

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CITOMETRÍA DE FLUJO DE NUEVA GENERACIÓN Y SU APLICACIÓN EN LA  
DETECCIÓN Y MONITORIZACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS EN EL CONTEXTO  
DE MIELOMA MÚLTIPLE: UNA REVISIÓN DEL ESTADO ACTUAL Y LOS PRINCIPALES  
AVANCES

Trabajo final de graduación sometido a la consideración de la Comisión del Programa de  
Posgrado en Especialidades en Microbiología para optar el grado y título de Especialidad  
en Hematología

LAURA MARCELA HERRERA VALERIO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2024

## DEDICATORIA

Le dedico el resultado de este trabajo a mi familia, principalmente a mi hijo Gustavo, cuyo nacimiento por casualidad ha coincidido con la finalización de esta tesis y ha llegado en el momento justo para darme el último impulso para terminar este proyecto y dar un giro a nuestros proyectos futuros.

Además, a mi esposo Jesús quien ha sido parte del proceso todos estos años de estudio, y que con su paciencia y comprensión es mi punto de soporte y equilibrio.

Por último, a mis padres, quienes con su ejemplo me inculcaron perseverancia y empeño.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los profesores de este posgrado, a mi tutor y lectores de tesis por haberme dado la posibilidad de recurrir a su capacidad, conocimiento científico y experiencia para desarrollar este trabajo y haber tenido toda la paciencia para guiarme.

Y para finalizar, gracias a mis compañeros y compañeras de especialidad con quienes comparto la pasión por la hematología y en quienes he encontrado además de colegas brillantes amigos que me han acompañado y enseñado en este proceso de especialización y han celebrado con mi familia la llegada de Gustavo.

Este trabajo final de graduación fue aceptado por la Comisión del Programa de Posgrado en Especialidades en Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Especialidad en Hematología.

Estiven Alfaro G.

Esp. Estiven Alfaro Gómez

Profesor tutor

  
Esp. Jorge López Villegas

Lector

  
Esp. Esteban Jara Segura

Lector

  
Laura Marcela Herrera Valerio

Sustentante

## TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
HOJA DE APROBACIÓN.....	iv
TABLA DE CONTENIDOS.....	v
Resumen.....	vii
LISTA DE TABLAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
Justificación.....	1
Objetivo General.....	2
Objetivos Específicos .....	2
Metodología.....	3
Introducción.....	5
CAPÍTULO I: Fisiopatología del mieloma múltiple y su importancia en salud pública.....	7
Evolución de la enfermedad .....	7
Gammapatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI) .....	9
Definición .....	9
Diagnóstico.....	10
Mieloma múltiple latente.....	14
Definición .....	14
Diagnóstico.....	16
Mieloma múltiple.....	19
Definición .....	19
Presentación clínica.....	21
Diagnóstico.....	22
Epidemiología, etiopatogenia y factores asociados a la enfermedad.....	24
Tratamiento .....	25
Importancia del MM en salud pública.....	30
Datos de MM en Costa Rica y la región .....	31
CAPÍTULO II: Citometría de flujo.....	36
Antecedentes de la Citometría de Flujo.....	36

Principio de la Citometría de Flujo.....	37
Citometría de flujo de primera generación y su aplicación en el mieloma múltiple .....	38
Citometría de flujo de nueva generación.....	39
CAPITULO III: Diagnóstico y monitorización de la enfermedad medible residual en MM mediante citometría de flujo de nueva generación .....	45
Definición de enfermedad medible residual .....	45
Tipo de muestra para detectar EMR .....	46
Técnicas para detección de EMR.....	46
Cuando realizar detección de EMR.....	50
Ventajas y desventajas de la detección de EMR por citometría de flujo de nueva generación versus NGS .....	51
CAPITULO IV: Citometría de flujo de nueva generación y detección de células plasmáticas monoclonales circulantes .....	53
Células plasmáticas circulantes en sangre periférica.....	53
Detección por citometría de flujo de células plasmáticas monoclonales circulantes en sangre periférica.....	54
Situación de la enfermedad en Costa Rica en cuanto a diagnóstico y seguimiento .....	59
Propuesta de algoritmo de diagnóstico.....	67
Conclusiones.....	72
Referencias .....	74

## Resumen

El mieloma múltiple (MM) es una de las neoplasias malignas hematológicas más prevalentes causada por la proliferación clonal de células plasmáticas (CP), que se distribuyen predominantemente en la médula ósea gracias a su adhesión al microambiente medular. Sin embargo, en la actualidad hay evidencia de que las CP clonales también pueden pasar a la circulación sanguínea para posteriormente alojarse en tejidos intramedulares o tejidos distantes, lo que permite que circulen y residan en la sangre periférica. (Xia Y, 2023 )

Aunque el estándar de oro para la detección de enfermedad medible residual (EMR) en MM sigue siendo mediante muestras de médula ósea (MO), la detección de células plasmáticas circulantes en sangre periférica por citometría de flujo puede proporcionar una forma menos invasiva, conveniente y un enfoque fiable para la estratificación del riesgo y el seguimiento de la enfermedad. (Xia Y, 2023 )

La EMR se ha convertido en un procedimiento estándar para el seguimiento de muchas neoplasias malignas hematológicas, en el caso del MM la efectividad alcanzada por las terapias actuales ha permitido llegar a una profundidad de respuesta mayor por lo que la EMR se considera una variable importante a considerar. (Bruno Paiva, 2020)

En Costa Rica actualmente se realiza citometría de flujo de nueva generación con paneles y procedimientos estandarizados por el Consorcio Europeo EuroFlow con el fin de aportar información al diagnóstico y determinación de EMR en dos hospitales nacionales que corresponden al Hospital Calderón Guardia y el Hospital San Juan de Dios.

La técnica de citometría de flujo empleada en el país se realiza utilizando la médula ósea como muestra, los protocolos actuales no incluyen el procesamiento de muestras de sangre periférica ante la sospecha de MM ni en la evaluación de la EMR. Por ello, se expone aquí una propuesta de algoritmo diagnóstico, donde se recomienda la implementación del análisis de citometría de flujo en algunos escenarios clínicos. (Sanoja-Flores, 2020).

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico y el riesgo de progresión en GMSI.....	11
Tabla 2. Características diferenciadoras clave del MM, el MM latente y la GMSI. ....	16
Tabla 3. Criterios diagnósticos MM según IMWG. ....	21
Tabla 4. Fenotipo habitual de las células plasmáticas normales.....	23
Tabla 5. Tubo PCST diseñado por el consorcio EuroFlow™. ....	42
Tabla 6. Tubo PCD diseñado por el consorcio EuroFlow™. ....	43
Tabla 7. Criterios de enfermedad mínima residual según el IMWG. ....	47
Tabla 8. Panel de Euroflow para el monitoreo de EMR .....	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transición de gammapatía monoclonal de significado incierto a mieloma múltiple .....	8
Figura 2. Algoritmo sugerido para biopsia de médula ósea e imágenes esqueléticas en pacientes con GMSI. ....	13
Figura 3. Manejo del mieloma múltiple latente. ....	17
Figura 4. Protocolo diagnóstico aplicado en Costa Rica ante sospecha de MM. ....	61
Figura 5. Casos anuales de MM vrs GMSI/MM latente en el Hospital Calderón Guardia analizados por citometría de flujo desde 2016. ....	62
Figura 6. Casos anuales de MM vrs GMSI/MM latente en el Hospital San Juan de Dios analizados por citometría de flujo desde noviembre 2019 a abril 2024. ....	63
Figura 7. Casos anuales registrados de MM donde se realizó CMF como herramienta diagnóstica en el HCG vrs HSJD. ....	64
Figura 8. Casos anuales registrados de GMSI/MM latente donde se realizó CMF como herramienta diagnóstica en el Hospital Calderón Guardia vrs Hospital San Juan de Dios. ....	65
Figura 9. Distribución por sexo de pacientes con diagnóstico de MM en conjunto durante el periodo 2016 - 2023 en el HCG y el periodo 2019 – 2022 del HSJD. ....	66
Figura 10. Estrategia propuesta para un estudio diagnóstico integral de pacientes con sospecha o diagnóstico de gammapatía monoclonal basado en la evaluación de células plasmáticas tumorales circulantes mediante tecnologías complementarias. ....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

APS	Separador automático de células
CART	Receptores quiméricos de antígenos
CD	Cluster de diferenciación
CMF	Citometría de flujo
CP	Células plasmáticas
CRAB	Acrónimo de anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal y lesiones óseas
EMA	Agencia Europea de medicamentos
EMR	Enfermedad medible residual
FISH	Hibridación fluorescente in situ
FLC	Cadenas ligeras libres
GMSI	Gammapatía monoclonal de significado incierto
HCG	Hospital Calderón Guardia
HSJD	Hospital San Juan de Dios
IMWG	Grupo de Trabajo Internacional sobre Mieloma
ISS	Sistema Internacional de Estadaje
MM	Mieloma múltiple
MO	Médula ósea
NGS	Secuenciación de próxima generación
NGF-MRD	Citometría de flujo de nueva generación para enfermedad medible residual
OMS	Organización mundial de la salud
PCD	Discrasia de células plasmáticas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCST	Tubo tamizaje de células plasmáticas
PET	Tomografía por emisión de positrones
SSP	Supervivencia libre de progresión
TCH	Trasplante autólogo de células hematopoyéticas
VEGF	Factores de crecimiento endotelial vascular

## Justificación

El MM es la tercera neoplasia más común entre las neoplasias hematológicas malignas tras el linfoma no Hodgkin y la leucemia, a nivel mundial, representa el 1% de todos los cánceres y aproximadamente el 10% de todos los cánceres de la sangre. (Pimentel, 2022)

El MM en Costa Rica es una neoplasia prevalente; sin embargo, como se describe más adelante, no se cuenta de momento con bases de datos actualizadas, en general, se desconoce la realidad de estos pacientes en nuestro medio. (Miranda Rojas, 2020)

Debido a la introducción de terapias dirigidas y técnicas de trasplante actuales, la supervivencia a 5 años se ha duplicado durante la última década. Además, se describe una tendencia creciente de la incidencia de esta enfermedad que podría estar relacionada con un mejor diagnóstico sumado a una mayor prevalencia de factores de riesgo ambientales y metabólicos. (Kostopoulos, 2020)

En cuanto al tratamiento del MM, éste ha mejorado durante los últimos 20 a 30 años, con combinaciones de medicamentos con o sin trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas que inducen altas tasas de remisión completa. Por lo que la enfermedad medible residual se ha convertido en una herramienta sensible para evaluar respuestas más profundas en los pacientes que responden de forma favorable al tratamiento, siendo el interés de este trabajo describir las herramientas de diagnóstico y monitorización disponibles actualmente. Además, en este contexto se pretende describir los alcances y avances de la cuantificación de células plasmáticas circulantes, pues se ha propuesto como una técnica menos invasiva y confiable para estratificar el riesgo de recaída.

En este sentido, la citometría de nueva generación es una herramienta técnica útil en la monitorización terapéutica y discriminación diagnóstica para pacientes con neoplasias de células plasmáticas. (Sanoja Flores, 2020)

## Objetivo General

Examinar la literatura científica actual sobre la citometría de flujo de nueva generación y su aplicación en la detección de células plasmáticas para el diagnóstico y monitorización de Mieloma Múltiple.

## Objetivos Específicos

1. Investigar la fisiopatología del mieloma múltiple y su importancia en la salud pública con el fin de entender el impacto de la enfermedad.
2. Describir el concepto de citometría de flujo de nueva generación, sus avances y sus aplicaciones clínicas en el contexto de Mieloma Múltiple, para obtener una base de conocimientos sobre el tema.
3. Describir el diagnóstico y monitorización de la enfermedad medible residual mediante citometría de flujo de nueva generación, con el objetivo de obtener información sobre las técnicas actualmente implementadas.
4. Describir los principales avances en la aplicación de la cuantificación de células plasmáticas tumorales circulantes mediante la citometría de flujo de nueva generación en la atención de los pacientes con mieloma múltiple.
5. Indagar sobre el abordaje diagnóstico y el seguimiento de la EMR de mieloma múltiple, así como realizar el análisis de datos acumulados en los laboratorios de hematología especializada que realizan citometría de flujo de nueva generación en Costa Rica.

## Metodología

Para llevar a cabo esta revisión bibliográfica sobre la citometría de flujo de nueva generación en mieloma múltiple, se emprendió una búsqueda minuciosa de literatura científica en múltiples bases de datos especializadas, incluyendo ClinicalKey, The New England Journal of Medicine, UpToDate, Cochrane Library, Medline, revistas como Leukemia, Blood y tesis en línea principalmente de la Universidad de Salamanca. Se emplearon términos de búsqueda específicos relacionados con la citometría de flujo como mieloma, citometría de flujo, citometría de flujo de nueva generación y enfermedad medible residual; abarcando aspectos como su patología, diagnóstico, seguimiento, tratamiento y pronóstico.

Se establecieron criterios rigurosos para la selección de estudios que formarían parte de la recopilación bibliográfica. Se priorizaron publicaciones de revistas indexadas originales, revisiones sistemáticas y metaanálisis que ofrecieran una visión completa y actualizada del estado del conocimiento sobre el tema. Se excluyeron estudios que no cumplieran con los criterios de relevancia temática.

La búsqueda y recolección de datos se realizaron durante un periodo de tiempo definido desde setiembre 2023 a mayo 2024, abarcando desde los avances más recientes. Se recopilaron datos bibliográficos detallados de cada estudio, incluyendo información sobre los autores, el año de publicación, el título del artículo, la revista científica y el enlace al texto completo.

La calidad de los estudios incluidos en la recopilación fue evaluada mediante una revisión crítica de su metodología, la validez de los resultados y su pertinencia para la comunidad científica, tomando en cuenta el número de veces en que se hizo referencia del artículo. Se priorizó la rigurosidad científica y la solidez de la evidencia presentada en cada estudio, con el objetivo de garantizar la fiabilidad de los datos recopilados y brindar así un escenario realista y objetivo.

La información obtenida fue organizada y sintetizada de acuerdo a los capítulos que contiene esta revisión bibliográfica, agrupando los estudios según diferentes aspectos como año de publicación, contenido y pertinencia con el tema. Se elaboró una estructura

coherente para presentar la información de manera clara y comprensible, facilitando su análisis e interpretación.

En todo momento, se respetaron los principios éticos de integridad académica y honestidad intelectual establecidos por el código de ética de la Universidad de Costa Rica.

## Introducción

De acuerdo a la OMS, el MM se define como una neoplasia de células plasmáticas multifocal que afecta la médula ósea y se asocia a la producción una proteína monoclonal sérica y/o urinaria. Esta enfermedad se caracteriza principalmente por la presencia de los hallazgos clínicos “CRAB” acrónimo que incluye: anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal y lesiones óseas. El MM es una enfermedad neoplásica que afecta a la población adulta y que se caracteriza por infiltración de células malignas a médula ósea y otros tejidos.(Escalona-González, 2020)

La frecuencia de esta enfermedad de acuerdo a la OMS corresponde alrededor del 1% de todas las neoplasias malignas y del 10 al 15% de las neoplasias hematológicas(Navarro-Hernández, 2018). Esta enfermedad rara vez afecta a pacientes menores de 30 años, con una frecuencia menor del 0.3% al 2%, el 90% de los casos se presentan en pacientes mayores de 50 años. De acuerdo a un estudio realizado en la Clínica Mayo, con más de 4082 pacientes, la mediana de edad es de 63 años y la incidencia de afectación extramedular es de un 20% y 40% entre los pacientes de 30 y 40 años respectivamente, la edad promedio en las mujeres es de 61 años y 62 años en los hombres. (Castro García, 2021).

Afecta más a hombres que a mujeres y a afroamericanos que caucásicos, presenta tasas de 8,1 por 100.000 para hombres afroamericanos, 6,1 para mujeres afroamericanas, 4 para hombres caucásicos y 2,7 para mujeres caucásicas. Se observa en todas las razas y áreas geográficas, con una menor incidencia en las poblaciones asiáticas. (Monroy Pesantez, 2022)

En materia de citometría de flujo, el consorcio EuroFlow que está formado por más de 20 grupos de investigación de diagnóstico y una PYME asociada, son considerados expertos en esta área. EuroFlow propone el uso de la citometría de flujo de nueva generación como una estrategia para aumentar la sensibilidad hasta rangos similares a los métodos moleculares, y pretende eliminar la subjetividad asociada a las características de los reactivos, parámetros de identificación de las células o a las herramientas de análisis; Abarcan todos los aspectos metodológicos de la técnica incluyendo elección del panel, preparación de la muestra, estrategia de análisis, informe de resultados, uso de bases de

datos automatizadas, y controles de calidad (Flores-Montero, 2017). Su implementación permite una mayor sensibilidad al compararlo con la citometría de flujo convencional gracias al uso de una combinación optimizada de fluorocromos y anticuerpos permitiendo una mayor especificidad a niveles muy bajos de EMR, y al aumento de 10 veces en el número de células evaluadas, en el contexto de protocolos de laboratorio completamente estandarizados. (Flores-Montero, 2017)


## CAPÍTULO I: Fisiopatología del mieloma múltiple y su importancia en salud pública

### Evolución de la enfermedad

El mieloma múltiple es una enfermedad caracterizada por la expansión clonal de células plasmáticas malignas, principalmente en la médula ósea, las células plasmáticas tienen la capacidad de interactuar con el microambiente circundante y las células estromales medulares, que son esenciales tanto para la resistencia al tratamiento como para la supervivencia celular. A pesar de los importantes avances terapéuticos, actualmente no existe cura. (Liu, 2024)

Esta patología forma parte del espectro de las discrasias de células plasmáticas, disproteinemias o gammapatías monoclonales que constituyen un grupo heterogéneo de entidades caracterizadas por la proliferación clonal de las células plasmáticas y la secreción de una inmunoglobulina aberrante detectable en sangre u orina, la paraproteína o componente monoclonal. (Alejo, 2023)

Se cree que múltiples trastornos genéticos y microambientales desempeñan un papel importante en el desarrollo del mieloma múltiple a partir de una gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), que puede evolucionar a un mieloma múltiple indolente o latente como se observa en la figura 1, donde vemos que la concentración de proteína monoclonal, el porcentaje de células plasmáticas en médula ósea, la afectación multiorgánica, así como la presencia o no de síntomas son hallazgos que llevan a la diferenciación entre estas entidades. (Ismaeel, 2023)



<b>Gammapatía monoclonal de significado incierto</b>	<b>Mieloma múltiple latente</b>	<b>Mieloma múltiple</b>
<b>ASINTOMÁTICO</b>		<b>SINTOMÁTICO</b>
Proteína M < 3 g/dL	Proteína M ≥ 3 g/dL	Proteína M en suero u orina
Células plasmáticas en MO < 10%	Células plasmáticas en MO ≥ 10%	Células plasmáticas en MO ≥ 10%
Sin deterioro de órganos	Sin deterioro de órganos	Con deterioro de órganos y tejidos relacionados
Sin trastorno proliferativo de células B	Trastorno proliferativo de células B	Trastorno proliferativo de células B

Figura 1. Transición de gammapatía monoclonal de significado incierto a mieloma múltiple.

Elaboración propia, modificado de (Moya, 2020).

Si bien la mayoría de los casos de GMSI parecen ser esporádicos, los familiares de personas con GMSI u otros trastornos de las células plasmáticas tienen un mayor riesgo de desarrollar GMSI y enfermedades relacionadas. Los estudios sobre la incidencia de trastornos linfoproliferativos y de células plasmáticas entre familiares de primer grado de pacientes con mieloma múltiple o GMSI apoyan una predisposición ambiental y/o genética compartida a estos trastornos. (Laubach, 2024)

Recientes estudios han demostrado que todos los pacientes con MM han tenido previamente una GMSI y suele preceder 8-10 años a su aparición, desarrollándose en una tasa de 1-2% por año. Durante la transición de GMSI a MM ocurren múltiples acontecimientos: (Moya, 2020)

A) En las células plasmáticas:

- Las CP aumentan en número
- Disminuyen su dependencia del microambiente medular
- Aumenta la complejidad genética
- Incrementa la capacidad de secretar citoquinas que aumenta la resorción ósea.

B) Cambios en el microambiente medular:

- Aumento de la angiogénesis
- Desbalance a favor de la resorción ósea
- Supresión del sistema inmune humoral y celular

Por su parte, el mieloma indolente o latente, muestra una mayor conversión a enfermedad activa, con un riesgo de alrededor del 10 -20% por año. Si bien los estudios, apoyan el papel de los factores genéticos y ambientales en el desarrollo del MM y sus estados, se desconoce la causa real del inicio de la GMSI o las causa que conducen a la progresión de la enfermedad. (Moya, 2020)

En el caso del MM, los daños orgánico terminal provocados por las células neoplásicas de la médula ósea, incluyen hipercalcemia, disfunción renal, anemia y diversas complicaciones esqueléticas, como lesiones óseas osteolíticas, fracturas patológicas y osteoporosis. (Ismaeel, 2023)

### Gammapatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI)

#### Definición

Desde su primera descripción en 1960 por Jan G. Waldenström como “hiperglobulinemia esencial” o “gammapatía monoclonal benigna” y la acuñación del término actual por Robert A. Kyle en 1978, se ha producido un notable progreso en la comprensión de la biología, epidemiología, asociaciones de enfermedades y la historia natural de GMSI. (Go, 2018)

Las gammapatías monoclonales son un conjunto de afecciones heterogéneas caracterizadas por la proliferación clonal de células plasmáticas, capaces de sintetizar componente monoclonal, con excepción del MM no secretor. La GMSI es la más frecuente dentro de este grupo y se caracteriza por ser una entidad asintomática, por lo que su hallazgo, la mayoría de las veces es incidental. Sin embargo, esta afección benigna puede evolucionar a malignidad transformándose en MM u otro trastorno linfoproliferativo, como se mencionó en la introducción a este capítulo los MM vienen precedidos por una GMSI. (Garí Carvajal, 2023)

Entre las malignidades en las que se considera a la GMSI un precursor obligado se encuentran la amiloidosis de cadenas ligeras de inmunoglobulinas, el mieloma múltiple y la

macroglobulinemia de Waldenström. Hay tres subtipos de GMSI cada uno con distinta tasa y tipo de progresión: (Go, R. S., & Rajkumar, S. V. , 2018)

- GMSI de inmunoglobulina M (IgM)
- GMSI no IgM
- GMSI de cadena ligera

Por tanto, la GMSI es una proliferación clonal de células plasmáticas premalignas, que tiene una elevada prevalencia en la población mayor de 50 años, y un riesgo anual de progresión del 1%. Por el riesgo de progresión a otras enfermedades los pacientes requieren un seguimiento de por vida, siendo fundamental un enfoque multidisciplinario y adaptado al riesgo. (Alejo, 2023)

Generalmente afecta al 3% de las personas mayores de 50 años y al 5% de los mayores de 70 años. (Moya, 2020)

### Diagnóstico

La GMSI es una entidad premaligna y asintomática, lo que aumenta el riesgo de desarrollar otras enfermedades, aunque las tasas de progresión son bajas, debe realizarse un estudio exhaustivo en el momento del diagnóstico para distinguir la GMSI de otras entidades clínicas asociadas a paraproteínas. El seguimiento de estos pacientes debe basarse en el riesgo de progresión, para prevenir daños terminales a los órganos afectados. (Alejo, 2023) El hemograma completo y el frotis de sangre periférica suelen ser normales en estos pacientes, sin embargo, con poca frecuencia se observa formación de rouleaux, que es el fenómeno en el que los glóbulos rojos adoptan la apariencia de una pila de monedas y se observa en personas con niveles elevados de proteína sérica. (Laubach, 2024)

No se recomienda la detección universal de gammapatía monoclonal en individuos asintomáticos de cualquier edad. Sin embargo, se puede considerar la detección en personas mayores de 50 años con dos o más familiares de primer grado afectados con mieloma múltiple o un trastorno relacionado. (Laubach, 2024)

En pacientes donde se detecta la presencia de la proteína monoclonal, generalmente se solicitan las siguientes pruebas: hemograma completo, calcio sérico, creatinina, inmunofijación y estudios de cadenas ligeras libres y electroforesis de proteínas en orina de

24 h. Sin embargo, aunque existe un acuerdo universal sobre los criterios para el diagnóstico de GMSI que se muestran en la tabla 1, los aspectos más prácticos como las pautas para el alcance de la evaluación inicial y el seguimiento posterior de GMSI, no son uniformes debido a la falta de evidencia de alto nivel (Go, R. S., & Rajkumar, S. V. , 2018)

Se debe tener en cuenta que, con la adición de la prueba de cadenas ligeras libres séricas a la electroforesis de proteínas y la electroforesis de inmunofijación en suero, algunos estudios indican que no es necesario incluir pruebas de orina en los algoritmos de cribado diagnóstico.(Katzmann, 2006)

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico y el riesgo de progresión en GMSI.

Elaboración propia, modificado de: Rajkumar, S. V. (2022) (Rajkumar, 2022).

Subtipo de GMSI	Criterios de diagnóstico	Riesgo de progresión	Patrón de progresión
<b>GMSI IgM</b>	<b>Se deben cumplir los 3 criterios:</b>	1% anual	Macroglobulinemia de Waldenström.  Amiloidosis  Raramente mieloma múltiple IgM
	Proteína monoclonal IgM sérica <3 g/dl		
	Infiltración linfoplasmocítica de médula ósea <10%		
	No hay evidencia de anemia, síntomas constitucionales, hiperviscosidad, linfadenopatía o hepatoesplenomegalia que puedan atribuirse al trastorno linfoproliferativo subyacente.		
<b>GMSI no IgM</b>	<b>Se deben cumplir los 3 criterios:</b>	0,5% anual	Mieloma múltiple  Plasmocitoma solitario  Amiloidosis
	Proteína monoclonal sérica (tipo no IgM) <3 g/dL		
	Células plasmáticas clonales de médula ósea <10 %		
	Ausencia de daño en órganos terminales como hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas (CRAB) que puedan atribuirse al trastorno proliferativo de células plasmáticas.		
<b>GMSI de cadena ligera</b>	<b>Se deben cumplir todos los criterios:</b>	0,3% anual	Mieloma múltiple de cadenas ligeras  Amiloidosis
	Relación cadenas ligeras libres anormal (<0,26 o >1,65)		
	Aumento del nivel de la cadena ligera involucrada (aumento de cadenas ligeras libres en pacientes con una relación de cadenas ligeras libres >1,65 y aumento de cadenas ligeras libres $\lambda$ en pacientes con una relación de cadenas ligeras libres <0,26)		
	No hay expresión de cadena pesada de inmunoglobulina en la inmunofijación		

	Ausencia de daño en órganos terminales que pueda atribuirse al trastorno proliferativo de células plasmáticas		
	Células plasmáticas clonales de médula ósea <10 %		
	Proteína monoclonal urinaria <500 mg cada 24 h		

Aunque por definición, la GMSI requiere <10% células plasmáticas clonales de médula ósea y la ausencia de evidencia de lesiones líticas en las imágenes esqueléticas, no todos los pacientes con sospecha de GMSI necesitan biopsia o imágenes óseas. En pacientes con GMSI de bajo riesgo que no tienen ningún problema clínico inexplicable, se pueden posponer las imágenes esqueléticas y la biopsia de médula ósea. En la figura 2 se muestra un modelo de estratificación de riesgo de la Clínica Mayo con riesgo bajo definido como: proteína M sérica  $\leq 1,5$  g/dL, isotipo IgG y relación de cadenas ligeras libres normal; de igual forma la probabilidad de encontrar lesiones óseas también es muy baja. (Go, 2018)

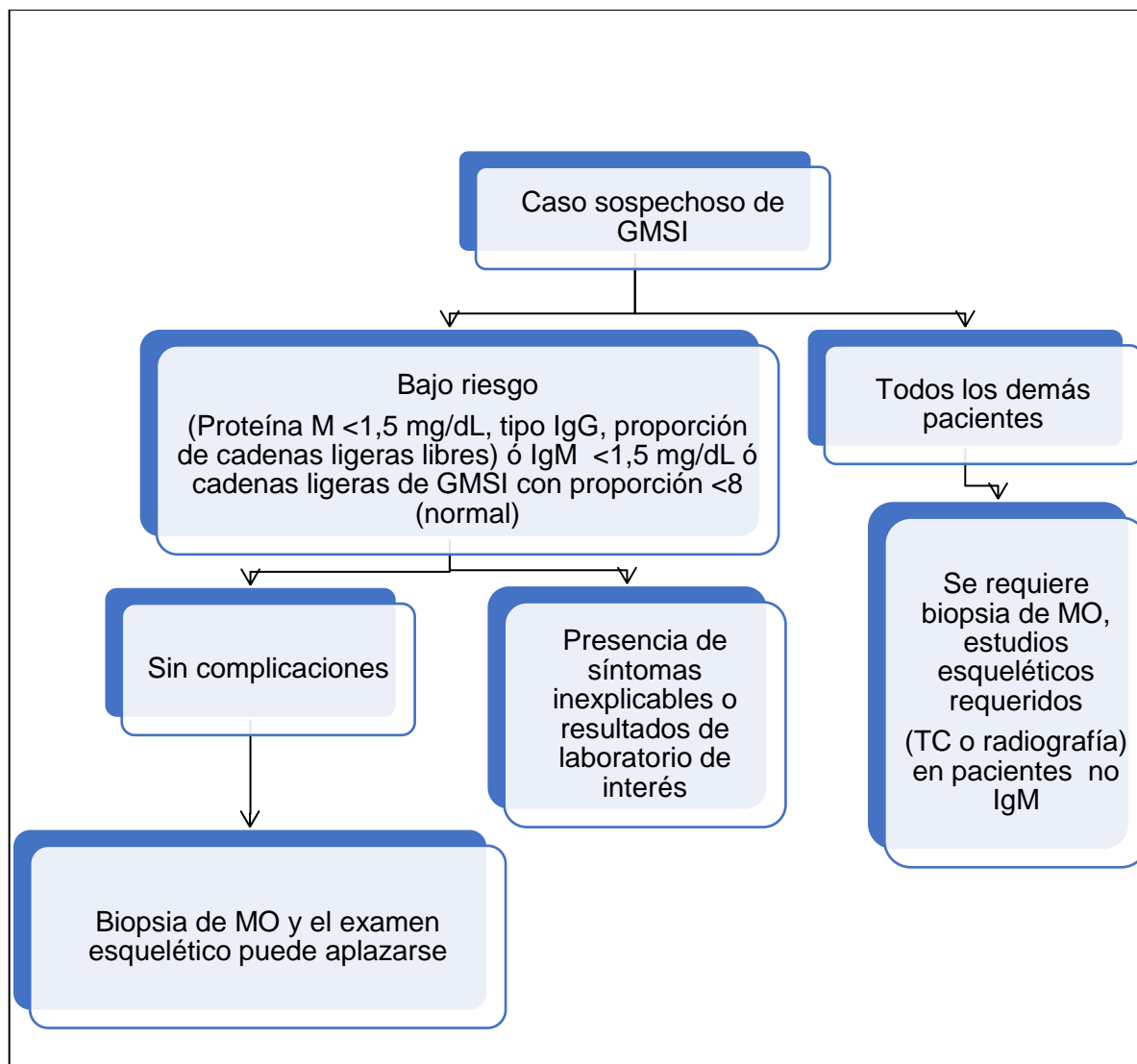


Figura 2. Algoritmo sugerido para biopsia de médula ósea e imágenes esqueléticas en pacientes con GMSI.

Elaboración propia, modificado de (Go, 2018).

Una aspiración y biopsia de médula ósea está indicada en todos los individuos con evidencia de una proteína monoclonal que además presenten cualquiera de los siguientes hallazgos considerados criterios “CRAB” y por tanto sea necesario realizar diagnóstico diferencial con MM: (Laubach, 2024)

- Anemia (hemoglobina <10 g/dL o 2 g/dL por debajo de lo normal)
- Insuficiencia renal (creatinina sérica >2 mg/dl)
- Calcio sérico elevado (calcio sérico >11,5 mg/dL)

- Anomalías en las imágenes

También está indicado para la mayoría de las personas con una proteína M  $\geq 1,5$  g/dL, personas con GMSI IgA de cualquier concentración y la mayoría de las personas con una proporción de cadenas ligeras libres séricas anormal. La toma de muestra de médula ósea se puede diferir en adultos mayores asintomáticos o en adultos mayores frágiles con esperanza de vida limitada en quienes se considera poco probable el mieloma o una neoplasia maligna relacionada. (Laubach, 2024)

En estos pacientes, una evaluación de seguimiento del nivel de proteína M en 6 meses probablemente identificará a cualquier paciente que necesite una evaluación adicional; debido a que aproximadamente el 50% de los pacientes con GMSI son de bajo riesgo, evitar las imágenes esqueléticas y la biopsia de médula ósea en estos pacientes minimizará los costos de atención médica sin afectar negativamente el resultado clínico. (Go, 2018)

Un aumento del nivel de proteína M o de relación de cadenas ligeras libres en suero debería generar preocupación por la progresión, pero se observa solo en alrededor del 50% de los pacientes con GMSI antes del diagnóstico de progresión de la enfermedad. Incluso cuando se produce un cambio, es difícil interpretarlo si no va acompañado de síntomas o alteraciones en otros parámetros de laboratorio como la hemoglobina, el calcio o la creatinina. (Go, 2018)

## Mieloma múltiple latente

### Definición

En 1980, Hyle y Greipp, dos investigadores clínicos que estudian a este grupo de afecciones clínicas, detectaron a seis pacientes que cumplían con los criterios diagnósticos de MM, pero que curiosamente no mostraron una evolución agresiva. En ese mismo año, otro investigador, Alexanian, publicó un reporte de 29 casos de características similares en pacientes con diagnóstico de mieloma localizado e indolente. En 2003, el *International Myeloma Working Group (IMWG)*, tras años de revisión de múltiples series de casos y ensayos de pacientes con evoluciones particulares de esta enfermedad, decidió clasificar a los pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple que no manifestaban un cuadro clínico habitual y que además mostraban mediante pruebas de laboratorio, células clonales

plasmáticas en la médula ósea mayores o iguales al 10% con o sin la existencia de proteína M sérica mayor o igual a 30 g/L como una nueva afección. (Lugo-Bautista, 2022)

Por tanto, por definición el mieloma latente es una condición intermedia entre GMSI y MM de tipo sintomático, caracterizada principalmente por la ausencia de síntomas. Se estima que el tiempo medio de progresión a MM sintomático es de 2 años, aunque hay pacientes que podrían no desarrollarlo nunca. (Moya, 2020)

En términos epidemiológicos, en la actualidad no existen datos mundiales concretos de incidencia y prevalencia del MM latente. La edad media de los pacientes al diagnóstico es de 67 años, aunque en otros artículos se menciona un intervalo de 50 a 70 años de edad. (Lugo-Bautista, 2022)

Como se resume en la Figura 3, el mieloma múltiple latente se diferencia de la gammapatía monoclonal de significado indeterminado según la concentración de la proteína M y el nivel de afectación de la médula ósea. Se considera una entidad premaligna separada porque el riesgo de progresión es mucho mayor que con la GMSI, especialmente durante los primeros cinco años. Como resultado, los pacientes con MM latente necesitan un seguimiento más frecuente en comparación con los pacientes con GMSI, al menos durante los primeros cinco años. (Mateos, 2023)

Por otra parte, el mieloma múltiple latente se diferencia del MM en función de la presencia de daño en el órgano terminal o en la presencia de al menos uno de estos tres biomarcadores:  $\geq 10\%$  de células plasmáticas clonales en MO, presencia de proteína monoclonal y evidencia de criterios CRAB que identifican con precisión a un subconjunto de pacientes que tienen un riesgo inminente de desarrollar daño en el órgano terminal (Tabla 2). (Mateos, 2023)

Tabla 2. Características diferenciadoras clave del MM, el MM latente y la GMSI.

Elaboración propia, modificado de (Mateos, 2023)

	<b>GMSI</b>	<b>MM latente</b>	<b>MM</b>
Células plasmáticas clonales en MO	<10%	10 a 59%	≥10% o Plasmocitoma comprobado por biopsia
Proteína monoclonal	Suero <30 g/L Orina <500 mg/24 h	Suero ≥30 g/L u orina ≥500 mg/24h	Cualquier valor
Criterios CRAB	Ninguno	Ninguno	Presente

### Diagnóstico

Según el Grupo de Trabajo Internacional sobre Mieloma (IMWG) deben cumplirse dos de estos criterios diagnósticos para el mieloma múltiple latente: (Kusumawindani, 2023)

- Proteína monoclonal sérica 30 g/L o proteína monoclonal urinaria ≥ 500 mg/24 h y/o células plasmáticas de médula ósea 10%-60%
- Sin eventos que demuestren mieloma/amiloidosis

En cuanto al manejo del mieloma múltiple latente como se muestra en la figura 3, este se puede tratar antes de que ocurra el mieloma múltiple mediante la estratificación del riesgo. Se estratifica como de riesgo bajo, medio y alto, lo cual tiene como objetivo determinar con qué frecuencia se monitorea a los pacientes con MM latente y cuándo comenzar la terapia, y una intervención más temprana para prevenir la progresión a MM activo y lograr la remisión completa. El MM latente de alto riesgo es una indicación de tratamiento. Los criterios de alto riesgo según la clínica Mayo son 20/2/20, el porcentaje de células plasmáticas en la médula ósea >20%, proteína M>2 g/dl y relación de cadenas ligeras libres >20. (Kusumawindani, 2023)

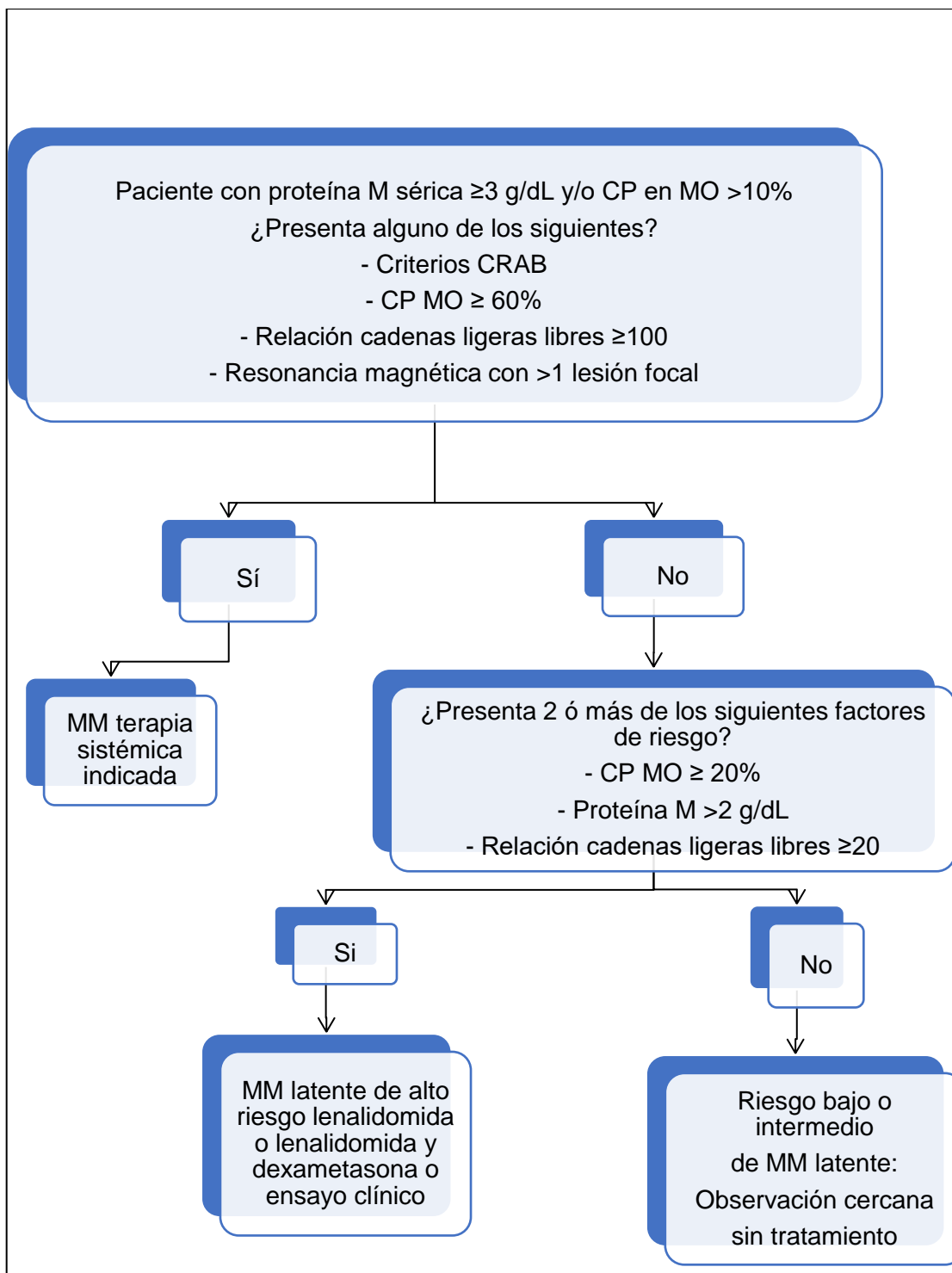


Figura 3. Manejo del mieloma múltiple latente.

Elaboración propia, modificado de: (Mateos, 2023)

CP: células plasmáticas, CRAB: acrónimo de los síntomas más comunes del mieloma múltiple (hipercalcemia, afectación renal, anemia, daño óseo)

Además, tienen más riesgo de desarrollar mieloma múltiple los casos de mieloma “*smoldering*” o latente o las GMSI que tienen >95% de células plasmáticas con fenotipo aberrante con respecto al total de células plasmáticas analizadas por citometría de flujo. (Remaggi, 2021)

Los casos de mieloma múltiple latente de alto riesgo tienen las siguientes características: mutaciones genéticas (t (4;14), del(17p), ganancia (1q), proteína M>3 g/dL, subtipo IgA, disminución de más de 1 en las concentraciones de inmunoglobulina no implicada y relación de cadenas ligeras libres >8, resonancia magnética con más de una lesión focal, infiltración a médula ósea y PET-CT con captación difusa o lesión focal, edad mayor de 65 años, más del 20% de células plasmáticas en médula ósea, más del 95% de células plasmáticas aberrantes en médula ósea y un aumento en la circulación de células plasmáticas. (Lugo-Bautista, 2022)

La mayoría de los pacientes con MM latente progresarán con una mediana de tiempo hasta la progresión de 4,8 años. Con el esquema de estratificación del riesgo (figura 3) se puede identificar a aquellos pacientes que tienen más o menos probabilidades de progresar en los próximos dos años y puede guiar la terapia. (Mateos, 2023)

Si el paciente tiene un conteo mayor o igual al 10% de células clonales plasmáticas y una concentración sérica mayor o igual a 3 g/dL de proteína monoclonal, la probabilidad de progresar a 15 años es del 87%, si las células clonales plasmáticas son mayores o igual al 10% y la proteína monoclonal menor de 3 g/dL, el riesgo a 15 años es del 70%, en cambio, si las células clonales plasmáticas son menores al 10% y la proteína monoclonal mayor o igual a 30 g/L, hay un riesgo del 39%. (Lugo-Bautista, 2022)

En el caso del MM latente de riesgo bajo o intermedio es necesaria la observación con aplazamiento del tratamiento. Un nivel claramente creciente de proteína M en el suero o en la orina sugiere que será necesario recibir terapia en un futuro próximo. Algunos pacientes con MM latente de riesgo bajo o intermedio pueden permanecer estables sin tratamiento

durante períodos prolongados y no está claro que el tratamiento con las terapias disponibles mejore los resultados. (Mateos, 2023)

Por tanto, es fundamental que los pacientes con mieloma latente tengan un seguimiento estrecho que involucre el monitoreo de la hemoglobina, la pesquisa de lesiones óseas focales y la cuantificación de la razón de las cadenas libres ya que es un biomarcador indicador de inicio de tratamiento. (Remaggi, 2021)

Es necesario prestar atención cuidadosa a la exploración de la historia médica, el examen físico, las pruebas de laboratorio y los exámenes de imágenes para diagnosticar el MM latente, considerando que a menudo se encuentra de manera coincidente entre varias manifestaciones. Además, se requiere más investigación para estudiar el tratamiento temprano en los casos de MM latente de alto riesgo para prevenir la progresión a MM activo. (Kusumawindani, 2023)

### Mieloma múltiple

En Inglaterra, entre 1844 y 1850, Samuel Solly, John Dalrymple, Henry Bence-Jones y William Macintyre protagonizaron el inicio del reconocimiento de lo que hoy llamamos mieloma múltiple. Describieron las peculiaridades clínicas, las propiedades de las proteínas de la orina y las características anatomopatológicas de esta enfermedad maligna que afecta a los huesos y los ablanda, llamada entonces enfermedad de huesos blandos o *mollities ossium*. Siguió el descubrimiento histológico por Ramón y Cajal de la célula plasmática, y a principios de 1900 Homer-Wright, al integrar todo lo anterior, y concluir que el origen celular del mieloma son las células plasmáticas malignas, se cerró la primera interrogante, planteada 50 años antes sobre el origen de los huesos reblandecidos. (Hidalgo, 2011)

### Definición

Hoy se conoce que el MM surge de la transformación maligna de las células plasmáticas post centro germinal, el origen de estas células está respaldado principalmente por la identificación de mutaciones somáticas en la región variable de los genes de inmunoglobulina, que sirven como marcador del tránsito del centro germinal. (Jevremovic, 2024)

Las células plasmáticas en el mieloma múltiple alteran la homeostasis de las células estromales y su interacción con la matriz extracelular, las citoquinas y los factores de crecimiento dentro del microambiente hematopoyético, lo que en consecuencia desencadena una señalización molecular anómala que promueve la proliferación, la supervivencia y la migración celular, al igual que la alteración de los mecanismos de autofagia, sistema ubiquitina-proteosoma y respuesta a proteínas mal plegadas, lo que influye en la resistencia a los medicamentos y la progresión de la enfermedad. (Rincón-Vásquez NJ, 2021)

Las células plasmáticas exhiben una restricción isotípica, es decir, que cada una de ellas solo puede producir un único tipo de inmunoglobulina, mientras que las células plasmáticas clonales malignas pueden además producir un exceso de cadenas ligeras kappa o lambda, que pueden ser identificadas en muestras de plasma u orina con un patrón electroforético de pico anormal. Además, en médula ósea estas células clonales pueden mostrar diversos inmunofenotipos. (Rincón-Vásquez NJ, 2021)

Morfologicamente las células plasmáticas de aspirados de MO de pacientes con MM teñidas con coloración de Wright muestran alteraciones citoplasmáticas como citoplasma abundante, pérdida del espacio del aparato de golgi y borde citoplasmático irregular, pueden observarse gránulos o vacuolas, basofilia y podrían observarse estructuras similares a cuerpos de auer que corresponden a inmunoglobulinas en forma de astillas o agujas. En el núcleo puede apreciarse una distribución irregular de cromatina, células binucleadas o multinucleadas e incluso formas aberrantes del núcleo. (Rincón-Vásquez NJ, 2021)

Como se mencionó el mieloma múltiple evoluciona a partir de una etapa premaligna asintomática de proliferación de células plasmáticas clonales denominada gammapatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI), está presente en más del 3% de la población mayor de 50 años y progresa a MM o una neoplasia maligna relacionada a una tasa del 1% por año. (Laubach, 2024)

Se diferencia del resto de discrasias de células plasmáticas principalmente por la aparición de lesiones provocadas por la infiltración de células plasmáticas en la médula ósea o por la

inmunoglobulina monoclonal, es en esta etapa de la enfermedad cuando se administra a los pacientes los tratamientos disponibles. (Moya, 2020)

El MM se clasifica según el tipo de componente monoclonal producido por el clon patológico. Lo más frecuente es que sea IgG (50-60%), seguido de IgA (30%), IgD (2%), IgM (0,5%) y raramente IgE. En un 15% de los pacientes el componente monoclonal está formado por cadenas ligeras libres. En el 1% de los casos no se detecta componente monoclonal, denominándose en este caso mieloma múltiple no secretor. (Moya, 2020)

### Presentación clínica

La mayoría de los pacientes con mieloma múltiple presentan signos o síntomas relacionados con la infiltración de células plasmáticas en el hueso u otros órganos o con daño renal por depósito de inmunoglobulinas. Si bien la presentación clínica suele ser subaguda, un pequeño porcentaje de pacientes presenta signos agudos que requieren atención e intervención rápidas. El acrónimo "CRAB" (tabla 3) se utiliza para recordar los eventos que definen el mieloma y que se utilizan en el diagnóstico como la elevación del calcio, insuficiencia renal, anemia, y daño en huesos. (Laubach, 2024)

La presentación clínica del mieloma múltiple es diversa y va más allá de las manifestaciones clínicas clásicas de dolor lumbar crónico, fracturas localizadas en huesos sometidos a una mayor exigencia mecánica (fémur o húmero), anemia (<10 g/dL), enfermedad renal crónica (creatinina sérica mayor de 2 mg/dL o aclaramiento renal menor de 40 mL/min). (Ramos-Peñafiel, 2021)

Tabla 3. Criterios diagnósticos MM según IMWG.

Elaboración propia, modificado de (Fernández Arregui, 2023).

CP: células plasmáticas, Ca: calcio, TFG: tasa de filtración glomerular, Hb: hemoglobina, PET-TC: tomografía por emisión de positrones.

<b>≥ 10% de CP en MO o una biopsia confirmatoria de plasmocitoma óseo o plasmocitoma extramedular y al menos uno de los siguientes:</b>	
<b>Criterios CRAB</b>	<b>Hipercalcemia:</b> Ca sérico > 1 mg/dL por encima del límite superior de la normalidad o >11 mg/dL.

	<p><b>Insuficiencia renal:</b> TFG &lt; 40 mL/min o creatinina sérica &gt; 2 mg/dL.</p> <p><b>Anemia:</b> descenso de Hb &gt; 2 g/dL por debajo del límite inferior de la normalidad o Hb &lt; 10 g/dL.</p> <p><b>Lesiones óseas:</b> ≥ 1 lesiones osteolíticas por radiología, TC o PET-TC.</p>
<b>Biomarcadores específicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ≥ 60% CP clonales en MO</li> <li>• Relación de cadenas ligeras libres alterada/no alterada ≥ 100</li> <li>• &gt;1 lesión focal (≥ 5 mm) por resonancia magnética</li> </ul>

### Diagnóstico

Dentro de los diferentes biomarcadores que se han adicionado a los eventos definitorios de MM se encuentran: la presencia de más de 60% de células plasmáticas clonales en MO, la presencia de cadenas ligeras libres (FLC) en suero >100 mg/L o la presencia de una o más lesiones óseas identificadas a través de una resonancia magnética. A pesar de tener todo este arsenal diagnóstico, alrededor de un 2% de los pacientes con MM no mostrarán evidencia de algún componente monoclonal detectado tanto por la electroforesis como por inmunofijación. (Ramos-Peñafilel, 2021)

Las células plasmáticas malignas de MM tienen una baja tasa de proliferación y, en general, no se ha podido mantener el crecimiento tumoral *in vivo*, lo que sugiere que las células precursoras son responsables de la proliferación de la población de células malignas. Se ha propuesto que estas células B precursoras anormales se originan en los ganglios linfáticos y migran a la médula ósea, lo que proporciona un microambiente propicio para la diferenciación de las células plasmáticas terminales. (Jevremovic, 2024; Jevremovic, 2024)

Para confirmar el diagnóstico de mieloma se debe demostrar un fenotipo o una monoclonalidad aberrante de las células plasmáticas, los estudios citogenéticos mediante FISH y la beta-2-microglobulina y de albúminas séricas son de gran utilidad para establecer el pronóstico del paciente; otros métodos como la resonancia magnética permiten evaluar el patrón de afectación, y determinar enfermedad oculta y plasmocitomas. (Segura, M. K. Á., Oquendo, E. R. L., Barrera, C. J. C., & Sánchez, M. V. C., 2020)

La CMF es la herramienta diagnóstica fundamental para diferenciar entre células plasmáticas reactivas y las neoplásicas. La CMF representa una parte integral en la

evaluación paraclínica y el manejo de diferentes neoplasias hematológicas, entre ellas el MM, y es fundamental en el diagnóstico, clasificación, estadificación pronóstica y seguimiento terapéutico de estas malignidades. El estudio de la médula ósea permite la inmunofenotipificación por medio de la citometría de flujo para la identificación de: relación k/λ citoplasmáticas, CD38, CD138, CD56, CD45, CD19, CD20, CD117, CD27, CD28 y CD81. (Martínez SLM, 2018)

La identificación se realiza por medio de los marcadores CD38+ y CD138+, mientras que para la diferenciación de células plasmáticas normales de las malignas se utilizan los marcadores de superficie CD19 y CD45, las normales como se muestra en el cuadro 4, tienen una alta expresión en la mayoría de las células, aunque el patrón sea heterogéneo, mientras que las células malignas carecen de estos antígenos o los expresan en muy baja intensidad. Por el contrario, las células plasmáticas normales no expresan los antígenos CD56 y CD117 o lo hacen muy débilmente; mientras que las células plasmáticas malignas pueden expresarlos. (Martínez SLM, 2018)

Tabla 4. Fenotipo habitual de las células plasmáticas normales.

Elaboración propia, modificado de (Peña-Celaya, 2020)

<b>Marcador</b>	<b>Expresión</b>
CD38	++
CD138	+
CD19	+
CD45	+
CD56	-
cyIgk/cyIgl	Policlonal
B2 microglobulina	+
CD81	+
CD117	-
CD27	+
CD28	-

Si hay dudas sobre la diferenciación de GMSI/MM latente de MM y si se debe iniciar el tratamiento, se debe reevaluar en dos o tres meses. Es importante destacar que, para que

se considere un criterio para el diagnóstico de MM, el daño del órgano terminal debe deberse al trastorno de las células plasmáticas. (Mateos, 2023)

La clonalidad de las células plasmáticas se establece también utilizando el cociente  $\kappa/\lambda$ , cuyo valor normal es de 0,26 a 1,65. En el mieloma múltiple y las gammapatías monoclonales esta relación es anormal, donde una relación menor a 1:2, con un promedio menor de 0,26, es indicativa de una población clonal con cadenas livianas  $\lambda$ , mientras que si la relación es mayor de 4:1, con un promedio mayor de 1,65, indica la presencia de una población clonal con cadenas livianas  $\kappa$ . (Rincón-Vásquez NJ, 2021)

### Epidemiología, etiopatogenia y factores asociados a la enfermedad

Se desconoce la etiología del MM, sin embargo, en algunos estudios se pone de manifiesto la posibilidad de que determinados elementos influyan en mayor o menor medida en la aparición de la enfermedad. Los factores de riesgo identificados son: (Moya, 2020)

- Edad: la incidencia de MM aumenta con la edad desde 1,7% en personas de entre 50-59 años a más de un 5% en personas mayores de 70 años.
- Sexo: generalmente se manifiesta con mayor frecuencia entre los hombres, aunque la diferencia es relativamente pequeña entre ambos sexos. La incidencia de la enfermedad es 1,5 veces superior en hombres que en mujeres.
- Raza: en los Estados Unidos, el MM se presenta en las personas de la raza negra con una frecuencia mayor al doble de la que se da en personas de raza blanca.
- Obesidad: personas con ratios elevados de índice de masa corporal (IMC) son entre 1,5-2,0 veces más propensas a desarrollar MM en comparación con personas con rangos regulares.
- Antecedentes familiares: habitualmente, individuos que tienen familiares de primer grado que hayan sufrido MM tienen al menos el doble de riesgo de desarrollar GMSI en comparación con el resto de la población general. Tener un familiar directo que sufre MM multiplica por cuatro el riesgo de padecer la enfermedad. Aun así, la mayoría de los pacientes no tiene familiares afectados por esta enfermedad. Por lo tanto, este factor de riesgo representa sólo un pequeño número de casos.
- Factores medioambientales: la exposición a dosis elevadas de radiación, insecticidas, pesticidas, disolventes orgánicos o benceno, aumenta el riesgo de padecer la enfermedad.

- Anomalías citogenéticas: el MM se asocia con una serie de anomalías citogenéticas presentes en el 75% del total de pacientes. Muchas de ellas se presentan en forma de translocaciones de los genes de las inmunoglobulinas. La proporción de pacientes que presenta este tipo de anomalía es del 5% en aquellos que padecen de tipo GMSI. En el 25% en los pacientes con MM sintomático se trata de alteraciones citogenéticas de mal pronóstico. Las alteraciones que aparecen en las células plasmáticas normales lo hacen de manera secuencial hasta convertirse en tumorales. Se piensa que ocurren dos tipos de eventos:
  - Translocaciones primarias: responsables de la yuxtaposición de un oncogen y el gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgH). Se originarían a partir de errores durante el proceso fisiológico de recombinación del ADN e implicarían a las ciclinas (D1, D3 y D5; 25%), a genes codificados en 4p16 (MMSET y FGFR3; 15%) y a factores de transcripción (C-maf y maf-B; 10%)
  - Eventos secundarios: debidos a la inestabilidad cariotípica, deleciones (retinoblastoma) o mutaciones (ras) génicas y de nuevo otras translocaciones que afectarían a genes diferentes del locus de las inmunoglobulinas o de 14q32 (c-myc) (50% de MM avanzado).

### Tratamiento

Los pacientes con MM no se curan con la terapia convencional. El tratamiento alivia los síntomas, revierte las citopenias y disminuye el daño a los órganos, y tiene como objetivo lograr una respuesta sostenida, mejorar la calidad de vida y prolongar la supervivencia general. (Laubach, 2024)

La terapia depende de aspectos como la etapa de la enfermedad, la edad y el estado general de salud del paciente y consiste principalmente en quimioterapia, radioterapia y regímenes de inmunoterapia, incluido el trasplante autólogo, que tienen como objetivo controlar y suprimir la progresión de la enfermedad. (Alarcón-Payer, 2022)

### Tratamiento farmacológico

Tiene como objetivo principal la disminución de la concentración de células plasmáticas anormales. Está dirigido hacia la reducción de la proteína monoclonal, el control de los síntomas CRAB, la prolongación de la supervivencia del paciente y la prevención de las

recaídas, la mejora en la calidad de vida y el mantenimiento de la respuesta farmacológica. Se describen a continuación los diferentes grupos farmacológicos:

- **Quimioterapia:**

Destruye aquellas células de crecimiento rápido como las células del mieloma, sin diferenciar entre células sanas y células cancerosas. Se utiliza el melfalán, por ser un agente alquilante que actúa sobre las enzimas y sustratos que participan en la síntesis del ADN, inhibiendo la replicación celular.

- **Inmunoterapia:**

Consiste en la utilización del sistema inmune del paciente para prevenir y controlar la propagación de células cancerosas y erradicar la patología. Los anticuerpos monoclonales son la principal forma de presentación, cuya diana de acción es el receptor CD38 debido a que su expresión se ve aumentada en las células tumorales. Destaca el uso de daratumumab e isatuximab, los cuales son utilizados en función de la etapa en la que se encuentre el paciente. También, se utilizan fármacos inmunosupresores como la lenalidomida, la talidomida o la pomalidomida, actuando como agentes inhibidores del sistema inmune, dicho mecanismo provoca el bloqueo de la proliferación de las células hematopoyéticas tumorales.

- **Terapia dirigida:**

Es utilizada por su selectividad, interfiriendo así en la base molecular de la enfermedad de manera que las dianas reconocidas son específicas del proceso patológico o cuyo efecto es más sensible. Son utilizados diferentes fármacos como el bortezomib o el carfilzomib que actúan de manera inhibitoria del proteosoma, obteniendo como resultado, un efecto antiproliferativo y antiapoptótico en los tumores hematológicos.

Junto con las citadas terapias se instaura el tratamiento coadyuvante con la dexametasona, utilizada para prevenir los vómitos y náuseas provocados por la terapia antineoplásica.

La quimioterapia de inducción se administra durante tres a seis meses en ciclos antes de la recolección de células madre para reducir la cantidad de células tumorales en la médula ósea y la sangre periférica, disminuir los síntomas y revertir el daño a los órganos terminales. El régimen utilizado depende de la estratificación del riesgo, las condiciones comórbidas y los recursos disponibles, y limita la exposición a agentes que pueden perjudicar la recolección de células madre o dañarlas. No existe un régimen de inducción único preferido y diferentes expertos utilizan regímenes diferentes. (Laubach, 2024)

Existen diversas indicaciones terapéuticas aprobadas por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para el tratamiento del MM, basadas en diferentes combinaciones de fármacos, como talidomida, bortezomib y lenalidomida. Las indicaciones europeas en práctica clínica se basan en diversas estrategias como talidomida con melfalán y prednisona; bortezomib en monoterapia o con melfalán y prednisona; lenalidomida con dexametasona, entre otras. (Alarcón-Payer, 2022)

Para la terapia inicial el tipo de tratamiento administrado difiere en función de la edad del paciente, estratificándose en dos grupos, mayores de 65 años y menores de 65 años. Se basa en combinaciones de inmunoterapia, terapia dirigida y quimioterapia junto con corticoides. Para los pacientes mayores de 65 años: (Torrejón Serrano, 2023)

- Daratumumab + Bortezomib + Melfalán + Prednisona (Dara-VMP).
- Daratumumab + Lenalidomida + Dexametasona (Dara-Rd).
- Bortezomib + Lenalidomida + Dexametasona (VRD).

Para los pacientes menores de 65 años: (Torrejón Serrano, 2023)

- Bortezomib + Lenalidomida + Dexametasona (VRD).
- Daratumumab + Bortezomib + Talidomida + Dexametasona (Dara-VTP)

La terapia de mantenimiento hace referencia al tratamiento continuo después de la terapia inicial, cuyo objetivo es prolongar la remisión y prevenir la recaída de la enfermedad. La lenalidomida y la combinación de lenalidomida + bortezomib son los tratamientos de elección. (Torrejón Serrano, 2023)

Para la terapia de refractariedad los pacientes son estratificados, en primer lugar, en función de si son refractarios o no a lenalidomida, y, en segundo lugar, en función de su refractariedad al daratumumab. Aquellos pacientes que no son refractarios a la lenalidomida o que no se les ha administrado previamente, la elección sería un régimen de tripletes compuesto por: (Torrejón Serrano, 2023)

- Daratumumab + Lenalidomida+ Dexametasona (Dara-Rd)
- Carfilzomib + Lenalidomida + Dexametasona (KRD).

En contraposición, aquellos pacientes que son refractarios al tratamiento de lenalidomida la opción sería combinaciones en ausencia de lenalidomida: (Torrejón Serrano, 2023)

- Isatuximab + Carfilzomib + Dexametasona (Isa-Kd).
- Carfilzomib + Dexametasona (Kd).
- Daratumumab + Bortezomib + Dexametasona (Dara-Vd).
- Isatuximab + Pomalidomida + Dexametasona (Isa-Pd).
- Pomalidomida + Bortezomib + Dexametasona (PVd).

La mayoría de los pacientes con MM tendrán una respuesta inicial al tratamiento. Sin embargo, el MM recaerá. Además, una minoría tendrá una enfermedad refractaria primaria que no responde al tratamiento inicial. La progresión generalmente se identifica por un aumento de la proteína monoclonal en el suero o la orina o en la proporción de cadenas ligeras libres en suero. El tratamiento para la enfermedad recidivante está indicado si hay una recaída clínica, enfermedad extramedular o un aumento rápido de las paraproteínas. (Laubach, 2024)

En caso de recaída se debe identificar si se trata de una enfermedad agresiva según la estratificación del riesgo, para ello la duración de la respuesta inicial al tratamiento es importante ya que se considera que los pacientes que recaen menos de 12 meses después de la terapia de primera línea o que recaen con dosis completas de la terapia de primera línea tienen una enfermedad agresiva. (Laubach, 2024)

Los pacientes con enfermedad agresiva en el momento de la recaída se tratan mejor con un régimen de quimioterapia con múltiples agentes, estos son los pacientes que tendrán menos probabilidades de responder a las terapias convencionales y probablemente requieran un tratamiento más intensivo, que puede incluir terapia de mantenimiento prolongada, terapia de combinación de múltiples agentes, trasplante autólogo de células hematopoyéticas o CAR-T cells, si está disponible. (Laubach, 2024)

En la práctica clínica actual los posibles tratamientos de MM en recaída incluyen casi siempre combinaciones de los siguientes fármacos: lenalidomida, bortezomib, dexametasona, prednisona, doxorubicina, talidomida, melfalan, ciclofosfamida, bendamustina, pomalidomida, daratumumab y carfilzomib. (Alarcón-Payer, 2022)

### *Trasplante de células hematopoyéticas*

Para los pacientes elegibles para un trasplante autólogo de células hematopoyéticas (TCH) debe analizarse la posibilidad, la función del TCH y el momento ideal. El TCH puede incorporarse a la terapia inicial (TCH temprano) o diferirse hasta la primera recaída (TCH retrasado). El momento se individualiza teniendo en cuenta la edad, la estratificación del riesgo, la respuesta y la tolerabilidad de la quimioterapia inicial, las opciones de tratamiento en caso de recaída, los factores logísticos y las preferencias del paciente. Los pacientes que no son elegibles para o sin acceso al trasplante autólogo son tratados con 8 a 12 meses de quimioterapia de inducción seguida de mantenimiento hasta progresión o toxicidad inaceptable. (Laubach, 2024)

En la terapia de intensificación el trasplante autólogo de médula ósea es una opción para aquellos pacientes que tras la terapia inicial persisten los síntomas CRAB. No tiene un efecto curativo, pero provoca el retraso de la progresión de la enfermedad. Para considerar como candidato a un paciente, debe tener menos de 65 años y no presentar contraindicaciones como padecer cirrosis hepática, infecciones y hepatopatías. (Torrejón Serrano, 2023)

Las células madre infundidas en los pacientes provienen de sangre periférica, la movilización de células CD34 positivas de MO a sangre periférica se logra mediante el uso de factores de crecimiento en monoterapia, junto con plerixafor, el cual es un antagonista de CXCR4 que mejora la movilización, o con quimioterapia, a este último procedimiento se le conoce como quimio-movilización. En general, el uso de factores de crecimiento en monoterapia con recolección de células madre a través de aféresis es bien tolerado y es el método más utilizado. (Miranda Rojas, 2020)

El mínimo de células madre en sangre periférica requerido para un trasplante autólogo de médula ósea es  $2 \times 10^6$  células CD34+/kg y lo ideal es  $3-5 \times 10^6$  células CD34+/kg. Monitorear el conteo de células madre en sangre periférica previo a la recolección permite identificar pacientes en riesgo de fallo de movilización que se beneficiarían de plerixafor para favorecer más esa movilización de células CD34+. (Miranda Rojas, 2020)

Antes del trasplante, se recolectan las células madre del paciente, se administra una terapia de intensificación con melfalán con el objetivo de eliminar todas las células plasmáticas y, por último, se procede al trasplante. Una vez realizado, se valora la posibilidad de

administrar varios ciclos de la terapia de inducción utilizada anteriormente. Con la terapia inicial se consigue una disminución de células tumorales, lo que conlleva a que en el periodo de recolección de células madre, las células recogidas sean sanas y no tumorales. En aquellos pacientes que son candidatos, se debe evitar el uso del melfalán como terapia inicial debido a que aumenta el riesgo de mielodisplasia posterior a la intervención. (Torrejón Serrano, 2023)

En comparación con la quimioterapia sola, las estrategias de tratamiento que incorporan el trasplante de células hematopoyéticas autólogo dan como resultado: (Laubach, 2024)

- Supervivencia libre de progresión (SSP) superior, con una mejora en la mediana de SSP >20 meses
- Toxicidad manejable a corto plazo con una baja mortalidad sin recaída
- Tasas generales similares de segundas neoplasias malignas primarias y un aumento de las neoplasias malignas mieloides

Por otra parte, el trasplante alogénico de células hematopoyéticas se reporta en la literatura como una opción potencialmente curativa en pacientes con MM y factores de mal pronóstico. Sin embargo, la mortalidad asociada al procedimiento, especialmente relacionada a la enfermedad injerto contra huésped y la alta tasa de recaídas tras el alo-TCH, hacen que esta estrategia terapéutica esté sometida a continuo debate. (Pera, 2018)

#### Importancia del MM en salud pública

Los estudios muestran un aumento global en la incidencia de la enfermedad, hasta en un 126% entre 1990 y 2016. Las regiones con las tasas más altas de MM incluyen Asia, América del Norte y Europa del Este. En el caso de Centroamérica y el Caribe, los especialistas médicos también han observado un aumento de casos, las causas de este aumento se desconocen, pero en general se atribuyen a mejores métodos de diagnóstico, al aumento de expertos en la enfermedad y una mayor capacidad entre los médicos generales y otros especialistas para identificar sus signos y síntomas, lo que lleva a la detección de un mayor número de casos. (Pimentel, 2022)

La carga de disfunción orgánica al diagnóstico hace del MM una condición de interés clínico y de alto impacto en salud pública, destacando su heterogénea presentación clínica, bioquímica y el ser una enfermedad incurable. Lo anterior sumado a que en los últimos

años se ha visto un importante aumento en la población adulta mayor, y tomando en cuenta que la incidencia de la enfermedad aumenta con la edad, es esperable que se vea un aumento gradual en la incidencia de pacientes con esta enfermedad. (Vargas Fallas, 2020)

Las consecuencias económicas del MM afectan tanto a los pacientes como a los sistemas de salud. En algunos países de la región, los pacientes tienen altos costos económicos debido a una financiación y cobertura de atención médica insuficientes; en el caso de Costa Rica, aunque cuenta con un sistema de salud solidario y equitativo, el acceso a la atención médica puede ser lento e insuficiente en algunos casos; y además el tratamiento genera una mayor demanda y costos al sistema de salud. (Pimentel, 2022)

Aunque no hay información disponible sobre la carga económica de la enfermedad en Centroamérica y el Caribe, los expertos creen que es alta, particularmente entre los pacientes más jóvenes obligados a abandonar sus trabajos y perder su capacidad de contribuir a sus hogares. Además, los pacientes con MM requieren períodos prolongados de hospitalización, lo que genera costos sustanciales para los pacientes y los sistemas de salud. (Pimentel, 2022)

Además, los problemas físicos y psicológicos asociados a la enfermedad tienen efectos sobre la funcionalidad y productividad de los pacientes con MM, lo cual afecta directamente la productividad nacional y el desarrollo económico. (Pimentel, 2022)

En general, en cuanto a la valoración del impacto de la enfermedad en las actividades básicas de la vida diaria del paciente con mieloma múltiple se evidencia que usualmente hay una dependencia leve para las actividades básicas como bañarse, vestirse, alimentarse y una mayor afectación en cuanto a las actividades instrumentales. (Vargas Fallas, 2020)

#### Datos de MM en Costa Rica y la región

El MM en Costa Rica es una neoplasia prevalente; sin embargo, de momento no se cuenta con bases de datos nacionales actualizadas con la información de estos pacientes, que permitan conocer la incidencia, el estado del paciente (vivo o fallecido) y los protocolos de tratamiento utilizados. En general, se desconoce la realidad de estos pacientes en nuestro medio. (Miranda Rojas, 2020)

Existe un estudio del 2020 que describe las características epidemiológicas, clínicas y de respuesta a tratamiento de una muestra de 37 pacientes con mieloma múltiple que recibieron trasplante de medula ósea autólogo en el Hospital San Juan de Dios, entre el 2012 y el 2016, sin embargo, existen diversos sesgos que repercuten en el análisis, la interpretación y la discusión de los datos; entre ellos la selección de la población, ya que se trató de pacientes previamente seleccionados por su elegibilidad a trasplante de médula ósea los cuales no corresponden a todos los pacientes diagnosticados con MM dentro del período de estudio. (Miranda Rojas, 2020)

A continuación, se resumen algunas de los resultados o conclusiones de las autoras al comparar sus hallazgos con los datos de estudios reportados en la literatura:

- En cuanto a las características demográficas de la población en estudio, la distribución de sexo confirma lo reportado en otros estudios; el diagnóstico predomina en hombres, y según estadísticas de la OMS en Centroamérica la relación hombre: mujer es de 1.4:1, también cercano a los resultados obtenidos. (Miranda Rojas, 2020)
- Con respecto a la distribución geográfica, la mayoría de los pacientes proviene de la provincia de San José, correspondiente al área con mayor densidad poblacional del país. Cabe destacar la cantidad menor de pacientes trasplantados en otras provincias, entre ellas la provincia de Limón, donde se encuentra una gran parte de la población afrodescendiente del país y según la literatura el MM es 2 veces más frecuente en dicha población, lo cual podría deberse a un menor acceso a servicios de salud en esas zonas. Sin embargo, no existe una estadística nacional sobre las características epidemiológicas de los pacientes diagnosticados con MM, que permita comparar la incidencia, así como los motivos por los cuales algunos pacientes diagnosticados, provenientes de otras zonas del país, se trasplantan menos. (Miranda Rojas, 2020)
- Al igual que lo descrito en la literatura, el estudio demuestra que la incidencia de MM aumenta conforme envejece la población; y con respecto a las características clínicas el tipo de MM más frecuente es IgG kappa. (Miranda Rojas, 2020)

- En relación con las características clínicas y de laboratorio evaluadas en este estudio, todos los parámetros del CRAB fueron solicitados al diagnóstico. Es frecuente encontrar en los pacientes con MM síndromes anémicos y lesiones líticas, lo cual pudo corroborarse en el estudio. En cuanto a síndromes anémicos, el nivel de hemoglobina promedio en los pacientes que al diagnóstico debutaron con anemia, fue de 7,9 g/dL. (Miranda Rojas, 2020)
- El promedio de edad al momento del diagnóstico de los pacientes trasplantados por MM, fue de 53,5 años, con un rango de edad de entre 27 y 72 años. Por grupos de edad, la mayoría de los pacientes tenía entre 50 y 65 años, para un total de 21 pacientes. La moda de la población con respecto a edad fue de 60 años. (Miranda Rojas, 2020)
- La mediana de sobrevida libre de progresión según el estudio fue 43,6 meses y la mediana de sobrevida global no se alcanzó al finalizar el estudio. La sobrevida libre de progresión y sobrevida global a 5 años fue de un 42% y 65%, respectivamente. Comparativamente con los resultados descritos en la literatura mundial, la sobrevida global fue del 73% a 4 años, lo cual es solo discretamente inferior a lo reportado en las últimas revisiones de MM. Sin embargo, si se compara con la última publicación de seguimiento a largo plazo de pacientes tratados con tripletas como VRD en países con más recursos, si es francamente inferior con una mediana de sobrevida libre de progresión de 65 meses y de sobrevida global de 126 meses. (Miranda Rojas, 2020)

La naturaleza retrospectiva de este estudio publicado en el 2020, el reducido número de pacientes en cada grupo y los criterios de selección pueden conferir sesgos al interpretar resultados a largo plazo, sin embargo, la importancia de ese estudio radica en conocer los resultados obtenidos por pacientes llevados a trasplante de MO en el sistema de salud público costarricense. (Miranda Rojas, 2020)

En otro estudio realizado en Costa Rica con adultos mayores atendidos en el Hospital Nacional de Geriátrica y Gerontología, durante el periodo de enero del 2010 a enero del 2019 se encontró que, del total de los 41 casos analizados, la media de edad al momento del diagnóstico fue de 77,6 años (DE: 8,4), la distribución según grupos de edad, evidenció que

el grupo con mayor frecuencia de casos se encuentra entre los 75 a los 85 años los cuales corresponden al 46,3%, seguido del grupo de edad de 60 a 74 años que son el 31,7%. Por último, la distribución según sexo evidenció que el masculino fue el que presenta con mayor frecuencia este diagnóstico y corresponde al 61,0%. (Vargas Fallas, 2020)

Otra publicación del 2022 titulada *“Declaración de consenso: Importancia del acceso oportuno al diagnóstico y tratamiento del mieloma múltiple en Centroamérica y el Caribe”* en la que participa el Doctor Fabián Jiménez quien es médico hematólogo en el Hospital San Juan de Dios, describe la situación actual del MM en las regiones de Centroamérica y el Caribe, destacando las principales barreras y desafíos, e incluye recomendaciones consensuadas sobre estrategias para reducir la carga de enfermedad y mejorar la calidad de vida de los pacientes. (Pimentel, 2022)

En cuanto a incidencia, prevalencia y carga de morbilidad el grupo de expertos reporta los siguientes datos:

- En 2020, el Observatorio Mundial del Cáncer informó que la incidencia global de MM era de 1,8 casos por cada 100.000 personas. En el Caribe, la incidencia fue de 2,3 con una tasa de mortalidad de 1,7 por 100.000; en Centroamérica, fue de 1,6 con una mortalidad de 1,1. (Pimentel, 2022)
- La incidencia aumenta progresivamente con la edad, alcanzando su punto máximo entre los pacientes de entre 50 y 70 años. La enfermedad es ligeramente más común entre hombres que entre mujeres, y los hombres afroamericanos y afrocaribeños corren mayor riesgo que sus homólogos caucásicos, japoneses e hispanos. (Pimentel, 2022)
- La carga de enfermedad del MM en Centroamérica y el Caribe es difícil de cuantificar debido a la limitada recopilación de datos, la ausencia de registros estandarizados de pacientes y su exclusión de las listas de enfermedades de declaración obligatoria. (Pimentel, 2022)
- El dolor de huesos es el síntoma más frecuente y afecta al 60-80% de los pacientes en el momento del diagnóstico. También puede causar dolor espinal, pérdida de apetito o pérdida de peso, fatiga, debilidad en las piernas, náuseas, estreñimiento y dolor abdominal. (Pimentel, 2022)
- Los médicos informan que hasta el 50% de los pacientes presentan anemia moderada. La función renal deteriorada puede causar problemas renales en

aproximadamente el 25-30% de los pacientes, las infecciones son la principal causa de mortalidad por MM. (Pimentel, 2022)

Si bien no existen datos rigurosos sobre la incidencia real del MM en la región, se cree que la prevalencia de la enfermedad en Centroamérica y el Caribe ha aumentado progresivamente debido, en gran parte, a una mayor conciencia entre los médicos de otras especialidades, pero la conciencia pública general sobre el MM sigue siendo baja ya que el MM tiene poca visibilidad, tal vez debido a la complejidad de la enfermedad y la falta de estadísticas confiables sobre su prevalencia. (Pimentel, 2022)

## CAPÍTULO II: Citometría de flujo

### Antecedentes de la Citometría de Flujo

El primer esbozo del Citómetro de Flujo se puede inferir del trabajo de Andrew Moldavan llamado "Photo-electric technique for the counting of microscopical cells" de año 1934 el autor mostró como contar los glóbulos rojos a través de un tubo capilar valiéndose de un sensor fotoeléctrico y así introduce el concepto de "contar células".(Shapiro, 2004)

En la década de los años 50, se diseñaron instrumentos para contar las poblaciones celulares sanguíneas, en un flujo líquido, diferenciando el tamaño celular basándose en el método de impedancia eléctrica en el que cada célula que atraviesa "el orificio" produce cambios en la resistencia y genera un pulso eléctrico, y ese número de pulsos equivale al número de partículas.(Shapiro, 2004)

La empresa Becton Dickinson para el año 1968 había producido un analizador que llamaron el FACScan equipado con una computadora construida por Hewlett-Packard que pocos años después el sistema informático fue reemplazado por Macintosh-Apple. La lámpara de ARCO fue una de las primeras fuentes de luz empleadas en el CF la luz monocromática que es seleccionada por el operador de acuerdo a lo que corresponda utilizar, excitaba a las células que habían sido marcadas previamente con un determinado fluorocromo, esa emisión de luz es medida y en consecuencia es cuantificable. Es así como Dittrich y Gohde por primera vez miden la fluorescencia emitida por las partículas suspendidas en un flujo líquido y de esta forma se pudo estudiar más de una característica de la célula al emplear más de un fluorocromo y se introdujeron otras fuentes de luz.(Shapiro, 2004)

En los años 70 fue desarrollada la técnica para crear anticuerpos con idéntica estructura química que se conocieron como los anticuerpos monoclonales, gracias a Georges J.F. Kohler de Alemania y C. Milstein de Argentina lo que les permitió ganar junto a Neils K Jerne el Premio Nobel 1984. Estos anticuerpos monoclonales son anticuerpos homogéneos producidos por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral. Todos los clones proceden de una sola célula madre y los anticuerpos monoclonales reconocen

específicamente “un antígeno”. Además, los investigadores cedieron absolutamente todo el fruto del descubrimiento, así como la técnica para producir los anticuerpos y de esta forma hoy los estudios en Citometría de Flujo, en el campo de las ciencias médicas están íntimamente relacionados con el área de la inmunología. (Shapiro, 2004)

Los anticuerpos monoclonales se conjugaron con fluorocromos y fue posible diferenciar poblaciones celulares y cuantificarlas. Su empleo permitió diferenciar células B, T y sus subpoblaciones, monocitos, polimorfonucleares (eosinófilos, basófilos, neutrófilos), así como detectar células aberrantes en sangre entera, sin requerir un proceso de purificación, iniciando así el camino para el diagnóstico de células tumorales.(Shapiro, 2004)

### Principio de la Citometría de Flujo

La citometría de flujo es un pilar en la inmunofenotipificación necesaria para el diagnóstico y el monitoreo de la mayoría de las neoplasias hematológicas, ya que, junto con la clínica del paciente, análisis de laboratorio habituales, técnicas de biología molecular y evaluación morfológica de la sangre, es un estudio inicial que aporta resultados concluyentes en poco tiempo, permitiendo un abordaje oportuno de la enfermedad. (Martínez SLM, 2018)

La CMF se basa en la conjugación de marcadores fluorescentes con anticuerpos monoclonales o policlonales haciendo posible la identificación de subpoblaciones celulares, es un método analítico que permite una medición rápida y cuantitativa de múltiples parámetros en las células individuales que se encuentren en suspensión. (Patiño Uriostegui, L. N., & Velazquez Cruz, R., 2022)

Los fluorocromos utilizados son moléculas químicas que absorben la luz a una determinada longitud de onda con una energía determinada, para posteriormente emitir a una longitud de onda superior de menor energía, lo que permite clasificarlos según sus espectros de excitación y emisión. (Mogorrón, 2022)

El procedimiento implica que estas células en suspensión sean dirigidas a un espacio físico en el equipo que es el sitio en el cual el láser o láseres inciden sobre las células, lo que provoca la dispersión de la luz en varias direcciones y brinda información sobre el tamaño y complejidad relativas de las células; el sistema óptico del equipo capta esa fluorescencia

emitida por estas, y brinda información sobre la expresión o no de los marcadores. Por último, todas las señales emitidas son recolectadas y transformadas en valores que pueden ser analizados e interpretadas por los usuarios de manera sencilla gracias a un software especializado que sirve de interfaz entre el equipo y el analista. (Mogorrón, 2022)

### Citometría de flujo de primera generación y su aplicación en el mieloma múltiple

A pesar del desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento dirigidas, el mieloma múltiple sigue siendo incurable. Los pacientes tienen una mediana de supervivencia de 3 a 4 años. Sin embargo, la enfermedad es biológicamente diversa y existe una variación significativa en el tiempo de supervivencia de los pacientes, algunos pacientes sobreviven de 7 a 10 años o más, lo que ha permitido reconocer una serie de factores pronósticos como por ejemplo los niveles de  $\beta$ 2-microglobulina y albúmina que utiliza el Sistema Internacional de Estadiaje (ISS). (Nowakowski, 2005)

El rápido desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y terapias combinadas que implican administración simultánea y sincrónica de varios medicamentos para el tratamiento del MM, debe ir de la mano con el uso de factores pronóstico accesibles y bien validados para verificar su eficacia y permitir una adecuada estratificación del riesgo previo al inicio de la terapia de forma que su administración al paciente sea lo más personalizada posible, por lo que tecnologías como la citometría de flujo deben estar fácilmente disponibles. (Nowakowski, 2005)

La tecnología de citometría de flujo de primera generación, que se implementó hace dos décadas utilizando combinaciones de 4 fluorocromos y adquisición de al menos entre  $2 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  células, permitió realizar los primeros estudios de detección de enfermedad medible residual en MO, alcanzando una sensibilidad de una célula patológica en  $10^4$  células totales en el caso del mieloma múltiple. (Arana Berganza, 2021)

Esta técnica de citometría de flujo ofrece ventajas con respecto a otras formas diagnósticas, ya que permite evidenciar si existe clonalidad de las células plasmáticas, además es un método que se puede aplicar en más del 90% de los casos y en comparación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras técnicas moleculares, tiene menor costo y es más rápida; además de tener reproducibilidad y una alta sensibilidad. Por lo anterior,

la citometría de flujo desde sus inicios es una prueba importante para realizar el diagnóstico diferencial y clasificar el desorden de las células plasmáticas, además para estratificar la enfermedad como GMSI y MM y monitorear la enfermedad medible residual. (Martínez SLM, 2018)

Entendiendo la enfermedad medible residual en MM como el método para detectar células patológicas, no detectables por metodologías convencionales, según los criterios de EMR del IMWG se considera una EMR negativa, en el caso de la citometría de flujo cuando se demuestra la enfermedad no detectable con sensibilidad  $10^{-5}$ . (Fernández Arregui, 2023)

La evaluación de EMR se usa, como ya se mencionó, para proporcionar una metodología semicuantitativa para establecer si se logra o no un estado de remisión profundo y la evaluación del riesgo de recaída después de la remisión, permitiendo identificar la posibilidad de una recaída inminente para permitir una intervención temprana y como criterio de valoración sustituto para acelerar las pruebas y la aprobación de fármacos. (Herlein, 2017)

### Citometría de flujo de nueva generación

En 2017, el consorcio EuroFlow publicó el artículo *“Next generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma”*, una propuesta de modificación sustancial a la citometría de flujo convencional, lo que permitió a los investigadores avanzar y empezar a hacer análisis de nueva generación en pacientes con MM. (Prieto, 2024)

En este estudio se analizó un total de 375 muestras de MO y 10 muestras de sangre periférica anticoaguladas con EDTA de 53 controles y 332 pacientes con trastorno de células plasmáticas, se comparó el rendimiento de los reactivos de anticuerpos evaluados en varias versiones del panel de citometría de flujo de nueva generación para EMR (NGF-MRD, por sus siglas en inglés), para valorar distintos protocolos de preparación de muestras y para validar la citometría de flujo de nueva generación frente a la EMR valorada por citometría de flujo de 8 colores convencional. Las muestras con niveles muy bajos de EMR ( $>10^{-4}$ ) fueron comparadas ciegamente contra secuenciación de nueva generación (NGS). (Flores-Montero, 2017)

Primero, se construyó un panel de anticuerpos para una identificación óptima de células plasmáticas en MM en niveles EMR, para ello compararon todo el perfil inmunofenotípico de células plasmáticas aberrantes o clonales de pacientes individuales con MM versus el de pacientes con células plasmáticas de MO normales o reactivas. (Flores-Montero, 2017) Para la construcción de la primera versión de panel de anticuerpos, se evaluaron ocho de los doce marcadores que contribuyeron con un mayor porcentaje a la discriminación entre células plasmáticas clonales y normales realizada por el separador automático de células (APS), de este modo se encontró según el análisis de componentes principales de fenotipos únicos de células plasmáticas, la presencia de CD19 en el 97% de los casos, CD45 en el 89%, CD56 y CD81 en el 86%, Cylgλ en el 73%, CD27 en 71%, CD117 en el 60% y Cylgκ en el 56% de los casos patológicos. Para las versiones 2 y 3 se combinan los tres marcadores de membrana de superficie más informativos (CD19, CD45, CD56), mas Cylgκ y Cylgλ, los marcadores de identificación de células plasmáticas CD138 y CD38, junto con CD229 como antígeno de identificación de células plasmáticas adicional. Finalmente se llega hasta la versión 5 y final ajustando diferentes reactivos conjugados con fluorocromo de los mismos marcadores, excluyendo a CD229 por no lograr la especificidad requerida. (Flores-Montero, 2017)

Por otro lado, se evaluó el protocolo del procedimiento operativo estándar de EuroFlow de preparación de muestras para la tinción de 50 µl con marcadores de superficie celular, y se realizaron procedimientos diferentes de lisis en masa basados en cloruro de amonio seguidos de tinción de  $5 \times 10^6$  células en 100 µl/tubo. Según las pruebas realizadas los procedimientos de lisis en masa se asociaron sistemáticamente con la adquisición de un número significativamente mayor de células en comparación con el procedimiento operativo estándar convencional basado en la solución de lisis BD FACS. Sin embargo, todas las condiciones de lisis en masa mostraron una proporción significativamente mayor de desechos y células muertas. Por lo que se implementó como protocolo de preparación de las muestras el procedimiento de lisis en masa que incluye un paso de fijación por lisis FACS y el uso de albúmina sérica bovina al 0,5%, es decir una combinación de ambos protocolos. (Flores-Montero, 2017)

Posteriormente, realizaron la evaluación de las mismas muestras de diagnóstico de MM utilizando las dos combinaciones de anticuerpos de 8 colores seleccionadas anteriormente,

pero centrándose ahora en la detección de cantidades mínimas, es decir, 0,02%–0,1% de células plasmáticas clonales. Realizaron diluciones de las muestras para obtener números decrecientes de células plasmáticas normales. Luego de probar varias versiones de los mismos marcadores conjugados con fluorocromos diferentes, usaron los conjugados optimizados CD138-BV421 y CD27-BV510, y el anticuerpo multiepítipo CD38-FITC. (Flores-Montero, 2017)

Este método de citometría de nueva generación MM-EMR basado en EuroFlow fue validado frente a la EMR de citometría de flujo convencional de 8 colores y se encontró una fuerte correlación entre ambos métodos en muestras de diagnóstico y seguimiento con una carga tumoral relativamente alta de pacientes con respuesta parcial, enfermedad estable y enfermedad progresiva ( $\rho = 0,96$ ;  $P < 0,001$ ). (Flores-Montero, 2017)

Por último, se realizó una evaluación paralela de EMR por citometría de flujo de nueva generación y secuenciación de nueva generación en un subconjunto de 31 muestras y se obtuvo una mayor aplicabilidad para el enfoque EuroFlow-NGF ya que el 100% de las muestras fueron analizadas por citometría de flujo de nueva generación y de ellas el 87% de las muestras fueron aptas para la secuenciación. De los 27 casos evaluados por ambos métodos, 22 de ellos con niveles de EMR  $>10^{-4}$ , se encontró una buena correlación entre el porcentaje de células plasmáticas aberrantes residual por CMF nueva generación y secuenciación de nueva generación. Sin embargo, CMF nueva generación mostró una mayor sensibilidad que la secuenciación de nueva generación en muestras de EMR+ al obtener niveles más altos de EMR, ya que se encontró resultados discrepantes entre las técnicas en 7 de 27 casos, incluidos seis EMR+ por NGF y EMR- por NGS. De hecho, el 30% fueron positivas para NGF (cuantificables), pero negativas para NGS o positivas discrepantemente bajas. (Flores-Montero, 2017)

La selección de los marcadores y la optimización del protocolo de preparación de la muestra, permitieron incrementar la sensibilidad, además el usar una combinación de anticuerpos con fluorocromos que son muy específicos y sensibles para la detección de esas células tumorales, incluyendo anticuerpos multi-epítipos que permiten valorar pacientes con terapia anti-CD38, permite indicarle al médico tratante con claridad si el paciente tiene enfermedad residual persistente o indetectable con una sensibilidad de  $1 \times 10^6$ , teniendo la capacidad de identificar la presencia de pequeñas clonas si las hay. Se

pasó de analizar un millón de células a 16 millones, para lograr la detección precoz que permite una acción temprana y contribuya algún día a la cura del mieloma múltiple. (Prieto, 2024)

En la actualidad, con la implementación de la citometría de flujo de nueva generación se utilizan combinaciones de 8 fluorocromos y permite adquirir aproximadamente 10-20 millones de células por paciente, además de utilizar un sistema de procesamiento de análisis digital robusto que permite generar y analizar una mayor cantidad de datos en menor tiempo. (Arana Berganza, 2021)

De esta forma se ha implementado, el tubo PCST (tabla 5) diseñado por el consorcio EuroFlow™ que es un paso de cribado inicial basado en un número limitado de anticuerpos que orientan eficazmente a la necesidad de caracterizar aún más las discrasias de células plasmáticas (PCD), además permite una estratificación pronóstica basada en la expresión del antígeno  $\beta$ 2-microglobulina. (Catálogo cytognos)

Tabla 5. Tubo PCST diseñado por el consorcio EuroFlow™.

Elaboración propia, modificado de (Catálogo cytognos)

<b>PCST</b> <b>(Plasma Cell Screening Tube)</b>							
<b>Pacific Blue™</b>	<b>OC515™</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCP-Cyanine5.5</b>	<b>PE-Cyanine7</b>	<b>APC</b>	<b>APC-C750™</b>
CD45	CD138	CD38	CD56	$\beta$ 2-microglobulina	CD19	CyIlgKappa	CyIgLambda

Además, otro tubo denominado PCD (tabla 6) diseñado por el consorcio EuroFlow™ es de caracterización de CP y utiliza anticuerpos únicos para identificar consistentemente la población de estudio por sospecha de discrasia de células plasmáticas. (Catálogo cytognos)

Tabla 6. Tubo PCD diseñado por el consorcio EuroFlow™.

Elaboración propia, modificado de (Catálogo cytognos)

<b>PCD</b> <b>(Discrasias de células plasmáticas)</b>							
<b>Pacific Blue™</b>	<b>OC515™</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCP-Cyanine5.5</b>	<b>PE-Cyanine7</b>	<b>APC</b>	<b>APC-C750™</b>
CD45	CD138	CD38	CD56	CD27	CD19	CD117	CD81

Por lo tanto, se considera que la NGF es una herramienta útil para monitorear la eficacia del tratamiento del mieloma múltiple en las distintas etapas incluyendo la inducción, trasplante, consolidación y mantenimiento, y se plantea a futuro como una herramienta de *endpoint* para estudios clínicos. (Herlein, 2017)

En síntesis, la monitorización de la EMR en la MO de pacientes con MM tratados, se ha demostrado una sensibilidad significativamente mayor y reproducibilidad mayor frente a la citometría de flujo clásica. Esto se debe principalmente a:

- (i) La evaluación de un número significativamente mayor de células por muestra (es decir,  $\geq 10 \times 10^6$  células) lograda mediante la lisis masiva de muestras de sangre a base de cloruro de amonio antes de la tinción con anticuerpos.
- (ii) Una combinación optimizada de anticuerpos de dos tubos de ocho colores.
- (iii) El uso de herramientas de software asistidas por computadora para un análisis de datos automatizado más objetivo y reproducible, como el software INFINICYT de Cytognos SI, Salamanca, España. (Sanoja Flores, 2020)

Gracias a la evidencia generada, el Grupo de trabajo internacional sobre mieloma (IMWG) adoptó dentro de sus criterios para medir EMR la determinación de células plasmáticas clonales fenotípicamente aberrantes mediante citometría de flujo de nueva generación en aspirados de médula ósea utilizando el procedimiento operativo estándar de EuroFlow para la detección de EMR en MM con una sensibilidad mínima de 1 en  $10^5$  células nucleadas o superior, que permita considerar una EMR negativa. (Shaji Kumar, 2024)

Está EMR evaluada por citometría de flujo de nueva generación identifica pacientes con mayor riesgo de progresión y menor supervivencia global, por lo que es una herramienta muy útil para estratificar el riesgo y es un factor pronóstico importante para los pacientes con MM, por lo tanto, los esfuerzos terapéuticos deben ser dirigidos a la erradicación de estas células tumorales residuales. El objetivo es detectar temprano e intervenir pronto para evitar que ese paciente sufra una recaída, y se evite un mieloma refractario al tratamiento. (Arana Berganza, 2021)

### CAPITULO III: Diagnóstico y monitorización de la enfermedad medible residual en MM mediante citometría de flujo de nueva generación

#### Definición de enfermedad medible residual

El término enfermedad medible residual (EMR) cuyo uso está en aumento en lugar del término enfermedad mínima residual, hace referencia a la permanencia de células malignas residuales, generalmente en niveles subclínicos, luego de que el paciente se sometió al régimen quimioterapéutico indicado y alcanzó la remisión clínica de la enfermedad. Es importante determinar el riesgo de cada uno de los pacientes de presentar EMR positiva, que es un factor pronóstico de gran importancia, ya que esta condición se ha relacionado con un aumento del riesgo de recaída y los pacientes que la desarrollan tienden a presentar peores resultados a largo plazo con mayores cifras de mortalidad y recaídas post-trasplante. (Cardona Quiceno, 2021)

El conocimiento de que esta pequeña fracción celular tumoral remanente existe, se remonta hasta la década de 1950, cuando se empiezan a plantear terapias dirigidas a su erradicación en tumores sólidos, aunque la primera mención específica a la presencia de EMR en hemopatías malignas data probablemente de 1973, año en el que se reportan los resultados de varios ensayos clínicos en los que se administra la vacuna BCG de la tuberculosis a pacientes de leucemia en los que no se había logrado eliminar toda la enfermedad. (Medina H, 2021)

La detección de EMR puede indicar que el tratamiento no fue completamente eficaz o que fue incompleto, posiblemente no todas las células cancerosas respondieron a la terapia, o las células cancerosas se volvieron resistentes a los medicamentos empleados. (Landgren, 2023)

Por tanto, en términos generales, la EMR en el MM hace referencia a la existencia de una pequeña cantidad de células cancerosas que permanecen en el organismo del paciente, después de haber recibido el correspondiente tratamiento. Dentro de la EMR, se distingue una subcategoría: la enfermedad medible residual negativa o indetectable. Esta tiene lugar cuando, tras la realización de las pruebas de detección de la EMR, no se observan indicios de células malignas. (Campus Sanofi, 2023)

La presencia de EMR es actualmente uno de los parámetros más informativos para el paciente con mieloma múltiple, dado que aquellos pacientes con EMR indetectable muestran una supervivencia mayor que aquellos pacientes en los que sí se detecta EMR. Actualmente, el grupo de trabajo internacional de mieloma (IMWG) recomienda el empleo de la citometría de flujo de nueva generación desarrollada por el grupo EuroFlow o la secuenciación de nueva generación empleando la estrategia de ClonoSEQ (Adaptive Biotechnologies) para la detección de EMR. (Medina H, 2021)

La detección de EMR además de ayudar a identificar y prevenir una posible progresión de la enfermedad, también es importante para explorar nuevas vías terapéuticas más eficaces para el paciente en los que resulte positiva. (Campus Sanofi, 2023)

#### Tipo de muestra para detectar EMR

Para la detección de enfermedad medible residual se emplean métodos muy sensibles. Las pruebas más empleadas y recomendadas son la citometría de flujo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y la secuenciación de próxima generación. Para estas pruebas se usan muestras de células de la médula ósea (que se extraen por aspiración) y/o células de la sangre periférica (de extracción venosa). (Landgren, 2023)

Para detectar la EMR en el MM, lo más empleado hasta el momento es obtener una muestra de células del paciente mediante un aspirado de la médula ósea. Teniendo en cuenta que la cantidad de dichas células podría ser ínfima, se descarta el empleo de pruebas tradicionales como el examen mediante microscopio. (Campus Sanofi, 2023)

Atendiendo a parámetros internacionales, la evaluación de la EMR debe ser realizada con una técnica que presente una sensibilidad de al menos  $10^{-5}$ . Lo que supone la posibilidad de hallar una célula plasmática patológica en una muestra de 100.000 células, por tanto, la calidad de la muestra es importante. (Campus Sanofi, 2023)

#### Técnicas para detección de EMR

Tomando en cuenta las publicaciones que profundizaban sobre las carencias de la respuesta convencional y las alternativas disponibles en MM, en la revisión de los criterios de respuesta de 2016 el IMWG (Cuadro 7) reconoció la utilidad de nuevos métodos mucho más sensibles para detectar la presencia de EMR en MO y discriminar de forma certera aquellos pacientes en los que puede detectarse aún enfermedad a pesar de haber alcanzado una respuesta completa. (Medina H, 2021)

Tabla 7. Criterios de enfermedad mínima residual según el IMWG.

Elaboración propia, modificado de (Fernández Arregui, 2023).

<b>EMR negativa por citometría de flujo</b>	No CP aberrantes por CMF (metodología EuroFlow CMF nueva generación) con sensibilidad $>10^{-5}$
<b>EMR negativa por biología molecular</b>	Ausencia de secuencias clonas ( $<2$ iguales), mediante plataforma con sensibilidad $>10^{-5}$
<b>EMR negativa más imagen negativa por PET-TC</b>	EMR negativa en MO (CMF o secuenciación) + imagen negativa
<b>EMR negativa mantenida</b>	EMR negativa en MO (CMF o secuenciación) + imagen negativa

Como se observa en la tabla 7, las pruebas que se emplean en la detección de la EMR en mieloma múltiple son las siguientes: (Campus Sanofi, 2023)

- **Citometría de flujo de nueva generación:** es una técnica que evalúa las células individuales verificando la presencia o ausencia de ciertos marcadores de proteínas en la superficie celular. Para obtener resultados confiables es necesario contar con una muestra recién obtenida por una aspiración de médula ósea. La muestra se trata con anticuerpos especiales que se unen solo a las células que tienen una proteína específica en su superficie. (Landgren, 2023)

La técnica de *Next Generation Flow* del grupo EuroFlow utilizando 2 tubos que se detallan en la tabla 8, puede alcanzar una sensibilidad de hasta  $10^{-6}$  y un límite de cuantificación de  $5 \times 10^{-6}$  si se analizan al menos 10 millones de eventos, y es actualmente la metodología inmunofenotípica recomendada por el Grupo internacional de trabajo del mieloma para la evaluación de EMR en MM. (Medina H, 2021)

Tabla 8. Panel de Euroflow para el monitoreo de EMR

Elaboración propia, modificado de (Peña-Celaya, 2020)

Tubos	Marcadores y fluorocromos conjugados							
	BV421	BV510	FITC	PE	PerCP- Cy 5.5	PE-Cy 7	APC	APC-H7
<b>Tubo 1</b>	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81
<b>Tubo 2</b>	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	cylgk	cylgk

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** En esta técnica se amplifican cantidades mínimas de ADN para poder analizar un segmento específico de ADN. La prueba de reacción en cadena de la polimerasa puede identificar células malignas según sus anomalías genéticas, tales como mutaciones o cambios cromosómicos. Como resultado, la prueba de reacción en cadena de la polimerasa puede detectar anomalías genéticas incluso cuando la cantidad de células cancerosas residuales es muy pequeña. Con esta técnica es posible identificar una célula cancerosa en medio de entre 100,000 a un millón de células normales. (Landgren, 2023)

Como el MM es una enfermedad genéticamente muy heterogénea, se realiza la detección de la recombinación de los genes IGHV, IGHD e IGHJ en los tres loci de inmunoglobulinas que proporciona reordenamientos V(D)J únicos, cuya variabilidad inicial se incrementa aún más por los procesos de edición del BCR. El resultado final es la producción de secuencias específicas para cada célula B que pueden emplearse como marcadores para detectar la presencia del clon patológico tanto al diagnóstico como en el seguimiento de la enfermedad, puesto que los reordenamientos son estables a lo largo del tiempo. (Medina H, 2021)

- **Secuenciación de próxima generación (NGS):** Las técnicas de NGS son actualmente el estándar molecular para la evaluación de EMR en MM y pueden superar las principales limitaciones de la qPCR. Los protocolos de NGS se basan en la amplificación masiva de los reordenamientos de inmunoglobulinas en una reacción de PCR multiplexada, donde se introducen diversas combinaciones de primers dirigidos frente a las regiones V y J de la cadena ligera kappa y de la cadena

pesada, permitiendo la amplificación de virtualmente todos los reordenamientos presentes en la muestra. (Medina H, 2021)

Recientemente, el grupo del Memorial Sloan Kettering Cancer Center ha descrito también la posibilidad de identificar los clonotipos patológicos mediante secuenciación de exoma completo, acoplado la caracterización de los reordenamientos a los estudios de alteraciones genéticas. Tras la secuenciación, los reordenamientos se alinean frente a genomas de referencia para identificar los genes V(D)J utilizados y obtener la secuencia clonotípica tumoral. (Medina H, 2021)

La NGS permite monitorizar a la vez no solo los clones patológicos, también el resto de clonotipos, lo cual es una ventaja adicional respecto a la qPCR porque ofrece la oportunidad de investigar las dinámicas clonales durante la enfermedad. Además, la sensibilidad de las estrategias de secuenciación masiva depende directamente de la cantidad de moléculas de ADN presentes en la reacción de PCR, por lo que puede alcanzarse una sensibilidad superior a  $10^{-5}$ . (Medina H, 2021)

- **Tomografía por emisión de positrones - tomografía computarizada (PET-TC):** La tomografía por emisión de positrones/tomografía computada (PET-CT) es una técnica no invasiva que combina información anatómica y funcional en un mismo equipo, PET y TC. De esta forma se pueden detectar lesiones óseas, extraóseas y de la MO en un tiempo razonable y en un único procedimiento. (Lissarrague, 2022)

PET-TC tiene una sensibilidad (59-85%) y una especificidad (75-92%) relativamente alta para la detección de enfermedad medular y extramedular, teniendo una sensibilidad significativamente más alta para la detección de esta última. A su vez, proporciona mayor información para detectar compromiso óseo (lesiones líticas), infiltración de MO, predecir el pronóstico y evaluar la respuesta al tratamiento comparado con la radiografía convencional. Este procedimiento permite evaluar y monitorear la respuesta al tratamiento, por su capacidad para distinguir entre los sitios metabólicamente activos de los inactivos. Su utilidad post TCH se debe a que muestra de manera temprana la normalización de los hallazgos imagenológicos, asociándose con mayor supervivencia libre de enfermedad. (Lissarrague, 2022)

En la actualidad, el nuevo consenso de imagen del *International Myeloma Working Group* (IMWG) del año 2019 propone realizar el PET-TC en MM cuando la TC de cuerpo entero o la RM no identifican signos de lesiones líticas u osteoporosis, o existen contraindicaciones para las mismas o estas no son factibles. En el seguimiento, permite evaluar la respuesta al tratamiento y la progresión y evolución de la enfermedad. En pacientes con lesiones residuales detectadas por PET-TC, se recomienda su realización anual para detectar progresión precozmente. (Lissarrague, 2022)

### Cuando realizar detección de EMR

El momento en el que se debe proceder a la detección de la enfermedad residual varía en atención al tratamiento empleado, así como a las características propias de la enfermedad, y del paciente. (Campus Sanofi, 2023)

Como pauta general, se recomienda realizar las pruebas de enfermedad medible residual: (Campus Sanofi, 2023)

- Tras el último ciclo de una terapia de combinación planificada.
- Después de un trasplante de médula ósea.
- Durante el tratamiento, con el fin de confirmar la remisión.
- Transcurrido un año de terapia de mantenimiento.
- En intervalos periódicos después de haber completado el tratamiento.

Dentro de los factores de riesgo para EMR positiva se encuentran la capacidad de tolerancia y respuesta del paciente al tratamiento, el cariotipo e inmunofenotipo. (Cardona Quiceno, 2021)

Tras el tratamiento empleado, la presencia de cualquier célula cancerosa en el organismo (por mínima que sea) conlleva un riesgo de recaída, ya que dichas células podrían activarse y multiplicarse. (Campus Sanofi, 2023)

La identificación de la EMR negativa tras 12 meses desde la finalización del tratamiento, se ha asociado a mejores resultados de supervivencia libre de progresión. Lo que refuerza aún

más el valor pronóstico de la enfermedad medible residual como marcador indirecto. (Campus Sanofi, 2023)

La ausencia de EMR prolongada en el tiempo, puede llegar a influir en las decisiones de tratamiento a utilizar, incluyendo la intensidad y la duración de la terapia de mantenimiento. Por todo ello, lograr un estado de negatividad en la EMR está surgiendo como el nuevo objetivo terapéutico a alcanzar en el mieloma múltiple, incluso en recaída. (Campus Sanofi, 2023)

### Ventajas y desventajas de la detección de EMR por citometría de flujo de nueva generación versus NGS

La ventaja que supone la detección de EMR por CMF o NGS ha sido ya demostrada de múltiples formas: las técnicas de EMR pueden aplicarse a la gran mayoría de pacientes, y sus resultados son reproducibles y clínicamente relevantes con independencia de la metodología elegida para su evaluación o el contexto de la enfermedad. Además de superar el valor pronóstico de la respuesta completa, la EMR también supera en capacidad predictiva marcadores de riesgo como la citogenética, el ISS o el R-ISS. (Medina H, 2021)

Como se describió hay dos técnicas principales, cada una de las cuales tiene fortalezas y debilidades:

1. La citometría de flujo de próxima o nueva generación que es un método estandarizado por el consorcio EuroFlow que se puede realizar en unas pocas horas utilizando un software automatizado que minimiza la subjetividad, y tiene la ventaja de no requerir una muestra inicial, pero requiere una muestra fresca (de no más de 36 h después de la recolección de la muestra), lo cual podría resultar en una desventaja. (Shaji Kumar, 2024)

La citometría de flujo brinda múltiples ventajas como facilidad, rapidez, menores costos, mayor disponibilidad y aplicabilidad en las muestras. A su vez, permite evaluar si la médula ósea se está recuperando luego de la quimioterapia o hay un cambio de linaje. Sin embargo, otra desventaja de esta técnica es la posibilidad de

tener falsos positivos debido a la modulación antigénica inducida por los tratamientos (Cardona Quiceno, 2021)

Además, otra ventaja importante es que no se ve afectado por la distribución irregular de la enfermedad en la MO. Al mismo tiempo, es muy adecuado para un seguimiento más frecuente de GMSI recién diagnosticado y de pacientes con MM tratados que alcanzan una respuesta completa, proporcionando información complementaria a la inmunofijación sérica, por ejemplo, para el seguimiento de tumores de células plasmáticas no secretoras. (Sanoja Flores, 2020)

2. La otra técnica es la secuenciación VDJ de próxima generación, el ensayo ClonoSEQ, que ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU para la evaluación de EMR en mieloma. Tiene la desventaja con respecto a la citometría de flujo que requiere una muestra de referencia para identificar el clonotipo dominante, pero la ventaja de que el estudio se puede realizar tanto en muestras frescas como almacenadas y no se ve afectado por los anticuerpos monoclonales terapéuticos. (Shaji Kumar, 2024)

## CAPITULO IV: Citometría de flujo de nueva generación y detección de células plasmáticas monoclonales circulantes

### Células plasmáticas circulantes en sangre periférica

Las células plasmáticas clonales se distribuyen predominantemente en la médula ósea esto gracias a su adhesión al microambiente; sin embargo, ha quedado claro que no solo residen en la médula ósea, sino que también pueden pasar a la circulación para posteriormente albergarse en tejidos intramedulares o distantes, este proceso permite que circulen y residan en la sangre periférica. (Xia Y, 2023 )

Hoy se tiene evidencia de que un microambiente hipóxico estimula la secreción de grandes cantidades de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que promueve localmente la angiogénesis y el crecimiento tumoral, junto con la pérdida de expresión de varias moléculas de adhesión al estroma que podría darse en las células plasmáticas tumorales, como del CD56, CD138, CD81 y CD117, lo cual favorece la liberación y circulación de las células tumorales. Además, las variaciones circadianas de los niveles plasmáticos del factor 1 derivado de células estromales (SDF1) y del receptor de quimiocinas 4 (CXCR4), junto con la regulación negativa de la expresión de integrinas como CD11a, CD11c, CD29, CD49d y CD49e y antígenos de activación como CD38 y CD27 en las células plasmáticas tumorales en circulación frente a células plasmáticas tumorales en la médula ósea, también favorece su liberación a la circulación. (Sanoja Flores, 2020)

Desde un punto de vista funcional de forma normal, las células plasmáticas circulantes están presentes en la sangre de personas sanas en niveles que oscilan entre 0,16 y 144 células/ $\mu$ L en la infancia y entre 0,14 y 27,5 células plasmáticas normales/ $\mu$ L en adultos, con ligeras diferencias entre adultos jóvenes menores de 50 años y adultos mayores con más de 50 años. Lo anterior es reflejo de la producción diaria de células plasmáticas a lo largo de la vida en respuesta a los antígenos presentes en el ambiente que estimulan a células B en los tejidos linfoides. (Sanoja Flores, 2020)

Por otro lado, el mieloma múltiple es una enfermedad de proliferación de células plasmáticas neoplásicas, que como ya se ha mencionado previamente, tienen inmunofenotipos que difieren de las células plasmáticas normales, como una expresión

homogénea y aberrante de CD56 y la pérdida homogénea del CD19 y CD45. Debido a que las células plasmáticas neoplásicas pueden identificarse y cuantificarse rápidamente mediante inmunofenotipado basado en citometría de flujo, se ha utilizado ampliamente esta herramienta como método complementario al examen morfológico y la inmunohistoquímica en el diagnóstico de la enfermedad. (Bae, 2018)

La presencia de estas células plasmáticas monoclonales se puede detectar no solo en la MO sino también en la sangre periférica de pacientes con trastornos de las células plasmáticas. Según estudios previamente realizados con inmunofluorescencia se demostró que los pacientes con un alto nivel de células plasmáticas circulantes tenían más probabilidades de progresar a una enfermedad manifiesta por gammapatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI) o mieloma múltiple latente. Por ello, se muestra una tendencia a utilizar citometría de flujo para estudios de células plasmáticas circulantes, porque la citometría de flujo es más reproducible y sensible que la inmunofluorescencia. (Bae, 2018)

#### Detección por citometría de flujo de células plasmáticas monoclonales circulantes en sangre periférica

Los pacientes con MM como parte de su abordaje y seguimiento de EMR se someten en repetidas ocasiones a aspirados de médula ósea para la caracterización. Las células tumorales circulantes son detectables en la sangre periférica de prácticamente todos los casos de MM y son pronósticas, pero su aplicabilidad para la detección no invasiva ha sido poco investigada. (Garcés, 2020)

Lo anterior aun cuando desde hace mucho tiempo la citometría de flujo ha sido reconocida como una metodología adecuada para la enumeración de CPTC en la sangre de pacientes con neoplasias de células plasmáticas, siendo además una técnica con un enfoque fácil, rápido, asequible y disponible en todo el mundo. Sin embargo, la falta de protocolos estandarizados, los niveles de sensibilidad variables alcanzados para la detección de CPTC, junto con la necesidad de muestras frescas de no más de 48 horas, han limitado la reproducibilidad de los resultados y, por lo tanto, su uso y aplicabilidad más amplios. A pesar de estas limitaciones, la citometría de flujo ha demostrado que la presencia y el número de CPTC en la sangre tanto en el momento del diagnóstico como después del

tratamiento, tiene implicaciones clínicas importantes no sólo en pacientes con MM, sino también en los pacientes con GMSI y MM latente. (Sanoja Flores, 2020)

De esta forma se ha demostrado por ejemplo que la presencia de células plasmáticas tumorales en sangre periférica es un signo de enfermedad sistémica y que tasas significativamente más bajas de células plasmáticas tumorales se detectan entre pacientes con subtipos diagnósticos de gammapatía monoclonal. (Sanoja Flores, 2020)

EuroFlow NGF-MM ha evidenciado que los inmunofenotipos entre las células plasmáticas en general de MO versus sangre periférica, son comparables y permiten utilizar los mismos paneles de marcadores conjugados con sus respectivos anticuerpos para su identificación. (Sanoja Flores, 2020)

Estas células plasmáticas circulantes (CPC) en la sangre periférica son detectables en una proporción significativa de pacientes con MM y en distintas concentraciones, lo cual representa diferencias en la biología de la enfermedad, como la adhesión de célula a célula y de célula a estroma que son necesarias para la progresión del mieloma, y median la resistencia a la terapia. (Nowakowski, 2005)

Por ello, desde un punto de vista clínico, se ha demostrado que la presencia y el número de CPTC tiene implicaciones diagnósticas y pronósticas en los pacientes y, además, ha confirmado ser útil para un seguimiento mínimamente invasivo del MM después del tratamiento. (Sanoja Flores, 2020)

Por ejemplo, se ha demostrado en varios estudios que las células plasmáticas tumorales en circulación sanguínea de pacientes con MM reproducen el patrón de mutaciones somáticas presentes en la célula plasmática del tumor de MO con niveles relativamente altos de heterogeneidad lo que las hace subclonas. Por lo tanto, las células plasmáticas tumorales en circulación muestran sobreexpresión de genes y mutaciones asociadas con la resistencia a los medicamentos, la respuesta inflamatoria, hipoxia, migración celular y metástasis, junto con la regulación negativa de los genes responsables del control del ciclo celular. Además, la presencia de células plasmáticas tumorales en circulación también se ha relacionado con alteraciones citogenéticas características, incluyendo t(4;14), delección 13q, delección 17p, t(11; 14) y t(14;16). (Sanoja Flores, 2020)

En otro estudio del 2020 se utilizó citometría de flujo de nueva generación para aislar células tumorales circulantes y MO compatibles de 53 pacientes y se comparó su perfil genético. En ocho casos, también se clasificaron células tumorales de plasmocitomas extramedulares y se realizó una secuenciación del exoma completo en las tres muestras de tumores distribuidas espacialmente. Las células tumorales circulantes fueron detectables mediante CMF de nueva generación en la sangre periférica de todos los pacientes con MM. Con base en la fracción de células cancerosas de mutaciones clonales y subclonales, encontraron que aproximadamente el 22% salieron de un sitio de MO o sitio extramedular distante del aspirado de MO compatible. La concordancia entre las células tumorales de la MO y las células tumorales circulantes fue alta para las alteraciones del número de copias a nivel del brazo cromosómico ( $\geq 95\%$ ), aunque no para las translocaciones (39%). Todas las anomalías genéticas de alto riesgo, excepto una t(4; 14), se detectaron en las células tumorales circulantes siempre que estuvieran presentes en las células tumorales de MO. Es de destacar que en las células tumorales circulantes se detectaron  $\geq 82\%$  de mutaciones presentes en clones de MO y extramedulares. Estos hallazgos respaldan que las células tumorales circulantes serían una muestra útil para la estratificación del riesgo no invasivo de los pacientes con MM en función de su número y perfil genético. (Garcés, 2020)

Por tanto, la monitorización seriada de la presencia de células plasmáticas clonales circulantes mediante métodos de citometría de flujo de mayor sensibilidad como lo es la de nueva generación, haría más factible evidenciar la evolución subclonal de las células plasmáticas que desarrollan independencia de anclaje y potencial de crecimiento fuera del microambiente de la médula ósea bajo presión terapéutica e inmunológica. (Chakraborty R, 2017)

En un estudio del 2005 publicado en la revista *Blood*, realizado entre mayo de 1998 y enero de 2003, efectuaron citometría de flujo en 302 pacientes con MM recién diagnosticado, el número de células plasmáticas circulantes se midió seleccionando células mononucleares CD38+ y CD45+. Se analizaron cincuenta mil eventos para cada paciente y se registró el número de células plasmáticas detectadas, y se demostró que la cantidad de células plasmáticas circulantes detectadas por citometría de flujo es un factor pronóstico independiente al encontrar una correlación inversa entre el número de células plasmáticas circulantes y el promedio de supervivencia. La mediana de supervivencia global fue

significativamente más prolongada en pacientes con menos células plasmáticas circulantes. (Nowakowski, 2005)

En otro estudio de *Mi Hyun Bae y colaboradores publicado en 2018*, realizado en Seúl Corea entre agosto de 2013 y julio de 2014, utilizando un panel de citometría de flujo con cinco marcadores CD45, CD38, CD138, CD19 y CD56 que es el panel mínimo recomendado por la Red Europea de Mieloma se cuantificaron las células plasmáticas circulantes para evidenciar su implicación pronóstica en pacientes con mieloma múltiple recién diagnosticados. Realizaron un análisis de supervivencia de 74 pacientes que recibieron tratamiento para el mieloma. Los pacientes los dividieron en dos grupos según el nivel de células plasmáticas circulantes; pacientes con  $<0,02\%$  y pacientes  $\geq 0,02\%$ , se evidenció que los pacientes con  $\geq 0,02\%$  de células plasmáticas circulantes mostraron peor supervivencia libre de progresión y supervivencia global que los pacientes con  $<0,02\%$  de células plasmáticas circulantes. (Bae, 2018)

En otro ejemplo, los pacientes con MM latente con  $\geq 150$  células plasmáticas circulantes en 150.000 células mononucleares, detectados mediante citometría de flujo de seis colores, mostraron una mediana de tiempo de progresión más corta (9 meses) que aquellos con  $<150$  células plasmáticas circulantes. En pacientes con mieloma múltiple con  $>10$  células plasmáticas circulantes entre 50.000 células mononucleares se relacionaron con una supervivencia general más corta, y  $\geq 400$  células plasmáticas circulantes entre 150.000 células mononucleares se asociaron con el tiempo transcurrido hasta el siguiente tratamiento y una supervivencia general también más cortos. (Bae, 2018)

Además del impacto negativo en la supervivencia, la presencia de células plasmáticas clonales circulantes en mieloma múltiple recién diagnosticado y en recaída, la cuantificación de estas células tumorales antes del autotrasplante de células madre es un predictor de supervivencia libre de progresión y supervivencia general inferiores, independientemente de la profundidad de la respuesta posterior a la inducción. (Chakraborty R, 2017)

Un estudio publicado en 2021 de *Wenmin Han y colaboradores*, refuerza aún más el valor del nivel de CPTC como marcador de pronóstico en el mieloma, al ser combinado con el actual sistema de pronóstico de estadificación R-ISS para distinguir un subconjunto de pacientes con un pronóstico particularmente malo. (Han, 2021)

El Sistema Internacional de Estadificación Revisado (R-ISS) incluye variables incluidas en el ISS original como beta-2 microglobulina sérica y albúmina sérica, al tiempo que incluye información de pronóstico adicional obtenida de la deshidrogenasa láctica (DHL) sérica y anomalías cromosómicas de alto riesgo detectadas mediante fluorescencia de interfase en hibridación in situ (iFISH) después de la purificación de células plasmáticas CD138.(Landgren, 2023)

Por lo tanto, estos hallazgos pueden tener importancia en el contexto de la modificación de las definiciones de enfermedad de alto riesgo y en la práctica clínica sobre la adopción de un tratamiento inicial adaptado al riesgo. Por ejemplo, un estadio R-ISS de alto riesgo combinado con un conteo de células plasmáticas circulantes  $\geq 0,105\%$  al momento del diagnóstico, indica un riesgo aún mayor de resultados adversos principalmente por la existencia de un elevado número de CPTC con anomalías citogenéticas como la delección 13q y t(4;14) que son más comunes en pacientes con células plasmáticas en sangre periférica que en aquellos con MM intramedular. (Han, 2021)

Se ha observado que los pacientes con  $CPTC \geq 0,105\%$  tienen un riesgo dos veces mayor de albergar cambios citogenéticos de alto riesgo que aquellos con  $CPTC < 0,105\%$ . Al evaluar la frecuencia de anomalías citogenéticas individuales, el 14,3% del grupo con un alto número de CPTC alberga delecciones de *p53*, lo que es más de ocho veces la tasa en el grupo de bajo conteo, se cree que el deterioro de la vía supresora de tumores *p53* podría desempeñar un papel en la expansión del tumor extramedular. (Han, 2021)

En conclusión, la cuantificación por citometría de flujo de las células plasmáticas circulantes en el momento del diagnóstico con cinco antígenos de superficie (CD138, CD38, CD56, CD19 y CD45) muestra un impacto pronóstico significativo en un grupo heterogéneo de pacientes con mieloma múltiple. Este método sencillo y sensible permitiría a muchos laboratorios clínicos adoptar fácilmente una estrategia de estratificación de riesgos que incorpore los niveles de células plasmáticas circulantes en pacientes con mieloma múltiple recién diagnosticado. (Bae, 2018)

Todos estos hallazgos demuestran que la citometría de flujo de nueva generación es una técnica altamente sensible que permite la identificación y cuantificación de CPTC en sangre en el momento del diagnóstico en la mayoría de los casos de GMSI y prácticamente en

todos los casos de MM latente y MM. Además, proporciona información pronóstica valiosa. (Sanoja Flores, 2020)

Según el protocolo EuroFlow para EMR, la técnica de bulk lisis está validada para muestras de médula ósea y sangre periférica, y como consideraciones analíticas indica que se utilice un máximo de 2 mL de muestra por 50 mL de solución lisante, y en caso de ser necesario procesar más muestra (es decir, la concentración celular inicial es baja), se utilice varios tubos de 50 mL, los volúmenes de otros reactivos de la técnica para EMR descritos son los mismos sin importar si se trabaja con sangre periférica o médula ósea. (Flores-Montero, 2018)

Por otro lado, el kit de detección de células plasmáticas en circulación para el análisis de muestras de sangre periférica indica que se debe lograr teñir al menos  $10 \times 10^6$  células nucleadas en cada tubo y adquirir al menos  $5 \times 10^6$  eventos, con lo cual se logra el criterio del IMWG para la detección de EMR por citometría de flujo. (Catálogo cytognos)

Por último, el uso de sangre periférica como muestra alternativa para analizar la EMR mediante CMF, permite la evaluación de la respuesta al tratamiento y su implementación está siguiendo una dirección clara hacia el uso de técnicas muy sensibles en muestras fácilmente accesibles. (Cerezo Ríos, 2024)

### Situación de la enfermedad en Costa Rica en cuanto a diagnóstico y seguimiento

En Costa Rica se realiza citometría de flujo para el diagnóstico y seguimiento del mieloma múltiple y otras discrasias de células plasmáticas en dos hospitales públicos nacionales que corresponden al Hospital Calderón Guardia (HCG) y el Hospital San Juan de Dios (HSJD), en este último se procesan muestras de pacientes procedentes del Hospital México, el Hospital San Vicente de Paul y el Hospital de Alajuela, previa referencia del caso por parte del Hematólogo de cada hospital. Además, se espera implementar en el Hospital México a corto o mediano plazo; todos estos hospitales forman parte de la Caja Costarricense de Seguro Social. A estos centros de salud son referidos todos los pacientes de hospitales periféricos que requieren una atención médica especializada, por lo que sus datos acumulados son un buen reflejo de la estadística nacional. Por otro lado, en el sector

privado Laboratorios Clínicos Jensen cuentan con la tecnología y expertos en citometría de flujo que ofrecen el servicio. (López Villegas, 2024)

Los cuidados preanalíticos a considerar en la obtención y transporte de la muestra incluyen que sea idealmente el primer aspirado medular, las muestras deben ser recolectadas en tubos de EDTA, se requiere un volumen de muestra de entre 1 a 2 mL, que se entreguen debidamente rotuladas, debe adjuntarse el formulario de citometría de flujo con la información completa del paciente y el transporte de la muestra hasta el laboratorio debe ser a temperatura ambiente sin refrigerar. (Rojas, 2024)

En cuanto a la extracción de la muestra, por ejemplo, en el HCG las muestras de médula ósea necesarias para el abordaje de los casos sospechosos de alguna de las discrasias de células plasmáticas son extraídas por un médico general que forma parte del servicio de Hematología y ha sido entrenado en el procedimiento por lo cual las muestras que normalmente se obtienen y son recibidas en el laboratorio especializado de hematología son de buena calidad. (López Villegas, 2024)

En el caso del HSJD una vez que los aspirados de médula ósea llegan al laboratorio se realiza una revisión macroscópica de la muestra (volumen, aspecto, presencia de coágulo), luego un conteo celular en los analizadores XN-1000 Sysmex para verificar la calidad de la muestra y obtener detalle de la celularidad. En este paso, se consulta al médico encargado de procedimientos sobre la dificultad de la punción y se le indica si se requiere o no una nueva muestra dependiendo de la calidad y cantidad. El médico a cargo de procedimientos trabaja en estrecha colaboración con el laboratorio ya que es consciente de la importancia de una buena muestra para el reporte de los resultados adecuados. (Rojas, 2024)

Una vez que se realiza el aspirado de médula ósea a los pacientes en los que se sospecha mieloma múltiple, en el HCG por ejemplo, se analiza la morfología y se realiza citometría de flujo simultáneamente utilizando los paneles PCD y PCST de EuroFlow; Si los hallazgos en estas pruebas son compatibles con el diagnóstico de MM se realiza un nuevo aspirado de médula ósea para realizar análisis de citogenética y FISH con sondas para detectar del(13q), del(17p), rearrreglos IgH con sonda break apart y duplicaciones del 1q, como se muestra en la figura 4. (López Villegas, 2024)

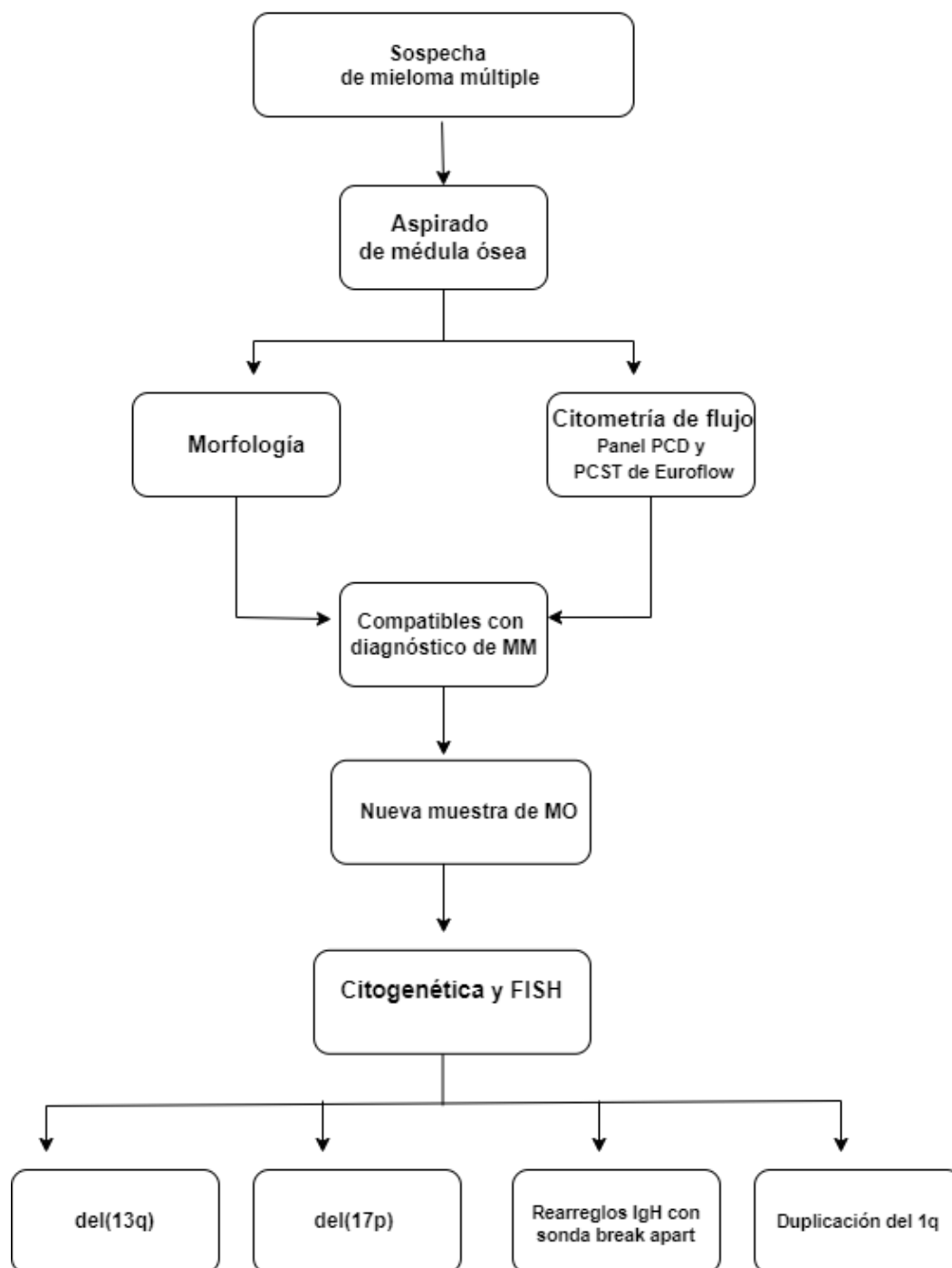


Figura 4. Protocolo diagnóstico aplicado en Costa Rica ante sospecha de MM.

Elaboración propia. Fuente: Entrevista Dr Jorge López Villegas, microbiólogo citometrista del Laboratorio especializado de hematología, HCG. (López Villegas, 2024)

Para EMR se utiliza en ambos laboratorios especializados la técnica de Bulk Lysis estandarizada por el consorcio europeo Euroflow y se verifica posterior a la técnica, que las concentraciones celulares obtenidas sean las adecuadas para dar resultados de buena sensibilidad. (Rojas, 2024)

Se consultó por medio de entrevista al Dr. Jorge López Villegas, quien es microbiólogo especialista en hematología y encargado de la citometría de flujo en el laboratorio de hematología especializada del Hospital Calderón Guardia, sobre el recuento de los casos de pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple, con GMSI o mieloma múltiple latente en los que se realizó citometría de flujo como parte de las pruebas que llevaron al diagnóstico, el detalle de los casos se observa en la figura 5 donde se muestra que el registro de casos de ese centro de salud se inicia el año 2016.

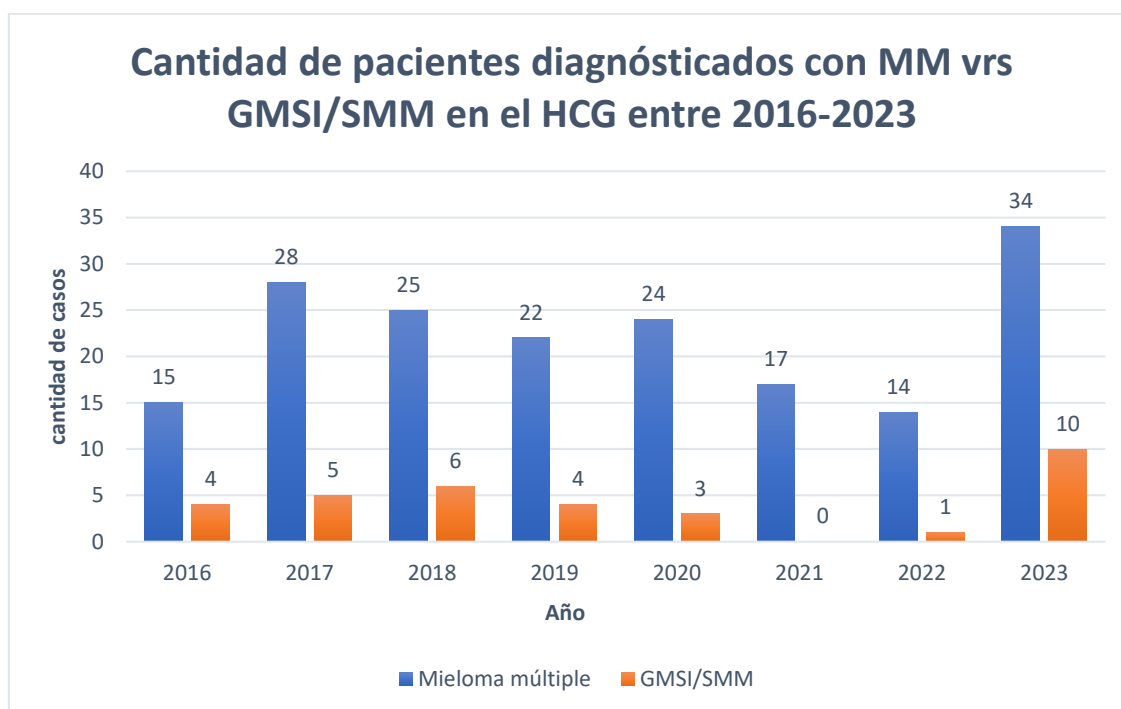


Figura 5. Casos anuales de MM vrs GMSI/MM latente en el Hospital Calderón Guardia analizados por citometría de flujo desde 2016.

Elaboración propia. Fuente: Entrevista Dr Jorge López Villegas, microbiólogo citometrista del Laboratorio especializado de hematología, Hospital Calderón Guardia. (López Villegas, 2024)

Por otro lado, se realizó de igual manera una entrevista a la Dra. Yaoska Rojas quien también es microbióloga especialista en hematología y forma parte del equipo de citometristas del Hospital San Juan de Dios. Según los datos aportados, los casos de MM, GMSI y MM latente en los que se utilizó la herramienta de citometría de flujo para llegar al diagnóstico se registran desde noviembre del año 2019, la cantidad de casos por año se observa con detalle en la figura 6. (Rojas, 2024)

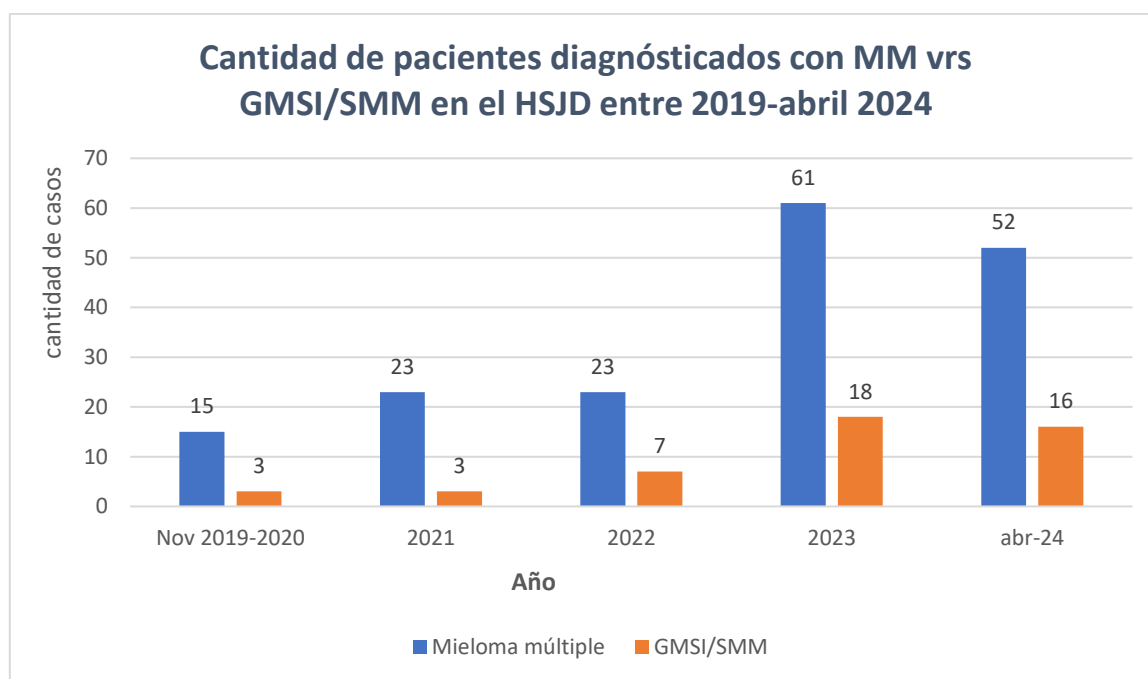


Figura 6. Casos anuales de MM vs GMSI/MM latente en el Hospital San Juan de Dios analizados por citometría de flujo desde noviembre 2019 a abril 2024.

Elaboración propia. Fuente: Entrevista Dra Yaoska Rojas, microbióloga citometrista del Laboratorio especializado de hematología, HSJD. (Rojas, 2024)

Para el diagnóstico en el caso de pacientes con sospecha de mieloma múltiple tanto en el Hospital Calderón Guardia como en el Hospital San Juan de Dios se utilizan primero los paneles PCD y PCST de Euroflow, y para la determinación y seguimiento de la EMR se usa el panel IMM MRD también de Euroflow con los procedimientos indicados y reactivos sugeridos, según la entrevista realizada a ambos expertos.

En cuanto a programas de control de calidad externo para mieloma múltiple en el laboratorio del HCG se utiliza UK NEQAS y el proporcionado por el mismo consorcio EuroFlow (López Villegas, 2024). En el caso del laboratorio de hematología especializada del HSJD las evaluaciones de control de calidad externo que se realizan son del Colegio Americano de Patólogos (CAP), UK NEQAS y del consorcio EuroFlow. (Rojas, 2024)

A continuación, en la figura 7 se muestra un gráfico con la cantidad de casos por año de pacientes con diagnóstico de MM en los que se utilizó la citometría de flujo como herramienta diagnóstica. Como se aprecia no se cuenta con los datos del HCG del año 2024 ya que aún no han sido generados, y en el caso del HSJD la CMF se implementó desde el año 2020 por tanto no existen datos previos.

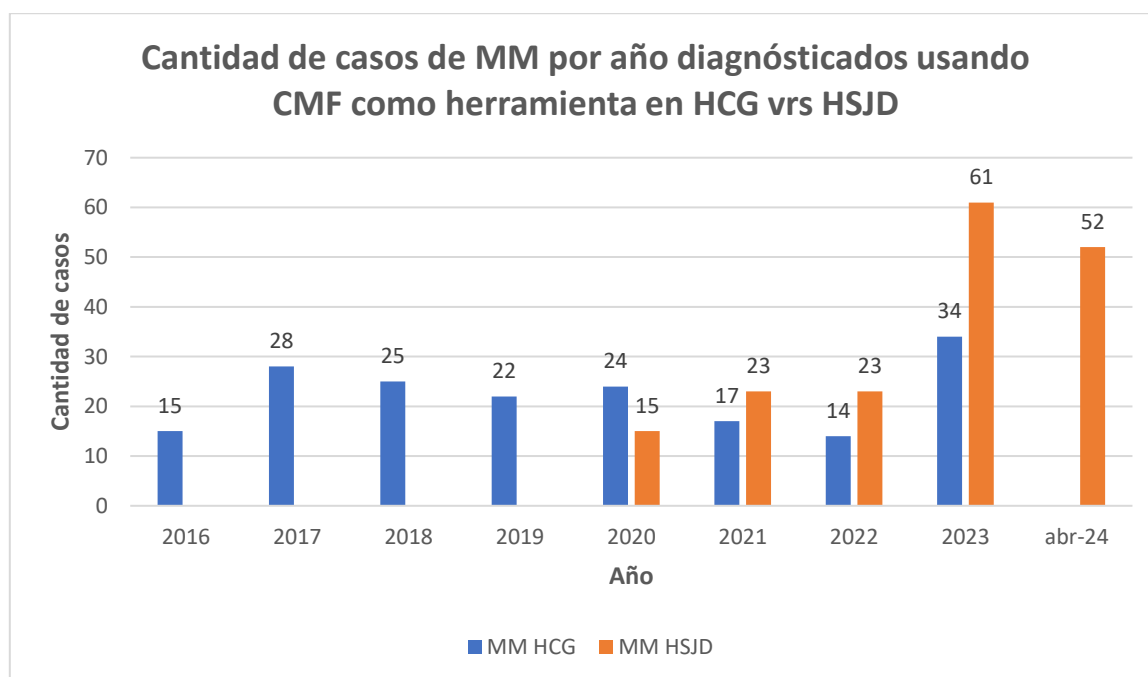


Figura 7. Casos anuales registrados de MM donde se realizó CMF como herramienta diagnóstica en el HCG vs HSJD.

Elaboración propia. Fuente: Entrevistas a Dra Yaoska Rojas y Dr. Jorge López.

De igual forma en la figura 8 se pueden observar los casos de pacientes en los que se logró llegar al diagnóstico de GMSI o MM latente utilizando la citometría de flujo como parte delestudio.

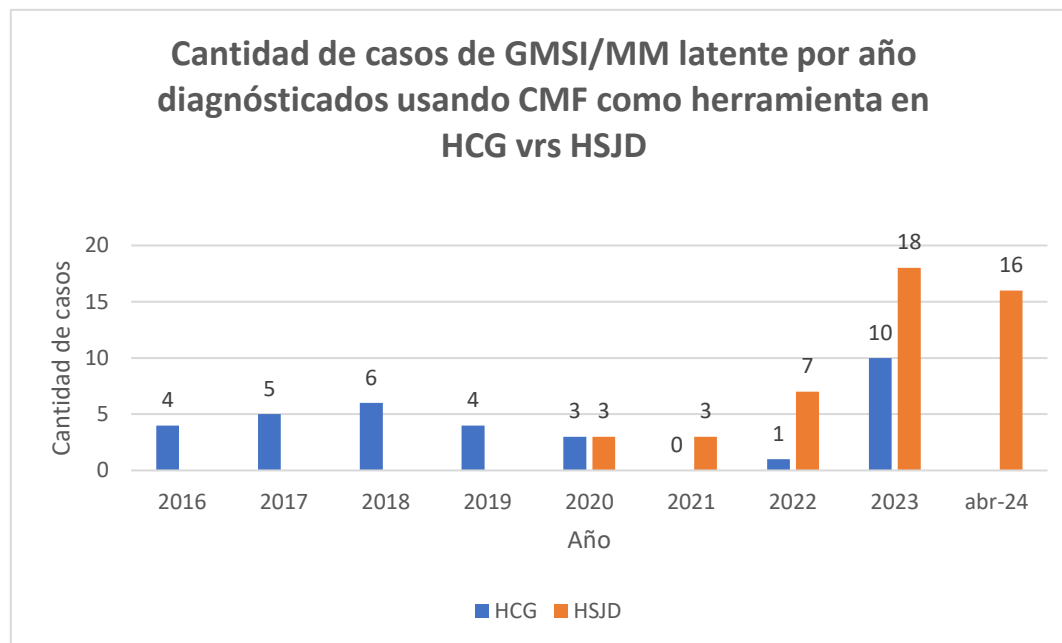


Figura 8. Casos anuales registrados de GMSI/MM latente donde se realizó CMF como herramienta diagnóstica en el Hospital Calderón Guardia vrs Hospital San Juan de Dios.

Elaboración propia. Fuente: Entrevistas a Dra Yaoska Rojas y Dr. Jorge López.

Con respecto a la distribución por sexo de los casos diagnosticados en conjunto entre el laboratorio del Hospital Calderón Guardia en el periodo 2016 - 2023, y el Hospital San Juan de Dios en el periodo 2019 -2022, en la figura 9 se observa que el 50,4% corresponden a pacientes femeninas y el 49,6% de los casos son masculinos, lo cual contrasta con lo reportado en la literatura en donde se reporta una mayor incidencia en hombres que en mujeres, sin embargo se podría considerar como una diferencia mínima probablemente sesgada por la cantidad de casos registrados hasta el momento. Además, el promedio de edad al diagnóstico corresponde a 65,1 años con un rango entre los 33 y los 95 años, según datos de ese mismo periodo y centros hospitalarios. (López Villegas, 2024)(Rojas, 2024)

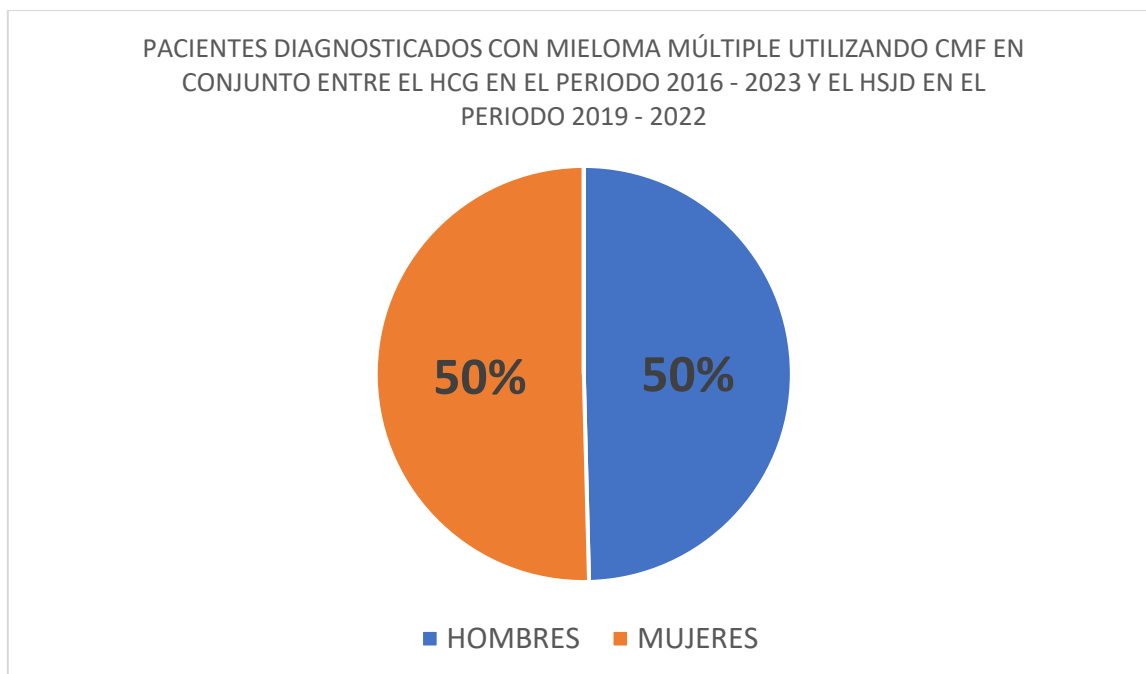


Figura 9. Distribución por sexo de pacientes con diagnóstico de MM en conjunto durante el periodo 2016 - 2023 en el HCG y el periodo 2019 – 2022 del HSJD.

Elaboración propia. Fuente: Entrevista Dr Jorge López Villegas y Dra Yaoska Rojas, microbiólogos citometristas del Laboratorio especializado de hematología, HCG y HSJD respectivamente

El análisis de EMR en el HCG suele ser solicitado por los médicos especialista en hematología a mitad del esquema de tratamiento inicial, al finalizar el tratamiento y previo al trasplante autólogo si está indicado para el paciente. (López Villegas, 2024)

De manera similar en el HSJD suele ser solicitada la determinación de EMRCuando se alcanzan criterios de repuesta completa y cada vez que se requiere determinar el estado de la enfermedad, respuesta a tratamiento, previo a TMO y post TMO. (Rojas, 2024)

Se le consultó al Dr. López sobre qué tan factible considera realizar en el país el seguimiento de la enfermedad medible residual en pacientes con MM utilizando la sangre periférica como muestra, y en su opinión es posible utilizarlo como una herramienta más para el seguimiento, pero no sustituye la EMR en MO, y considera además que actualmente

la gran limitante es la cantidad de muestra y reactivos necesarios para obtener la cantidad de células requeridas. (López Villegas, 2024)

Por su parte, la Dra. Yaoska Rojas considera que, aunque el seguimiento de EMR en pacientes con MM utilizando sangre periférica se encuentra estandarizado por el consorcio europeo Euroflow, si no se detectan células plasmáticas neoplásicas en sangre periférica, lo recomendado sería realizar la EMR en médula ósea ya que un significativo número de casos de MM presentan EMR detectable en médula ósea con EMR no detectable en sangre periférica; por ese motivo y debido a los altos costos económicos de la prueba, considera que no es factible de momento realizar EMR en sangre periférica para evitar una duplicidad de análisis. (Rojas, 2024)

Por último, en el país se realiza trasplante autólogo para los pacientes de MM que son candidatos al procedimiento como parte del abordaje terapéutico. Actualmente, sólo el Hospital México y el Hospital San Juan de Dios cuentan con Unidades de Trasplantes de médula ósea. Dichos seguimientos de EMR se realizan entre los 3 - 6 meses posteriores al TMO mientras el paciente es valorado por los hematólogos del Hospital. (Rojas, 2024)

#### Propuesta de algoritmo de diagnóstico

A pesar de todo lo descrito en este capítulo, la detección y el monitoreo de los niveles de células plasmáticas tumorales en sangre periférica no son parte de los criterios de respuesta al tratamiento y diagnóstico clínico actuales.

Como se mencionó en capítulos anteriores, recientemente se han desarrollado enfoques de citometría de flujo de nueva generación para la monitorización de la enfermedad medible residual en la MO de pacientes con MM tratados, con una sensibilidad mayor de  $\leq 2 \times 10^{-6}$ , y más recientemente, esta técnica también se ha aplicado para la detección de CPTC en la sangre periférica de pacientes con GMSI, MM latente y MM. (Sanoja-Flores, 2020)

*Sanoja Flores y colaboradores* en su publicación *“Detection of Circulating Tumor Plasma Cells in Monoclonal Gammopathies: Methods, Pathogenic Role, and Clinical Implications”* del año 2020, proponen un algoritmo de diagnóstico que se muestra en la Figura 10 para evaluar la presencia de CPTC para el estudio diagnóstico de pacientes con sospecha de

neoplasias de células plasmáticas que podría contribuir a una mayor eficiencia diagnóstica y un seguimiento más cercano de los pacientes. (Sanoja-Flores, 2020)

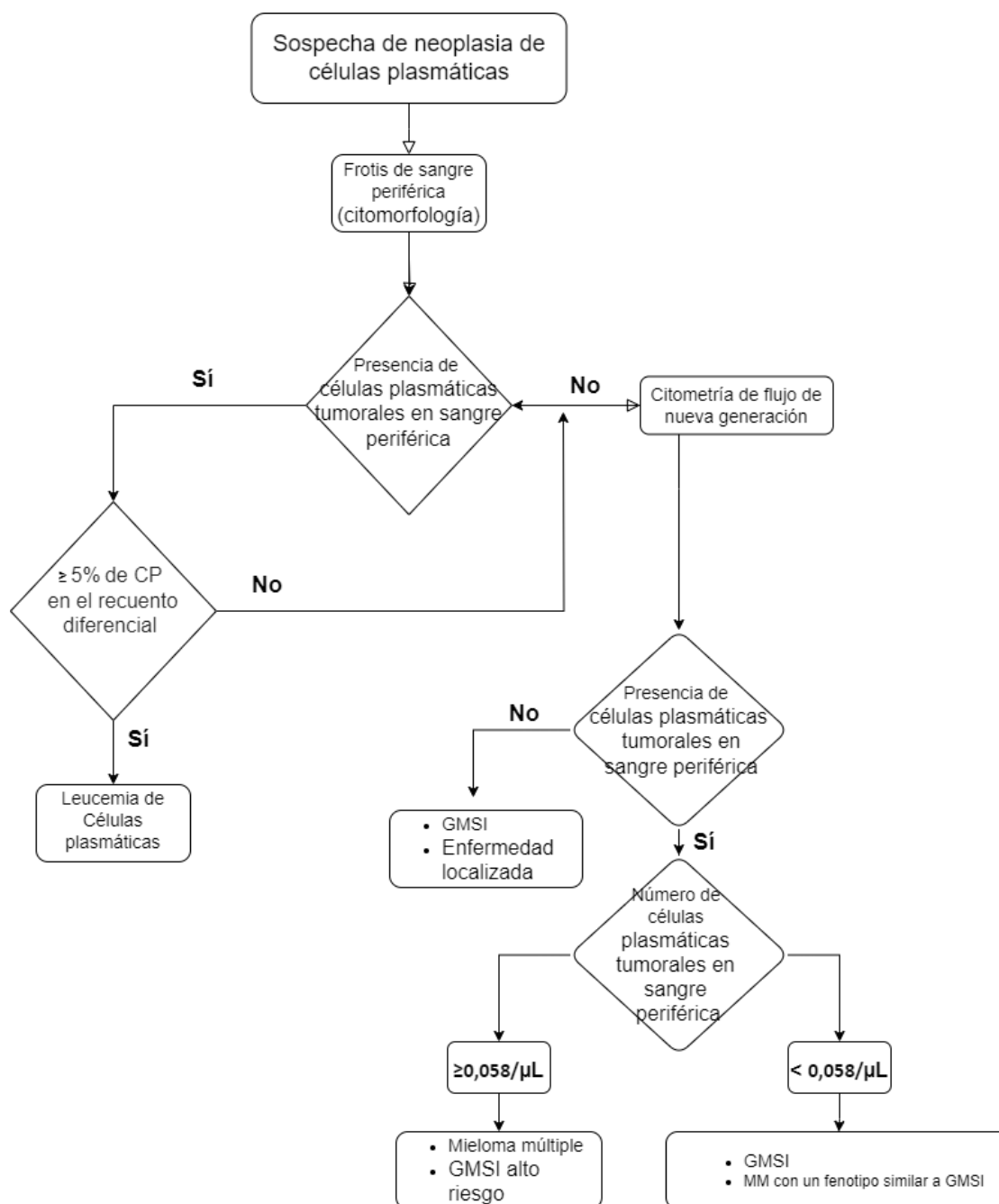


Figura 10. Estrategia propuesta para un estudio diagnóstico integral de pacientes con sospecha o diagnóstico de gammopatía monoclonal basado en la evaluación de células plasmáticas tumorales circulantes mediante tecnologías complementarias.

Elaboración propia. Modificado de (Sanoja Flores, 2020)

De esta forma, se propone el análisis de la citomorfología para detectar la presencia de CPTC a pesar de ser una técnica de detección de baja sensibilidad, reservando las pruebas más sensibles para pacientes con sospecha de neoplasia de células plasmáticas con resultados citomorfológicos en sangre negativos. (Sanoja-Flores, 2020)

En este algoritmo utilizan un punto de corte de 0,058 CPTC/ $\mu$ L que según el estudio fue capaz de discriminar GMSI de pacientes con MM con un 80% de sensibilidad y 80% de especificidad. Además desde el punto de vista pronóstico, el número de CPTC en sangre periférica detectado por citometría de flujo de nueva generación también demostró discriminar eficientemente entre casos de GMSI con riesgo alto de progresión a MM cuando se obtiene  $\geq 0,058$  CPTC/ $\mu$ L o riesgo bajo de progresión a MM al obtener un resultado  $< 0,058$  CPTC/ $\mu$ L, y para identificar aquellos pacientes con MM recién diagnosticado con supervivencia libre de progresión y supervivencia general reducida al obtener un conteo  $\geq 0,1$  CPTC/ $\mu$ L versus prolongada cuando se obtiene un conteo  $< 0,1$  CPTC/ $\mu$ L. (Sanoja-Flores, 2020)

En los casos donde los recuentos de células plasmáticas tumorales en sangre periférica obtenidos por citometría de flujo de nueva generación sean altos ( $\geq 0,058$  CPTC/ $\mu$ L) se consideran altamente sugestivos de MM, y se recomienda el examen de la MO para obtener un diagnóstico final. Por el contrario, en aquellos casos de GMSI donde no se detectan células plasmáticas tumorales en sangre periférica, y en los casos con recuentos bajos de CPTC en sangre se asociarán con mayor frecuencia con GMSI y MM latente de bajo riesgo. En tales casos, se podría considerar la planificación de un análisis de MO dependiendo de la presencia versus ausencia de síntomas y la cantidad del componente monoclonal sérico. (Sanoja-Flores, 2020)

A pesar de la menor sensibilidad de detección de CPTC mediante citometría de flujo de nueva generación en sangre periférica frente a la EMR en médula ósea, la persistencia de CPTC después del tratamiento se asocia con tasas de supervivencia libre de progresión cinco veces menores en comparación con los pacientes a los que no se les detectan células plasmáticas neoplásicas en sangre periférica, independientemente de la citogenética del tumor del paciente, la respuesta al tratamiento lograda, incluido el estado de la EMR de la MO, y la fase de tratamiento en la que se evalúa la presencia de CPTC en sangre. (Sanoja-Flores, 2020)

Los autores del estudio que expone este algoritmo (Figura 10), sugieren que, de manera similar, la presencia de CPTC en la sangre de los pacientes con MM una vez tratados puede verse como un marcador sustituto de la persistencia de la enfermedad de la MO y, por lo tanto, usarse para una planificación más eficiente del muestreo de MO para la determinación de EMR. Pues basándose en estudios que demuestran que pacientes con MM tratados que tenían CPTC en la sangre por citometría de flujo de nueva generación también obtuvieron un resultado positivo de EMR en MO, y que en caso de no detectar EMR en sangre periférica se recomienda analizar la EMR en MO ya que hay un porcentaje de casos de pacientes con EMR positivos en la MO que no muestran afectación sanguínea por CPTC. (Sanoja-Flores, 2020)

En conjunto, estos hallazgos demuestran que la citometría de flujo de nueva generación es una técnica altamente sensible que permite la identificación y cuantificación de CPTC en sangre en el momento del diagnóstico en la mayoría de los casos de GMSI y prácticamente en todos los casos de MM latente y MM. (Sanoja-Flores, 2020)

En una fracción importante de los casos de GMSI no se detectan células plasmáticas tumorales en sangre periférica, lo que podría ser de gran utilidad para evitar o retrasar el estudio de médula ósea. A su vez, los casos con recuentos bajos de células plasmáticas tumorales en circulación se asociarán con mayor frecuencia con GMSI, MM latente de bajo riesgo y MM similar a GMSI. En tales casos, se podría considerar la planificación de un análisis de MO dependiendo de la presencia versus ausencia de síntomas y la cantidad del componente monoclonal sérico. (Sanoja Flores, 2020)

De manera similar, la presencia de células plasmáticas tumorales en sangre periférica de pacientes con mieloma múltiple tratados puede verse como un marcador sustituto de la persistencia de la enfermedad de la MO y, por lo tanto, usarse para una planificación más eficiente del muestreo de MO. (Sanoja Flores, 2020)

Sin embargo, la detección de células plasmáticas tumorales en sangre periférica mediante citometría de flujo de nueva generación, sigue siendo un marcador de EMR menos sensible que EMR en médula ósea para el seguimiento de pacientes con MM tratados. Pero, la monitorización sanguínea de CPTC tiene múltiples ventajas en comparación con la determinación de EMR en MO ya que la muestra se obtiene mediante un procedimiento

menos invasivo, no se ve afectado por la distribución irregular de la enfermedad o la hemodilución que podrían afectar su determinación en médula ósea. Lo cual permitiría un seguimiento más frecuente de GMSI recién diagnosticado y de pacientes con MM tratados que alcanzan una respuesta completa. (Sanoja-Flores, 2020)

## Conclusiones

El mieloma múltiple junto con otras discrasias de células plasmáticas representa una causa importante de morbilidad y mortalidad entre la población adulta en Costa Rica y el mundo. Por ello, se considera importante conocer la fisiopatología de la enfermedad que incluye su evolución natural, así como las opciones diagnósticas y terapéuticas disponibles según cada escenario clínico, con el fin de contribuir a visibilizar esta neoplasia.

La evolución de la técnica de citometría de flujo y su aplicación en el campo del diagnóstico de laboratorio ha permitido conseguir lo que hoy es la citometría de flujo de nueva generación, que se ha consolidado como una técnica sensible y específica, que ha cambiado la forma en que la citometría de flujo contribuye como herramienta diagnóstica y de seguimiento de la EMR de neoplasias hematológicas entre las que se incluye el mieloma múltiple, por lo que todos los esfuerzos para lograr la estandarización de protocolos y reactivos que permitan obtener resultados comparables entre distintos centros médicos son de suma importancia.

Las técnicas de detección de EMR actualmente recomendadas por el grupo internacional de mieloma (IMWG) son la técnica de citometría de flujo de nueva generación desarrollada por el grupo EuroFlow y la secuenciación de nueva generación empleando la estrategia de ClonoSEQ, ya que ambas alcanzan los niveles deseables de detección, que permiten la detección de remanentes de células plasmáticas neoplásicas cuando se encuentren en muy bajo porcentaje.

En Costa Rica actualmente no se procesan muestras de sangre periférica para detección de EMR, la muestra de elección sigue siendo la médula ósea, sin embargo, se considera que con el tiempo y mayor evidencia científica en el futuro se debe evaluar la técnica, ya que la cuantificación por citometría de flujo de las células plasmáticas circulantes muestra un impacto pronóstico significativo.

Los laboratorios especializados en el país que realizan análisis de citometría de flujo de nueva generación, utilizan protocolos de trabajo similares, y emplean las técnicas estandarizadas por los expertos del consorcio EuroFlow.

Las estadísticas de la enfermedad en Costa Rica difieren a la reportada en la literatura, según los datos obtenidos, que son limitados, se han reportado 353 casos MM en los últimos años con una frecuencia levemente mayor en mujeres que corresponde al 50,4% y de 49,6% en hombres, lo cual resulta llamativo ya que la distribución es bastante homogénea y difiere con lo reportado en la literatura donde se indica que la incidencia es mayor en hombres. La edad promedio al momento del diagnóstico corresponde a 65,1 años con un rango entre los 33 y los 95 años, lo cual se encuentra dentro del rango de edad descrito en la literatura. Se han reportado 80 casos de pacientes con GMSI/MM latente en Costa Rica en el mismo periodo 2016 – 2024.

## Referencias

- Alarcón-Payer, C.C. (2022). Estudio de terapia secuencial en mieloma múltiple en recaída. *Revista de la OFIL*, 32(3), 283-290. <https://dx.doi.org/10.4321/s1699-714x20220003000012>
- Alejo, E., Puertas, B. y Mateos, M.V. (2023). Gammapatía monoclonal de significado incierto. *Medicina Clínica*, 161(5), 217-224. Doi: 10.1016/j.medcli.2023.05.006
- Arana Berganza, P. (2021). Evaluación de enfermedad mínima residual en mieloma múltiple: nuevos algoritmos para la estratificación pronóstica de pacientes mediante citometría de flujo multiparamétrica. [Tesis doctoral, Universidad de Navarra]. doi:<https://hdl.handle.net/10171/60687>
- Bae, M.H., Park, C.J., Kim, B.H., Cho, Y.U., Jang, S., Lee, D.H., Seo, E.J., Yoon, D.H., Lee, J.H., Suh, C. (2018). Increased circulating plasma cells detected by flow cytometry predicts poor prognosis in patients with plasma cell myeloma. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 94(3):493-499. doi: 10.1002/cyto.b.21606
- Baker, B. (21 de abril de 2022). *Implementación rápida de diseños de citómetros de flujo mediante módulos de adquisición de datos de alta precisión*. <https://www.digikey.com.mx/es/articulos/quickly-implement-flow-cytometer-designs-using-high-accuracy-data-acquisition-modules>
- Campus Sanofi. (20 de abril de 2023). Enfermedad Mínima Residual en Mieloma Múltiple: Campus Sanofi. Recuperado el 13 de abril de 2024, de Campus Sanofi Web Site: <https://campus.sanofi.es/es/ciencia/mieloma-multiple/enfermedad-minima-residual>.
- Cardona Quiceno, R.A. (2021). Detección por citometría de flujo de la enfermedad mínima residual en las leucemias aguda. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 37(3), e1428. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892021000300009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892021000300009)
- Castro García, B.K. (2021). *Amiloidosis y Mieloma Múltiple. Manifestaciones Bucales. Revisión bibliográfica*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Metropolitana]. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/26053>
- Cerezo Ríos, J. (2024). *Evolución de los criterios y técnicas para la evaluación de la respuesta al tratamiento en pacientes con mieloma múltiple*. [Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Salamanca]. <http://hdl.handle.net/10366/158233>
- Chakraborty, R., Muchtar, E., Kumar, S.K., Jevremovic, D., Buadi, F.K., Dingli, D., Dispenzieri, A., Hayman, S.R., Hogan, W.J., Kapoor, P., Lacy, M.Q., Leung, N., Gertz, M.A.. (2017). Serial measurements of circulating plasma cells before and after induction therapy have an independent prognostic impact in patients with multiple myeloma undergoing upfront autologous transplantation. *Haematologica*, 102(8): 1439–1445. doi: 10.3324/haematol.2017.166629
- Cytognos. (2021). *Catálogo 2021*. [Archivo pdf]. [https://campuspatologia.s3.us-east-2.amazonaws.com/wp-content/uploads/2021/09/20202009/Makol\\_4\\_Banner.pdf](https://campuspatologia.s3.us-east-2.amazonaws.com/wp-content/uploads/2021/09/20202009/Makol_4_Banner.pdf)

- Escalona-González, S., González-Milán, Z.C. y Vázquez-González, L.A. (2020). Mieloma múltiple como presentación de enfermedad renal crónica terminal. *EsTuSalud*, 2(1). <https://revestusalud.sld.cu/index.php/estusalud/article/download/5/5>
- Fernández Arregui, A. (2023). *Inmunoterapia con daratumumab en pacientes con mieloma múltiple: Estudio descriptivo retrospectivo realizado en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Basurto*. [Trabajo Fin de Grado, Universidad del país Vasco]. <http://hdl.handle.net/10810/62526>
- Flores-Montero, J., Sanoja-Flores, L., Paiva, B., Puig, N., García-Sánchez, O., Böttcher, S., van der Velden, V.H.J., Pérez-Morán, J.J., Vidriales, M.B., García-Sanz, R., Jimenez, C., González, M., Martínez-López, J., Corral-Mateos, A., Grigore, G.E., Fluxá, R., Pontes, R., Caetano, J., Sedek, L., Del Cañizo, M.C., Bladé, J., Lahuerta, J.J., Aguilar, C., Báez, A., García-Mateo, A., Labrador, J., Leoz, P., Aguilera-Sanz, C., San-Miguel, J., Mateos, M.V., Durie, B., van Dongen, J.J.M., Orfao, A. (2017). Next Generation Flow para la detección altamente sensible y estandarizada de la enfermedad residual mínima en el mieloma múltiple. *Leucemia*, 31(10), 2094–2103. doi:10.1038/leu.2017.29
- Garcés, J.J., Bretones, G., Burgos, L., Valdes-Mas, R., Puig, N., Cedena, M.T., Alignani, D., Rodríguez, I., Álvarez Puente, D., García Álvarez, M., Goicoechea, I., Rodríguez, S., Calasanz, M.J., Agirre, X., Flores-Montero, J., Sanoja-Flores, L., Rodríguez-Otero, P., Rios, R., Martínez-Lopez, J., Millacoy, P., Palomera, L., Del Orbe, R., Pérez-Montaña, A., El Omri, H. (2020). Células tumorales circulantes para la caracterización genética no invasiva integral y multirregional del mieloma múltiple. *Leucemia*, 34, 3007–3018. doi: <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0883-0>
- Garí Carvajal, C. (2023). *Estudio gammapatía monoclonal de significado incierto en la población adulta del área de referencia del Hospital Universitario Son Llàtzer: Características clínicas y biológicas de evolución a mieloma múltiple*. [Tesis, Universitat de les Illes Balears]. <https://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/160107>
- Go, R.S. y Rajkumar, S. V. (2018). How I manage monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 131(2), 163-173. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-807560>
- Han, W.J. (2021). Prognostic value of circulating clonal plasma cells in newly diagnosed multiple myeloma. *Hematology*, 26(1), 510-517. DOI: 10.1080/16078454.2021.1948208
- Herlein, T.I. Fanessi, V.; Cismondi, V.; Issouribehere, D.; Herlein, T.; Ghio, A.; Cruset, S.; Bordone, J.; Scandizzo, E. (25 y 26 de Octubre de 2017). *Detección de enfermedad mínima residual por citometría de flujo de alta sensibilidad en pacientes con Mieloma Múltiple post trasplante autólogo*. 10º Jornadas Científicas del HEC. <http://repositorio.hospitalelcruce.org/xmlui/handle/123456789/579>
- Ismaeel, A., Farid, E., Majed, K.S., Mansoor, E.J., Toorani, J., Tufail, F., Abdulla Aldanasoury, R., Ali Alsuwaidi, S. y Kumar Shome, D. (2023). Hematologic malignancies of primary bone marrow. *Asociación brasileña de hematología*, 45(2), S68-S75. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.02.002>
- Jevremovic, D. (2022). Multiple myeloma: Pathobiology. U: UpToDate, Rajkumar SV ed. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate.

- Katzmann, J.A., Dispenzieri, A., Kyle, R.A., Snyder, M.R., Plevak, M.F, Larson, D.R., Abraham, R.S., Lust, J.A.L, Melton, J., Rajkumar, S.V. (2006). Elimination of the need for urine studies in the screening algorithm for monoclonal gammopathies by using serum immunofixat and free light chain assays. *Mayo Clin Proc.*, 81(12): 1575-1578.DOI: 10.4065/81.12.1575
- Kostopoulos, I., Papanota, A., Ntanasis-Stathopoulos, I., Papadimitriou, K., Malandrakis, P., Eleftherakis-Papaiakovou, E., Rousakis, P., Panteli, C., Kanellias, N., Fotiou, D., Migkou, M., Gavriatopoulou, M., Kastritis, E., Tsitsilonis, O., Dimopoulos, M.A, Terpos, E. (2020). MM-167: Phenotypic and Prognostic Evaluation of Circulating Plasma Cells in Newly Diagnosed Multiple Myeloma Detected with Next-Generation Flow Cytometry (NGF). *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 20(Supp 1), S297-S298. [https://doi.org/10.1016/S2152-2650\(20\)30936-8](https://doi.org/10.1016/S2152-2650(20)30936-8)
- Kusumawindani, D., Savitri, M., Noor Diansyah, M., Niken Amrita, P., Zaky Romadhon, P., Yudho Bintoro, S.U., Ashariati, A. (2023). Autoimmune Hemolytic Anemia, Amoebic Dysentery, And Intracranial Hemorrhage as Rare Manifestations of Smoldering Multiple Myeloma. *Gaceta Médica de Caracas*, 131(Supl 2): S228-S234. DOI: 10.47307/GMC.2023. 131.s2.20
- Labnalcit.org. (01 de febrero de 2016). *¿Qué es la Citometría de Flujo?* Obtenido de <https://labnalcit.org/que-es-la-citometria-de-flujo/>
- Laubach, J. P. (2022). Multiple myeloma: Clinical features, laboratory manifestations, and diagnosis. U: UpToDate, Rajkumar SV ed. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate.
- Leukemia & Lymphoma society. (2020). *Tabla sobre enfermedad residual mínima/medible*. [Archivo pdf]. [https://www.lls.org/sites/default/files/2021-05/PS117S\\_SP\\_MRD\\_Chart\\_Dec2020.pdf](https://www.lls.org/sites/default/files/2021-05/PS117S_SP_MRD_Chart_Dec2020.pdf)
- Lissarrague, E., Fregeiro, M.S., Binstok, Y., Barla, C., Cavani, M., Frachia, F., Ranero, S., Servente, L. y Riva, E. (2022). Aportes de la tomografía por emisión de positrones con 18F-fluorodesoxiglucosa/tomografía computada en el diagnóstico de compromiso extramedular por mieloma múltiple en Uruguay. *Revista médica de Chile*, 150(2), 199-205. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872022000200199>
- Liu, Z., Wang a, H., Liu, H., Ding, K., Shen, H., Zhao, X, Fu, R. (2024). Targeting NKG2D/NKG2DL axis in multiple myeloma therapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 76(2024), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2024.02.001>
- Lugo-Bautista, K.S., Díaz-Greene, E.J., & Rodríguez-Weber, F.L. (2022). Tratamiento contra el mieloma múltiple latente de alto riesgo. *Medicina Interna de Mexico*, 38(3), 560-570. <https://doi.org/10.24245/mim.v38i3.4236>
- Mateos, M. V. (2023). Smoldering multiple myeloma. U: UpToDate, Rajkumar SV ed. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate.
- Martínez Sánchez, L.M., Álvarez Hernández, L.F., Ruiz Mejía, C., Villegas Álzate, J.D. (2018). Utilidad del cariotipo y la citometría de flujo en el mieloma múltiple. *Rev cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 34(3):1-16. <https://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/913/798>
- Medina Herrera, A. (2021). *Caracterización molecular del reordenamiento de la cadena pesada de inmunoglobulinas en mieloma múltiple: utilidad como marcador de enfermedad mínima*

*residual*. [Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca].  
<https://gredos.usal.es/handle/10366/148915?locale-attribute=es>

- Miranda Rojas, K. y Murillo Mesén, C. (2020). *Características clínicas, demográficas y respuesta a tratamiento de los pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple en quienes se realizó trasplante autólogo de médula ósea entre los años 2012 y 2016 en la unidad de trasplante de médula ósea del Hospital San Juan de Dios*. [Tesis, Universidad de Costa Rica] <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/81393>
- Mogorrón, M. A. (2022). *Utilidad pronóstica de parámetros biológicos e inmunológicos en pacientes con gammopatías monoclonales*. [Doctoral dissertation, Universidad de Murcia]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=315659>
- Monroy Pesantez, M.F., Saracay Carrillo, H.E., Domínguez Vacacela, E.D., Huang Carpio, J.J. (2022). Diagnóstico de mieloma múltiple. *RECIMUNDO*, 6(2), 133-142. [https://doi.org/10.26820/recimundo/6.\(2\).abr.2022.133-142](https://doi.org/10.26820/recimundo/6.(2).abr.2022.133-142)
- Moya, A. (16 de 11 de 2020). Actualización en oncología y hematología para farmacéuticos. [Archivo pdf]. <https://svfh.es/wp-content/uploads/2020/11/16.-Mieloma-multiple.-Ana-Moya.pdf>
- Navarro-Hernández, M., Reynoso-Noverón, N., De la Piedra-Gómez, A. (2018). Encuesta sobre el uso de Medicina alternativa y complementaria en pacientes mexicanos con cáncer atendidos en un centro de referencia oncológico. *Gaceta Mexicana Oncología*, 17, 237-244. DOI: 10.24875/j.gamo.18000146
- Nowakowski, G. S., Witzig, T.E., Dingli, D., Tracz, M.J., Gertz, M.A., Lacy, M.Q., Lust, J.A., Dispenzieri, A., Greipp, P.R., Kyle, R.A., Rajkumar, S.V. (2005). Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, 106(7): 2276–2279. doi: 10.1182/blood-2005-05-1858
- Ortiz Hidalgo, C. (2011). De las células plasmáticas al mieloma múltiple. Una breve perspectiva histórica. *Patología Revista latinoamericana*, 49(2), 120-131. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patrevlat/rlp-2011/rlp112c.pdf>
- Paiva, B., Puig, N., Cedena, M.T., Rosiñol, L., Cordón, L., Vidriales, M.B., Burgos, L., Flores-Montero, J., Sanoja-Flores, L., Lopez-Anglada, L., Maldonado, R., de la Cruz, J., Gutierrez, N.C., Calasanz, M.J., Martin-Ramos, M.L., Garcia-Sanz, R., Martinez-Lopez, J., Oriol, A., Blanchard, M.J., Rios, R. (2020). Enfermedad residual medible mediante citometría de flujo de próxima generación en mieloma múltiple. *Revista de Oncología Clínica*, 38(8), 784-792. doi:10.1200/JCO.19.01231
- Patiño Uriostegui, L.N. y Velazquez Cruz, R. (2022). Fundamentos de citometría de flujo. *Mens. Bioquím*, 46(2022), 67-77. <http://bq.facmed.unam.mx/tab>
- Peña-Celaya, J.A., Aguilar-Luevano, J., Alcivar-Cedeño, L.M., Álvarez-Vera, J.L., Anaya-Cuellar, I., Añorve-Hernández, E., Arana-Luna, L.L., Arteaga-Ortiz, L., Báez-Islas, P.E., Banda-García, L.I., Bates-Martín, R.A., Campa-Monroy, D.I., Cardiel-Silva, M., Castillo-Salas, Á.J., Cota-Rangel, X., Díaz-Vargas, G., Espitia-Ríos, M.E., Estrada-Domínguez, P., Fermín-Camirero, D., García-Camacho, A. (2020). Consenso Mexicano de Mieloma Múltiple. *Gaceta Médica Mexicana*, 156(supl.2), 1-49. <https://doi.org/10.24875/gmm.m20000392>

- Pera, S.C. (2018). *Papel del trasplante alogénico en el mieloma múltiple*. [Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Salamanca] [https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/80770/1/TFG%20JULHO\\_Sandra%20Pera.pdf](https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/80770/1/TFG%20JULHO_Sandra%20Pera.pdf)
- Pimentel, M.E., Espinal, O., Godinez, F., Jimenez, F., Martinez, D., Mendoza, N., Quintana, A., Richmond, J.E., Romero, E. (2022). Declaración de consenso: Importancia del acceso oportuno al diagnóstico y tratamiento del mieloma múltiple en Centroamérica y el Caribe. *Revista de Hematología*, 11(1), 1. doi: 10.14740/jh971
- Prieto, M.L. (2023). *Análisis del impacto pronóstico de la enfermedad residual medible, evaluada por citometría de flujo de nueva generación y PET-CT en la práctica clínica de los pacientes con mieloma múltiple*. Academia Nacional de Medicina de Colombia. <https://anmdecolombia.org.co/analisis-del-impacto-pronostico-de-la-enfermedad-residual-medible-evaluada-por-citometria-de-flujo-de-nueva-generacion-y-pet-ct-en-la-practica-clinica-de-los-pacientes-con-mieloma-multiple/>
- Rajkumar, S. (2022). Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*, 95(5), E105-E130. doi: <https://doi.org/10.1002/ajh.25791>
- Ramos-Peñafiel, C., Madera-Maldonado, C., Santoyo Sánchez, A., Rojas-González, E., Olarte-Carrillo, I., Martínez-Tovar, A., Collazo-Jaloma, J. (2021). Mieloma múltiple: consideraciones especiales sobre el diagnóstico. *Revista Colombiana de Cancerología*, 25(2), 93-102. doi: <https://doi.org/10.35509/01239015.140>
- Remaggi, G. (2021). El mieloma “smoldering”. *Hematología*, 25(Extraordinario), 427-432. [https://books.google.co.cr/books/about/Hematologia.html?id=Qp5MEAAAQBAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.co.cr/books/about/Hematologia.html?id=Qp5MEAAAQBAJ&redir_esc=y)
- Rincón-Vásquez N.J., Jaramillo-Arbeález, P.E. y Llanos-Albornoz, C.M. (2021). Morfología e inmunofenotipo de las células plasmáticas en el mieloma múltiple. *Medicina & Laboratorio.*, 23(09-10):443-458. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/05/883834/mieloma-multiple.pdf>
- Sanoja Flores, L. d. C. (2020). *Desarrollo y validación de un nuevo método de citometría de flujo de nueva generación para la detección sensible y estandarizada de células plasmáticas tumorales en médula ósea y sangre periférica de pacientes con neoplasias de células plasmáticas utilidad clínica*. [Tesis, Universidad de Salamanca]. <http://hdl.handle.net/10366/144218>
- Sanoja-Flores, L.F., Flores-Montero, J., Pérez-Andrés, M., Puig, N. y Orfao, A. (2020). Detection of circulating tumor plasma cells in monoclonal gammopathies: methods, pathogenic role, and clinical implications. *Cancers*, 12(6), 1499. <https://doi.org/10.3390/cancers12061499>
- Segura, M.K.Á., Oquendo, E.R.L., Barrera, C.J.C. y Sánchez, M.V.C. (2020). Mieloma Múltiple: Métodos de Diagnóstico. *Journal of American Health*, 3(2), 21-31. <https://doi.org/10.37958/jah.v3i2.27>
- Shaji Kumar (2024). Multiple myeloma: Evaluating response to treatment. U: UpToDate, Rajkumar SV ed. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate.

- Shapiro, H.M. (2004). "Cellular astronomy"—A foreseeable future in cytometry. *The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 60(2), 115-124. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20067>
- Torrejón Serrano, A. (2023). *Inmunoterapia con el anticuerpo biespecífico Teclistamab para el tratamiento del mieloma múltiple*. [Tesis, Universidad Europea de Madrid]. <https://hdl.handle.net/20.500.12880/6087>
- Vargas Fallas, T. (2020). *Forma de presentación del Mieloma Múltiple en adultos mayores atendidos en el Hospital Nacional de Geriátrica y Gerontología, durante el periodo de enero 2010 a enero 2019*. [Tesis, Universidad de Costa Rica]. <https://hdl.handle.net/10669/81175>
- Xia, Y. (2023). High-risk multiple myeloma predicted by circulating plasma cells and its genetic characteristics. *Front Oncol*, 13(2023), 1-11. doi: 10.3389/fonc.2023.1083053