



## **Práctica Optativa**

# **“Estudio de la Prevalencia de Neoplasias de Células Plasmáticas procesadas en el Laboratorio Central de la Provincia de Corrientes. Periodo 2013–2024”**

### **Autor**

Juan Manuel Sosa

### **Director**

Bioq. Emiliano Sotelo Rodriguez

### **Co-Directora**

Bioq. María Patricia de la Paz Ibarrola Leiva

### **Asesora**

Prof. María Josefa Jorge

### **Lugar de Trabajo**

Área de Citometría de Flujo - Oncohematología  
Laboratorio Central de Redes y Programas de la Provincia de Corrientes

### **Carrera**

Bioquímica

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura  
Universidad Nacional del Nordeste**

# **2024**

## Índice

1. Introducción .....	4
2. Objetivos.....	5
2.1. Generales .....	5
2.2. Específicos .....	5
3. Marco Teórico .....	5
3.1. Ontogenia de Linfocitos B y Diferenciación a Células Plasmáticas .....	5
3.1.1. Estadios del Desarrollo del Linfocito B .....	6
3.1.2. Diferenciación a Células Plasmáticas .....	8
3.1.3. Células Plasmáticas.....	9
3.2. Fundamentos de la Citometría de Flujo .....	10
3.2.1. Sistema de Fluidos.....	11
3.2.2. Sistema Óptico .....	11
3.2.2.1. Parámetros de Estudio .....	13
3.2.3. Sistema Electrónico .....	14
3.2.4. Inmunofenotipificación.....	15
3.3. Neoplasias de Células Plasmáticas .....	16
3.3.1. Células Mielomatosas Malignas .....	16
3.3.2. Fisiopatología de las Neoplasias de Células Plasmáticas .....	17
3.3.3. Clasificación de Neoplasias de Células Plasmáticas .....	18
3.3.3.1. Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto (MGUS).....	18
3.3.3.2. Mieloma Múltiple Quiescente (Smoldering) o Asintomático .....	19
3.3.3.3. Mieloma Múltiple .....	19
3.3.4. Pruebas Analíticas para el Diagnóstico y Pronóstico de las NCP .....	20
3.3.5. Pronóstico, Supervivencia y Estratificación de las NCP .....	20
3.4. Estudio Inmunofenotípico de NCP mediante CMF .....	21
3.4.1. Marcadores utilizados en el estudio de Neoplasias de Células Plasmáticas ....	23
3.4.2. Panel de Inmunomarcación para NCP.....	25
3.4.3. Valor Predictivo de la presencia de Células Plasmáticas Aberrantes en Sangre Periférica en el momento del Diagnóstico .....	27
3.5. Conceptos Estadísticos y Epidemiológicos.....	27
4. Datos y Resultados .....	29
4.1. Inmunomarcación Superficial e Intracitoplasmática .....	29
4.1.1. Preparación de la Muestra .....	29
4.1.2. Inmunomarcación superficial .....	29

4.1.3.	Marcación intracitoplasmática .....	30
4.2.	Análisis para la Inmunofenotipificación de Células Plasmáticas .....	31
4.3.	Justificación de la Población de Estudio .....	35
4.4.	Análisis descriptivo de la variable <i>edad</i> .....	35
4.5.	Análisis descriptivo de la variable <i>Sexo</i> .....	37
4.6.	Análisis descriptivo de la variable <i>Institución de Salud</i> .....	38
4.7.	Prevalencia de Neoplasias de Células Plasmáticas .....	41
4.8.	Análisis de la Clonalidad de Neoplasias de Células Plasmáticas.....	43
4.9.	Expresión de los Marcadores Utilizados .....	44
4.10.	Pruebas de Hipótesis Paramétricas y No-Paramétricas .....	45
4.10.1.	Prueba de t-Student: <i>Comparación de medias de la edad en los subgrupos de diagnóstico</i> .....	45
4.10.2.	Prueba de Chi-Cuadrado de Independencia: <i>Edad vs Diagnóstico (n=126)</i> ....	45
4.10.3.	Prueba de Chi-Cuadrado de Independencia: <i>Sexo vs Diagnóstico (n=126)</i> .....	46
4.10.4.	Pruebas de Chi-cuadrado de Independencia: <i>Relación entre expresión de marcadores y subgrupos de diagnóstico</i> .....	46
5.	Conclusiones .....	48
6.	Agradecimientos .....	50
7.	Bibliografía .....	51
8.	Anexo.....	52
8.1.	Pruebas de Chi-Cuadrado de Independencia: <i>Marcadores vs Diagnóstico</i> .....	52
8.2.	Pruebas de Chi-Cuadrado de Independencia: <i>Cadenas Livianas vs otros marcadores</i> .....	55
8.3.	Pruebas de Chi-Cuadrado de Independencia: <i>Expresión de marcadores</i> .....	59

## 1. Introducción

Las *gammopatías monoclonales* representan un grupo de diversos trastornos caracterizados por la proliferación de un clon de células plasmáticas (CP) que tienen la capacidad de producir una inmunoglobulina o un fragmento de ella, que puede detectarse en sangre y/u orina en forma de una banda de carácter homogéneo o componente monoclonal (M) en el proteinograma electroforético<sup>1</sup>.

Las *Neoplasias de Células Plasmáticas* (NCP) incluyen un amplio espectro evolutivo, iniciando con una fase premaligna, denominada “Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto (MGUS)”, caracterizada por la aparición de una población clonal de CPs con secreción de una gammaglobulina clonal, que puede evolucionar posteriormente a una fase denominada “Mieloma Múltiple Indolente, Quiescente, *Smoldering* o Asintomático (SMM)” y finalmente al “Mieloma Múltiple Sintomático (MM)”<sup>2</sup>.

El MM representa el 1,5% de todas las neoplasias y el 15% de las hemopatías malignas, teniendo el segundo lugar tras el linfoma. Es más frecuente en la población adulta con una mediana de edad entre los 69 y 70 años. Es una enfermedad de pronóstico muy heterogéneo y difícil de predecir. Por otra parte, se estima que el 3% de los individuos mayores de 50 años presenta una MGUS. En la citogenética, la característica de esta enfermedad es la presencia de cariotipos altamente complejos, poseyendo alteraciones tanto estructurales como de ploidía que suelen ser acumulativas con la progresión<sup>3</sup>.

En el aspecto epidemiológico, según datos de EEUU, su incidencia es de 56 casos nuevos por cada millón de habitantes y año. Además, se sitúa como la décima causa de muerte por cáncer en números absolutos (3,8 muertes por cada 100000 habitantes y año). Solo un 15% de los casos se diagnostica antes de los 50 años. No hay diferencias relevantes en la incidencia por sexo y origen étnico<sup>3</sup>.

El análisis mediante *Citometría de Flujo* (CMF) brinda información en diversos aspectos de la patología, como ser la descripción del inmunofenotipo, la clonalidad, el pronóstico, la ploidía, índices de proliferación y apoptosis, y la detección de la presencia de CPs atípicas en sangre periférica. Por lo tanto, la CMF resulta una herramienta sumamente útil para<sup>4</sup>:

1. Identificación, cuantificación y caracterización de las células plasmáticas
2. Detección de monoclonalidad
3. Diagnóstico diferencial de las entidades nombradas
4. Estimación de marcadores de utilidad pronóstica
5. Evaluación de la respuesta terapéutica y la progresión de la enfermedad mediante estudios de Enfermedad Mínima Residual (EMR)

El presente trabajo fue realizado en el marco de la asignatura “Practica Optativa”, comprendida en el Plan de Estudios 2009 para la Carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la Universidad Nacional del Nordeste.

El enfoque metodológico fue de tipo cuali-cuantitativo, retrospectivo, transversal y analítico. El objetivo del mismo fue el de estudiar por primera vez la prevalencia de las Neoplasias de Células Plasmáticas procesadas en el Área de Citometría de Flujo – Oncohematología del Laboratorio Central de Redes y Programas de la Ciudad de Corrientes, en el periodo enero 2013-septiembre 2024, teniendo en cuenta el estudio inmunofenotípico de muestras de médula ósea.

## 2. Objetivos

### 2.1. Generales

- Proporcionar a los alumnos una formación teórica y práctica en los fundamentos y técnicas básicas de la citometría de flujo.
- Conocer la prevalencia de las Neoplasias de Células Plasmáticas en la población estudiada en el Laboratorio Central de Redes y Programas de la Provincia de Corrientes.
- Posibilitar un mayor desarrollo de competencias en aspectos no tradicionales del perfil profesional y que presentan una importante demanda: área de Citometría de Flujo – Oncohematología.

### 2.2. Específicos

- Iniciación en técnicas utilizadas en citometría de flujo.
- Aprendizaje de hábitos de trabajo correctos y adquisición de habilidades para el futuro uso de estas técnicas.
- Adquirir entrenamiento en la utilización de una citometría de flujo.
- Adquirir conocimiento teórico acerca de la fisiopatología de las Neoplasias de Células Plasmáticas.
- Determinar la prevalencia de las Neoplasias de Células Plasmáticas en la población estudiada en el Laboratorio Central de la Provincia de Corrientes.
- Registrar y comparar los resultados obtenidos.
- Elaborar conclusiones.

## 3. Marco Teórico

### 3.1. Ontogenia de Linfocitos B y Diferenciación a Células Plasmáticas

Al igual que el resto de los componentes celulares del sistema inmunitario, los linfocitos B se originan a partir de un precursor común denominado *stem cell* o *célula madre pluripotente hematopoyética* (CMPH). Estas tienen la capacidad de autorrenovarse y de dar lugar a distintos tipos celulares. A partir de esta, se diferencian los dos primeros progenitores, el *progenitor mieloide común* y el *progenitor linfoide común (PLC)*, siendo de este último del cual se generarán los linfocitos B y T<sup>5</sup>.

De forma general, se establece que la maduración de los linfocitos B tiene lugar en dos estadios diferentes y en dos localizaciones distintas: la diferenciación de precursores de células B desde la *stem cell* hasta los linfocitos B maduros *naïve*, que ocurre en la médula ósea (MO); y la maduración a células de memoria/efectoras, que tiene lugar en los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos (GL), bazo y tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y MO<sup>6</sup>.

La ontogenia B ocurre en la MO y depende de la presencia de células estromales. Estas últimas, no solo tienen funciones de sostén, sino que también sintetizan factores de crecimiento que tienen un papel crítico al estimular la diferenciación y proliferación de los precursores B<sup>5</sup>.

Las claves durante la maduración de los linfocitos B son el reordenamiento y expresión de los genes de Inmuglobulina (Ig) en un orden preciso, la selección y proliferación de los linfocitos B en desarrollo en el punto de control del prerreceptor para el antígeno, y la selección del repertorio de linfocitos B maduros<sup>7</sup>.

### 3.1.1. Estadios del Desarrollo del Linfocito B

Durante la maduración, las células del linaje linfóide B atraviesan estadios distinguibles, caracterizados por diferentes marcadores de superficie celular y un patrón específico del gen de la Ig<sup>5,7</sup>. Basándonos en esto, se han identificado cinco compartimentos madurativos de células B en la MO: precursores pro-B, pre-B-I, pre-B-II, linfocitos B inmaduros (o transicionales) y células B *naïve*<sup>6</sup>.

A continuación, se describen los cambios ocurridos y las características propias de cada estadio. Al finalizar este apartado se exponen los Cluster of Differentiation (CD) expresados en cada uno.

- **Pro-Linfocito B (Pro-B)**

Representa el primer estadio comprometido en la línea de diferenciación de linfocitos B y conservan la capacidad de autorrenovarse. Estos no producen Ig, pero pueden distinguirse de otras células inmaduras por la expresión de moléculas de superficie restringidas al linaje B, como CD19 y CD10<sup>7</sup>. Tras la interacción de IL-7 con su receptor promueve la producción de varios factores de transcripción que induce la síntesis de la enzima TdT y el gen activador de la recombinación (RAG), por lo que se sintetizan las proteínas RAG-1 y RAG-2, involucradas en la recombinación génica del locus de la cadena pesada de la Ig (IgH)<sup>6,7</sup>. El reordenamiento es un acontecimiento crítico en la expresión de Ig y característico de este primer estadio, porque solo el gen reordenado se transcribirá<sup>5,7</sup>. La enzima TdT se sobreexpresa, ya que se encarga de catalizar la adición sin plantilla de los nucleótidos N de la unión, principalmente cuando se da la recombinación VDJ del *locus* IgH, para luego disminuir una vez reordenada la cadena ligera<sup>6,7</sup>.

Si el reordenamiento resulta productivo, el ARNm de la cadena  $\mu$  es traducido, llevando a la síntesis de la cadena H $\mu$  que se expresará en la superficie del siguiente estadio. Alrededor de la mitad de los pro-linfocitos B producen reordenamientos productivos del *locus* IgH al menos en un cromosoma, y pueden así sintetizar la cadena  $\mu$ , solo estas sobreviven y continúan el proceso de diferenciación<sup>5,7</sup>.

- **Pre-Linfocito B (Pre-B)**

Una vez obtenido el reordenamiento productivo de la cadena H $\mu$  de la Ig y esta se expresa en la superficie, se considera que el precursor se ha diferenciado al estadio de pre-linfocito B, pero aún no posee el reordenamiento del *locus* de la cadena ligera. En la superficie, H $\mu$  se encuentra asociada a otras proteínas en un complejo llamado *receptor del pre-linfocito B* o *pre-BCR*, el cual ejerce importantes funciones en la maduración del linfocito B<sup>7</sup>.

En el pre-BCR, H $\mu$  se encuentra asociada con las proteínas pre-B  $\lambda$ 5 y pre-B V. Estas son conocidas como sustitutos de las cadenas ligeras, ya que tienen una estructura homóloga a  $\kappa$  y  $\lambda$ , siendo estas invariantes (idénticas en todos los pre-linfocitos B) y se sintetizan solo en el pasaje de linfocitos pro-B a pre-B. Las proteínas de transducción de señales Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  conforman un heterodímero que termina de conformar el pre-BCR. Este complejo proteico envía señales responsables de la expansión proliferativa del linaje B en MO. Al día de hoy, se desconoce el mecanismo de activación del mismo, aunque el consenso actual indica un funcionamiento independiente del ligando, activándose por el proceso de ensamblaje. A su vez, representa el primer punto de control en la ontogenia B, ya que es necesaria la presencia de numerosas moléculas transmisoras ligadas al pre-BCR para lograr la transición adecuada del estadio pro-B al pre-B. La tirosin kinasa de Bruton (Btk) se activa como consecuencia de la activación del pre-



BCR, y resulta necesaria para las señales transducidas por este receptor que median la supervivencia, la proliferación y la maduración en el estadio pre-B y posteriores<sup>7</sup>.

Por otra parte, el pre-BCR también tiene inferencia en el reordenamiento adicional de los genes de Ig. En primer lugar, si H $\mu$  logra conformar el pre-BCR se inhibe irreversiblemente el reordenamiento de la IgH en el otro cromosoma a través de la supresión de RAG-1 y RAG-2, y de no ser productivo el reordenamiento permite completar el reordenamiento VDJ en *locus* IgH del otro cromosoma. Este fenómeno se conoce como *exclusión alélica*, y es fundamental en la tolerancia inmunológica, ya que permite expresar solo un tipo de receptor manteniendo la especificidad clonal<sup>5,7</sup>.

Tras varios ciclos de expansión proliferativa, se obtiene entonces un mayor número de células con un reordenamiento H $\mu$  productivo, y es en estas células hijas donde se vuelven a expresar RAG-1 y RAG-2 estimulando el reordenamiento del gen de la cadena ligera  $\kappa$ . Sin embargo, para esto último no es absolutamente necesaria la expresión de la cadena H $\mu$ <sup>5,7</sup>.

Por último, las señales del pre-BCR inactivan la expresión del gen de los sustitutos de cadena ligera a medida que los pre-linfocitos B maduran<sup>5,7</sup>.

El reordenamiento del *locus* de la cadena liviana se produce de manera secuencial hasta lograr un reordenamiento productivo no autorreactivo. Comienza por el *locus*  $\kappa$  del primero cromosoma, luego el del segundo cromosoma, continuando por el *locus*  $\lambda$  de la misma manera. Como resultado de este proceso, un clon de linfocitos B puede expresar solo uno de los dos tipos de cadenas ligeras, conociéndose este fenómeno como *exclusión de isotipo de cadena ligera*<sup>7</sup>. Se estima que normalmente un 65% de los pre-linfocitos B logran un reordenamiento exitoso de la cadena L $\kappa$ , mientras que el restante 35% presenta reordenamientos productivos de la cadena L $\lambda$ <sup>5</sup>.

- **Linfocitos B inmaduros**

Una vez que se logra sintetizar la cadena liviana, la IgM logra conformarse completamente y se expresa en su superficie, por lo que el precursor se ha diferenciado a *linfocito B inmaduro*. Las moléculas de IgM ensambladas se expresan en la superficie celular asociadas a Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ , donde funcionan como receptores específicos para los antígenos, denominándose BCR. En las células que no son fuertemente autorreactivas, el BCR proporciona señales supervivencia y de inactivación de la expresión del gen RAG, lo que impide un mayor reordenamiento génico de Ig. Los linfocitos B inmaduros no proliferan ni se diferencian en respuesta a los antígenos. De hecho, si reconocen antígenos propios con alta avidéz, puede ocurrir la edición del receptor o bien inducirse un proceso de apoptosis. Este punto resulta fundamental en la selección negativa de los linfocitos B fuertemente autorreactivos. En contraste, los que no son fuertemente autorreactivos abandonan la MO y finalizan su maduración en el bazo antes de migrar a otros órganos linfáticos periféricos<sup>5,7</sup>. Este proceso es denominado *tolerancia central B*<sup>5</sup>.

- **Linfocitos B maduros**

Solo un pequeño porcentaje de los linfocitos B inmaduros logra emigrar de la médula ósea para continuar su maduración en el bazo<sup>5</sup>, donde pasan rápidamente a través de dos estadios de transición para luego comprometerse en el desarrollo hacia los linfocitos B de la zona marginal o hacia los linfocitos B foliculares dependiendo de la afinidad del BCR por los antígenos propios<sup>7</sup>. En estos estadios transicionales, los BCR son evaluados nuevamente y sufren

un proceso de selección negativa dependiente de la afinidad del reconocimiento de antígenos en el bazo, lo que se denomina *tolerancia periférica B*<sup>5</sup>.

La mayoría de los linfocitos B maduros pertenecen al subgrupo de linfocitos B foliculares y co-expresan IgM e IgD. La co-expresión de estos dos tipos de Ig se acompaña de la capacidad de recircular y de la adquisición de competencia funcional, siendo este el motivo por el que los linfocitos B IgM+ IgD+ se los llama *Linfocitos B maduros*. Los linfocitos B foliculares también se llaman a menudo linfocitos B re-circulantes, porque migran desde un órgano linfático al siguiente y residen en nichos conocidos como folículos<sup>7</sup>.

El reconocimiento del antígeno por parte del linfocito B maduro IgM+ IgD+ lleva a la proliferación y diferenciación, pero no a la edición del receptor ni a la apoptosis. Como resultado de una elevada afinidad entre el BCR y un antígeno, estos se activan en los tejidos linfáticos lo que lleva a respuestas inmunitarias humores. Los linfocitos B foliculares producen la mayoría de las respuestas de anticuerpos que dependen de linfocitos T helpers frente a antígenos proteicos<sup>7</sup>.

### 3.1.2. Diferenciación a Células Plasmáticas

Las CPs representan el último estadio de diferenciación, encontrándose comprometidas en la producción abundante de anticuerpos. Se generan tras la activación de los linfocitos B a través de señales del BCR, el CD40, el TLR y otros receptores como los de citoquinas como IL-21, existiendo dos tipos de células plasmáticas<sup>7</sup>.

Algunos linfocitos B foliculares abandonan el primer foco de proliferación y se dirigen a los cordones medulares del ganglio linfático y se diferencian en *plasmocitos de vida media corta*, los cuales se encargan de la producción de los primeros anticuerpos de la respuesta humoral, de clase IgM<sup>5,7</sup>. Las células plasmáticas de vida corta se generan durante las respuestas T independientes y durante las respuestas T dependientes en los focos de linfocitos B extrafoliculares. Se suelen encontrar en órganos linfáticos secundarios y en tejidos extralinfáticos periféricos<sup>7</sup>.

Si bien los anticuerpos producidos por las células plasmáticas de vida corta del foco primario cumplen un papel protector importante, la diferenciación de los linfocitos B en el centro germinal provee al individuo de anticuerpos más eficaces para el control de patógenos, ya que allí se produce la hipermutación somática y el *switch* de isotipo, lo que permite obtener anticuerpos de mayor afinidad por el antígeno y de isotipos diferentes de IgM<sup>5</sup>.

La mayoría de linfocitos B provenientes del primer foco de proliferación, migran hacia el interior del folículo primario, donde continúan proliferando de forma muy activa, dando lugar al centro germinal. Es importante destacar, que la formación del centro germinal no solo se da en los ganglios, sino también en otros tejidos linfáticos secundarios como el bazo y las placas de Peyer. Estos linfocitos B proliferantes se los conoce como *centroblastos*, y debido a su rápida expansión desplazan a los linfocitos B en reposo. Es así, que se conforma una “zona oscura” donde se encuentran los centroblastos en división activa, y una “zona clara” compuesta por células dendríticas foliculares, linfocitos Tfh y linfocitos B. Cuando el centroblasto pierde la capacidad de proliferación y abandona la zona oscura del centro germinal, se transforma en *centrocito*<sup>5</sup>.



Los centrocitos que han sobrevivido al proceso de selección, es decir aquellos de mayor afinidad, dan lugar a dos tipos de células: los *plasmoblastos*, que abandonan el centro germinal para completar su diferenciación en CPs productoras de Ig de alta afinidad, y *linfocitos B de memoria*<sup>5</sup>. Los *plasmoblastos* se encuentran principalmente en circulación, donde pueden identificarse como células secretoras de anticuerpos que no expresan CD20 (marcador de linfocitos B maduros)<sup>7</sup>.

Una vez que los plasmoblastos se sitúan en la MO, dan lugar a los *plasmocitos de vida corta* (pocos días) o *de vida larga* (meses o años). Entre el 10 y el 20% de los plasmoblastos se transforman en plasmocitos de vida larga, los cuales a través de citoquinas logran sobrevivir durante largos periodos, pudiendo durar hasta toda la vida del individuo<sup>5,7</sup>. Por lo tanto, los plasmocitos de vida larga se generan en respuestas del centro germinal dependientes de T frente a antígenos proteicos<sup>7</sup>.

Tras 2 a 3 semanas post-inmunización con un antígeno T dependiente, la MO se convierte en un lugar importante de producción de anticuerpos, siendo estos secretados durante meses o incluso años después de que el antígeno ya no esté presente. Se calcula que aproximadamente la mitad de los anticuerpos circulantes en la sangre de un adulto sano lo producen células plasmáticas de vida larga y son específicos frente a antígenos que se encontraron en el pasado. Es importante recalcar que las células plasmáticas maduras no recirculan<sup>7</sup>. El número de nichos de plasmocitos de vida larga es limitado, estimándose que en el hombre el número total es de  $10^9$  nichos en la MO, por lo que cada plasmoblasto deberá desplazar a una CP ya establecida<sup>5</sup>.

### 3.1.3. Células Plasmáticas

Las CPs normales de MO no expresan la mayoría de los antígenos asociados al linaje B (CD5, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD79b) excepto CD19, CD21, CD27 y CyCD79a. Una proporción variable de los plasmocitos puede expresar en la membrana marcadores asociados a otras líneas hematopoyéticas, como CD13, CD28, CD33 y CD56, y presentar positividad para las moléculas de adhesión de la familia de las tetraspaninas CD9, CD53, CD63 y CD81<sup>6</sup>.

La supervivencia de los plasmocitos en la médula ósea se encuentra estrechamente vinculada con el estroma, siendo los principales estímulos: BAFF (B-cell activation factor), APRIL (a proliferation induced ligand), IL-6 y CXCL12<sup>5</sup>.

En los adultos sanos se detecta de forma sistemática la presencia de un pequeño número (y proporción) de células con características morfológicas, fenotípicas y funcionales superponibles a las de las CPs que representan aproximadamente el 1-3% de todas las células B en sangre periférica. Se cree que la mayoría de estas células son plasmoblastos recién generados que han pasado a la sangre desde los tejidos linfoides secundarios, dirigiéndose a un nicho de MO, MALT o a focos inflamatorios<sup>6</sup>.

Desde el punto de vista inmunofenotípico se han identificado algunas diferencias entre las células plasmáticas que se encuentran en los nichos de la MO y los plasmoblastos/CP circulantes de sangre periférica. Estas últimas muestran expresión heterogénea de CD20 y CD138, expresión débil pero homogénea de CD19 y CD45 en ausencia de CD56, y expresan niveles ligeramente más bajos de CD38 que las CPs de la MO. Además, al contrario que las CPs de MO que son slg- (Inmugolobulina de superficie negativas), más del 75% de los plasmoblastos /CP circulantes expresan slg de forma débil<sup>6</sup>.

La diferenciación de los linfocitos B en CPs secretoras de anticuerpos implica alteraciones estructurales importantes de los componentes del retículo endoplásmico y de la vía secretora, y un aumento de la producción de Ig, así como un cambio en las cadenas pesadas de Ig de la forma membranaria superficial a la secretada. La célula aumenta su tamaño significativamente (lo que se correlaciona con un Forward Scatter elevado), y la relación núcleo/citoplasma por observación microscópica incrementa notablemente. El retículo endoplásmico se hace llamativo, y la célula secretora termina compartiendo pocas características con el linfocito B<sup>7</sup>.

**Tabla 1.** Marcadores (Clusters of Differentiation: CD) presentes en los estadios de maduración y diferenciación de los plasmocitos.

Pro-B	Pre-B-I	Pre-B-II	LB inmaduro	LB maduro naïve	LB maduro naïve	Centroblasto	Plasmoblasto	Plasmocito
MO	MO	MO	MO	MO	SP	GL	SP	MALT/Bazo/MO
CD34	CD34							
CD38 <sup>hi</sup>	CD38 <sup>hi</sup>	CD38	CD38			CD38	CD38 <sup>hi</sup>	CD38 <sup>hi</sup>
CD45 <sup>lo</sup>	CD45 <sup>lo</sup>	CD45	CD45 <sup>hi</sup>	CD45 <sup>hi</sup>	CD45 <sup>hi</sup>		CD45	CD45
Tdt	Tdt	(Tdt)						
CD22	CD22	CD22	CD22	CD22 <sup>hi</sup>	CD22 <sup>hi</sup>			
	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19
	CD10 <sup>hi</sup>	CD10	CD10 <sup>lo</sup>			CD10		
		CD20 <sup>+/-</sup>	CD20	CD20	CD20	CD20	CD20 <sup>+/-</sup>	
		cyIg	slgM	slgM/D	slgM/D	slg <sup>lo</sup>	*	slg <sup>neg</sup>
					CD23	CD23 <sup>neg</sup>		
						CD5 <sup>neg</sup>		
						CD27	CD27 <sup>hi</sup>	CD27
							CD138 <sup>+/-</sup>	CD138

**Fuente:** Barrena Delfa, S. (2011). *Nuevas estrategias inmunofenotípicas aplicadas al diagnóstico y clasificación de síndromes linfoproliferativos crónicos*. Universidad de Salamanca. \*slgM, slgG, slgA, slgD o slg neg.

### 3.2. Fundamentos de la Citometría de Flujo

La *Citometría de Flujo* (CMF) es una tecnología que permite analizar rápidamente células individuales o partículas suspendidas en una solución buffer salina que mediante un flujo homogéneo son interceptadas por uno o varios láseres. Cada partícula es analizada teniendo en cuenta la dispersión en el espectro visible, como así también múltiples parámetros de emisión fluorescente<sup>8</sup>.

Para lograr lo expuesto anteriormente, el citómetro de flujo cuenta que con tres sistemas: un *sistema de fluidos* encargado de lograr el flujo homogéneo de las células o partículas por enfoque hidrodinámico; un *sistema óptico*, compuesto por fuentes de luz láser, filtros y espejos polarizadores, que logra clasificar las señales de emisión o dispersión, las cuales serán captadas por tubos fotomultiplicadores que las traducen en señales eléctricas para ser interpretadas por el *sistema electrónico* a través de un software<sup>9</sup>.

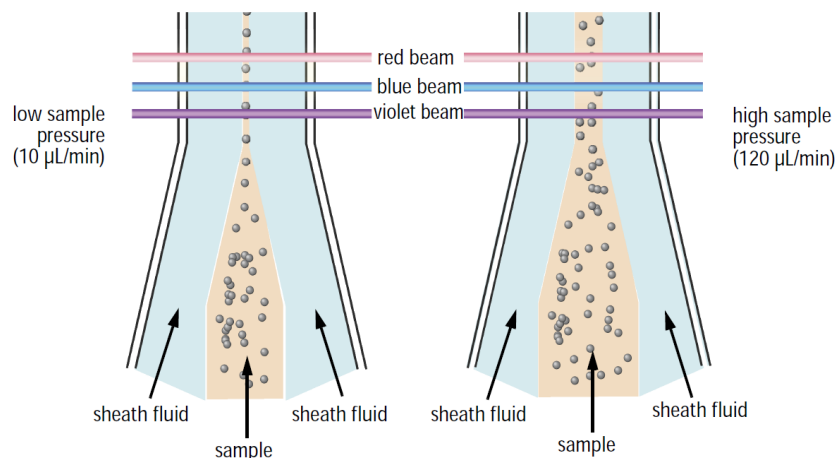
Existen dos conceptos claves a la hora de interpretar el funcionamiento del citómetro de flujo:

- **Partícula:** termino usualmente empleado para denominar a aquello que fluye a través del citómetro y resulta de interés.
- **Evento:** toda señal que el citómetro interprete, correcta o incorrectamente, como una partícula.

### 3.2.1. Sistema de Fluidos

La celda de flujo o *Flow cell* presenta una forma cónica, de manera que al ingresar la muestra a la misma una corriente del fluido del sistema (*Sheath Fluid*) provoca un enfoque hidrodinámico arrastrando las células o partículas en estudio hacia el centro del flujo. Idealmente, el objetivo de este sistema es lograr que las células sean interceptadas individualmente por los láseres en el sitio de análisis<sup>9,10</sup>.

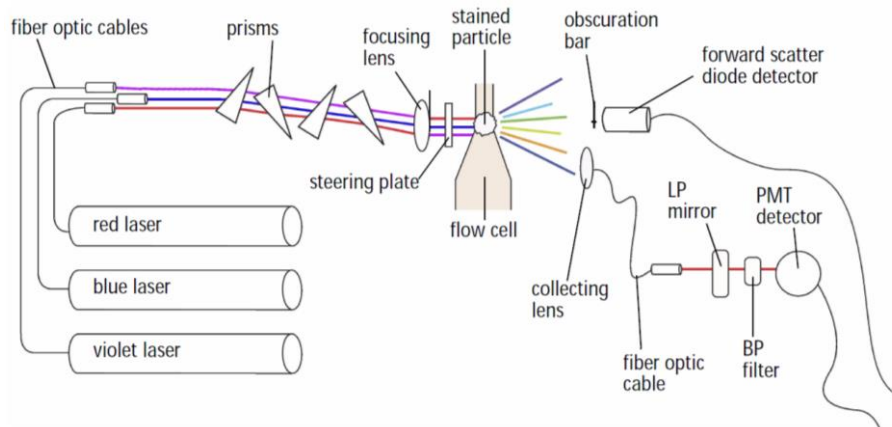
La diferencia de presiones entre el fluido del sistema y la muestra que ingresa es la responsable de determinar el diámetro del flujo de corriente, lo que se conoce como *core*. Por ello, un flujo de muestra alto permite obtener la información más rápidamente, pero esta presenta menos resolución. En cambio, un flujo de muestra bajo, asegura el paso único de cada partícula en estudio por lo que es utilizada en ensayos que se requiere una alta resolución como ser los análisis de Enfermedad Mínima Residual<sup>9</sup>. Sin embargo, el flujo también puede contener agregados celulares conocidos como *clumps*, o bien si el flujo es elevado o la concentración de células lo es puede darse la probabilidad de que más de una célula coincida en el sitio de análisis, lo que se conoce como *pseudo-clumps*, por lo que ambas son fuentes de error<sup>11</sup>.



**Figura 2.** Representación del enfoque hidrodinámico dentro de la celda de flujo a bajo y alto flujo de muestra. **Fuente:** Becton, Dickinson & Company. (s.f.). *BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual*.

### 3.2.2. Sistema Óptico

Las células marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados con fluoróforos son incididas por uno o más láseres en el sitio de análisis, siendo estos la fuente de luz de elección ya que tienen una longitud de onda específica. El citómetro FACS Canto II cuenta con tres fuentes de emisión de luz, una violeta de 405nm, una azul de 488nm y una roja de 633nm. La luz dispersada o emitida por las células o partículas es colectada, filtrada y convertida en una señal eléctrica a través de tubos fotomultiplicadores<sup>9</sup>.



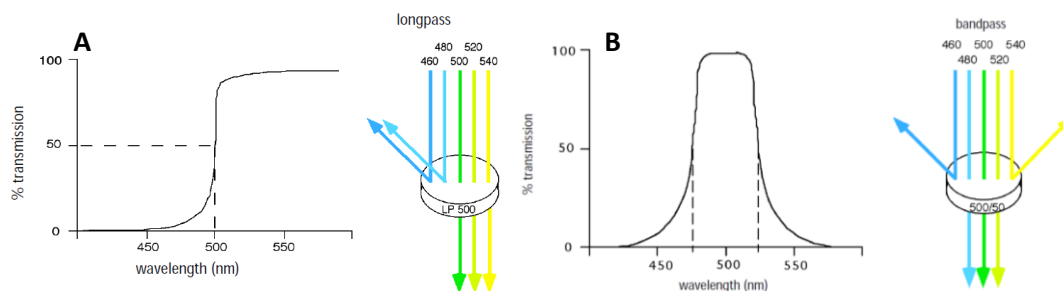
**Figura 3.** Representación esquemática del sistema óptico de un citómetro de flujo.

**Fuente:** Becton, Dickinson & Company. (s.f.). *BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual*.

Mediante filtros ópticos este sistema logra modificar la distribución espectral de la luz dispersada y la fluorescencia dirigiéndolas hacia los detectores. Cuando los fotones se encuentran con un filtro óptico, estos pueden transmitirlos, absorberlos o reflejarlos<sup>9</sup>.

Existen dos tipos de filtros:

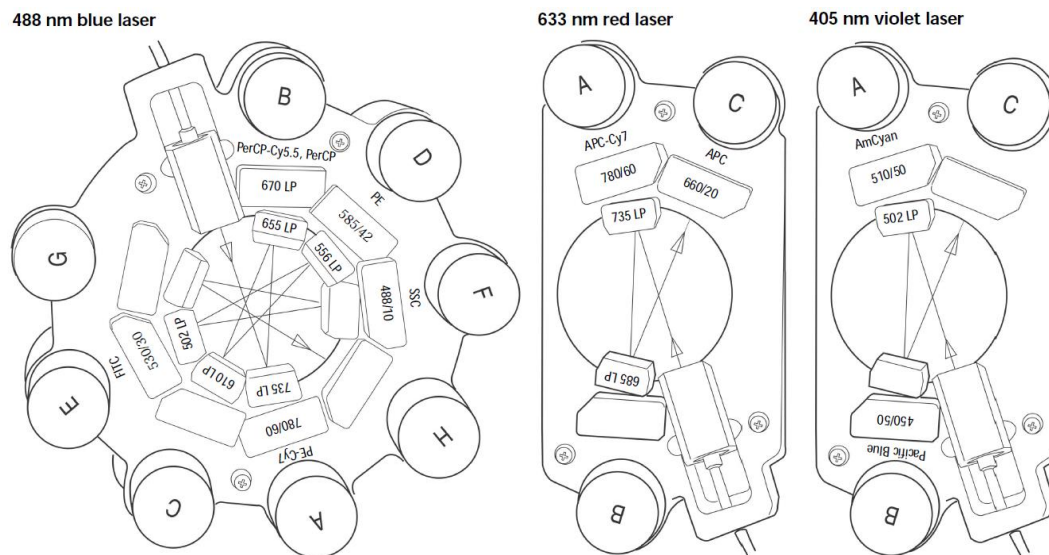
- **Longpass Filters (LP):** permiten el paso de longitudes de onda mayores que las del filtro. Por ejemplo, un filtro 500LP permite el paso de longitudes de onda mayores a 500nm y absorbe o refleja las menores a la misma<sup>9</sup>.
- **Bandpass Filters (BP):** este tipo de filtros, transmiten la luz en un rango de longitudes de onda relativamente estrecho. En su nomenclatura, el primer número indica el centro del rango y el segundo la amplitud del ancho de banda. Por ejemplo, un filtro 500/50BP está centrado en 500nm y transmite longitudes de onda de entre 475 y 525nm<sup>9</sup>.



**Figura 4.** Filtros polarizadores. **A:** Longpass Filter. **B:** Bandpass Filter.

**Fuente:** Becton, Dickinson & Company. (s.f.). *BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual*.

Dependiendo de la configuración de estos, el sistema óptico del citómetro de flujo logra clasificar las señales luminosas emitidas por los fluoróforos para que cada una llega a un tubo fotomultiplicador (detector) diferente. Es así, que el citómetro FACS Canto II cuenta con tres arreglos de detectores, uno octagonal y dos trigonales. En el octagonal se recogen las señales obtenidas de la incidencia del láser azul (488nm) sobre las partículas, detectando las fluorescencias de FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7 y SSC. Uno de los trigonales, detecta las señales provenientes de la excitación de los fluoróforos APC y APC-Cy7 con el láser rojo (633nm). Por último, el segundo arreglo trigonal, recolecta las señales de los fluoróforos excitados con el láser violeta (405nm), V450 (equivalente a Pacific Blue) y V500 (de espectro similar a AmCyan)<sup>9</sup>.



**Figura 5.** Arreglos de fotodetectores. Citómetro FACS Canto II - BD.

**Fuente:** Becton, Dickinson & Company. (s.f.). *BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual*.

### 3.2.2.1. Parámetros de Estudio

#### Luz dispersada

Cuando una partícula atraviesa el sitio de análisis la luz incidente es dispersada en todas las direcciones. De esta dispersión se pueden obtener dos parámetros importantes:

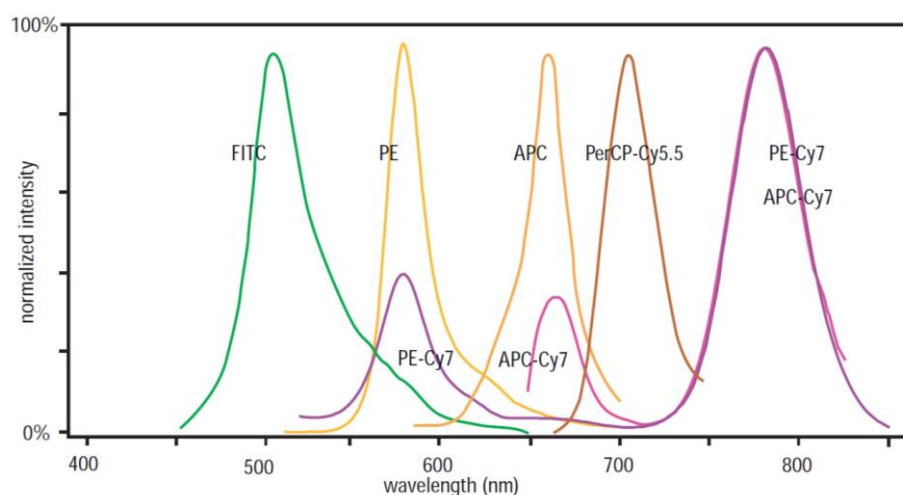
- *Forward Scatter (FSC)*: es la luz dispersada estrictamente en la misma dirección del haz de luz, por lo que el fotodetector se encuentra a 180° respecto del ángulo de incidencia. FSC indica las diferencias relativas en el tamaño de las células o partículas<sup>9</sup>.
- *Side Scatter (SSC)*: este fotodetector se encuentra ubicado a 90° respecto del ángulo de incidencia, por lo que colecta la luz dispersada perpendicularmente. En este caso, la señal se encuentra relacionada a las diferencias relativas de complejidad interna o granularidad de las células<sup>9</sup>.

#### Fluorescencia

Al atravesar el haz de luz las células o partículas marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados con fluoróforos, estos absorben fotones pasando a su estado excitado. Al regresar a su estado basal, estos son capaces de emitir un haz de luz de una longitud de onda mayor a la que absorbieron. Este fenómeno se conoce como *fluorescencia*<sup>9</sup>. Teniendo en cuenta el tamaño del sitio de análisis y el tiempo que la partícula reside en el mismo, un fluoróforo puede absorber y emitir luz aproximadamente mil veces<sup>11</sup>.

Diferentes fluoróforos emiten haces de diferentes longitudes de onda, por ejemplo, PerCP y FITC pueden absorber la luz proveniente del láser azul (488nm) pero emiten a 675nm y 530nm respectivamente. Esta diferencia de excitación y emisión permite que con un mismo láser se puedan excitar más de un fluorocromo<sup>9</sup>.

Los fluorocromos utilizados habitualmente en un citómetro de 8 canales de fluorescencia son: FITC (Fluorescein isothiocyanate), PE (Phycoerythrin), PerCP-Cy5.5 (Peridin chlorophyll protein-Cyanine5.5), PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanine7), APC (Allophycocyanin), APC-Cy7 (Allophycocyanin-Cyanine7), V450 (PacificBlue) y V500 (AmCyan).

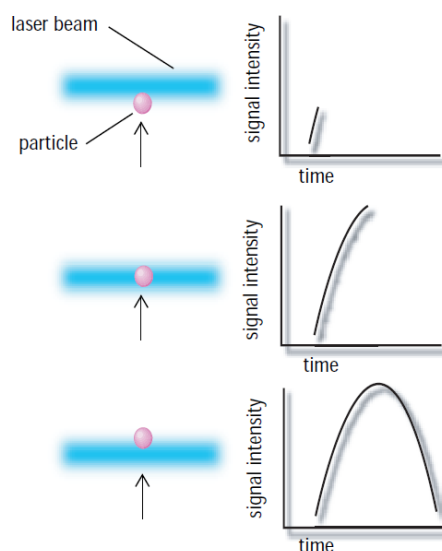


**Figura 6.** Espectros de absorción de los diferentes fluorocromos utilizados.

**Fuente:** Becton, Dickinson & Company. (s.f.). *BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual*.

### 3.2.3. Sistema Electrónico

Dentro del tubo fotomultiplicador, el haz de luz es convertido en una señal eléctrica, llamada *pulso*. Cada pulso comienza cuando la partícula ingresa al haz del láser, alcanzando un máximo de intensidad al ubicarse en el centro y decayendo nuevamente en su salida<sup>9</sup>. Los pulsos son recibidos por una computadora, traduciéndolos en gráficos e histogramas<sup>10</sup>.



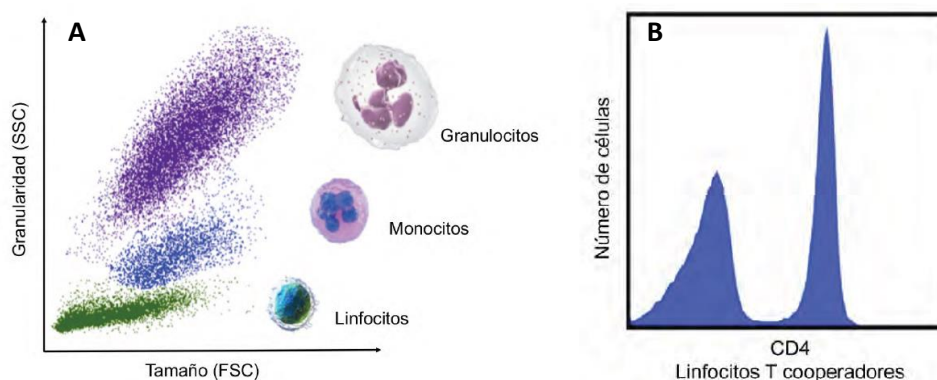
**Figura 7.** Fases del pulso de señal.

**Fuente:** Becton, Dickinson & Company. (s.f.). *BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual*.

Los gráficos más comúnmente utilizados son los histogramas y los dispersogramas, gráficos de puntos o *dot-plot*. Los *histogramas* muestran la intensidad de la expresión de un marcador respecto del número de eventos, siendo un desplazamiento a la derecha indicativo de una mayor expresión y la altura del pico de la frecuencia de las células que presentan el marcador con esa intensidad. El área bajo la curva contiene entonces a las células analizadas. Por otra parte, los *dot-plot* muestran la relación entre dos marcadores diferentes, siendo cada punto un evento. Por lo que el desplazamiento del punto en uno y/u otro eje indica la expresión de cada marcador en estudio<sup>10</sup>.



Otros gráficos también utilizados son los de densidad, que, con base a la expresión de dos marcadores, muestran la frecuencia relativa de las poblaciones. Son ejemplos los gráficos de cebra, pseudocolor o de contornos. Además, los dispersogramas 3D son equivalente a los de dos dimensiones, pero comparan las poblaciones con respecto a la expresión de tres marcadores. Los histogramas también pueden representarse en tres dimensiones, comparando la expresión de dos marcadores respecto del número de eventos<sup>10</sup>.



**Figura 8.** Representaciones gráficas más utilizadas. **A:** dispersograma o *dot-plot*. **B:** Histograma

**Fuente:** Perez Lara, J. C., Santiago Cruz, W., Romero Ramirez, H., & Rodríguez Alba, J. C. (2018).

Fundamentos de la Citometría de Flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica.

*Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 8(2), 41-52.

### 3.2.4. Inmunofenotipificación

La inmunofenotipificación es una de las aplicaciones más utilizadas de la CMF. Esto se debe a que esta técnica permite el análisis simultáneo de diversas poblaciones teniendo en cuenta múltiples parámetros fluorométricos. Para ello se utilizan anticuerpos monoclonales conjugados con fluoróforos, los cuales se encuentran dirigidos contra ciertos antígenos que pueden estar expresados en la superficie celular, llamados CD (Cluster of Differentiation) como por ejemplo CD38, o intracitoplasmáticamente como lo son las cadenas livianas kappa y lambda<sup>8</sup>.

La mayoría de las células del sistema inmune poseen CDs específicos que definen una determinada población celular. Estos marcadores son llamados *marcadores de linaje* y suelen estar asociados a una población específica de células, lo que permite identificarlas para luego profundizar el análisis desde otros parámetros. Por ejemplo, CD19 para linfocitos B, CD3 para linfocitos T o CD56 para linfocitos NK<sup>8</sup>.

Además, se pueden utilizar otros marcadores que permiten caracterizar a la población, como ser marcadores de activación (CD69, CD25, CD62L), de memoria inmunológica (CD27, CD45RO), de proliferación (Ki67) o antígeno-específicos (como los tetrámeros MHC). También se pueden evaluar citoquinas o receptores de quimiocinas<sup>8</sup>.

### 3.3. Neoplasias de Células Plasmáticas

Las Gammopatías Monoclonales (GM) constituyen un grupo de condiciones clínicas caracterizadas por la presencia de una inmunoglobulina monoclonal o un fragmento de ella, detectable en sangre periférica y/u orina, conocida como componente monoclonal (M). Las GM pueden estar causadas por procesos linfoproliferativos crónicos de linfocitos B, como es el caso del linfoma linfoplasmocítico secretor de IgM (Macroglobulinemia de Waldeström). Sin embargo, las **Neoplasias de Células Plasmáticas (NCP)** son el principal exponente clínico de las GM. Las NCP se deben a la proliferación y acumulación de células plasmáticas clonales de fenotipo aberrante (CPa) en la médula ósea, e incluyen al mieloma múltiple (MM), el plasmocitoma (óseo o extramedular) y la leucemia de células plasmáticas (LCP, mucho menos frecuente). Sin embargo, las afecciones asintomáticas, como la gammopatía monoclonal de significado incierto (MGUS: Monoclonal Gammopathy of Uncertain Significance), presentan una mayor prevalencia<sup>4</sup>.

El MM constituye el prototipo de GM maligna, y se caracteriza por la proliferación neoplásica de un clon de células plasmáticas que produce una inmunoglobulina de carácter monoclonal<sup>1</sup>. Esta entidad representa el 1,5% de todas las neoplasias y el 15% de las hemopatías malignas, teniendo el segundo lugar tras el linfoma. Es más frecuente en la población adulta con una mediana de edad entre los 69 y 70 años. La incidencia aumenta progresivamente con la edad alcanzando un pico entre los 50 y 70 años, siendo rara su presentación antes de los 35 años. La edad media diagnóstica del MM es de 70 años, y solo el 37% de los pacientes son menores de 65 años. La presencia de un componente monoclonal (M) es un hallazgo frecuente e incrementa su incidencia con la edad (1, 5 y 10% en personas mayores de 50, 70 y 80 años, respectivamente). En la mayoría de los casos (60-70%) es un hallazgo casual y únicamente unas 5 personas de cada 100000 desarrollarán una NCP. Por otra parte, se estima que el 3% de los individuos mayores de 50 años presenta una MGUS, siendo este un estadio de premalignidad al MM<sup>2,3,4</sup>. En su fase terminal, el MM puede evolucionar hacia una forma extramedular, denominada LCP Secundaria. Otras veces, la enfermedad puede progresar a una LCP aguda primitiva<sup>12</sup>.

Desde el punto de vista citogenético, esta enfermedad se caracteriza por presentar cariotipos altamente complejos, poseyendo alteraciones tanto estructurales como de ploidía que suelen ser acumulativas con la progresión<sup>3</sup>.

Es una enfermedad de pronóstico muy heterogéneo y difícil de predecir, ya que algunos pacientes fallecen a las pocas semanas del diagnóstico, mientras que otros viven más de diez años, por lo que en el futuro, el tratamiento seguramente se adecuará a nuevos criterios pronósticos<sup>2,3</sup>.

#### 3.3.1. Células Mielomatosa Maligna

Lo esencial de los procesos oncogénicos que conducen a la célula mielomatosa es que no interfiere con la diferenciación plasmática normal. Las regiones variables de los genes de inmunoglobulinas de las CPs mielomatosas son portadoras de numerosas hipermutaciones somáticas, que con el tiempo parecen estables. Al igual que las CPs normales, las CPs malignas se encuentran en íntimo contacto con las células estromales y óseas del microambiente medular<sup>12</sup>.

En todos los estadios, la enfermedad es poco proliferante, así en las MGUS, el índice de proliferación celular es inferior al 0,5%, en el MM es inferior al 1% y en los estadios avanzados de la enfermedad, excepcionalmente alcanza el 5 al 10%<sup>12</sup>.

### 3.3.2. Fisiopatología de las Neoplasias de Células Plasmáticas

El evento disparador del proceso maligno resulta ser la adquisición de defectos o aberraciones genéticas, pudiendo ser estos numéricos (hipoploidías o hiperploidías) o estructurales (translocaciones, delecciones o ganancias de regiones), involucrando estas últimas principalmente al *locus* de la cadena pesada de la Ig<sup>13</sup>.

Etiológicamente, el enhacer o potenciador del *locus* de la cadena pesada de la Ig (14q32) al translocarse puede afectar a ciertos oncogenes importantes que en todos los casos termina con la desregulación de los genes de ciclinas, de manera que las CPs resultan más sensibles a estímulos proliferativos o menos sensibles a la muerte por apoptosis, conduciendo a la acumulación clonal de estas<sup>6,13</sup>.

Cada vez son más numerosos los estudios que otorgan un papel fundamental en el desarrollo de la progresión de la enfermedad a las interacciones del microambiente medular y las células mielomatosas, pues activaría rutas de señalización que median el crecimiento, supervivencia, resistencia a fármacos y migración de las CPa, así como la osteoclastogénesis, angiogénesis e inmunosupresión<sup>6</sup>. Se ha identificado la interleuquina-6 (IL-6) como el factor crucial para la proliferación de las células del mieloma, tanto *in vitro* como *in vivo*, además que estimula la actividad osteoclástica. De hecho, los anticuerpos anti-IL-6 bloquean el crecimiento de las CPs *in vitro*, y la proliferación tumoral, tanto en líneas celulares mielomatosas como en los pacientes que reciben tratamiento con dichos anticuerpos<sup>1</sup>.

La sintomatología típica del MM, como exponente de las NCP, se asocia a la sigla CRAB<sup>4</sup>:

- C: Hipercalcemia
- R: Lesión renal
- A: Anemia
- B: Lesiones osteolíticas (*Bone*: hueso)

La proliferación de células mielomatosas interfiere en la producción normal de células en la médula ósea, provocando una displasia que por lo general se manifiesta en anemia, aunque en algunas ocasiones se observa también leucopenia y trombocitopenia<sup>14</sup>.

El daño en la estructura ósea es la principal causa de morbilidad en el MM, lo cual se debe a un desbalance entre la resorción ósea por parte de los osteoclastos y la regeneración ósea por los osteoblastos, siendo estos eventos constitutivos del proceso de modelado óseo en cuanto a su estructura física. Las células mielomatosas secretan factores estimuladores de osteoclastos (como RANK-L e IL-6) y factores inhibidores de osteoblastos (como DDK1 y esclerotina), lo que trae como consecuencia la destrucción exagerada del tejido óseo con la consecuente fractura patológica, asociándose también a hipercalcemia. Esto a su vez, genera un feedback que permite progresar la proliferación de las células mielomatosas y la supresión del sistema inmune, debido a la liberación de IGF-1 y TGF- $\beta$  durante la resorción ósea<sup>13,14</sup>.

Otras citoquinas implicadas en la patogénesis son el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la IL-10, el Factor de Crecimiento Insulinomimético-1 (IGF-1) y el Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas-Monocíticas (GM-CSF). El Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

(VEGF) es un potente factor angiogénico, responsable, por lo menos en parte, del importante incremento de la angiogénesis observado en el MM. Esto último resulta un factor pronóstico adverso y constituye una diana terapéutica para nuevos agentes con propiedades antiangiogénicas<sup>1</sup>.

También se encuentra descrita una alta tasa de infecciones en estos pacientes, por lo que la primera manifestación de la enfermedad en el 25% de los casos son infecciones recidivantes<sup>14</sup>.

### **3.3.3. Clasificación de Neoplasias de Células Plasmáticas**

#### **3.3.3.1. Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto (MGUS)**

El MGUS es el trastorno de CPs más frecuente y por ello es importante su correcto diagnóstico, pues en general no tiene implicaciones clínicas y muy pocas (1% al año) evolucionarán a estadios más agresivos<sup>4</sup>. El hallazgo de un M en el suero o en la orina de un paciente no implica necesariamente la presencia de una gammapatía monoclonal maligna (MM, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidosis, etc.)<sup>1</sup>. MGUS representa el estadio premaligno del MM, presentándose entre 3 y 4% de la población mayor de 50 años<sup>15</sup>.

Esta entidad se caracteriza por:

- Presencia en suero de un componente M < 3g/dL
- Ausencia o mínimas cantidades de cadenas ligeras en orina (< 50mg/día) (Proteinuria de Bence-Jones negativa o mínima)
- Plasmocitosis medular inferior al 10% (en el estudio histológico)
- Ausencia de signos CRAB o ausencia de amiloidosis atribuible a la proliferación de CPs
- Ausencia de Síndromes Linfoproliferativos B

Estudios demostraron que un porcentaje valorable de los sujetos con MGUS evolucionan finalmente a una gammapatía monoclonal maligna o a diferentes síndromes linfoproliferativos. Luego de un seguimiento de 24 a 38 años a partir del hallazgo del componente M, algo más de la mitad de pacientes había fallecido por otras causas, y del resto, el 22% no había desarrollado ninguna gammapatía maligna, mientras que el 26% había evolucionado a MM, macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis u otro tipo de síndrome linfoproliferativo. El intervalo medio de aparición de dichas condiciones oscilaba entre 8 y 11 años, y la tasa actuarial de transformación se situaba en el 40% a los 25 años<sup>1</sup>.

Cerca del 80% de los casos de MM se originan de un MGUS no-IgM, y un 20% de MGUS de cadenas livianas. Los MGUS IgM suelen evolucionar a Macroglobulinemia de Waldenström, pero en raros casos también pueden progresar a MM de tipo IgM<sup>15</sup>.

El riesgo de progresión de MGUS a MM es de 0,5 a 1% por año, pero también se encuentra afectado por la concentración del componente M, el tipo de proteína monoclonal, la proporción de cadenas livianas libres en suero, la plasmocitosis en la MO, la proporción de CPs fenotípicamente clonales, y la presencia de inmunoparesis (disminución de inmunoglobulinas policlonales)<sup>15</sup>.

### 3.3.3.2. Mieloma Multiple Quiescente (Smoldering) o Asintomático

Es un estadio intermedio entre la MGUS y el MM, aún asintomático, sin embargo, tienen un riesgo de progresión mucho mayor en los primeros 5 años desde el diagnóstico. Un estudio reportó que el MM quiescente (SMM) representa alrededor del 14% de los pacientes con MM<sup>4,15</sup>. El riesgo de progresión a MM de los pacientes con SMM es de: 10% por año durante los primeros 5 años, 3% por año durante los siguientes 5 años, y 1,5% por año a partir de los 10 años<sup>4</sup>.

Al igual que en MGUS, el diagnóstico requiere de la ausencia de signos CRAB atribuibles a un trastorno proliferativo de CPs, pero el criterio del componente monoclonal y el porcentaje de CPs en MO es diferente. Resulta entonces que el SMM es biológicamente heterogéneo, clínicamente definido en un subgrupo de pacientes en pacientes con premalignidad, y en ausencia de signos CRAB asociados a malignidad. Desafortunadamente, no existen rasgos patológicos o moleculares pueden ser utilizados para discriminar entre pacientes con SMM de quienes tienen solo un estadio premaligno (MGUS)<sup>15</sup>.

En algunos casos, la terapéutica en el SMM se retrasa debido a que existe un grupo de pacientes que presenta largos periodos libres de progresión. Es así que el 50% de los pacientes con SMM no progresan en los primeros 5 años, y alrededor del 30% se encuentran libres de progresión luego de 10 años<sup>15</sup>.

El International Myeloma Working Group (IMWG) estableció en 2014 que esta enfermedad debe cumplir ambos criterios de diagnóstico<sup>4</sup>:

- Componente M en sangre  $\geq 3$ /dL o en orina  $\geq 0,5$ g/24hs, o infiltración medular de CPs de entre 10 y 60%
- Ausencia de síntomas CRAB

Para lograr la intervención previa a la detección de un daño orgánico debido a un MM, se requieren biomarcadores que identifiquen subgrupos de pacientes con SMM que tengan malignidad y un riesgo de progresión inminente<sup>15</sup>. En este sentido, un estudio halló que un porcentaje de al menos 60% de CPs en MO puede ser utilizado como marcador para identificar pacientes con un alto riesgo (alrededor del 90%) de progresión en los siguientes 2 años desde el diagnóstico. El porcentaje de pacientes que no progresa en los primeros 2 años (hasta 20%) es posible que sean similares a los pacientes MM con mínimos síntomas CRAB<sup>15</sup>.

### 3.3.3.3. Mieloma Múltiple

Esta neoplasia se caracteriza por una acumulación de CPs  $> 10\%$  en MO (mediante estudio histológico) o por la presencia de un plasmocitoma, cuyo cuadro clínico característico incluye, cuyo cuadro clínico característico incluye insuficiencia renal, anemia, hipercalcemia y lesiones osteolíticas (CRAB), que con frecuencia producen destrucción esquelética, dando lugar a dolor óseo y fracturas. Ocasionalmente, las CPs infiltran múltiples órganos y producen otros síntomas<sup>4</sup>. El resultado del daño orgánico, especialmente la falla renal aguda y las fracturas patológicas, representan el mayor riesgo que puede acarrear en términos de morbilidad<sup>15</sup>. El componente M puede conducir a fracaso renal por proteinuria de Bence Jones (proteinuria de cadenas livianas monoclonales) o a hiperviscosidad por su exceso en sangre<sup>4</sup>.

Los criterios diagnósticos establecidos por IMWG en 2014 son:

- Presencia de > 10% de CPs en MO (mediante estudio histológico) o de plasmocitoma óseo o extramedular comprobado por biopsia, junto con al menos uno de los siguientes eventos que definen el mieloma:
  - Criterios CRAB
  - > 60% de CPs en MO
  - Ratio de cCCL (concentración de cadenas livianas libres):  
cadena alterada /cadena no alterada  $\geq$  100
  - Más de una lesión ósea focal detectada mediante resonancia magnética nuclear

#### 3.3.4. Pruebas Analíticas para el Diagnóstico y Pronóstico de las NCP

El correcto diagnóstico y pronóstico de los pacientes con este tipo de patologías requiere de una apropiada validación desde la sintomatología, pruebas de laboratorio en orina, suero, sangre periférica y MO, así como pruebas de imagen para evaluar la afectación extramedular y el daño óseo ocasionado<sup>4</sup>.

El análisis bioquímico e inmunológico de suero y orina debe incluir técnicas destinadas a revelar la presencia, la cuantía y el tipo de componente M, como proteinograma, cuantificación de Ig, inmunofijación (Gold Standard), cuantificación de cadenas livianas libres de las Ig (cCCL) y su cociente, y los pares cadenas pesadas-ligeras y su cociente. Además, deben evaluarse parámetros con valor pronóstico, como la  $\beta$ 2-microglobulina y la albumina. Asimismo, los parámetros de función renal, el recuento de células sanguíneas y los valores de hemoglobina, calcio y ácido úrico ofrecen información valiosa para el diagnóstico<sup>4</sup>.

El análisis histológico de la MO permitirá evaluar directamente su grado de infiltración y cuantificar el porcentaje de CPs, y además hará accesibles las CPs tumorales a estudios cromosómicos mediante FISH, y con ello la estimación de parámetros de alto valor pronóstico<sup>4</sup>.

#### 3.3.5. Pronóstico, Supervivencia y Estratificación de las NCP

A mediados de los 90's, la mediana de supervivencia del MM era de tres años, mientras que actualmente se estima en más de cinco años; incluido 20% de pacientes con supervivencia que excede los 10 años<sup>16</sup>.

La supervivencia de los pacientes con MM es muy variable incluso con los tratamientos actualmente disponibles, por lo que la correcta identificación de aquellos de alto riesgo es el primer paso para mejorar los resultados. El pronóstico de los pacientes con MM depende de la carga tumoral, de las características del paciente y de la biología de la enfermedad<sup>4</sup>.

Los Criterios de Estratificación actualmente utilizados son los del International Staging System (ISS), los cuales tienen en cuenta las concentraciones séricas de albumina y  $\beta$ 2-microglobulina, estableciendo 3 estadios pronósticos con diferentes medianas de supervivencia, independientes del tipo de tratamiento<sup>4</sup>:

- *Estadio I:* B2-microglobulina <3,5 mg/L y albumina  $\geq$  3,5 g/dL
- *Estadio II:* ni I ni III
- *Estadio III:* B2-microglobulina  $\geq$  5,5 mg/L



Resultan útiles también los modelos de predicción de riesgo que integran la presencia de alteraciones citogenéticas de alto riesgo junto al ISS o bien junto con datos clínicos o de laboratorio, generando modelos más sólidos como por ejemplo los mencionados en la siguiente tabla<sup>4</sup>:

**Tabla 2.** Modelos de estratificación de riesgo para MGUS, SMM y MM.

Modelos	Factores de riesgo	N.º factores de riesgo	Porcentaje de progresión
<b>GMSI – Gammapatía monoclonal de significado incierto<sup>8-10</sup></b>			
Clínica Mayo	CM >1,5 g/dl	0	5% (a 20 años)
	Tipo no IgG	1	21% (a 20 años)
	FCL ratio <0,26 o >1,64	2	37% (a 20 años)
		3	58% (a 20 años)
Grupo Español	≥95% aCP sobre el total de CP	0	2% (a 5 años)
	en MO por CMF	1	10% (a 5 años)
	Aneuploidía ADN	2	46% (a 5 años)
<b>SMM – Mieloma quiescente<sup>8-10</sup></b>			
Clínica Mayo	CP en MO ≥10% en histología	1	25% (a 5 años)
	CM ≥3 g/dl	2	51% (a 5 años)
	Ratio FLC <0,125 o >8	3	76% (a 5 años)
Grupo Español	≥95% aCP sobre el total de CP	0	4% (a 5 años)
	en MO por CMF	1	46% (a 5 años)
	Inmunoparesia	2	72% (a 5 años)
<b>MM – Mieloma múltiple<sup>12,13</sup></b>			
ISS y genética	Riesgo alto	Riesgo intermedio	Bajo riesgo
	ISS II/III y t(4;14) o delección 17p13	Otros	ISS I/II y ausencia de t(4;14), del 17p13, o ganancia de 1q21, y edad <55 años
Genética y clínica	del 17p13; t(14;16); t(14;20). LDH >2 veces límite normal	t(4;14); +1q21; del 13 o hipodiploidía en cariotipo	Trisomías (hiperdiploidía) t(11;14); t(6;14)
	Características de LCP		
	Expresión génica de alto riesgo		

aCP: células plasmáticas de fenotipo aberrante; CM: componente monoclonal; FCL: ratio cadenas ligeras κ/λ en suero; ISS: International Scoring System; LCP: leucemia de células plasmáticas; LDH: lactato dehidrogenasa.

**Fuente:** Muñoz Calleja, C., & Minguela Puras, A. (2019). *Diagnóstico y monitorización inmunofenotípica de las neoplasias leucocitarias*. Barcelona: Elsevier.

También se sabe que la extensión de la enfermedad detectada por resonancia magnética y PET/TAC se correlaciona con la carga tumoral y tiene utilidad pronóstica<sup>4</sup>.

Por otra parte, se ha demostrado una clara asociación entre la profundidad de la respuesta al tratamiento (medida como EMR) y los resultados de este a largo plazo, incluyendo la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG)<sup>4</sup>.

Igualmente, es importante la descripción de los pacientes con MM y características inmunofenotípicas similares a MGUS (MGUS-like), por presentar médulas con menor infiltración de CPs que los MM convencionales, mayor presencia de CPs normales (media del 30% sobre el total de CPs), menos proliferación de CPs y menor frecuencia de translocaciones de mal pronóstico, por lo que todo ello está asociado a un pronóstico más favorable<sup>4</sup>.

### 3.4. Estudio Inmunofenotípico de NCP mediante CMF

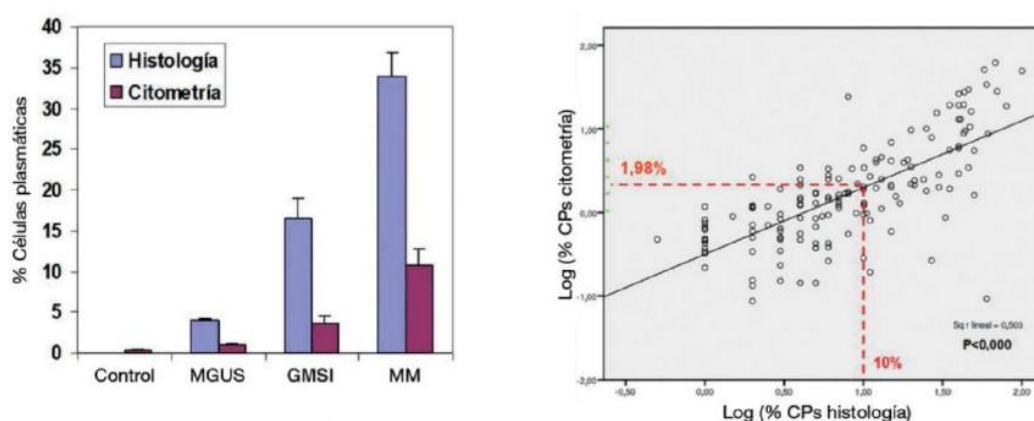
La caracterización de marcadores en los clones tumorales mediante CMF ha permitido una mejor tipificación de las distintas GM, facilitando así su diagnóstico diferencial<sup>16</sup>.

La CMF se ha consolidado como una herramienta útil para demostrar la clonalidad de forma sensible, específica y objetiva; así como también para evaluar la respuesta terapéutica y la progresión en fases preclínicas o avanzadas de la enfermedad<sup>16</sup>.

El análisis inmunofenotípico de las CPs patológicas mediante CMF permite diferenciar en gran medida este tipo de población, y por ello se ha consolidado como herramienta útil en el estudio de las GM y las NCP, pues además permite<sup>4</sup>:

- Demostrar clonalidad de forma sensible, específica y objetiva
- Diferenciar y cuantificar CPs aberrantes de CPs normales
- Estratificar el riesgo de progresión en MGUS y SMM
- Estimar marcadores de valor pronóstico en MM
- Detectar CPs patológicas en sangre periférica
- Evaluar la respuesta terapéutica y la progresión de la enfermedad mediante estudios de Enfermedad Mínima Residual

A pesar de la facilidad, la rapidez y la objetividad de la CMF para cuantificar CPs, las cifras de CPs utilizadas para el diagnóstico de las NCP continúan siendo las observadas en el estudio citológico o histopatológico de aspirados o biopsias de MO. Esto se debe a que el recuento de CPs obtenido mediante CMF ofrece, por lo general, valores inferiores a los estimados por microscopía. No obstante, se ha descrito que existe una clara proporcionalidad entre ambas técnicas. En un Centro de Estudios establecieron su propia equivalencia, siendo que el 10% de las CPs determinadas por microscopía equivaldrían al 1,98% de CPs detectadas por CMF. Por lo tanto, el 1,78% de CPs en MO permite diferenciar MM de MGUS, y ofrece valor pronóstico sobre la progresión y la supervivencia global<sup>4</sup>.



**Figura 9.** Comparación entre las Células Plasmáticas observadas mediante histología y citometría de flujo. **Fuente:** Muñoz Calleja, C., & Minguela Puras, A. (2019). *Diagnóstico y monitorización inmunofenotípica de las neoplasias leucocitarias*. Barcelona: Elsevier.

Uno de los datos del estudio inmunofenotípico de mayor relevancia clínica es la relación o ratio entre las cifras de CPs normales y patológicas. En el MGUS y SMM, la coexistencia de CPs normales y aberrantes es habitual, pero es rara en el MM. El 82% de los MGUS y el 40% de SMM muestran más del 5% de CP sanas, de tal manera que **el parámetro que mejor permite discriminar MGUS de MM son cifras superiores al 3% de CP normales respecto del total de CPs**. Un estudio del Grupo Español de Mieloma puso en manifiesto que, si las CP normales eran menos del 5%, el riesgo de progresión a MM de los pacientes con MGUS y SMM era del 25% y el 63%, frente al 5% y el 8%, respectivamente, cuando se encontraban por encima del 5%. Más recientemente se ha demostrado que los MM con más del 5% de CPs normales tienen mejor pronóstico, menor frecuencia de citogenética de alto riesgo, mejores respuestas al tratamiento y mejor supervivencia libre de progresión y supervivencia global, pudiendo considerarse una enfermedad MGUS-like<sup>4,16</sup>.

Es por ello, que, en el Laboratorio Central de Redes y Programas, se utiliza como punto de corte para la diferenciación entre MGUS y MM valores superiores e inferiores al 3% de CPs sanas del total de CPs, respectivamente.

#### **3.4.1. Marcadores utilizados en el estudio de Neoplasias de Células Plasmáticas**

- **CD38**

Es un marcador cuya expresión comparten numerosas células hematopoyéticas, especialmente en sus etapas tempranas de maduración y tras su activación. Las CPs tanto sanas como afectadas sobreexpresan este marcador por lo que se lo utiliza para la identificación de las mismas. Sin embargo, la expresión de CD38 puede verse reducida en células plasmáticas mielomatosas respecto de la de una sana<sup>16</sup>.

- **CD138**

También llamado sindecano-1, es una molécula de la familia del heparán-sulfato que se expresa en células plasmáticas, células epiteliales, mesenquimales y carcinomas. Es un receptor de diversos factores de crecimiento de especial relevancia para las CPs de MM. Su expresión aparece tardíamente en la diferenciación de los linfocitos B, y se detecta a partir del estadio de plasmoblasto, por lo que se dice que es un marcador “exclusivo” de células plasmáticas en MO<sup>6,16</sup>.

- **CD45**

Es una tirosin-fosfatasa considerada como marcador panleucocitario. Se expresa intensamente en CPs sanas, pero su expresión se reduce o negativiza en las CPs mielomatosas asociándose a malignidad y pronóstico adverso. Se ha visto que las células plasmáticas en proliferación, tanto sanas como patológicas, son CD45 intermedias<sup>16</sup>.

- **CD19**

Es un marcador de gran utilidad para diferenciar células plasmáticas patológicas de células sanas, ya que en la mayoría de los pacientes con MM (97,5%) se manifiesta una pérdida de su expresión en las CPs aberrantes, mientras que las CPs sanas habitualmente retienen la expresión de este marcador. Raramente las CPs aberrantes retienen este marcador de linfocitos B, detectándose en estos casos mayor asociación con reordenamiento t(11:14), diploidía y buen pronóstico<sup>16</sup>. La detección de CD19+ se correlaciona con un pronóstico adverso, sin embargo, su valor clínico se encuentra en discusión por la baja frecuencia (4%)<sup>17</sup>. Se debe tener en cuenta también, que alrededor de un tercio de las CPs sanas no expresan este marcador o lo expresan de manera débil<sup>18</sup>.

- **CD56**

Es un marcador de expresión aberrante en las CPs patológicas, encontrándose típicamente asociada a linfocitos NK. Se expresa en el 78% de los pacientes con MM, mientras que en las CPs sanas y las de LCP, su expresión suele ser negativa. CD56 es una molécula de adhesión entre las CPs entre sí y con los osteoblastos, por lo que la pérdida de su expresión en la LCP suele asociarse a la posibilidad de abandonar el nicho en la médula ósea. Además, CD56-se asocia a ausencia de osteolisis, gammapatías de cadena ligera lambda y con mal pronóstico<sup>16</sup>.

- **CD117**

Conocido como c-Kit (cytokine stem cell factor), CD117 es expresado aberrantemente en alrededor de un tercio de los pacientes con CPs aberrantes. Se expresa naturalmente en células progenitoras de estirpe mieloide. En CPs patológicas se asocia con hiperploidia, ausencia de translocaciones y mejor pronóstico. La del(13q) y t(4:14) se han relacionado con la falta de expresión de CD117<sup>16</sup>.

- **CD27**

Se encuentra asociado a la memoria inmunológica, cuya expresión suele restringirse a células linfoides del centro germinal, células de memoria y células plasmáticas sanas. La expresión de este marcador se encuentra claramente disminuida en 50% de los pacientes con CPs aberrantes. Si su expresión se mantiene en niveles normales, se asocia con mejor pronóstico. Esta descrito que la progresión de la enfermedad disminuye la expresión de este marcador<sup>16</sup>.

- **CD28**

Típicamente es un marcador de linfocitos T, teniendo una expresión aberrante en las CPs patológicas en el 47,8% de los pacientes con MM. Su expresión se asocia con peor evolución, dándose una progresión de la enfermedad por aumento del riesgo de recaída. Además, se asocia con del(17p) y t(14;16)<sup>16</sup>.

- **CD20**

Es un marcador de linfocitos B que puede retenerse en células plasmáticas patológicas, sin embargo, no se conocen casos de co-expresión con CD19. El fenotipo CD19-CD20-CD27- se relaciona a reordenamientos de IgH de pronóstico adverso (t(4:14) y t(14:16)) y ausencia de hiperploidía. CD20 se vincula a células plasmáticas pequeñas (menor FSC)<sup>16</sup>.

- **CD81**

CD19 se encuentra regulado por CD81, una tetraspanina ampliamente expresada en células B, incluyendo CPs madura. CD81 está involucrado en la regulación del crecimiento celular, motilidad, señalización y homing en la médula ósea. Por lo tanto, este marcador tiene relación con la supervivencia celular y el potencial invasivo de las CPs, ya que su señalización disminuye la actividad de las vías mTOR y mTOR/ricor. En un estudio realizado se halló que el 45% de los pacientes presentaron un CD81+, de los cuales 72% fueron heterogéneos y el 28% restante homogéneos. Se vio que los pacientes con CD81+ tuvieron tiempos de sobrevida libre de eventos más cortos<sup>4,17</sup>.

- **Cadenas ligeras Kappa y Lambda**

El estudio de las Ig intracitoplasmáticas de cadenas livianas (kappa y lambda) o pesadas (IgA, IgD, IgG e IgM) permite establecer la clonalidad de las CPs patológicas y diferenciarlas de las CPs sanas de distribución policlonal, e identificar múltiples líneas de CPs patológicas. Además, el estudio de las Ig citomasplasmáticas permite establecer el ratio de células plasmáticas patológicas-sanas. Por su parte, el cociente kappa/lambda en poblaciones de células plasmáticas normales va desde 0,26 hasta 1,65, por lo que: un valor menor a 0,26 indica una población clonal de cadenas livianas lambda; y en contraste un valor mayor a 1,65 indica una población clonal de cadenas livianas kappa<sup>16</sup>.

- **β2-microglobulina**

β2-microglobulina forma parte de la cadena liviana invariante de las moléculas HMC tipo I<sup>19</sup>. Su utilidad es sobre todo la evaluación de sus niveles en plasma durante el tratamiento de los pacientes con MM. Sin embargo, es difícil encontrar referencias de utilidad de la evaluación de este marcador expresado en CPs<sup>4</sup>. Su presencia en plasma se debe al *turnover* de membrana normal, y sus niveles permiten estimar la masa tumoral<sup>19</sup>. Algunos autores mencionan que *in vitro* la β2-microglobulina inhibe el crecimiento de las CPs e induciría la apoptosis. Sin embargo, esto no se condice con lo visto desde la clínica, ya que niveles elevados de β2-microglobulina se condicen con progresión de la enfermedad y peor pronóstico<sup>20</sup>. La expresión aberrante de moléculas HLA se ha visto en una gran variedad de tumores y procesos neoplásicos. No obstante, se ha visto que las CPs maduras pierden su expresión, por lo que la determinación de β2-microglobulina de superficie puede considerarse un potente indicador pronóstico<sup>19</sup>.

### 3.4.2. Panel de Inmunomarcación para NCP

Los consensos actuales incluyen a CD38, CD138 y CD45 como la mejor combinación para la identificación y cuantificación de CPs. Por otra parte, la expresión de CD19, CD56, CD117, CD20, CD28, CD27 y CD81, junto a la restricción de cadenas livianas intracitoplasmáticas, se asocian a patrones fenotípicos particulares que permiten una clara discriminación entre las células normales/reactivas frente a los plasmocitos clonales. Se ha encontrado que la expresión de β2-microglobulina es inversamente proporcional a la concentración sérica de la misma, relacionándose con un mejor pronóstico, lo que lo posiciona como un potencial marcador pronóstico<sup>21</sup>.

**Tabla 3.** Panel de anticuerpos monoclonales para el estudio de NCP sugerido por el Grupo EuroFlow.

	FITC	PE	PerCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450	V500
<b>Tubo 1</b>	CD38	CD56	β2 micro	CD19	Igκcit	Igλcit	CD45	CD138
<b>Tubo 2</b>	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81	CD45	CD138

**Fuente:** EuroFlow. (2012). *EuroFlow innovation and standardization of flow cytometric diagnosis and classification in hemato-oncology*. Rotterdam: BD.

**Tabla 4.** Panel de anticuerpos monoclonales para el estudio de NCP utilizado en el Laboratorio Central de Redes y Programas, Provincia de Corrientes.

	FITC	PE	PerCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450	V500
<b>Tubo 1</b>	CD38	CD138	CD19	CD117	CD56	Igλcit	Igκcit	CD45

**Fuente:** Laboratorio Central de Redes y Programas, Provincia de Corrientes.

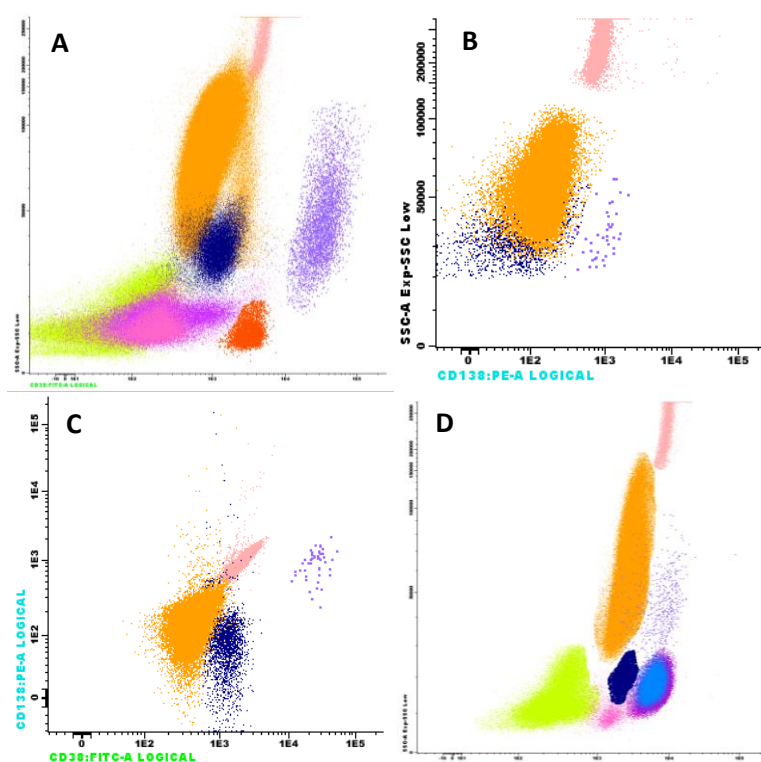
Como se mostró en la **Tabla 1**, el inmunofenotipo normal de las CPs es: CD38++, CD138+, CD45+, CD19+, CD56-, CD117- y no presentan restricción de la expresión de cadenas livianas. A continuación, se presentan los *dot-plot* correspondientes a este inmunofenotipo.

Como se ha mencionado anteriormente, CD38 no es exclusivo de las CPs, sino que como se puede apreciar en el gráfico SSC-A vs CD38, este marcador es expresado también por monocitos (color azul), poblaciones inmaduras de granulocitos neutrófilos (color amarillo) y precursores tempranos e la ontogenia B (color naranja). Sin embargo, la utilidad de este

marcador está en que las CPs (población lila) lo sobreexpresan, inclusive en células aberrantes, lo que permite seleccionar fácilmente esta población (Fig. 10 A)<sup>16</sup>.

Por otra parte, CD138 es considerado marcador exclusivo de CPs en médula ósea, como se puede apreciar en el dot-plot SSC-A vs CD138 (Fig.10 B). Además, al estudiar la expresión de CD38 y CD138 en conjunto, se puede distinguir claramente una población doble-positiva para estos marcadores aislada del resto de las poblaciones (Fig. 10 C)<sup>16</sup>.

En adición, las CPs normales expresan intensamente CD45, de manera similar a los linfocitos, aunque por tener una mayor granularidad y complejidad que estos, su SSC-A es mayor<sup>16</sup>. En este gráfico se pueden identificar la población de eritroblastos (color lima) CD45-, y poblaciones CD45+ como granulocitos neutrófilos y eosinófilos, monocitos, linfocitos B, T (color morado) y NK (color celeste) (Fig. 10 D).



**Figura 10.** Marcadores utilizados en la identificación de Células Plasmáticas.

**A:** SSC-A vs CD38. **B:** SSC-A vs CD138. **C:** CD138 vs CD38. **D:** SSC-A vs CD45.

La identificación del inmunofetipo y la clonalidad de las células plasmáticas resulta crucial al momento de definir si las mismas representan una población normal o patológica.

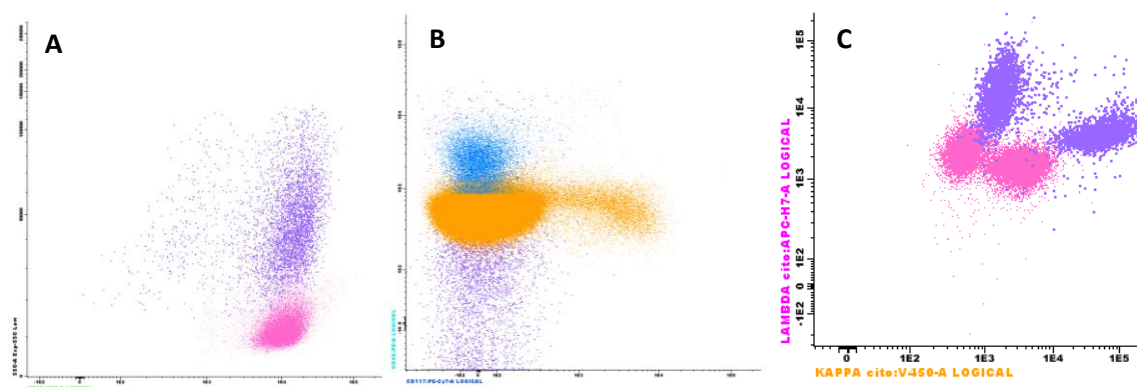
En este sentido, el gráfico 11 A representa los parámetros SSC-A vs CD19, donde tomando como población de control positivo a los linfocitos B (CD19+ con bajo SSC-A, color rosa) podemos definir que la población de CPs en estudio expresa este marcador<sup>16,18</sup>. Sin embargo, es destacable que alrededor de un tercio de las CPs normales no expresan CD19<sup>18</sup>.

El gráfico CD56 vs CD117 nos permite descartar dos de las aberrancias más frecuentes de las CPs. En este caso, se toman como población control positivo de CD56 a los linfocitos NK (color celeste), a precursores mieloides como control positivo de CD117, y a los neutrófilos maduros como control negativo. Vemos así que la población de CPs normales no expresa



ninguno de estos (Fig. 11 B)<sup>16</sup>. Se debe tener en cuenta que existen pequeñas subpoblaciones de CPs normales que expresan CD56 de manera débil<sup>18</sup>.

Por último, el dispersograma Lambda<sub>cit</sub> vs Kappa<sub>cit</sub> demuestra la policlonalidad de las CPs normales, teniéndose también como referencia la policlonalidad de la población de linfocitos B maduros<sup>16</sup>.



**Figura 11.** Marcadores utilizados en la inmunofenotificación de Células Plasmáticas.

**A:** SSC-A vs CD19. **B:** CD56 vs CD117. **C:** Lambda<sub>cit</sub> vs Kappa<sub>cit</sub>.

### 3.4.3. Valor Predictivo de la presencia de Células Plasmáticas Aberrantes en Sangre Periférica en el momento del Diagnóstico

La presencia de CPs aberrantes (aCP) circulantes es un factor pronóstico en pacientes de debut diagnóstico con MM, SMM o MGUS. En una elevada proporción de pacientes con MM (46-80%) es posible detectar aCP circulando en sangre periférica y, aunque con menor frecuencia, también es pacientes con SMM (50%) y MGUS (20-25%). Además de valor diagnóstico, las CPs circulantes tiene valor pronóstico, de manera que la supervivencia global disminuye según aumentan las cifras de aCP en SP de los pacientes con MM. Igualmente, tiene significado pronóstico también para la progresión a SMM desde MGUS<sup>4</sup>.

La presencia de aCP circulantes en combinación con otros factores pronósticos, como la concentración del componente M y el isotipo de la Ig, identifican un grupo de individuos con MGUS con mayor riesgo de progresión a MM<sup>4</sup>.

En los datos obtenidos de un centro particular se observó que un valor de aCP en SP superior al 0,0035%, por sí solo, permite hacer una estratificación del riesgo en los pacientes con MM con un valor predictivo al menos igual que el de los modelos actuales basados en citogenética<sup>4</sup>.

## 3.5. Conceptos Estadísticos y Epidemiológicos

### • Diseño Observacional

En este tipo de estudio solo se observan características que la población ha adquirido naturalmente, por lo que el investigador no realiza ninguna intervención sobre los sujetos de estudio. La población se selecciona en base a alguna característica que ella posea y que sea de interés estudiar. En contraste, los diseños experimentales el investigador realiza una intervención sobre la población<sup>22</sup>.

- **Diseño Retrospectivo**

Para esta clasificación se tienen en cuenta la manera en que se producen los datos del estudio. En los diseños retrospectivos los datos se han recabado previamente o ya existen, por ejemplo, las historias clínicas o bases de datos de un centro de salud. En cambio, en los diseños prospectivos los datos se generan al momento de iniciar la investigación<sup>22</sup>.

- **Diseño Transversal**

En este tipo de diseños se estudia durante un cierto periodo de tiempo los pacientes con diagnóstico previo o reciente de una cierta enfermedad. Por lo tanto, los datos se pueden obtener sobre las compilaciones de historias clínicas. Por el contrario, los estudios longitudinales evalúan al sujeto durante un cierto periodo de tiempo para conocer su evolución<sup>22</sup>. Los estudios transversales suelen llamarse también estudios de prevalencia, dado que en estos se busca estudiar la frecuencia de una enfermedad en una población expuesta<sup>23</sup>.

- **Diseño analítico**

En los diseños analíticos, la población se subclasifica de acuerdo con alguna característica relevante y se comparan los datos de los eventos entre las subpoblaciones. Por su parte, los diseños descriptivos solo reportan los datos observados obtenidos de toda la población estudiada<sup>22</sup>.

- **Prevalencia**

Se denomina prevalencia a la frecuencia de un factor de exposición o evento ya presente en la población, independientemente del tiempo en que los sujetos presenten el factor de exposición o evento<sup>22</sup>. Es decir, que la prevalencia es la frecuencia de casos de enfermedad en una población y en un momento dados<sup>23</sup>.

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Nº de personas con la enfermedad en un momento determinado}}{\text{Población total expuesta al riesgo en el momento determinado}}$$

Lo ideal es que para el cálculo de prevalencia se incluya como población solo a las personas potencialmente susceptibles de padecer la enfermedad considerada (Población Expuesta al Riesgo)<sup>23</sup>.

*Caso* es un sujeto con el factor de exposición o evento de interés. El factor de exposición y/o el evento ya existente en la población pueden ser recientemente diagnosticados o bien existir desde hace mucho tiempo. Lo importante es que ya están presentes en la población<sup>22</sup>.

Los datos de prevalencia son mucho más útiles cuando se convierten a tasas, lo cual se calcula expresando la prevalencia calculada en casos por 10<sup>n</sup> personas<sup>23</sup>.

## 4. Datos y Resultados

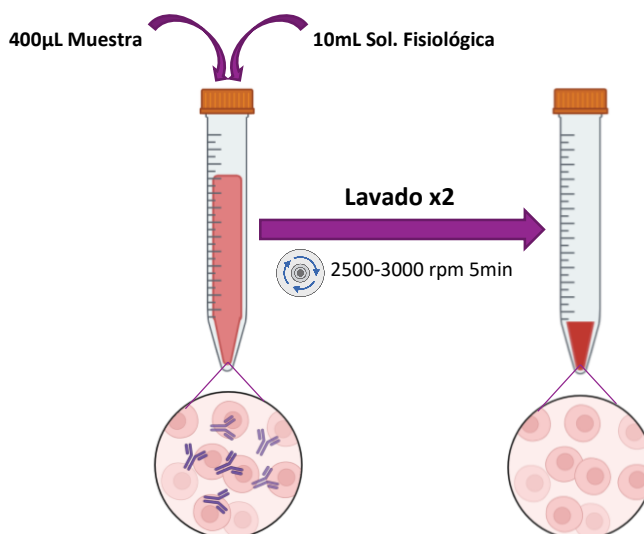
### 4.1. Inmunomarcación Superficial e Intracitoplasmática

El panel de inmunomarcación para Neoplasias de Células Plasmáticas cuenta con antígenos de superficie e intracitoplasmáticos. Es por ello que se debe comenzar con el proceso marcando los antígenos superficiales, y utilizando el Kit comercial BD Intrasure se prosigue para lograr la marcación de las cadenas livianas intracitoplasmáticas. El reactivo A de este kit presenta formaldehído en su composición, teniendo como fin fijar las células de manera de conservar su estructura, ya que el reactivo B permeabilizará la membrana celular permitiendo que los anticuerpos dirigidos contra antígenos citoplasmáticos logren ingresar.

#### 4.1.1. Preparación de la Muestra

En el caso del estudio de las Neoplasias de Células Plasmáticas la muestra de elección es Médula Ósea, excepto ante las sospechas de Leucemia de Células Plasmáticas donde la búsqueda de plasmocitos aberrantes se realiza sobre sangre periférica.

Las determinaciones que involucren la marcación de cadenas livianas (kappa y lambda), deben ser lavadas previamente con solución fisiológica, a fin de quitar los anticuerpos solubles, ya que los mismos interferirán con el proceso de marcación consumiendo el anticuerpo monoclonal.



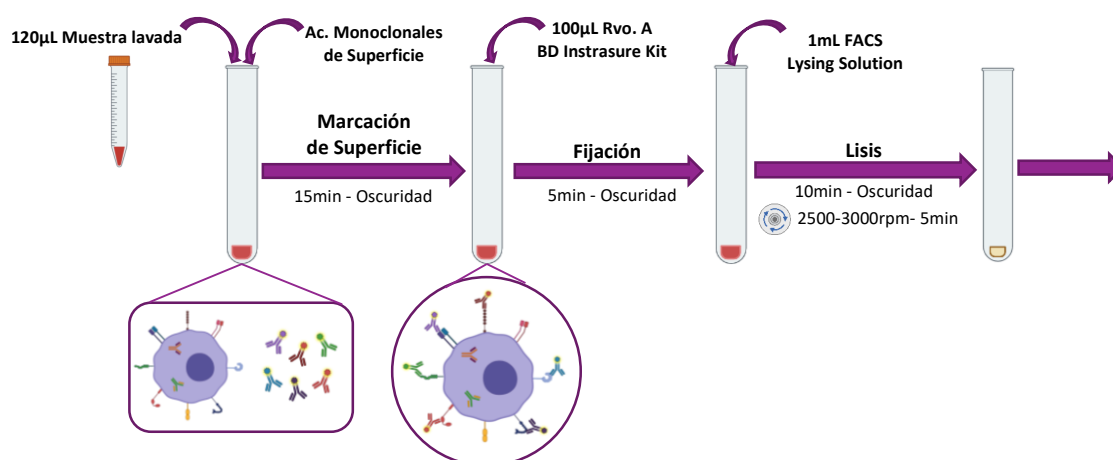
**Figura 11.** Eliminación de anticuerpos séricos interferentes.

#### 4.1.2. Inmunomarcación superficial

En un tubo de citometría, se colocan 120 µL de muestra previamente lavada y los anticuerpos monoclonales contra CDs de superficie: CD38, CD138, CD45, CD19, CD117 y CD56, en los volúmenes mencionados en la **Tabla 5**. A continuación se procede a la incubación de la muestra en oscuridad durante 15 minutos, tiempo tras el cual los anticuerpos monoclonales marcados se han unido por complementareidad paratope-epitope.

Posteriormente se añade el reactivo A al tubo, de manera de fijar las células, durante 5 minutos en oscuridad.

Luego, se realiza la lisis de los glóbulos rojos presentes en la muestra utilizando el lisante FACS Lysing Solution (BD) durante 10 minutos en oscuridad. Pasado este tiempo, se debe centrifugar a 2500-3000 rpm durante 5 minutos, descartar el sobrenadante y verificar la ausencia de botón hemático en el fondo del tubo. De no ser así, se debe repetir el proceso de lisis.



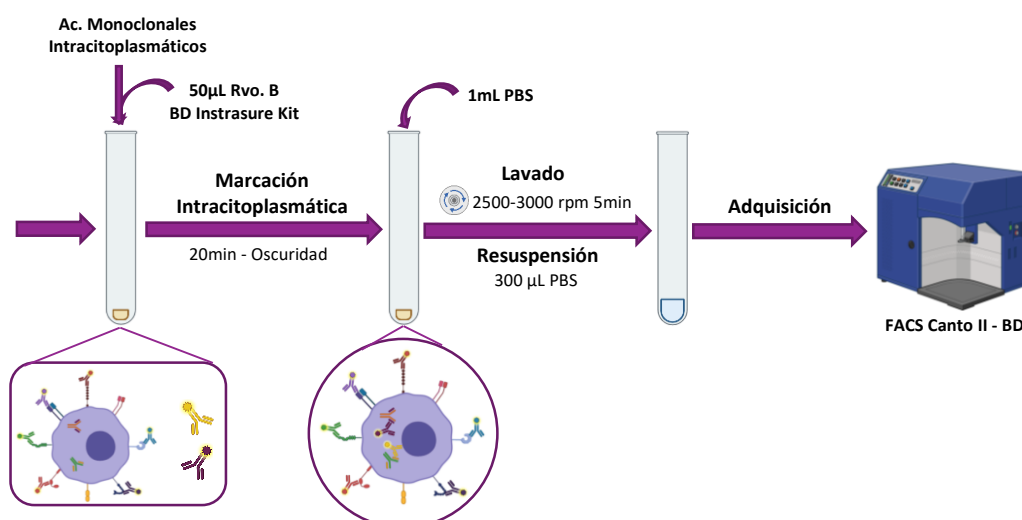
**Figura 12.** Representación esquemática del proceso de marcación superficial.

#### 4.1.3. Marcación intracitoplasmática

En la muestra lisada se encuentran presentes entonces, los elementos celulares distintos de los eritrocitos, que en caso de tener el/los marcador/es contra los que se dirigieron los anticuerpos monoclonales utilizados previamente, estos últimos quedarán fijados en su superficie adheridos a ese CD.

En este punto, se añade el reactivo B del kit y los anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos intracitoplasmáticos, en este caso las cadenas livianas kappa y lambda.

Tras 20 minutos de incubación, la muestra debe ser lavada con PBS y centrifugada a 2500-3000 rpm por 5 minutos nuevamente, para finalmente descartar el sobrenadante y resuspender el pellet celular con 300-400 µL de Buffer PBS. De esta manera la muestra se encuentra lista para ser adquirida mediante el citómetro de flujo.



**Figura 13.** Representación esquemática del proceso de marcación intracitoplasmática.

**Tabla 5.** Panel de anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio de NCP en el Laboratorio Central de Redes y Programas, y volúmenes de cada anticuerpo.

	FITC	PE	PerCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450	V500
<b>Tubo 1</b>	CD38	CD138	CD19	CD117	CD56	Igλcit	Igκcit	CD45
<b>Volúmenes</b>	5 µL	3 µL	5 µL	2 µL	2 µL	2,5 µL	2,5 µL	3 µL

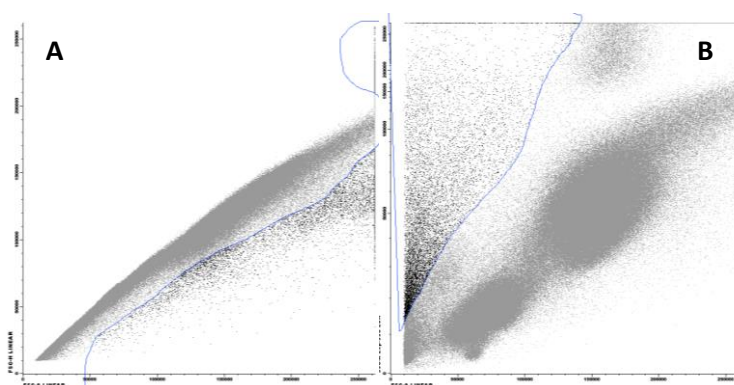
**Fuente.** Laboratorio Central de Redes y Programas, Provincia de Corrientes.

#### 4.2. Análisis para la Inmunofenotipificación de Células Plasmáticas

Para explicar el análisis inmunofenotípico de las células plasmáticas, se ha seleccionado a un paciente cuyo diagnóstico final fue MGUS, ya que en estos casos la patología presenta dos subpoblaciones de este tipo celular, una aberrante y una de células normales o reactivas.

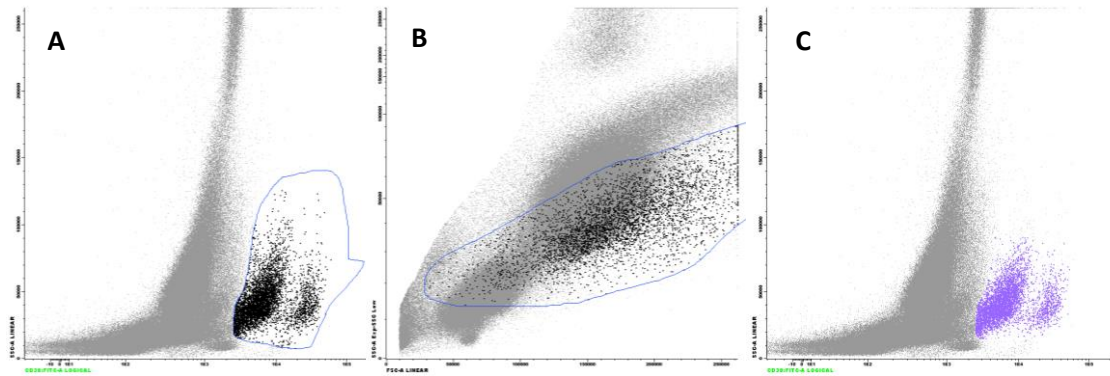
Los softwares de procesamiento y análisis de datos utilizados fueron: Infinicyt (Cytognos) y FACS Diva (BD).

En primer lugar, se debe seleccionar el background celular, ya que el mismo puede interferir en la definición de las poblaciones. Desde el dot-plot FSC-H vs FSC-A se seleccionan los dobletes, es decir aquellos eventos en los cual más de una célula se encontraba en el sitio de análisis en el momento en que el equipo detectó la señal (Fig.14 A). Luego, en el gráfico SSC-A vs FSC-A se seleccionan los eventos asociados a células en apoptosis, restos apoptóticos y *debries* (Fig. 14 B).



**Figura 14.** Selección del Background celular. **A:** FSC-H vs FSC-A. **B:** SSC-A vs FSC-A.

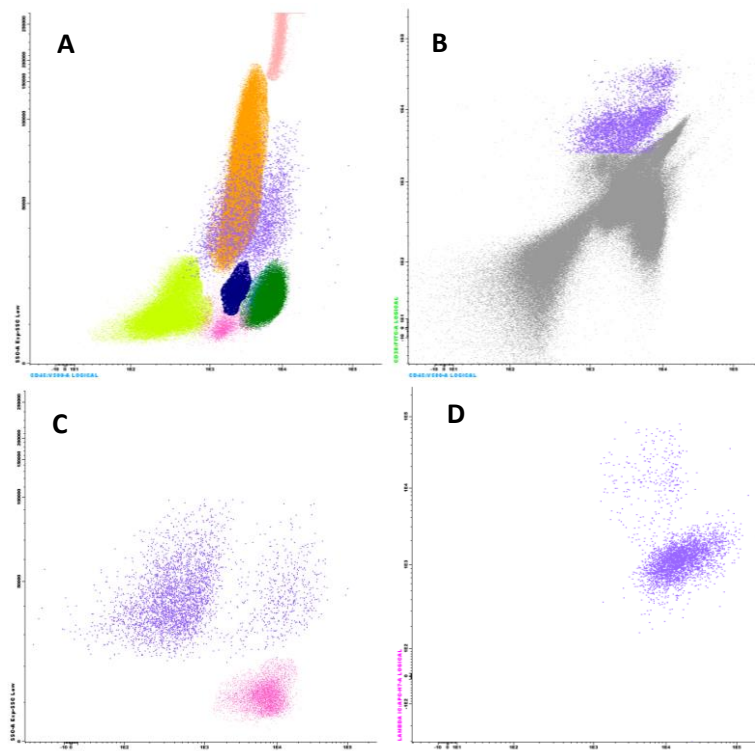
Una vez eliminado el background celular, se procede a la selección de la/s población/es de células plasmáticas, teniendo en cuenta que las mismas tienen como característica la sobreexpresión de CD38 con un SSC mayor al de los precursores B (Fig. 15 A). Posteriormente, se selecciona la población más homogénea en el gráfico SSC-A vs FSC-A, incluyendo los eventos con alto FSC-A ya que dentro de los cambios morfológicos que presentan las células plasmáticas en su diferenciación se encuentra un aumento de su tamaño (Fig. 15 B). Por último, en la Figura 15 C, podemos observar de color lila la población de células plasmática. En este punto se debe prestar particular atención, a que desde esta primera instancia se observa una subpoblación con mayor expresión de CD38 que la otra.



**Figura 15.** Selección de la población de Células Plasmáticas.  
A y C: SSC-A vs CD38. B: SSC-A vs FSC-A.

Habiendo identificado las demás poblaciones celulares, se puede observar que la población de células plasmáticas, presenta una expresión heterogénea de CD45 (marcador panleucocitario), tomando como control negativo a la población de eritroblastos (color lima), y como controles positivos a los linfocitos B (color rosa), los neutrófilos (color naranja) y los monocitos (color azul) (Fig. 16 A). Al seleccionar la visualización de las células plasmáticas en el gráfico CD38 vs CD45, se pueden diferenciar dos subpoblaciones. La primera presenta expresión de CD38 más elevada, en contraste con la segunda subpoblación, la cual presenta una disminución de la expresión de este marcador (Fig. 16 B).

El dot-plot SSC-A vs CD19, permite discernir claramente las dos subpoblaciones de células plasmáticas. Una de ellas expresa CD19, tomando como control positivo a los linfocitos B (CD19 es característico de este linaje); mientras que la otra población no expresa dicho marcador (Fig. 16 C).



**Figura 16.** Población de Células Plasmáticas.  
A: SSC-A vs CD45. B: CD38 vs CD45. C: SSC-A vs CD19. D: Lambda<sub>cit</sub> vs Kappa<sub>cit</sub>.

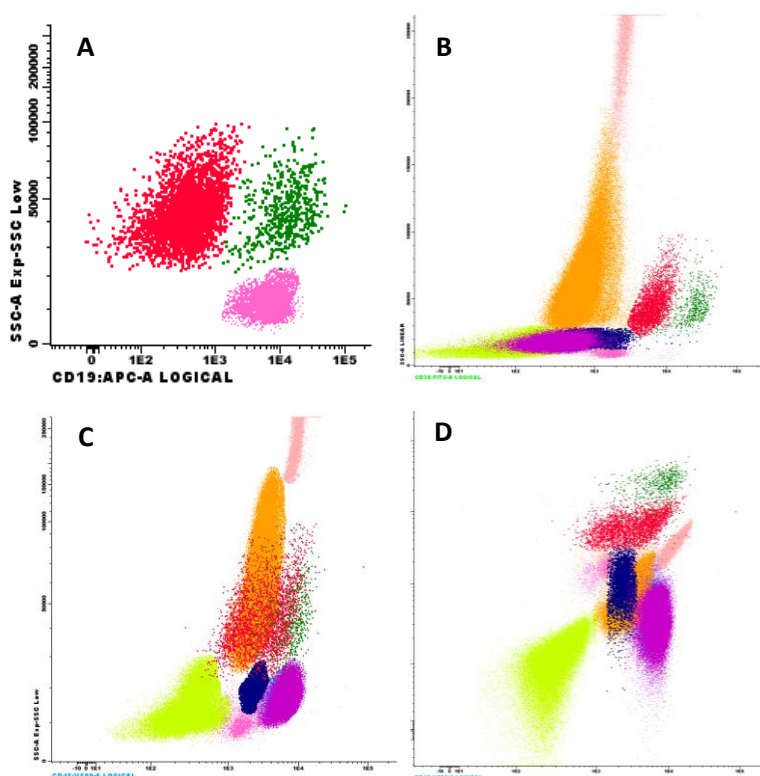


Además, en el gráfico que entre cruza los marcadores intracitoplasmáticos Lambda vs Kappa, se logra evidenciar una clara restricción de cadenas livianas a expensas de Kappa (Fig. 16 D).

Como se mencionó anteriormente, el gráfico SSC-A vs CD19 denota la presencia de dos subpoblaciones. Teniendo en cuenta que la pérdida de expresión de CD19 es una de las aberrancias más frecuentes en los casos de NCP, se puede definir entonces dos subpoblaciones: una de células plasmáticas normales o reactivas (verde) y una de clones aberrantes (rojo) (Fig. 17 A).

En el dot-plot de la Figura 17 B, a pesar de que la expresión de CD38 en ambas subpoblaciones es mayor a la del resto, la población atípica presenta una disminución de este marcador, siendo este un aspecto característico del proceso neoplásico.

Al observar la expresión de CD45 en los dispersogramas 17 C y 17 D, la subpoblación de células normales tiene una expresión homogénea de este marcador. No así la subpoblación aberrante, la cual presenta heterogeneidad en su expresión.



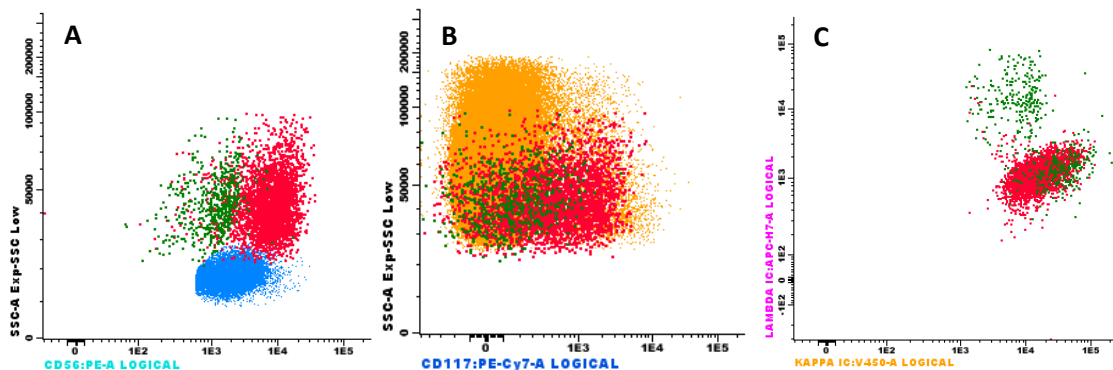
**Figura 17.** Análisis Inmunofenotípico de la Población de Células Plasmáticas.

**A:** SSC-A vs CD19. **B:** SSC-A vs CD38. **C:** SSC-A vs CD45. **D:** CD38 vs CD45.

Tomando como control positivo a los linfocitos NK (color celeste), la subpoblación de células plasmáticas atípicas presenta expresión de CD56, siendo este uno de los principales marcadores de aberrancia en las neoplasias de células plasmáticas. En contraparte, la subpoblación de células normales, no lo expresa (Fig. 18 A).

El gráfico SSC-A vs CD117 (marcador de inmadurez del linaje mieloide, por lo que se tomó como control positivo a esta serie), permite denotar que la subpoblación normal no expresa este marcador, siendo que la población aberrante si lo expresa de manera heterogénea (Fig. 18 B).

Por último, la Figura 18 C, correspondiente al estudio de la clonalidad de estas subpoblaciones, permite definir que la población de células normales no presenta restricción de la expresión de cadenas livianas, como si sucede en la población patológica a expensas de Kappa.



**Figura 18.** Análisis inmunofenotípico de la población de Células Plasmáticas.

**A:** SSC-A vs CD56. **B:** SSC-A vs CD117. **C:** Lambda<sub>cit</sub> vs Kappa<sub>cit</sub>.

Por lo antes expuesto, podemos apreciar que este paciente presenta dos subpoblaciones de células plasmáticas:

- *Subpoblación de células normales o reactivas:* CD38++, CD45+, CD19+, CD117- CD56-, sin restricción de cadenas livianas.
- *Subpoblación de células atípicas o aberrantes:* CD38+dim, CD45-/++dim, CD19-, CD117+, CD56+, con restricción de cadenas livianas citoplasmáticas a expensas de Kappa.

Los resultados de este paciente fueron:

- Linfocitos totales: 22% de la celularidad total de la muestra.
- Granulocitos neutrófilos: 59% de la celularidad total de la muestra.
- Granulocitos eosinófilos: 4% de la celularidad total de la muestra.
- Serie eritroide remanente: 8,7% de la celularidad total de la muestra.
- Background celular: 5,4% de la celularidad total de la muestra.
- **Células Plasmáticas Totales: 0,90% de la celularidad total de la muestra, del cual:**
  - **0,74% del total de la celularidad presenta fenotipo aberrante/atípico (82% del total de CPs)**
  - **0,16% del total de la celularidad presenta fenotipo normal (18% del total de CPs)**

Conclusión: presencia de plasmocitos clonales/aberrantes (82% del total de CPs) en concurrencia con plasmocitos fenotípicamente normales (18% del total de CPs). En el contexto clínico adecuado estos hallazgos podrían ser vinculables a Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto (MGUS) debido a que el porcentaje de plasmocitos normales excede el 3% de plasmocitos.

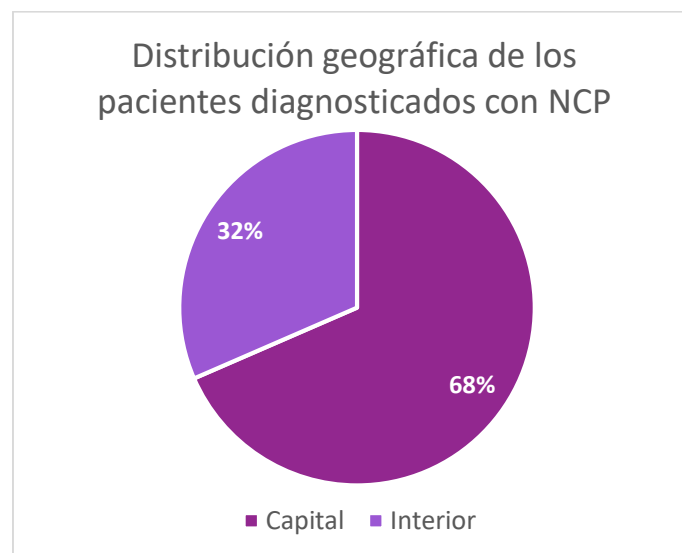
Para llegar a una conclusión diagnóstica definitiva es necesario correlacionar estos resultados con la presentación clínica y estudios hematológicos morfológicos, citogenéticos y moleculares.

#### 4.3. Justificación de la Población de Estudio

El Laboratorio Central de Redes y Programas de la provincia de Corrientes es el único centro diagnóstico en dicha región geográfica que cuenta con el Servicio de Citometría de Flujo. Si la mayoría de los pacientes del interior no logran acceder a la prestación, centrarse en la población de la ciudad de Corrientes permitirá obtener una muestra más representativa de quienes realmente están accediendo a la posibilidad del diagnóstico mediante esta metodología. Por otra parte, considerar sólo a los habitantes mayores de 40 años de la ciudad de Corrientes resulta un enfoque práctico puesto que reduce el tamaño de la población objetivo a un grupo donde la prevalencia de Neoplasias de Células Plasmáticas podría ser más relevante, dado que epidemiológicamente se conoce que afectan a la población de adultos mayores.

Es relevante destacar que sólo el 32% de los pacientes que acudieron al laboratorio provienen del interior de la provincia, mientras que el 68% son residentes de la ciudad de Corrientes (Fig.19). Esta distribución geográfica refuerza la decisión de centrar el estudio en la población de la ciudad de Corrientes, ya que representa la mayoría de los pacientes que acceden al Servicio de Citometría de Flujo.

Por lo antes expuesto, la población elegida para este trabajo es: “Todos los individuos mayores de 40 años, residentes de la Ciudad de Corrientes”.



**Figura 19.** Distribución geográfica de los pacientes diagnosticados con NCP de la Provincia de Corrientes.

#### 4.4. Análisis descriptivo de la variable *edad*

El número total de pacientes con diagnóstico de Neoplasias de Células Plasmáticas en el periodo 2013-2024 fue de 126 individuos, presentando como medidas de tendencia central una edad promedio de 64,5 años y una mediana de 65 años. Al observar el promedio en el transcurso de los años, el mismo varía entre los 59 y 69 años, con un valor mínimo en 2016 y 2024 (60 y 59 años, respectivamente) y un valor máximo en 2017 y 2022 (69,71 y 68,36 años, respectivamente). Por su parte, la mediana se mantuvo relativamente estable en el transcurso de los años, oscilando entre 61 y 68,5 años.

El Coeficiente de Variación (CV) es una medida de dispersión relativa que indica la variabilidad dentro de la serie de datos. Un CV alto sugiere una mayor dispersión. En el período 2013-2023, el CV se mantuvo dentro de un rango moderado (10 - 30%). Específicamente, el CV promedio para todo el período fue de 18,12%, lo que indica una variabilidad moderada en las

edades. Sin embargo, se observaron picos en 2014 y 2018 con valores de 19,71% y 25,20%, respectivamente y valores mínimos en 2013 y 2023 de 12,38% y 11,59%, respectivamente. Cabe destacar que, en 2024, el CV alcanzó un valor considerado alto (37%), aunque es importante tener en cuenta el tamaño reducido de la muestra (n=5).

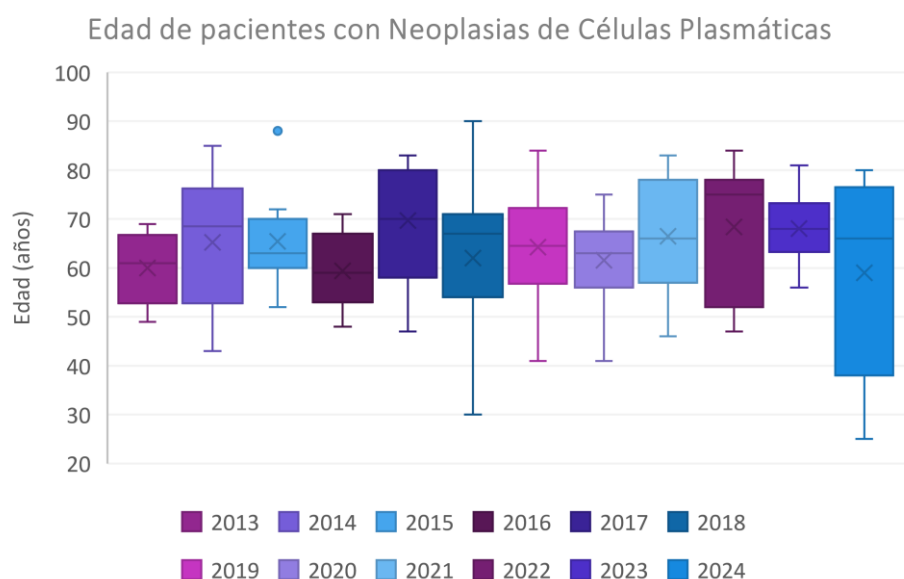
Entre 2013 y 2024, el rango de edades varía significativamente, generalmente entre 40 y 88 años, aunque se observaron dos excepciones notables, en 2024, con una pequeña muestra de sólo 5 pacientes, el rango de edades fue de 25 a 80 años, lo que se debió a la inclusión de pacientes más jóvenes; por otro lado, en 2018, el rango fue de 30 a 90 años, siendo este el valor máximo registrado en todo el período.

**Tabla 6.** Medidas descriptivas de la variable edad de los pacientes diagnosticados con Neoplasias de Células Plasmáticas

Año	n	Media	CV	Mínimo	Máximo	Mediana	Asimetría
2013	8	60	12,38	49	69	61	-0,3
2014	14	65,21	19,71	43	85	68,5	-0,25
2015	9	65,44	15,53	52	88	63	1,35
2016	7	59,43	13,42	48	71	59	0,09
2017	7	69,71	18,9	47	83	70	-0,9
2018	11	62	25,2	30	90	67	-0,37
2019	16	64,25	17,04	41	84	64,5	-0,15
2020	13	61,54	14,54	41	75	63	-0,7
2021	11	66,45	17,54	46	83	66	-0,21
2022	11	68,36	19,36	47	84	75	-0,75
2023	14	68,07	11,59	56	81	68	0,12
2024	5	59	37	25	80	66	-1,1

La asimetría mide la distribución de los datos: valores negativos indican una distribución sesgada hacia la izquierda (menores edades), mientras que valores positivos indican una distribución sesgada hacia la derecha (mayores edades). La asimetría varía significativamente a lo largo de los años, con valores que van desde -1,10 hasta 1,35. Esto sugiere que las distribuciones de edades no son simétricas en general. Algunos años presentan una distribución sesgada hacia la izquierda (menores edades), mientras que otros años presentan una distribución sesgada hacia la derecha (mayores edades). Además, la variabilidad en la asimetría puede estar relacionada con la variabilidad en el tamaño de la muestra (n) y la dispersión de los datos (CV). Sobre esto último, la variabilidad en las edades es mayor en algunos años (2014, 2018 y 2024), y el tamaño de la muestra es pequeño en algunos años (2013, 2016, 2017 y 2024), lo que puede afectar la precisión de las estimaciones.

El rango intercuartil (RIC), que refleja la dispersión del 50% central de las edades, varió a lo largo de los años analizados. El año 2022 presentó el RIC más alto con 26 años, lo que sugiere una considerable variabilidad en las edades de los pacientes. Otros años con RIC elevados incluyen 2014 (23 años), 2017 (22 años) y 2024 (22 años). En contraste, los años 2015 (6 años) y 2023 (9 años) mostraron un RIC más bajo, indicando una mayor concentración de edades en esos períodos. Estos resultados reflejan la variabilidad en la población de pacientes a lo largo del tiempo.

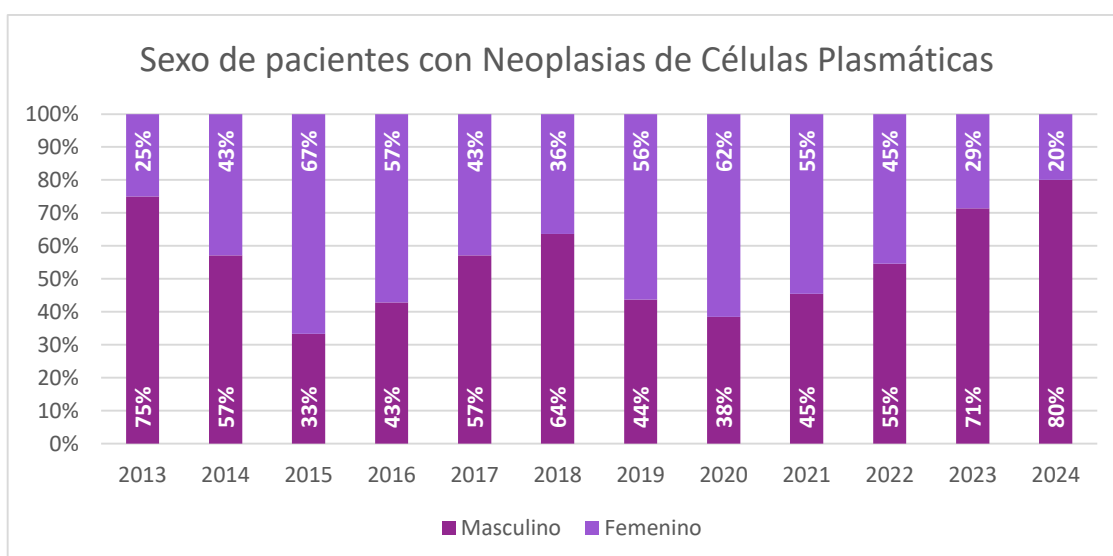


**Figura 20.** Gráficos de Box-Plot. Dispersión de la variable edad de los pacientes diagnosticados con Neoplasias de Células Plasmáticas.

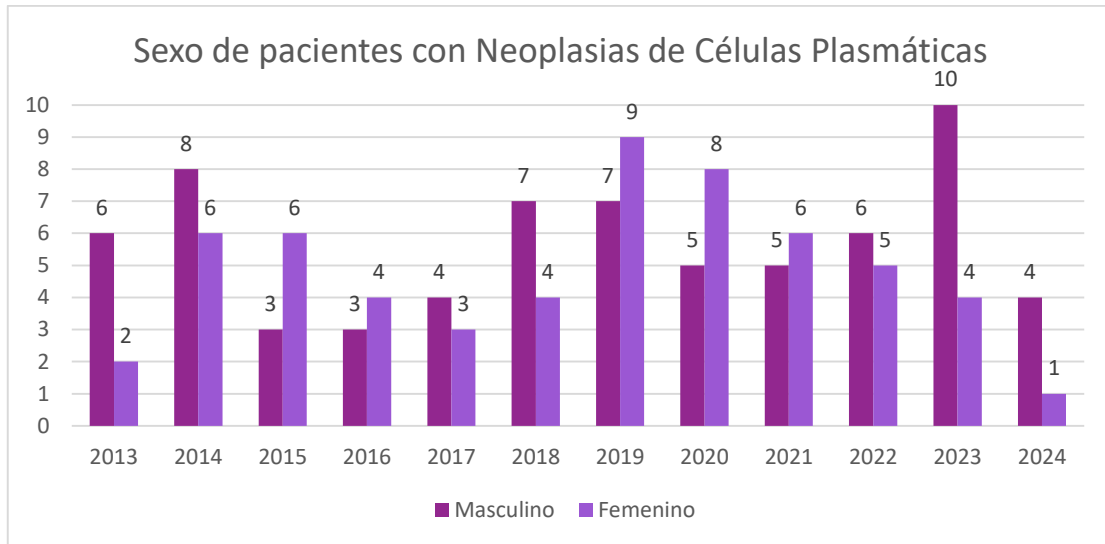
#### 4.5. Análisis descriptivo de la variable Sexo

La proporción del sexo femenino oscila entre 20% (2024) y 67% (2015). Por su parte, la proporción del sexo masculino presenta un mínimo de 33% (2015) y un máximo de 80% (2024), considerando que el tamaño muestral de 2024 fue pequeño, el segundo porcentaje más elevado fue de 75% (2013).

En 7 de los 12 años comprendidos dentro del periodo de estudio (2013-2024) la proporción de hombres fue mayor frente a la de las mujeres. En contraparte, el número de casos de mujeres respecto del total, fue mayor en 5 años dentro de este lapso temporal. En el año 2017, las proporciones de hombres y mujeres fueron aproximadamente iguales (57% y 43%, respectivamente).



**Figura 21.** Distribución porcentual del sexo de los pacientes diagnosticados con Neoplasias de Células Plasmáticas por año.



**Figura 22.** Frecuencia absoluta del sexo de los pacientes diagnosticados con Neoplasias de Células Plasmáticas por año.

**Tabla 7.** Distribución del sexo por año de los pacientes diagnosticados con Neoplasias de Células Plasmáticas.

Año	n	Sexo			
		Masculino		Femenino	
2013	8	6	75%	2	25%
2014	14	8	57%	6	43%
2015	9	3	33%	6	67%
2016	7	3	43%	4	57%
2017	7	4	57%	3	43%
2018	11	7	64%	4	36%
2019	16	7	44%	9	56%
2020	13	5	38%	8	62%
2021	11	5	45%	6	55%
2022	11	6	55%	5	45%
2023	14	10	71%	4	29%
2024	5	4	80%	1	20%

#### 4.6. Análisis descriptivo de la variable *Institución de Salud*

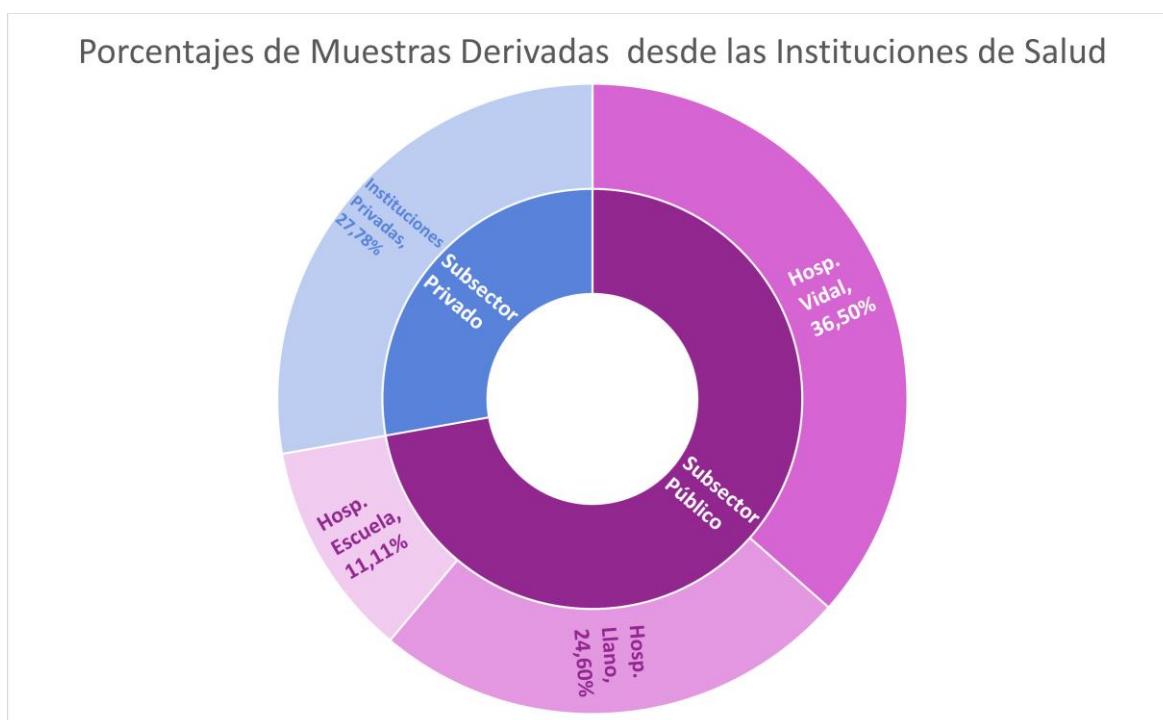
Las muestras derivadas de las Instituciones de Salud incluidas dentro del Subsector Público del Sistema de Salud representaron un 72,22%, mientras que las del Subsector privado el 27,78% restante. Dentro del grupo de Instituciones de Salud Públicas, el Hospital “Juan Ramón Vidal” derivó el 50,55%, seguido en orden decreciente por el Hospital “Ángela Iglesias de Llano” y el Hospital Escuela “José Francisco de San Martín (34,07% y 15,38%, respectivamente).



**Tabla 8.** Frecuencia de las muestras derivadas desde las diferentes Instituciones de Salud.

	Institución	N° de pacientes	
Subsector Público	Hosp. Vidal	46 (50,55%*)	91 (72,22%)
	Hosp. Llano	31 (34,07%*)	
	Hosp. Escuela	14 (15,38%*)	
Subsector Privado	Instituciones Privadas	35 (27,78%)	

\*Porcentaje respecto del total de muestras derivadas del Subsector Público.



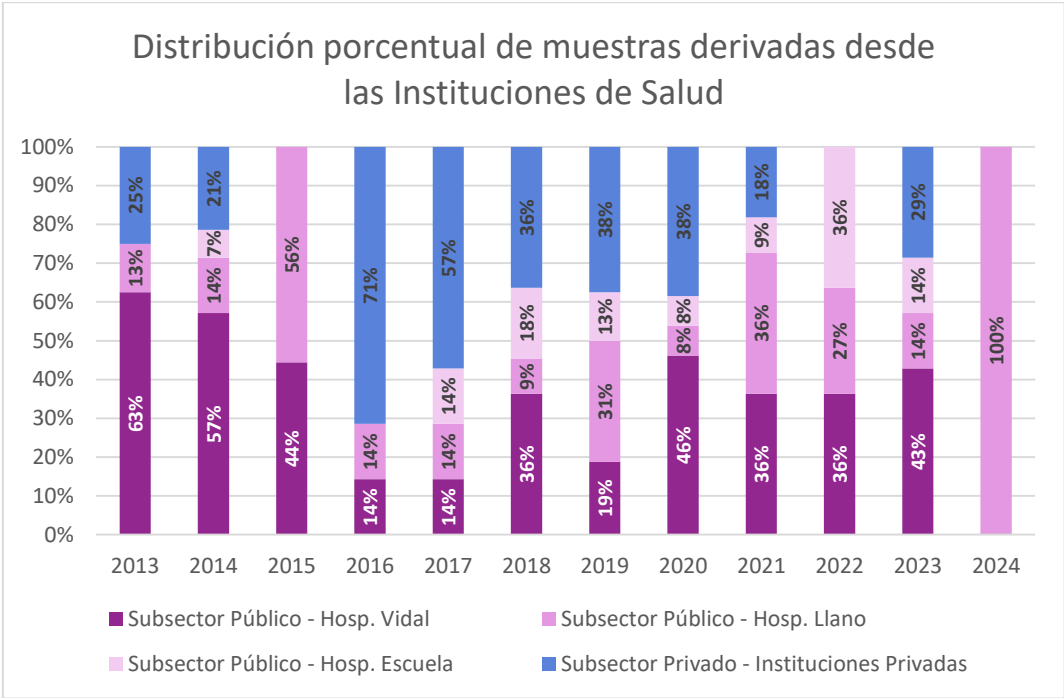
**Figura 23.** Distribución porcentual de las muestras derivadas desde las distintas Instituciones de Salud.

\*Porcentajes sobre el total de muestras.

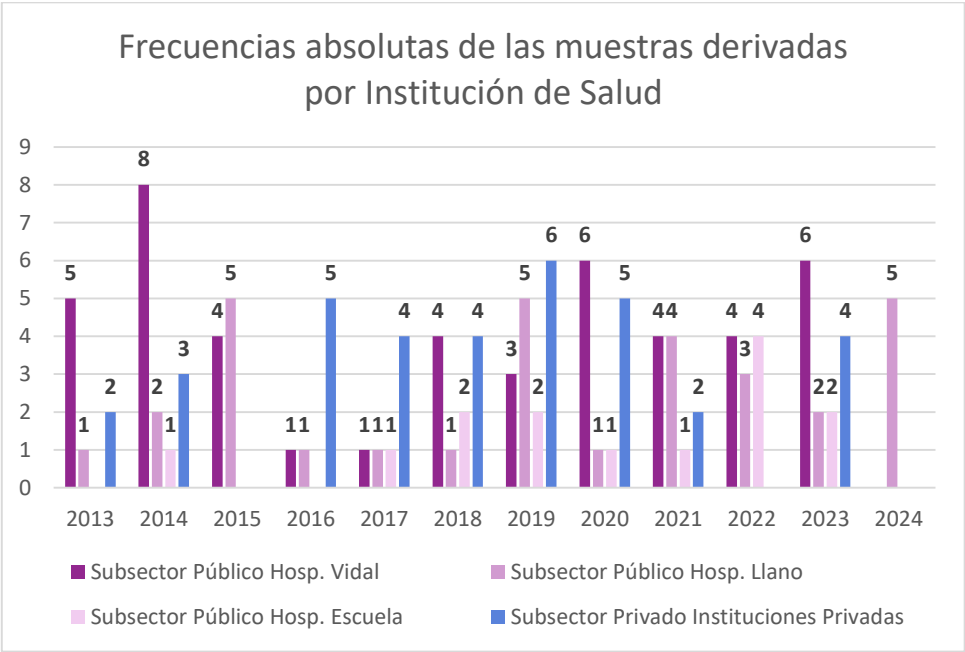
A su vez, el Hospital “Juan Ramón Vidal” tuvo la mayor frecuencia de muestras remitidas en 4 de los 12 años comprendidos en el periodo, seguido por las Instituciones privadas (3 de 12 años, 1 año similar con el Hospital Vidal), el Hospital “Ángela Iglesias de Llano” (1 de 12 años, 1 año similar al Hospital Vidal), y el Hospital Escuela “José Francisco de San Martín” (1 de 12 años, 1 año similar al Hospital Vidal). A su vez, el Hospital Escuela como Institución fue el que menor frecuencia de muestras remitidas presentó, y el Hospital Vidal el que mayor número de muestras remitió (11,11% y 36,51% del total de muestras, respectivamente).

Solo en 2 de los 12 años las muestras remitidas desde el Subsector Privado tuvieron mayor frecuencia que las del Subsector Público (2016 y 2017). En los 10 años restantes, el Subsector Público del Sistema de Salud abarcó más del 60% de las muestras por año, observándose inclusive 3 años en los que sólo se recibieron muestras provenientes de este Subsector (2015, 2022 y 2024).

En términos generales, desde el año 2016 a la actualidad, se observa una tendencia creciente a la utilización del Servicio por parte del Subsector Público del Sistema de Salud, y una decreciente desde el Subsector Privado.



**Figura 24.** Frecuencia porcentual de las muestras derivadas por Institución de Salud.



**Figura 25.** Frecuencia absoluta de las muestras derivadas por Institución de Salud.

**Tabla 9.** Frecuencia absoluta y porcentual de las muestras derivadas desde de las diferentes Instituciones de Salud.

Año	n	Institución de Salud					
		Hosp. Vidal	Hosp. Llano	Hosp. Escuela	Subsector Publico		Subsector Privado
2013	8	5	1		6	75,00%	2 25,00%
2014	14	8	2	1	11	78,57%	3 21,43%
2015	9	4	5		9	100,00%	0,00%
2016	7	1	1		2	28,57%	5 71,43%
2017	7	1	1	1	3	42,86%	4 57,14%
2018	11	4	1	2	7	63,64%	4 36,36%
2019	16	3	5	2	10	62,50%	6 37,50%
2020	13	6	1	1	8	61,54%	5 38,46%
2021	11	4	4	1	9	81,82%	2 18,18%
2022	11	4	3	4	11	100,00%	0,00%
2023	14	6	2	2	10	71,43%	4 28,57%
2024	5		5		5	100,00%	0,00%

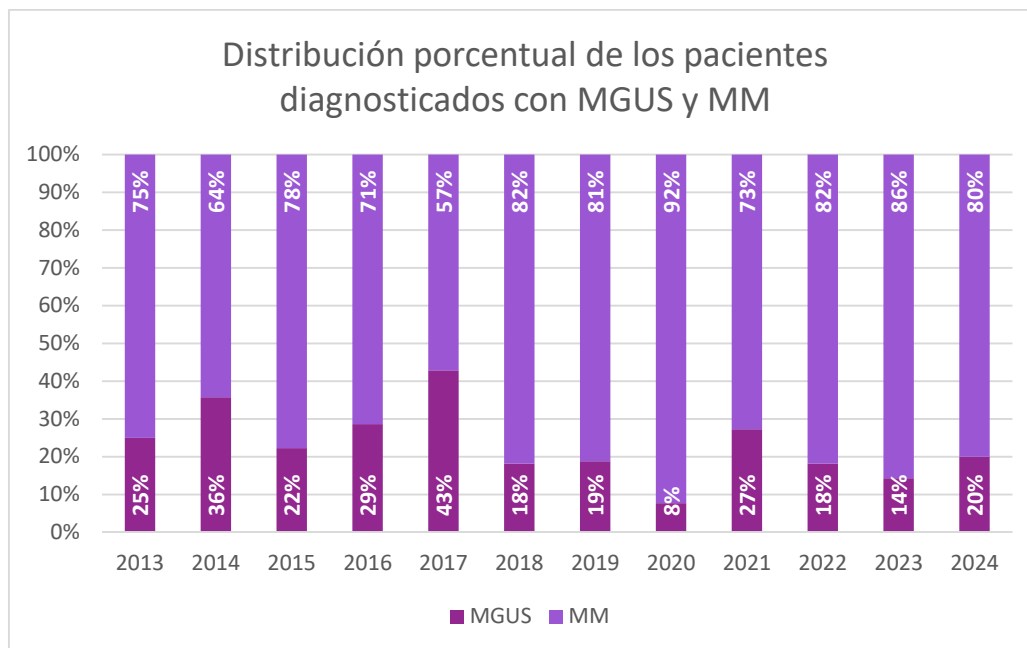
#### 4.7. Prevalencia de Neoplasias de Células Plasmáticas

La prevalencia acumulada de Neoplasias de Células Plasmáticas varía entre 3,20 (2024) y 10,74 (2019) casos por 100000 habitantes. Dentro de los diagnósticos diferenciales, la prevalencia de MM resultó mayor que la prevalencia de MGUS en todos los años comprendidos en el periodo.

**Tabla 10.** Prevalencia de Neoplasias de Células Plasmáticas (NCP).

Año	Diagnóstico			Prevalencia (casos/100000 habitantes)			Porcentaje de prevalencia total	
	NCP	MGUS	MM	NCP	MGUS	MM	MGUS%	MM%
2013	8	2	6	5,74	1,44	4,31	25,00%	75,00%
2014	14	5	9	9,93	3,55	6,39	35,71%	64,29%
2015	9	2	7	6,31	1,40	4,91	22,22%	77,78%
2016	7	2	5	4,85	1,39	3,47	28,57%	71,43%
2017	7	3	4	4,80	2,06	2,74	42,86%	57,14%
2018	11	2	9	7,46	1,36	6,11	18,18%	81,82%
2019	16	3	13	10,74	2,01	8,73	18,75%	81,25%
2020	13	1	12	8,64	0,66	7,98	7,69%	92,31%
2021	11	3	8	7,24	1,97	5,27	27,27%	72,73%
2022	11	2	9	6,84	1,24	5,60	18,18%	81,82%
2023	14	2	12	9,04	1,29	7,75	14,29%	85,71%
2024	5	1	4	3,20	0,64	2,56	20,00%	80,00%
Promedio	10	2	8	7,07	1,58	5,48	23,23%	76,77%

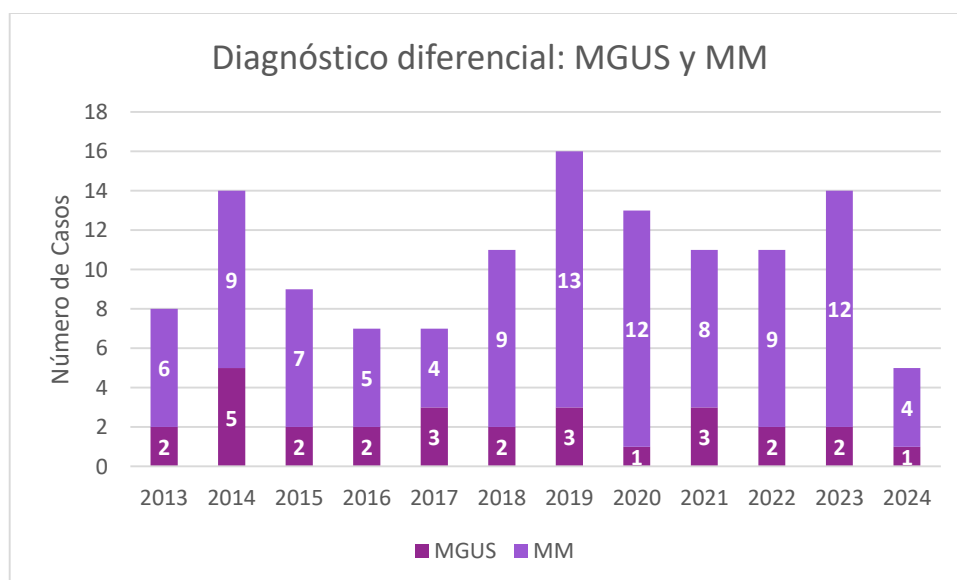
La proporción de los pacientes diagnosticados con MGUS respecto del total de pacientes con NCP oscila entre un 7,69% (2020) y un 42,86% (2017), mientras que los diagnósticos de MM oscilan entre un 57,14% (2017) y un 92,31%(2020). En ambos casos el rango de variación fue de un 35%.



**Figura 26.** Distribución porcentual de los pacientes diagnosticados con MGUS y MM.

Es probable, que en el año 2020 este gran porcentaje de pacientes diagnosticados con MM respecto de los diagnosticados con MGUS, se haya debido a la pandemia de Covid-19, ya que, al haberse restringido la movilidad, es posible que sólo los casos con una sintomatología muy marcada hayan concurrido a los Centros de Salud. Por lo tanto, se detectaron muchas menos MGUS (estadios premalignos asintomáticos o levemente sintomáticos), respecto de los MM (clínicamente sintomáticos).

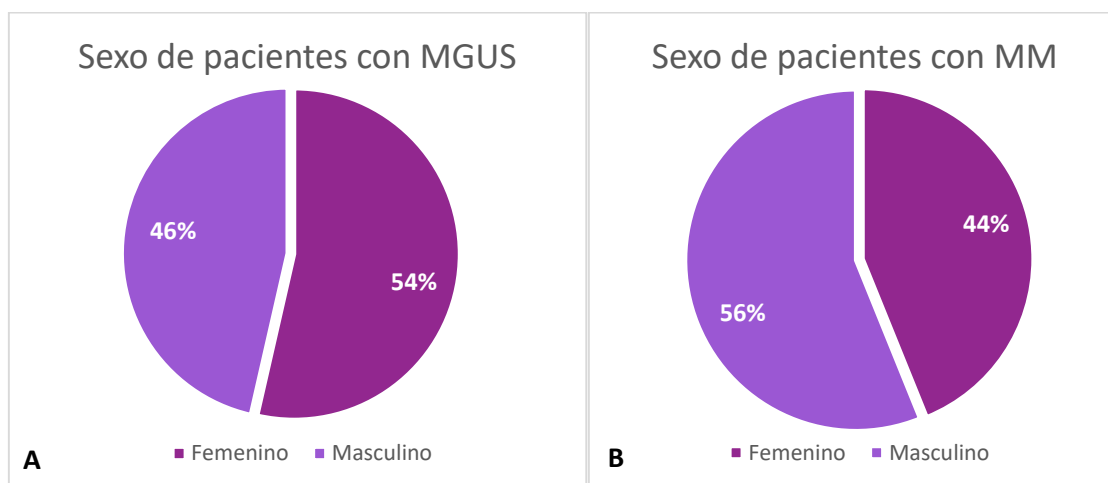
Sin embargo, en todos los años comprendidos en el periodo de estudio se observa una mayor proporción de pacientes con MM respecto de los diagnosticados con MGUS. Solo en 2 años se halló una proporción de MGUS relativamente más alta que el resto de los años (2014 y 2017).



**Figura 27.** Frecuencia absoluta de los pacientes diagnosticados con MGUS y MM. La altura de las barras representa la frecuencia de los casos de NCP.

Respecto a la variable sexo en estas dos subpoblaciones, se observó que la proporción de mujeres es mayor en el grupo MGUS, y la de hombres en el grupo MM, con un 8% de diferencia con el sexo opuesto en ambos casos.

Además, se identificó que la proporción de mujeres con MGUS es un 10% mayor respecto al diagnóstico de MM para este sexo. En contraposición, la proporción de hombres con MGUS fue un 10% menor en contraste con los hombres diagnosticados con MM.

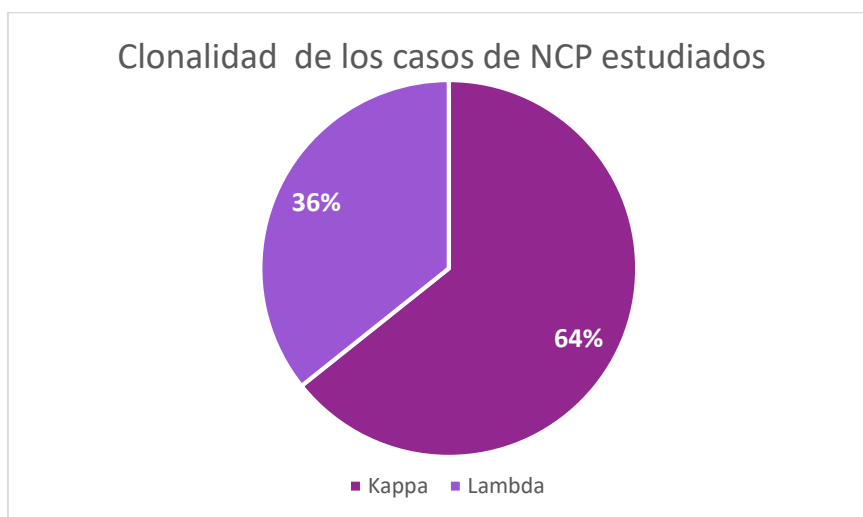


**Figura 28.** Distribución porcentual de los pacientes diagnosticados con MGUS y MM según el sexo.

**A:** MGUS. **B:** MM.

#### 4.8. Análisis de la Clonalidad de Neoplasias de Células Plasmáticas

Al analizar el isotipo de cadena livianas de las células plasmáticas clonales, se observó que el 64% de los casos de NCP presentó restricción a expensas de kappa, mientras que el 36% restantes correspondió al isotipo lambda. Estos datos resultaron muy similares a los aportados por la bibliografía, la cual menciona un 65% y 35%, respectivamente<sup>5</sup>.



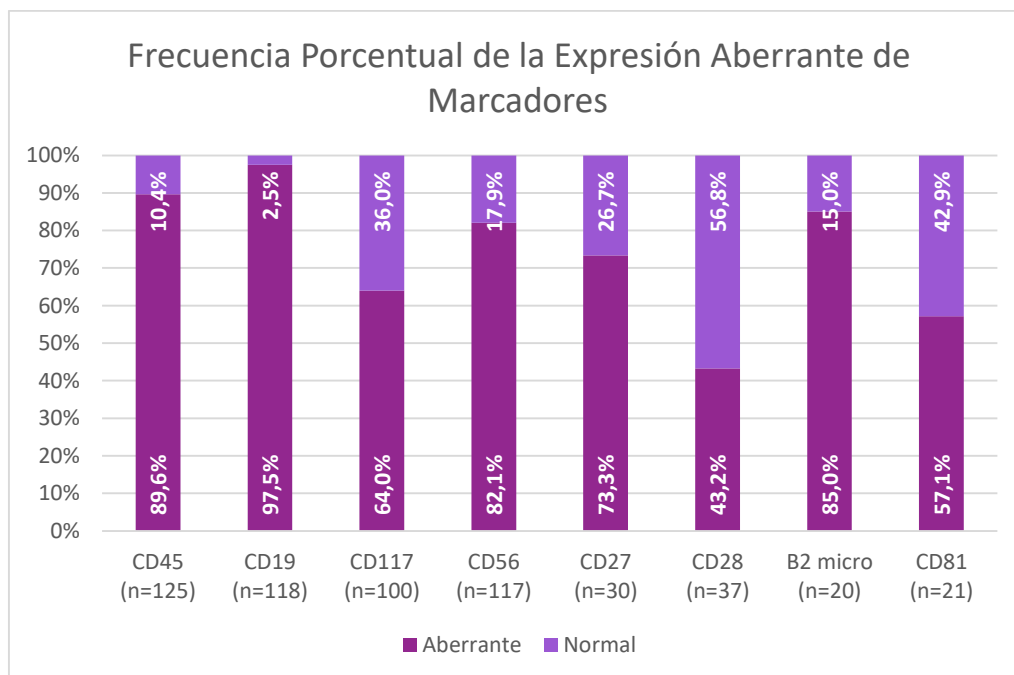
**Figura 29.** Distribución porcentual de restricción de cadenas livianas.

#### 4.9. Expresión de los Marcadores Utilizados

En este aspecto, es importante mencionar la existencia de dos tipos de aberrancia:

- Por pérdidas de expresión de un marcador típicamente expresado:
  - CD45: marcador panleucocitario
  - CD19: marcador de linaje B
  - CD27: marcador de memoria celular
- Por ganancia de expresión o sobreexpresión de marcadores pertenecientes a otros linajes:
  - CD117: marcador de inmadurez del linaje mieloide
  - CD56: marcador de linfocitos NK
  - CD28: marcador de linfocitos T
  - CD81: marcador relacionado a la supervivencia celular
  - B2-microglobulina: subunidad de moléculas HMC tipo 1

Las aberrancias halladas con mayor frecuencia fueron CD19-, CD45-, B2-microglobulina+ y CD56+ (97,5%, 89,6%, 85% y 82,1%, respectivamente), seguidas por CD27- y CD117+ (73,3% y 64%, respectivamente), y por ultimo CD81+ y CD28+ (57,1% y 43,2%, respectivamente), aproximadamente similares al fenotipo normal.



**Figura 30.** Frecuencia porcentual de la expresión aberrante de los marcadores evaluados.

Se puede apreciar que en el panel de marcadores utilizado actualmente por el Servicio de Citometría de Flujo – Oncohematología del Laboratorio Central de Redes y Programas, se contemplan 4 de los marcadores que presentan aberrancia con alta frecuencia: CD19, CD45, CD56 y CD117. Esto permite entonces, distinguir con una mayor precisión las poblaciones de células plasmáticas atípicas, aumentando la sensibilidad diagnóstica.



#### 4.10. Pruebas de Hipótesis Paramétricas y No-Paramétricas

##### 4.10.1. Prueba de t-Student: *Comparación de medias de la edad en los subgrupos de diagnóstico*

- Media etaria MGUS = 67,25 años
- Media etaria MM = 63,71 años

##### *Hipótesis*

- $H_0$ : no hay diferencia significativa en la edad entre los dos grupos de diagnóstico.
- $H_1$ : hay diferencia significativa en la edad entre los dos grupos de diagnóstico.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.1585 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula, es decir:

- No hay una diferencia estadísticamente significativa en la edad entre los dos subgrupos de pacientes con Neoplasias de Células Plasmáticas.
- La diferencia observada en la edad entre los grupos puede ser atribuida a la variabilidad aleatoria.

En el contexto de las Neoplasias de Células Plasmáticas, no hay evidencia de que la edad sea un factor que distinga significativamente entre los dos grupos de diagnóstico final.

##### 4.10.2. Prueba de Chi-Cuadrado de Independencia: *Edad vs Diagnóstico (n=126)*

**Tabla 11.** Tabla de contingencia. Variables: Edad vs Diagnóstico.

Edad	Diagnóstico		Total
	MGUS	MM	
25-44 años	1	6	7
45-64 años	13	41	54
65-74 años	10	30	40
Mas de 75 años	5	20	25
Total	29	97	126

##### *Hipótesis*

- $H_0$ : las variables edad y diagnóstico son variables independientes.
- $H_1$ : las variables edad y diagnóstico no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.9072 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5% no hay evidencia estadística de una relación significativa entre la edad y el diagnóstico final.

#### 4.10.3. Prueba de Chi-Cuadrado de Independencia: Sexo vs Diagnóstico (n=126)

**Tabla 12.** Tabla de contingencia. Variables: Sexo vs Diagnóstico.

Sexo	Diagnóstico		Total
	MGUS	MM	
Femenino	15	43	58
Masculino	13	55	68
Total	28	98	126

##### Hipótesis

- $H_0$ : las variables sexo y diagnóstico son variables independientes.
- $H_1$ : las variables sexo y diagnóstico no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.3641 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que, a un nivel de significación del 5%, las variables sexo y diagnóstico final son independientes, es decir, no existe relación entre pertenecer un grupo diagnóstico en función del sexo.

#### 4.10.4. Pruebas de Chi-cuadrado de Independencia: Relación entre expresión de marcadores y subgrupos de diagnóstico

Se realizaron múltiples pruebas de hipótesis no-paramétricas de chi-cuadrado de independencia, para determinar la relación entre los diagnósticos, el isotipo de cadenas livianas restringido y la expresión de los marcadores utilizados (Ver **Anexo**). Sobre estas, en las pruebas se obtuvieron los p-valor presentados en la **Tabla 12**.

**Tabla 13.** p-valor de las pruebas de chi-cuadrado de independencia realizadas.

	Diagnóstico	Cadenas Livianas	CD45	CD19	CD56	CD117	CD27	CD28	CD81	B2-micro
Diagnóstico	1	0,6547	0,4445	0,3278	0,2810	0,4237	0,0814	0,0946	0,1052	0,2781
Cadenas Livianas		1	0,7948	0,9340	0,1252	0,6818	0,2900	0,3992	0,8987	0,2187
CD45			1	0,1502	0,9556	0,2064	0,5397	0,8428	0,5127	<b>0,0017</b>
CD19				1	0,4497	0,0635	0,5195	0,3796	0,6547	<b>0,0017</b>
CD56					1	0,9563	0,9008	0,6501	0,7483	0,4300
CD117						1	0,7408	0,8970	0,9494	0,4132
CD27							1	0,5800	0,3330	0,1494
CD28								1	<b>0,0274</b>	0,3478
CD81									1	0,2069
B2-micro										1

Las pruebas de independencia de los subgrupos diagnósticos (MGUS y MM) respecto de la restricción de cadenas livianas y los marcadores evaluados, sugieren que estadísticamente el

diagnóstico final de las NCP no guarda relación con el inmunofenotipo y la restricción de cadenas livianas, es decir, que la variable diagnóstico es independiente a las antes mencionadas.

Por su parte, a través de estas pruebas se evidenció que el isotipo de cadenas livianas restringido no depende de la expresión de ninguno de los marcadores estudiados.

Sobre el análisis de expresión de marcadores entre sí, se obtuvieron tres relaciones estadísticamente dependientes:

- Ganancia de expresión de CD28 y CD81
- Pérdida de expresión de CD19 y ganancia de expresión de  $\beta$ 2-microglobulina
- Pérdida de expresión de CD45 y ganancia de expresión de  $\beta$ 2-microglobulina

Sin embargo, se debe hacer la aclaración que el tamaño muestral de estas pruebas en las que existió dependencia fue pequeño, n=20 para CD19 vs  $\beta$ 2-microglobulina y CD45 vs  $\beta$ 2-microglobulina, y n=19 para CD28 vs CD81.

## 5. Conclusiones

En el desarrollo del presente trabajo se estudió la prevalencia de las Neoplasias de Células Plasmáticas sobre las muestras de médula ósea derivadas desde las Instituciones de Salud de los pacientes con sospecha de esta patología. Además, se realizó un análisis descriptivo de la población de pacientes con NCP, teniendo en cuenta los dos diagnósticos distinguibles desde la citometría de flujo (MGUS y MM) y las variables edad, sexo, instituciones de salud y expresión de marcadores. Por otra parte, se evaluó la frecuencia de los principales marcadores de aberrancia que expresan las células mielomatosas, como así también el posible vínculo en la expresión de los mismos.

El análisis estadístico de los datos obtenidos permitió en primera instancia determinar la prevalencia de las NCP sobre la población mayor de 40 años de la ciudad de Corrientes, siendo en promedio, 7 casos de NCP por cada 100.000 habitantes, distribuyéndose en aproximadamente 2 casos de MGUS y 5 casos de MM por cada 100.000 habitantes (23,23% y 76,77% sobre el total de los casos, respectivamente). Resulta importante resaltar, que no se halló bibliografía respecto de la descripción epidemiológica de este tipo de neoplasia en la provincia o el país, por lo que el presente trabajo podría sentar bases para futuras investigaciones.

Por otra parte, se realizó el análisis estadístico descriptivo de la población de pacientes que padecen NCPs, como así también respecto de ambas subpoblaciones de los diagnósticos incluidos dentro de este grupo de procesos malignos.

Sobre la variable *edad*, la media obtenida (64,5 años) es ligeramente menor a la descripta en la bibliografía (70 años), aunque al observar las edades promedio en el transcurso de los años comprendidos en el periodo esta varió entre los 59 y 69 años. Además, la prueba de t-student para comparar las medias de la edad en los subgrupos de diagnóstico, no encontró diferencias significativas en las mismas, por lo que no hay evidencia de que la edad sea un factor que permita distinguir un estadio del otro. A su vez, la prueba de chi-cuadrado de independencia, denotó que el subgrupo diagnóstico no tiene correspondencia con la edad de los pacientes.

Respecto a la variable *sexo*, la proporción de hombres y mujeres varió ampliamente en el transcurso de los años, por lo que no existe una tendencia clara en cuanto a la distribución de los sexos de los pacientes que padecen NCP. En adición, al realizar la prueba de independencia, se halló que no existe relación estadística entre pertenecer a un grupo de diagnóstico respecto al sexo.

En cuanto a las Instituciones de Salud desde las cuales se derivaron las muestras, se observó que el Subsector Público del Sistema de Salud agrupó el 72,22% de los pacientes, mientras que el Subsector Privado el 27,78% restante. Sobre el Subsector Público, los 3 nosocomios cuentan con reconocidos hematólogos ejerciendo su profesión desde este lugar. A propósito, el Hospital “Juan Ramón Vidal” derivó aproximadamente la mitad de las muestras recibidas desde este subsector, siendo este centro reconocido por su excelencia en diagnóstico y tratamiento de enfermedades oncohematológicas. Además, desde el año 2016 hasta la actualidad, los gráficos denotan una tendencia creciente en cuanto a la derivación de muestras por parte del Subsector Público, por lo que demuestra una vez más, la necesidad de apostar a este Subsector, no solo por la cantidad de pacientes que se atienden en el mismo, sino también para garantizar el acceso a la Salud, ya que determinaciones como la inmunofenotipificación

tiene un costo sumamente elevado, lo cual dificulta el acceso de las poblaciones más vulnerables.

Mediante pruebas de hipótesis No-Paramétricas se analizó la existencia o no de una relación entre la expresión de los marcadores y el subgrupo diagnóstico, como así también la coexpresión de estos. Esto permitió obtener las siguientes conclusiones:

- No existe asociación entre la isotipo de restricción de cadenas livianas con el subgrupo diagnóstico de NCP.
- La expresión de ninguno de los marcadores utilizados guarda relación con el subgrupo diagnóstico de NCP.
- El isotipo de restricción de cadenas livianas es independiente respecto de la expresión de cualquiera de los demás marcadores.
- Se obtuvieron tres relaciones estadísticamente dependientes entre la expresión de marcadores:
  - Ganancia de expresión de CD28 y CD81
  - Pérdida de expresión de CD19 y ganancia de expresión de  $\beta$ 2-microglobulina
  - Pérdida de expresión de CD45 y ganancia de expresión de  $\beta$ 2-microglobulina

Sin embargo, se debe hacer la aclaración que el tamaño muestral de estas pruebas en las que si existió dependencia fue pequeño,  $n=20$  para CD19 vs  $\beta$ 2-microglobulina y CD45 vs  $\beta$ 2-microglobulina, y  $n=19$  para CD28 vs CD81.

El objetivo de la presente investigación, no fue solo el de conocer la prevalencia de las NCP en la ciudad de Corrientes, sino también lograr capacitarme en aspectos no tradicionales del perfil profesional bioquímico, específicamente en el área de Citometría de Flujo – Oncohematología, la cual anhelé desde hace un tiempo atrás, y gracias al Laboratorio Central y a mis directores quienes me abrieron las puertas, pude iniciar mi formación en esta área de alta complejidad. En este sentido, a través de una exhaustiva búsqueda bibliográfica logré interiorizarme en esta hemopatía, como así también en los fundamentos de la técnica. Descubrí la importancia y la gran relación que tiene el conocimiento de la ontogenia y diferenciación de tipos celulares para conocer el inmunofenotipo normal, como así también lograr detectar poblaciones aberrantes en caso de que existan. “Es fundamental conocer lo normal, para identificar lo patológico” es una frase que me llevo de esta área, resaltando la importancia tanto de la formación y actualización continua para llegar a un diagnóstico certero y confiable. Gracias a la constante orientación y acompañamiento de mis directores, he adquirido los principios fundamentales para desarrollarme en esta área, como ser los procesos de inmunomarcación, la adquisición de las muestras a través del citómetro y el correspondiente análisis inmunofenotípico en softwares especializados para tal fin. Además, en este tiempo, pude adquirir nociones básicas de diferentes patrones de expresión típicos y atípicos de otras series celulares, aplicables a otras hemopatías malignas como ser Síndromes Linfoproliferativos y Mieloproliferativos Crónicos, Mielodisplasias y Leucemias Agudas. Por último, he podido apreciar la gran comunicación que existe entre los médicos hematólogos y los profesionales bioquímicos, lo que permite el establecimiento precoz de terapéuticas, que en muchos casos logran salvar la vida de los pacientes.

## 6. Agradecimientos

El mayor de mis agradecimientos a mis directores, los bioquímicos Emiliano Sotelo Rodríguez y María Patricia de la Paz Ibarrola Leiva, quienes me han recibido de una manera increíble en su sector, haciendo que esta etapa de cierre de mi carrera sea aún mejor de lo que alguna vez imaginé. Ambos pusieron todo de sí para instruirme de la mejor manera posible, acompañándome no solo desde lo procedimental y teórico, sino también desde lo personal, ayudándome a crecer en mi formación como futuro profesional bioquímico en cuanto aptitudes y actitudes. De ellos me llevo grandes saberes, vivencias, experiencias y por sobre todo una fraterna relación. Me han demostrado un gran empeño y compromiso en la búsqueda de transmitirme sus conocimientos tanto teóricos como prácticos, teniendo como objetivo que en mi paso lograra interiorizarme con la metodología de trabajo y los conocimientos necesarios para realizar un verdadero desempeño bioquímico. A través de ellos, he logrado comprender los fundamentos teóricos y adquirir los conocimientos prácticos en esta área de alta complejidad, que como su nombre lo indica resulta complejo el entendimiento. Personalmente, no me alcanzan las palabras para agradecerles el increíble compromiso que tuvieron para con mi formación, resaltando también su confianza en mí, lo que posibilitó mi crecimiento académico y profesional.

A la profesora María Josefa Jorge de la cátedra de Bioestadística, por su acompañamiento y compromiso en el asesoramiento del presente trabajo.

A la bioquímica María José Lerena y al técnico de laboratorio Walter German Leyes, integrantes del área de Citometría de Flujo – HIV, con quienes he compartido espacio físico y me han hecho sentir cómodo en el sector, brindándome conocimientos y experiencias personales en el transcurso de mi paso por el Laboratorio.



## 7. Bibliografía

1. Sans Sabrafen, J., Besses Raebel, C., & Vives Corrons, J. (2006). *Hematología Clínica 5ª Edición*. Madrid: Elsevier.
2. Curutchet, M., Kusminsky, G., Labanca, V., Orlando, S., Quiroga, L., Sánchez Avalos, J. C., & Slavutsky, I. (2011). Mieloma Múltiple. *Sociedad Argentina de Hematología*, 291-315.
3. Neira Borja, J., Morán Mancero, C., Correa Bravo, R., & Estrada Morales, R. (2014). Mieloma múltiple: aspectos biológicos, clínicos, diagnóstico, tratamiento con nuevos agentes y estadificación. Revisión de dos casos clínicos. *Rev Med FCM-UCGS*, 18(2), 87-94.
4. Muñoz Calleja, C., & Minguela Puras, A. (2019). Diagnóstico y monitorización inmunofenotípica de las neoplasias leucocitarias. Barcelona: Elsevier.
5. Fainboim, L., & Geffner, J. (2011). *Introducción a la Inmunología Humana 6ta Edición*. Editorial Médica Panamericana.
6. Barrena Delfa, S. (2011). Nuevas estrategias inmunofenotípicas aplicadas al diagnóstico y clasificación de síndromes linfoproliferativos crónicos. Universidad de Salamanca.
7. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología Celular y Molecular, Octava Edición*. Barcelona, España: Editorial Elsevier.
8. McKinnon, K. (2019). Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*.
9. Becton, Dickinson & Company. (s.f.). *BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual*.
10. Perez Lara, J. C., Santiago Cruz, W., Romero Ramirez, H., & Rodríguez Alba, J. C. (2018). Fundamentos de la Citometría de Flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 8(2), 41-52.
11. Givan, A. (2011). Flow Cytometry: An Introduction. *Flow Cytometry Protocols*.
12. Bouscary, D., Roux, C., & Ravaud, P. (2003). Mieloma Múltiple: Fisiopatología. *Encycl Méd Chir*
13. van de Donk, N., Pawlyn, C., & Yong, K. (2021). Multiple Myeloma. *Lancet*, 397, 410-427.
14. Weber Estrada, N. (2012). Revisión Fisiopatología, Clínica y Diagnóstico de Mieloma Múltiple. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 69(603), 343-349.
15. Vincent Rajkumar, S. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet oncol*, 15, 538-548
16. de los Reyes *et al.* (2011). La citometría de flujo en el estudio de las discrasias de células plasmáticas. *Rev Hematol Mex*, 12(2), 90-98.
17. Paiva *et al.* (2012). Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. *Leukemia*, 26, 1862-1869.
18. Flores-Montero *et al.* (2016). Immunophenotype of Normal vs. Myeloma Plasma Cells: Toward Antibody Panel Specifications for MRD Detection in Multiple Myeloma. *Clinical Cytometry*, 90B, 61-72.
19. Jones, R. A., Scott, C. S., Norfolk, D. R., Stark, A. N., & Child, J. A. (1987). Cell surface expression of B2-microglobulin (B2m) correlates with stages of differentiation in B cell tumours. *J Clin Pathol*, 40, 486-489.
20. Min, R., Li, Z., Epstein, J., Barlogie, B., & Yi, Q. (2002). B2-microglobulin as a negative growth regulator of myeloma cells. *British Journal of Haematology*, 118, 495-505.
21. EuroFlow. (2012). EuroFlow innovation and standardization of flow cytometric diagnosis and classification in hemato-oncology. Rotterdam: BD.
22. Henquin, R. (2013). *Epidemiología y Estadística para principiantes 1ª Edición*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Corpus.
23. Bonita, R., Beaglehole, R., & Kjellström, T. (2008). *Epidemiología Básica 2da Edición*. Washington D.C.: Organización Panamericana de la Salud.

## 8. Anexo

### 8.1. Pruebas de Chi-Cuadrado de Independencia: *Marcadores vs Diagnóstico*

- **Cadenas Livianas vs Diagnóstico (n=126)**

**Tabla 14.** Tabla de contingencia. Variables: Cadenas Livianas vs Diagnóstico.

Cadenas Livianas	Diagnóstico		Total
	MGUS	MM	
Kappa	17	64	81
Lambda	11	34	45
Total	28	98	126

#### *Hipótesis*

- $H_0$ : las variables Cadenas Livianas y diagnóstico son variables independientes
- $H_1$ : las variables Cadenas Livianas y diagnóstico no son independientes

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.6547 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables Cadenas Livianas y diagnóstico final son independientes, es decir, no existe relación entre el isotipo de cadenas livianas restringido y el subgrupo de diagnóstico.

- **CD45 vs Diagnóstico (n=125)**

**Tabla 15.** Tabla de contingencia. Variables: CD45 vs Diagnóstico.

CD45	Diagnóstico		Total
	MGUS	MM	
CD45-	24	88	112
CD45+	4	9	13
Total	28	97	125

#### *Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD45 y diagnóstico son variables independientes
- $H_1$ : las variables CD45 y diagnóstico no son independientes

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.4445 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD45 y diagnóstico final son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD45 y el subgrupo de diagnóstico.

- **CD19 vs Diagnóstico (n=118)**

**Tabla 16.** Tabla de contingencia. Variables: CD19 vs Diagnóstico.

CD19	Diagnóstico		Total
	MGUS	MM	
CD19-	28	87	115
CD19+	0	3	3
Total	28	90	118

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD19 y diagnóstico son variables independientes
- $H_1$ : las variables CD19 y diagnóstico no son independientes

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.3278 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD19 y diagnóstico final son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD19 y el subgrupo de diagnóstico.

- **CD56 vs Diagnóstico (n=117)**

**Tabla 17.** Tabla de contingencia. Variables: CD56 vs Diagnóstico.

CD56	Diagnóstico		Total
	MGUS	MM	
CD56-	7	14	21
CD56+	20	76	96
Total	27	90	117

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD56 y diagnóstico son variables independientes
- $H_1$ : las variables CD56 y diagnóstico no son independientes

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.2181 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD56 y diagnóstico final son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD56 y el subgrupo de diagnóstico.

- **CD117 vs Diagnóstico (n=100)**

**Tabla 18.** Tabla de contingencia. Variables: CD117 vs Diagnóstico.

CD117	Diagnóstico		Total
	MGUS	MM	
CD117-	7	29	36
CD117+	17	47	64
Total	24	76	100

### Hipótesis

- $H_0$ : las variables CD117 y diagnóstico son variables independientes
- $H_1$ : las variables CD117 y diagnóstico no son independientes

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.4237 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD117 y diagnóstico final son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD117 y el subgrupo de diagnóstico.

- **CD27 vs Diagnóstico (n=30)**

**Tabla 19.** Tabla de contingencia. Variables: CD27 vs Diagnóstico.

CD27	Diagnóstico		Total
	MGUS	MM	
CD27-	4	18	22
CD27+	4	4	8
Total	8	22	30

### Hipótesis

- $H_0$ : las variables CD27 y diagnóstico son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD27 y diagnóstico no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.0814 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD27 y diagnóstico final son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD27 y el subgrupo de diagnóstico.

- **CD28 vs Diagnóstico (n=37)**

**Tabla 20.** Tabla de contingencia. Variables: CD28 vs Diagnóstico.

CD28	Diagnóstico		Total
	MGUS	MM	
CD28-	2	19	21
CD28+	5	11	16
Total	7	30	37

### Hipótesis

- $H_0$ : las variables CD28 y diagnóstico son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD28 y diagnóstico no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.0946 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD28 y diagnóstico final son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD28 y el subgrupo de diagnóstico.

- **CD81 vs Diagnóstico (n=21)**

**Tabla 21.** Tabla de contingencia. Variables: CD81 vs Diagnóstico.

CD81	Diagnóstico		Total
	MGUS	MM	
CD81-	0	9	9
CD81+	3	9	12
Total	3	18	21

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD81 y diagnóstico son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD81 y diagnóstico no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.1052 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD81 y diagnóstico final son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD81 y el subgrupo de diagnóstico.

- **$\beta$ 2-microglobulina vs Diagnóstico (n=20)**

**Tabla 22.** Tabla de contingencia. Variables:  $\beta$ 2-microglobulina vs Diagnóstico.

$\beta$ 2-micro	Diagnóstico		Total
	MGUS	MM	
$\beta$ 2-micro-	0	3	3
$\beta$ 2-micro+	5	12	17
Total	5	15	20

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables  $\beta$ 2-microglobulina y diagnóstico son variables independientes.
- $H_1$ : las variables  $\beta$ 2-microglobulina y diagnóstico no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.2781 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables  $\beta$ 2-microglobulina y diagnóstico final son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de  $\beta$ 2-microglobulina y el subgrupo de diagnóstico.

## 8.2. Pruebas de Chi-Cuadrado de Independencia: Cadenas Livianas vs otros marcadores

- **CD45 vs Cadenas Livianas (n=125)**

**Tabla 23.** Tabla de contingencia. Variables: CD45 vs Cadenas Livianas.

Cadenas Livianas	CD45		Total
	CD45-	CD45+	
Kappa	73	8	81
Lambda	39	5	44
Total	112	13	125

### Hipótesis

- $H_0$ : las variables CD45 y Cadenas Livianas son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD45 y Cadenas Livianas no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.7948 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD45 y Cadenas Livianas son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD45 y el isotipo de cadenas livianas restringido.

- **CD19 vs Cadenas Livianas (n=118)**

**Tabla 24.** Tabla de contingencia. Variables: CD19 vs Cadenas Livianas.

Cadenas Livianas	CD19		Total
	CD19-	CD19+	
Kappa	74	2	76
Lambda	41	1	42
Total	115	3	118

### Hipótesis

- $H_0$ : las variables CD19 y Cadenas Livianas son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD19 y Cadenas Livianas no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.9340 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD19 y Cadenas Livianas son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD19 y el isotipo de cadenas livianas restringido.

- **CD56 vs Cadenas Livianas (n=117)**

**Tabla 25.** Tabla de contingencia. Variables: CD56 vs Cadenas Livianas.

Cadenas Livianas	CD56		Total
	CD56-	CD56+	
Kappa	11	67	78
Lambda	10	29	39
Total	21	96	117

### Hipótesis

- $H_0$ : las variables CD56 y Cadenas Livianas son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD56 y Cadenas Livianas no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.1252 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD56 y Cadenas Livianas son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD56 y el isotipo de cadenas livianas restringido.



- **CD117 vs Cadenas Livianas (n=100)**

**Tabla 26.** Tabla de contingencia. Variables: CD117 vs Cadenas Livianas.

Cadenas Livianas	CD117		Total
	CD117-	CD117+	
Kappa	21	40	61
Lambda	15	24	39
Total	36	64	100

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD117 y Cadenas Livianas son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD117 y Cadenas Livianas no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.6818 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD117 y Cadenas Livianas son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD117 y el isotipo de cadenas livianas restringido.

- **CD27 vs Cadenas Livianas (n=30)**

**Tabla 27.** Tabla de contingencia. Variables: CD27 vs Cadenas Livianas.

Cadenas Livianas	CD27		Total
	CD27-	CD27+	
Kappa	15	7	22
Lambda	7	1	8
Total	22	8	30

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD27 y Cadenas Livianas son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD27 y Cadenas Livianas no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.2900 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD27 y Cadenas Livianas son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD27 y el isotipo de cadenas livianas restringido.

- **CD28 vs Cadenas Livianas (n=37)**

**Tabla 28.** Tabla de contingencia. Variables: CD28 vs Cadenas Livianas.

Cadenas Livianas	CD28		Total
	CD28-	CD28+	
Kappa	13	12	25
Lambda	8	4	12
Total	21	16	37

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD28 y Cadenas Livianas son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD28 y Cadenas Livianas no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.3992 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD28 y Cadenas Livianas son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD28 y el isotipo de cadenas livianas restringido.

- **CD81 vs Cadenas Livianas (n=21)**

**Tabla 29.** Tabla de contingencia. Variables: CD81 vs Cadenas Livianas.

Cadenas Livianas	CD81		Total
	CD81-	CD81+	
Kappa	5	7	12
Lambda	4	5	9
Total	9	12	21

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD81 y Cadenas Livianas son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD81 y Cadenas Livianas no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.8987 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD81 y Cadenas Livianas son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD81 y el isotipo de cadenas livianas restringido.

- **$\beta 2$ -microglobulina vs Cadenas Livianas (n=20)**

**Tabla 30.** Tabla de contingencia. Variables:  $\beta 2$ -microglobulina vs Cadenas Livianas.

Cadenas Livianas	$\beta 2$ -microglobulina		Total
	$\beta 2$ -micro-	$\beta 2$ -micro+	
Kappa	3	11	14
Lambda	0	6	6
Total	3	17	20

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables  $\beta 2$ -microglobulina y Cadenas Livianas son variables independientes.
- $H_1$ : las variables  $\beta 2$ -microglobulina y Cadenas Livianas no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.2187 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables  $\beta 2$ -microglobulina y Cadenas Livianas son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de  $\beta 2$ -microglobulina y el isotipo de cadenas livianas restringido.

### 8.3. Pruebas de Chi-Cuadrado de Independencia: *Expresión de marcadores*

- **CD45 vs CD19 (n=117)**

**Tabla 31.** Tabla de contingencia. Variables: CD45 vs CD19.

CD45	CD19		Total
	CD19-	CD19+	
CD45-	104	2	106
CD45+	10	1	11
Total	114	3	117

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD45 y CD19 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD45 y CD19 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.1502 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD45 y CD19 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD45 y la expresión de CD19.

- **CD45 vs CD56 (n=116)**

**Tabla 32.** Tabla de contingencia. Variables: CD45 vs CD56.

CD45	CD56		Total
	CD56-	CD56+	
CD45-	18	86	104
CD45+	2	10	12
Total	20	96	116

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD45 y CD56 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD45 y CD56 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.9556 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD45 y CD56 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD45 y la expresión de CD56.

- **CD45 vs CD117 (n=99)**

**Tabla 33.** Tabla de contingencia. Variables: CD45 vs CD117.

CD45	CD117		Total
	CD117-	CD117+	
CD45-	33	55	88
CD45+	2	9	11
Total	35	64	99

### Hipótesis

- $H_0$ : las variables CD45 y CD117 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD45 y CD117 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.2064 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD45 y CD117 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD45 y la expresión de CD117.

- **CD45 vs CD27 (n=30)**

**Tabla 34.** Tabla de contingencia. Variables: CD45 vs CD27.

CD45	CD27		Total
	CD27-	CD27+	
CD45-	21	8	29
CD45+	1	0	1
Total	22	8	30

### Hipótesis

- $H_0$ : las variables CD45 y CD27 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD45 y CD27 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.5397 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD45 y CD27 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD45 y la expresión de CD27.

- **CD45 vs CD28 (n=37)**

**Tabla 35.** Tabla de contingencia. Variables: CD45 vs CD28.

CD45	CD28		Total
	CD28-	CD28+	
CD45-	20	15	35
CD45+	1	1	2
Total	21	16	37

### Hipótesis

- $H_0$ : las variables CD45 y CD28 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD45 y CD28 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.8428 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD45 y CD28 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD45 y la expresión de CD28.

- **CD45 vs CD81 (n=21)**

**Tabla 36.** Tabla de contingencia. Variables: CD45 vs CD81.

CD45	CD81		Total
	CD81-	CD81+	
CD45-	9	12	21
CD45+	0	0	0
Total	9	12	21

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD45 y CD81 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD45 y CD81 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.5127 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD45 y CD81 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD45 y la expresión de CD81.

Sin embargo, es importante destacar que la tabla de contingencia presenta valores cero en algunas celdas, lo que puede afectar la precisión del resultado de la prueba por aumentar la probabilidad de falsos positivos o negativos.

- **CD45 vs  $\beta 2$ -microglobulina (n=20)**

**Tabla 37.** Tabla de contingencia. Variables: CD45 vs  $\beta 2$ -microglobulina.

CD45	$\beta 2$ -microglobulina		Total
	$\beta 2$ -micro-	$\beta 2$ -micro+	
CD45-	3	17	20
CD45+	0	0	0
Total	3	17	20

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD45 y  $\beta 2$ -microglobulina son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD45 y  $\beta 2$ -microglobulina no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  **$p\text{-valor} = 0.0017 < 0.05$**  por lo tanto se rechaza la hipótesis nula de independencia, y se acepta la hipótesis alternativa.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD45 y  $\beta 2$ -microglobulina son **dependientes** entre sí, es decir, **existe una relación entre la pérdida de expresión de CD45 y la expresión de  $\beta 2$ -microglobulina**.

Sin embargo, es importante destacar que la tabla de contingencia presenta valores cero en algunas celdas, lo que puede afectar la precisión del resultado de la prueba por aumentar la probabilidad de falsos positivos o negativos.

- **CD19 vs CD56 (n=111)**

**Tabla 38.** Tabla de contingencia. Variables: CD19 vs CD117.

CD19	CD56		Total
	CD56-	CD56+	
CD19-	18	90	108
CD19+	1	2	3
Total	19	92	111

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD19 y CD56 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD19 y CD56 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.4497 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD19 y CD56 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD19 y la expresión de CD56.

- **CD19 vs CD117 (n=94)**

**Tabla 39.** Tabla de contingencia. Variables: CD19 vs CD117.

CD19	CD117		Total
	CD117-	CD117+	
CD19-	33	59	92
CD19+	2	0	2
Total	35	59	94

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD19 y CD117 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD19 y CD117 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.0635 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD19 y CD117 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD19 y la expresión de CD117.

- **CD19 vs CD27 (n=28)**

**Tabla 40.** Tabla de contingencia. Variables: CD19 vs CD27.

CD19	CD27		Total
	CD27-	CD27+	
CD19-	19	8	27
CD19+	1	0	1
Total	20	8	28

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD19 y CD27 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD19 y CD27 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.5195 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD19 y CD27 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD19 y la expresión de CD27.

- **CD19 vs CD28 (n=35)**

**Tabla 41.** Tabla de contingencia. Variables: CD19 vs CD28.

CD19	CD28		Total
	CD28-	CD28+	
CD19-	19	15	34
CD19+	1	0	1
Total	20	15	35

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD19 y CD28 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD19 y CD28 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.3796 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD19 y CD28 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD19 y la expresión de CD28.

- **CD19 vs CD81 (n=20)**

**Tabla 42.** Tabla de contingencia. Variables: CD19 vs CD81.

CD19	CD81		Total
	CD81-	CD81+	
CD19-	9	11	20
CD19+	0	0	0
Total	9	11	20

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD19 y CD81 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD19 y CD81 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.6547 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD19 y CD81 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD19 y la expresión de CD81.

Sin embargo, es importante destacar que la tabla de contingencia presenta valores cero en algunas celdas, lo que puede afectar la precisión del resultado de la prueba por aumentar la probabilidad de falsos positivos o negativos.



- **CD19 vs  $\beta$ 2-microglobulina (n=20)**

**Tabla 43.** Tabla de contingencia. Variables: CD19 vs  $\beta$ 2-microglobulina.

CD19	$\beta$ 2-microglobulina		Total
	$\beta$ 2-micro-	$\beta$ 2-micro+	
CD19-	3	17	20
CD19+	0	0	0
Total	3	17	20

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD19 y  $\beta$ 2-microglobulina son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD19 y  $\beta$ 2-microglobulina no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un **p-valor = 0.0017 < 0.05** por lo tanto se rechaza la hipótesis nula de independencia, y se acepta la hipótesis alternativa.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD45 y  $\beta$ 2-microglobulina son **dependientes** entre sí, es decir, **existe una relación entre la pérdida de expresión de CD19 y la expresión de  $\beta$ 2-microglobulina**.

Sin embargo, es importante destacar que la tabla de contingencia presenta valores cero en algunas celdas, lo que puede afectar la precisión del resultado de la prueba por aumentar la probabilidad de falsos positivos o negativos.

- **CD56 vs CD117 (n=92)**

**Tabla 44.** Tabla de contingencia. Variables: CD56 vs CD117.

CD56	CD117		Total
	CD117-	CD117+	
CD56-	6	11	17
CD56+	27	48	75
Total	33	59	92

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD56 y CD117 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD56 y CD117 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.9563 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD56 y CD117 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD56 y la expresión de CD117.

- **CD56 vs CD27 (n=29)**

**Tabla 45.** Tabla de contingencia. Variables: CD56 vs CD27.

CD56	CD27		Total
	CD27-	CD27+	
CD56-	3	1	4
CD56+	18	7	25
Total	21	8	29

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD56 y CD27 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD56 y CD27 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.9008 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD56 y CD27 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD56 y la expresión de CD27.

- **CD56 vs CD28 (n=36)**

**Tabla 46.** Tabla de contingencia. Variables: CD56 vs CD28.

CD56	CD28		Total
	CD28-	CD28+	
CD56-	3	3	6
CD56+	18	12	30
Total	21	15	36

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD56 y CD28 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD56 y CD28 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.6501 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD56 y CD28 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD56 y la expresión de CD28.

- **CD56 vs CD81 (n=21)**

**Tabla 47.** Tabla de contingencia. Variables: CD56 vs CD81.

CD56	CD81		Total
	CD81-	CD81+	
CD56-	2	2	4
CD56+	7	10	17
Total	9	12	21

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD56 y CD81 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD56 y CD81 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.7483 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD56 y CD81 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD56 y la expresión de CD81.

- **CD56 vs  $\beta 2$ -microglobulina (n=20)**

**Tabla 48.** Tabla de contingencia. Variables: CD56 vs  $\beta 2$ -microglobulina.

CD56	$\beta 2$ -microglobulina		Total
	$\beta 2$ -micro-	$\beta 2$ -micro+	
CD56-	0	3	3
CD56+	3	14	17
Total	3	17	20

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD56 y  $\beta 2$ -microglobulina son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD56 y  $\beta 2$ -microglobulina no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.4300 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD56 y  $\beta 2$ -microglobulina son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD56 y la expresión de  $\beta 2$ -microglobulina.

- **CD117 vs CD27 (n=26)**

**Tabla 49.** Tabla de contingencia. Variables: CD117 vs CD27.

CD27	CD117		Total
	CD117-	CD117+	
CD27-	8	10	18
CD27+	3	5	8
Total	11	15	26

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD27 y CD117 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD27 y CD117 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.7408 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD27 y CD117 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD27 y la expresión de CD117.

- **CD117 vs CD28 (n=29)**

**Tabla 50.** Tabla de contingencia. Variables: CD117 vs CD28.

CD28	CD117		Total
	CD117-	CD117+	
CD28-	6	7	13
CD28+	7	9	16
Total	13	16	29

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD28 y CD117 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD28 y CD117 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.8970 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD28 y CD117 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD28 y la expresión de CD117.

- **CD117 vs CD81 (n=16)**

**Tabla 51.** Tabla de contingencia. Variables: CD117 vs CD81.

CD81	CD117		Total
	CD117-	CD117+	
CD81-	4	3	7
CD81+	5	4	9
Total	9	7	16

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD81 y CD117 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD81 y CD117 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un p-valor = 0.9494 > 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD81 y CD117 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD81 y la expresión de CD117.

- **CD117 vs  $\beta$ 2-microglobulina (n=20)**

**Tabla 52.** Tabla de contingencia. Variables: CD117 vs  $\beta$ 2-microglobulina.

$\beta$ 2-micro	CD117		Total
	CD117-	CD117+	
$\beta$ 2-micro-	2	1	3
$\beta$ 2-micro+	7	10	17
Total	9	11	20

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD117 y  $\beta$ 2-microglobulina son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD117 y  $\beta$ 2-microglobulina no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.4132 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD117 y  $\beta 2$ -microglobulina son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD117 y la expresión de  $\beta 2$ -microglobulina.

- **CD27 vs CD28 (n=27)**

**Tabla 53.** Tabla de contingencia. Variables: CD27 vs CD28.

CD27	CD28		Total
	CD28-	CD28+	
CD27-	11	9	20
CD27+	3	4	7
Total	14	13	27

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD27 y CD28 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD27 y CD28 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.5800 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD27 y CD28 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD27 y la expresión de CD28.

- **CD27 vs CD81 (n=19)**

**Tabla 54.** Tabla de contingencia. Variables: CD27 vs CD81.

CD27	CD81		Total
	CD81-	CD81+	
CD27-	8	7	15
CD27+	1	3	4
Total	9	10	19

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD27 y CD81 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD27 y CD81 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.3133 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD27 y CD81 son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD27 y la expresión de CD81.

- **CD27 vs  $\beta$ 2-microglobulina (n=19)**

**Tabla 55.** Tabla de contingencia. Variables: CD27 vs  $\beta$ 2-microglobulina.

CD27	$\beta$ 2-microglobulina		Total
	$\beta$ 2-micro-	$\beta$ 2-micro+	
CD27-	3	9	12
CD27+	0	7	7
Total	3	16	19

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD27 y  $\beta$ 2-microglobulina son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD27 y  $\beta$ 2-microglobulina no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.1494 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD27 y  $\beta$ 2-microglobulina son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD27 y la expresión de  $\beta$ 2-microglobulina.

- **CD28 vs CD81 (n=19)**

**Tabla 56.** Tabla de contingencia. Variables: CD28 vs CD81.

CD28	CD81		Total
	CD81-	CD81+	
CD28-	8	4	12
CD28+	1	6	7
Total	9	10	19

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD28 y CD81 son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD28 y CD81 no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  **$p\text{-valor} = 0.0274 < 0.05$**  por lo tanto se rechaza la hipótesis nula de independencia, y se acepta la hipótesis alternativa.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD28 y CD81 son **dependientes** entre sí, es decir, **existe una relación entre la expresión de CD28 y la expresión de CD81.**

- **CD28 vs  $\beta$ 2-microglobulina (n=19)**

**Tabla 57.** Tabla de contingencia. Variables: CD28 vs  $\beta$ 2-microglobulina.

CD28	$\beta$ 2-microglobulina		Total
	$\beta$ 2-micro-	$\beta$ 2-micro+	
CD28-	2	6	8
CD28+	1	10	11
Total	3	16	19

*Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD28 y  $\beta$ 2-microglobulina son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD28 y  $\beta$ 2-microglobulina no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.3478 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD28 y  $\beta 2$ -microglobulina son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD28 y la expresión de  $\beta 2$ -microglobulina.

#### 8.4. CD81 vs $\beta 2$ -microglobulina (n=14)

**Tabla 58.** Tabla de contingencia. Variables: CD81 vs  $\beta 2$ -microglobulina.

CD81	$\beta 2$ -microglobulina		Total
	$\beta 2$ -micro-	$\beta 2$ -micro+	
CD81-	2	3	5
CD81+	1	8	9
Total	3	11	14

##### *Hipótesis*

- $H_0$ : las variables CD81 y  $\beta 2$ -microglobulina son variables independientes.
- $H_1$ : las variables CD81 y  $\beta 2$ -microglobulina no son independientes.

Al realizar la prueba se obtuvo un  $p\text{-valor} = 0.2069 > 0.05$  por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de independencia.

Sobre esta prueba se puede concluir que a un nivel de significación del 5%, las variables CD81 y  $\beta 2$ -microglobulina son independientes, es decir, no existe relación entre la expresión de CD81 y la expresión de  $\beta 2$ -microglobulina.