered necessary, a list of modifications will be sent to authors to correct their work or justify their decision not to do so.

The responsibility for opinions expressed in articles is solely of the authors.

Manuscripts should not be submitted simultaneously to more than one journal. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. Reproduction, in full or partial, translated into other languages requires prior permission of the editors.

The journal publishes the following sessions: Original Article, Special Article, Review Article, Updates in the Specialty, Case report, Letter to the Editor, Images in Clinical Hematology, Editorial, Scientific Comment and What is the Evidence. Other types of publications of interest in the area will be published at the discretion of the editors. All manuscripts must be submitted in English.

PREPARATION OF THE MANUSCRIPT

GENERAL INFORMATION

For any manuscript to be evaluated, it must be accompanied by the following documentation:

- **Conflict of interest:** Situations that may improperly influence the development or the conclusions of the work such as participation in drug- or equipment-producing companies cited or used in the work, as well as competitors of these companies should be mentioned. Financial assistance, payments received for consultancies, relationships related to employment, etc. are also considered sources of conflict.
- **Approval of the study by a Research Ethics Committee recognized by the National Research Ethics Committee (CONEP):**
- **Articles that deal with clinical research involving human beings** must include a statement in the Methods Section that all study participants signed an informed consent form. Authors should also confirm that the study was conducted

in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2008;

- **For works involving animal experimentation**, the authors should confirm in the Methods Section that the study followed the rules contained in the Ethical Code for Animal Experimentation of the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) [WHO Chronicle 1985; 39 (2): 51-6] and the principles of the Brazilian College of Animal experimentation - COBEA (www.cobea.org.br). Authors must complete the Declaration - Statement of Human and Animal Rights.

All randomized controlled trials and clinical trials submitted for publication must be registered in a clinical trials database. This is a guideline of the International Clinical Trial Registry Platform (ICTPR) of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). The instructions for the registry are available at <http://www.icmje.org/clintrialup.htm> and registration can be attained in the Clinical Trials Database of the National Library of Medicine available at <http://clinicaltrials.gov/ct/gui>.

TECHNICAL REQUIREMENTS

1. **Article identification:** a) A concise however informative title; b) Complete names of authors without abbreviations and their institutions; c) Department and official name of the institution(s) to which the work should be attributed; d) Name, full address including telephone and e-mail of corresponding author; e) financial support (if any).

2. **Abstract and keywords:** Abstract in English of not more than 250 words. For Original Articles this should be structured with background, method, main results and conclusion. For the other article types, the abstract need not be structured but should contain information illustrating the importance of the work. Specify up to five keywords, which define the theme of the paper. The keywords should be based on MeSH (Medical Subject Headings) from the National Library of Medicine available at: <http://www.sgponline.com.br/rbhh/sgp/naveg/mesh.asp>. For clinical trials, indicate the International Clinical Trials Registry Number below the summary.

3. **Manuscript content:** a) **Original Article:** Used to publish the results of scientific research, it must be original and should comprise the following: Introduction, Objective, Method, Results, Discussion, Conclusion and References. The work should not exceed 4000 words (including references), up to 6 authors, up to 7 tables, illustrations and photos and up to 30 references; b) **Special Article:** With the same structure as original articles, Original Articles are reclassified by the Editor depending on their importance; c) **Review Articles:** narrative reviews addressing an important issue in the specialty. These articles should not exceed 5000 words (including references), a maximum of 7 tables,

Figures and Photos and up to 60 references; **d) Update in the Specialty:** on a theme, method, treatment, etc. It must contain a brief history of the topic, its current state of knowledge and the reasons for the work; study methods (data sources, selection criteria), hypotheses, study lines, etc., criteria similar to review articles; **e) Case Report:** should have an introduction with a brief literature review, a description of the case showing significant results for the diagnosis and differential diagnoses (if any), discussion or comments and references. It should not exceed 1800 words, two tables, illustrations and photographs, up to four authors and ten references; **f) Letters to the Editor:** a maximum of 1000 words (including references), three authors, and two illustrations; **g) Images in Clinical Hematology:** Maximum 100 words, two images, three authors and three references; **h) Scientific comments:** will only be accepted by invitation of the editors.

4. Acknowledgements: Should be addressed to collaborators who deserve recognition, but whose participation does not justify their inclusion as an author such as technical assistants, as well as financial support received.

5. References: References should always be numbered in the order they appear in the text. The format must be based on the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" guidelines proposed by the International Committee of Medical Journal Editors and updated in 2009, as follows: the titles of journals should be abbreviated following the List of Journals Indexed in Index Medicus of the National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Cite the first six authors after which add the words et al.

EXAMPLES OF REFERENCES: PRINTED DOCUMENTS

- **Journals:** Padley DJ, Dietz AB, Gastineau DA. Sterility testing of hematopoietic progenitor cell products: a single-institution series of culture-positive rates and successful infusion of culture-positive products. *Transfusion*. 2007;47(4):636-43.
- **Books:** Chalmers J. Clinician's manual on blood pressure and stroke prevention. 3rd ed. London: Science Press; 2002. 70 p. Richardson MD, Warnock DW. Fungal Infection Diagnosis and Management. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science Ltd Editorial Offices; 1997. 249 p.
- **Book chapters:** F. Reyes. Lymphocyte differentiation. In P Solal-Céligny, N Brousse, F Reyes, C Gisselbrecht, B Coiffier. *Non-Hodgkin's Lymphomas*. Paris: Éditions Frison-Roche; 1993. p.19-29.
- **Annals:** Souza AM, Vaz RS, Carvalho MB, Arai Y, Hamerschilak N. Prevalência de testes sorológicos relacionados à hepatitis B e não-A, não-B em doadores de sangue. In: 19^o Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia / 26^o Congresso da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; 2003 Ago 6-9; São Paulo, 2003. Anais. p.103.

- **Theses:** Sandes AF. Caracterização imunofenotípica da diferenciação eritrocitária, granulocítica e megacariótica em pacientes com síndromes mielodisplásicas [thesis]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2009. 126p.

ELECTRONIC DOCUMENTS

- **Articles in Periodicals:** Almeida ID, Coitinho AS, Juckowsky CA, Schmalfluss T, Balsan AM, Röhlig LM. Controle de esterilidade de produtos de células progenitoras hematopoéticas do sangue periférico. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet] 2010 [cited 2010 Jun 10]; 32(1):23-8. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v32n1/aop03010.pdf>
- **Books:** Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical methods. The history, physical, and laboratory examinations*. 3rd ed. [Internet]. Boston: Butterworths; 1990. [cited 2010 Jun 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cm>
- **Illustrations and photos:** Must have a resolution of at least 1000 dpi. Color figures should be in CMYK and will be published in color only if essential and must be in TIFF, JPEG or CDR format. Do not send the figures within the text.
- **Tables:** should be numbered consecutively using Arabic numerals and cited in the text in numerical order. If the table requires special symbols, it should be sent as a high resolution image (1000 dpi) in TIFF or JPG format.

SUBMISSION

The submission of the manuscript must be via the website of the Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, (Journal of Hematology and Hemoterapy) www.rbhh.org. A copyright transfer form (available on the website) must be completed and signed by all authors and sent to the editorial office e-mail brazilbloodjournal@yahoo.com.br.

When a manuscript is accepted for publication, the author(s) will be requested to complete a conflict of interest form which must be sent to the editorial office.

It is the responsibility of authors to obtain written permission to reproduce any previously published data included in the manuscript.

The editors can publish papers that do not exactly follow the instructions after careful evaluation always taking into account the interests of the readership.

Correspondence address:

Fernando Ferreira Costa
Editor in Chief
Rua Carlos Chagas, 480
Campinas, SP, Brazil
CEP: 13083-970