

Artigo / Article

O valor da imunofenotipagem para o diagnóstico do Mieloma Múltiplo e na avaliação da doença residual mínima

The value of immunofenotyping for the diagnosis of Multiple Myeloma and for the evaluation of minimal residual disease

Roberto P. Falcão¹
Leandro Felipe F. Dalmazzo²

Os plasmócitos normais podem ser diferenciados dos presentes no mieloma múltiplo por imunofenotipagem. Os normais são CD45⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD38⁺⁺, CD56^{-fraco}, CD138⁺, mIg-, cIg policlonal. Por outro lado, os plasmócitos do mieloma múltiplo são monoclonais (cIg) e aproximadamente 80% são CD19⁺CD56⁺ e 20% CD19⁺CD56⁻. O perfil na leucemia plasmocitária primária é semelhante ao do mieloma, embora a positividade para o CD56 ocorra em 45% dos casos. Na gamopatia monoclonal de causa indeterminada existe uma mistura de plasmócitos normais e neoplásicos, que têm perfil semelhante ao do mieloma múltiplo. A doença residual na medula é importante para estimar a resposta terapêutica e pode ser avaliada por citometria de fluxo e pela reação da polimerase em cadeia para o rearranjo da cadeia pesada da Ig. A citometria apresenta sensibilidade de 10⁻⁴ a 10⁻⁵, é realizada em aproximadamente duas horas e a sua aplicabilidade chega a 90%. O PCR qualitativo tem sensibilidade de 10⁻⁶ enquanto o quantitativo, 10⁻⁵. Em ambos, o tempo para a realização é maior (2-3 dias), com aplicabilidade de 75%. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29(1):3-9.

Palavras-chave: Plasmócitos; mieloma múltiplo; imunofenótipo; citometria de fluxo; doença residual mínima.

Introdução

Os plasmócitos foram descritos pela primeira vez em 1875, mas a sua função como célula produtora de anticorpos só começou a ser definida a partir de 1937. Naquela época, Bing e Plum demonstraram que o mieloma múltiplo estava associado à produção excessiva de gamaglobulina. Nas décadas de 1940 e 1950, outros procedimentos experimentais revelaram que a imunização endovenosa de animais com múltiplos antígenos era acompanhada do aumento de plasmoblastos no baço.^{1,2} Esses plasmócitos jovens dividiam-se rapidamente e o citoplasma tornava-se rico em RNA, sugerindo a capacidade de produção de proteínas (anticorpos). Posteriormente, Coons e colaboradores demonstraram que os plasmócitos continham anticorpos. A validação

deste modelo para o homem foi feita graças às observações em pacientes com doença de Bruton, que não tinham plasmócitos, nem produziam anticorpos. Entretanto, a definição da origem dos plasmócitos a partir de linfócitos B só foi estabelecida em meados da década de 1960. Os plasmócitos normais possuem mutações somáticas na região variável da imunoglobulina, indicando que são células derivadas do compartimento do centro germinativo ou pós-centro germinativo. Os plasmócitos, uma vez integralmente constituídos, irão migrar para a medula óssea ou para outros gânglios, para o baço e para o tecido linfóide associado à mucosa (Figura 1).^{3,4} A exemplo do que ocorre com os plasmócitos normais, os plasmócitos neoplásicos do mieloma múltiplo representam células que já passaram pelo centro germinativo e, portanto, sofreram os fenômenos de edição

¹Professor titular do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

²Pós-graduando de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Correspondência: Roberto Passetto Falcão
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 – Ribeirão Preto-SP – Brasil
Tel: (16) 3602-2610
E-mail: rpfalcao@fmrp.usp.br

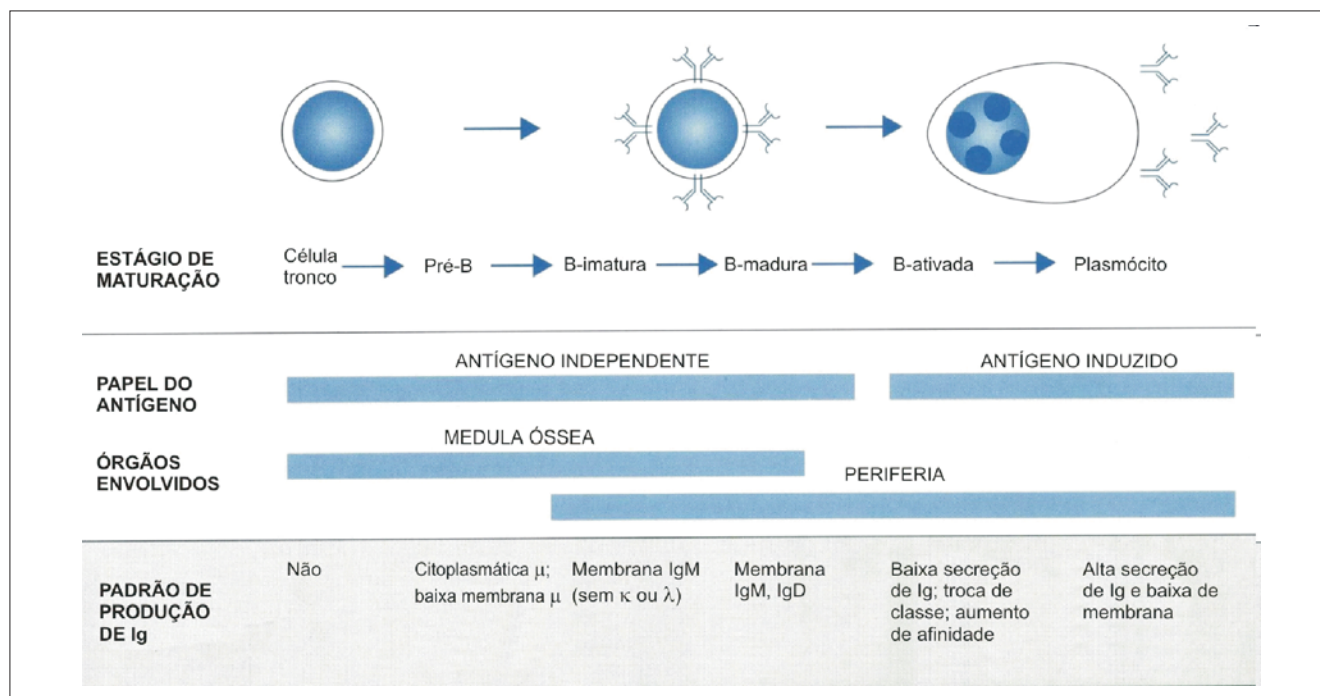


Figura 1. Ontogênese dos plasmócitos

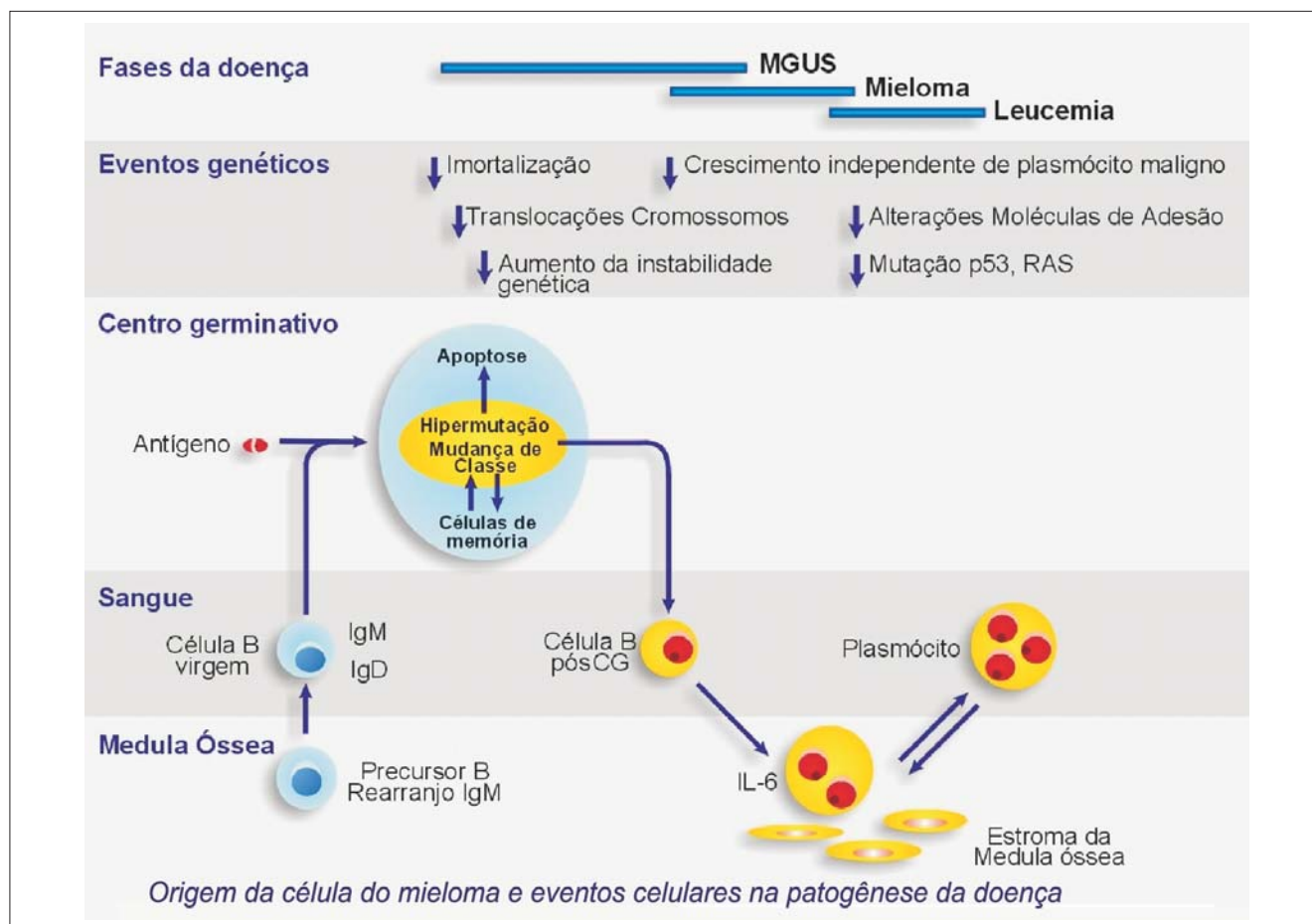


Figura 2. Esquema comparativo das fases da doença e eventos genéticos do mieloma múltiplo com a ontogênese dos linfócitos B.

do receptor, hipermutação somática e troca de classe (Figura 2). A patogênese molecular do mieloma múltiplo corresponde a um processo composto por várias etapas, cuja primeira é a aquisição da translocação envolvendo o locus de uma das cadeias da imunoglobulina, com conseqüente instabilidade citogenética. Essa primeira anormalidade ocorre num plasmócito que inicialmente originará um pequeno clone, cuja repercussão clínica será a gamopatia monoclonal de significado indeterminado. Alterações cromossômicas adicionais, geralmente no decorrer de vários anos, associadas à ativação de oncogenes e ao aumento acentuado do número de plasmócitos neoplásicos, farão com que ocorra a progressão clínica para mieloma múltiplo (Figura 2).

Características imunofenotípicas dos plasmócitos normais e neoplásicos

Os plasmócitos de indivíduos normais caracterizam-se pela presença dos antígenos CD45⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD38⁺⁺, CD56^{-fraco}, CD138⁺, ausência de imunoglobulinas na superfície de membrana (mIg) e presença de imunoglobulina citoplasmática policlonal (cIg) (Tabela 1).⁵

Os plasmócitos do mieloma múltiplo expressam cIg monoclonal e não possuem mIg. A imunoglobulina mais comum é a IgG. Ocasionalmente há expressão de IgA, e raramente IgD, IgE ou IgM. A molécula de imunoglobulina é completa em 85% dos casos, apresentando cadeias pesadas e leves, e em 15% dos casos apenas as cadeias leves *kappa* ou *lambda* estão presentes, o que corresponde à proteína Bence-Jones. A maioria dos casos é CD45⁺ ou CD45^{+fraco}, não possui os marcadores pan-B CD19 e CD20, mas expressa o CD38⁺, CD79^{a+}, CD56^{forte}.^{5,6} A molécula de adesão CD138 (sindecina 1) é encontrada na maioria dos casos, sendo importante para a ancoragem dos plasmócitos

na medula óssea. Ocasionalmente, pode haver expressão do CD10. Apesar de aproximadamente 80% dos plasmócitos do mieloma múltiplo serem CD19⁻ e CD56⁺, cerca de 20% dos casos são CD19⁻ CD56⁻ e possuem cIg monoclonal. Os plasmócitos neoplásicos podem expressar antígenos das linhagens mielóide ou monocítica, como o CD13 (31% dos casos), CD15 (7%) e CD117 (43%).⁶ A expressão da molécula VLA-5, envolvida na adesão entre os plasmócitos neoplásicos e as células do estroma da medula óssea, é heterogênea, sendo que os plasmócitos VLA-5⁻ são células imaturas proliferativas e os plasmócitos VLA-5⁺ são células neoplásicas maduras.⁷ O conhecimento das características imunofenotípicas dos plasmócitos do mieloma múltiplo e dos plasmócitos normais permite a detecção de células tumorais residuais e a comparação da eficiência de diferentes tratamentos.^{8,9,10}

O fenótipo das células na leucemia plasmocitária primária (LPP) é semelhante ao do mieloma múltiplo (cIg⁺, CD38⁺, CD138⁺), mas difere na expressão dos antígenos CD56, CD9, HLA-DR e CD117, que são menos freqüentes na leucemia plasmocitária primária.⁶ Entretanto, as características fenotípicas não permitem a completa distinção entre a LPP e o MM. A falta de CD56, que tem um importante papel na ancoragem de plasmócitos no estroma da medula óssea, poderia explicar a leucemização dos plasmócitos da LPP. Por outro lado, a presença do CD20 em metade dos casos de LPP sugere um fenótipo mais imaturo na leucemia do que no MM, no qual esse antígeno geralmente não está presente. Ademais, estas diferenças imunofenotípicas poderiam explicar a melhor sobrevida global do MM em comparação à LPP, pois a expressão do CD56 está associada a um bom prognóstico, enquanto a do CD20 está associada a uma sobrevida menor.⁶ (Tabela 2).

A gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) apresenta duas subpopulações distintas de plasmócitos.^{5,11} Uma delas apresenta as características dos plasmócitos normais: CD19⁺, CD38^{+forte}, CD56⁻. O estudo das cadeias leves intracitoplasmáticas revela que essas células são policlonais. A outra subpopulação apresenta as características dos plasmócitos do mieloma múltiplo, caracterizada por CD19⁻, CD38^{+intermediário}, CD56^{+forte} e cadeia leve intracitoplasmática monoclonal. Todos os indivíduos com GMSI, mas nenhum com mieloma múltiplo, apresentavam ≥ 20% de plasmócitos fenotipicamente normais em relação ao total de

Tabela 1. Características imunofenotípicas dos plasmócitos normais, do mieloma múltiplo, leucemia plasmocitária primária e da gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI)

	CD45	CD19/ CD20	CD38	CD138	CD56	Kappa/lambda intracitoplasm	Outros
Normal	CD45 ⁺	+	+++	+	-	policlonal	
Mieloma múltiplo	CD45 ⁺ ou CD45 ^{fraco}	-	+	+	++ (70%)	monoclonal	CD117 ⁺ , CD13 ⁺ , CD15 ⁺ , CD9 ⁺ , CD10 ⁺
Leucemia plasmocitária primária	CD45 ⁺ ou CD45 ^{fraco}	+/-	+	+	+(45%)	monoclonal	CD117 ⁺ , CD13 ⁺ , CD15 ⁺ , CD9 ⁺ , CD10 ⁺
GMSI*	CD45 ⁺ ou CD45 ^{fraco}	-	+	+	++	monoclonal	População de plasmócitos normais sempre presente

*GMSI: Gamopatia monoclonal significado indeterminado

Tabela 2. Imunofenotipagem em MM e leucemia plasmocitária primária

Imunofenótipo	MM	PCL	P
CD138+	99%	100%	.90482
CD10+	6%	6%	.72808
CD13+	31%	23%	.40456
CD15+	7%	8%	.60321
CD20+	17%	50%	.00139
CD38+	100%	100%	
CD56+	70%	45%	.02217
CD9+	78%	46%	.01984
CD117+	43%	0%	.03646
DR+	56%	21%	.01549

Garcia-Sanz R *et al*. Blood 1999; 93:1.032-1.037⁶

Tabela 3. Células em fase S e DNA ploídia por citometria de fluxo no MM e na leucemia plasmocitária primária

Parâmetro	MM (n = 404)	PCL (n = 22)	P
Fase S- CD38 ⁺⁺⁺ (PCs)	2.9%	4.5%	.0038
Fase S- CD38 ⁺ (células normais residuais)	7.4%	2.7%	<.0001
DNA index			
<1	1.5%	4.8%	
=1	42.5%	95.2%	<.0001
>1	56.0%	0%	

Garcia-Sanz R *et al*, Blood 1999; 93:1.032-1.037⁶

plasmócitos da medula óssea.¹¹ Esse valor é, portanto, altamente discriminatório no diagnóstico diferencial entre MM e GMSI.

Características do ciclo celular por citometria de fluxo

Cinquenta e sete por cento dos casos de MM apresentam um índice de DNA dos plasmócitos hiperdiplóide (>1). Os outros 43% são diplóides (=1) (Tabela 3). Por outro lado, os achados na LPP são completamente diferentes, pois quase a totalidade dos casos são diplóides.⁶ A distribuição de células no ciclo celular também é diferente nas duas doenças, sendo que a LPP apresenta uma maior porcentagem de células plasmocitárias neoplásicas na fase S, correspondendo, portanto, a uma maior capacidade proliferativa. Ademais, a porcentagem de células plasmocitárias normais residuais em fase S é menor na LPP do que no MM, o que poderia explicar porque os achados de anemia e plaquetopenia são maiores na LPP do que no MM.

Sezer *et al*¹¹ compararam o ciclo celular do MM com a GMSI. Os pacientes com MM foram divididos em dois gru-

pos. No grupo A, foram incluídos pacientes com infiltração de 10%-30% de plasmócitos na medula óssea, proteínas séricas menor que 3,5 g/dL (IgG) ou menor que 2 g/dL (IgA) e sem lesões osteolíticas no raio X convencional. No grupo B, foram incluídos os pacientes que preenchem os critérios de Durie e Salmon, incluindo pelo menos um critério maior. No grupo A, a porcentagem de plasmócitos em fase S na medula óssea e o índice de DNA não diferiram na GMSI em relação ao MM. Por outro lado, a atividade proliferativa medida pela porcentagem de plasmócitos em fase S foi maior no grupo B do MM em relação à GMSI e ao grupo A do MM

Avaliação de doença residual mínima em mieloma múltiplo

O mieloma múltiplo (MM) é uma proliferação clonal de plasmócitos na medula óssea (MO), que, apesar de responder ao tratamento com agentes quimioterápicos, permanece hoje como doença incurável. O tratamento usual do MM deve incluir altas doses de quimioterápicos, seguida da infusão autóloga de células-tronco periféricas (TMO autólogo). Com esse esquema, muitos pacientes conseguem atingir remissão completa da doença quando avaliados pela morfologia da MO, eletroforese e/ou imunofixação de proteínas séricas e urinárias, citogenética clássica.¹² No entanto, todos os doentes irão invariavelmente sofrer uma recaída, com uma taxa mediana de sobrevida global de cerca de três anos.

A recaída da doença se deve à presença de plasmócitos neoplásicos residuais na MO, chamada de doença residual mínima (DRM). Nos últimos anos, o estudo da DRM provou ser de grande valia para a avaliação de resposta clínica em diversas neoplasias hematológicas.¹³ Porém, no mieloma múltiplo, tanto a sua utilidade clínica quanto o melhor método para detecção da DRM permanecem controversos.

Métodos para detecção de DRM em mieloma múltiplo

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

No mieloma múltiplo, existem alguns possíveis alvos para detecção de clonalidade por PCR, sendo que o principal e o mais estudado é o rearranjo gênico da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH).^{14,15} Os genes da IgH encontram-se no cromossomo 14 e, durante a ontogenia das células B, cerca de 150 regiões chamadas variáveis (V), 30 chamadas diversidade (D) e 6 chamadas junção (J) sofrem rearranjos. Essa região variável, VDJ da IgH, formada após o rearranjo, é única para cada célula B madura e pode ser considerada como um marcador clonal dos plasmócitos neoplásicos no mieloma múltiplo. Assim, técnicas de PCR foram desenvolvidas para detecção e quantificação do rearranjo VDJ da IgH.

A pesquisa por PCR qualitativo atinge a maior sensibilidade entre todos os métodos de detecção de DRM, quando se utiliza a técnica do RT-PCR aninhado (*nested*) com *primers*

montados através do seqüenciamento do rearranjo VDJ de cada paciente.¹⁶ Esses *primers* são os chamados oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO) e são específicos para cada paciente. A técnica que utiliza esses oligonucleotídeos pode ser chamada de ASO-RT-PCR e atinge níveis de sensibilidade de cerca de 10^{-6} .

A pesquisa molecular do rearranjo da IgH pode também ser realizada de forma quantitativa.^{14,15,16} A técnica mais utilizada e aplicável clinicamente, o PCR em tempo real, também utiliza como *primer* um oligonucleotídeo alelo-específico (ASO), seqüenciado de cada paciente (ASO-RQ-PCR). Esse método atinge níveis de sensibilidade de cerca de 10^{-5} .

Todas as técnicas descritas para detecção molecular de DRM em mieloma múltiplo envolvem experimentos trabalhosos, minuciosos e que consomem muito tempo para a sua realização, aproximadamente dois a três dias. Além disso, a técnica do PCR só é aplicável em cerca de 75% dos pacientes (Tabela 4).¹⁸ Essa falha de aplicabilidade do teste se deve à falta de marcadores clonais para amplificação genética, o que, por sua vez, é causada pela presença de mutações somáticas nos genes da IgH já presentes em alguns clones de mieloma múltiplo.

Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Recentemente, a citometria de fluxo (CF) passou a ser utilizada como alternativa para monitorização de doença residual mínima no mieloma múltiplo. Os plasmócitos expressam marcadores que são linhagem-específicos de células B e também alguns marcadores próprios. Além disso, as células plasmocíticas neoplásicas também podem ser diferenciadas das não-neoplásicas por marcadores de superfícies detectáveis pela citometria de fluxo.

Como já foi descrito os plasmócitos normais expressam CD19, CD38, CD138, CD45 (fraco) e geralmente são negativos para CD56. Os plasmócitos neoplásicos, em sua maioria, expressam CD56 e podem ou não apresentar positividade para CD19 e CD45. Utilizando-se métodos multiparamétricos com quatro cores, a aplicabilidade do teste chega a 90%, pois ainda existem alguns casos em que a citometria de fluxo não pode diferenciar plasmócitos normais de neoplásicos, devido à ausência de marcadores diferenciais.¹⁸

Além dessa capacidade de diferenciar as células, a citometria de fluxo ainda é capaz de quantificar os plasmócitos neoplásicos e comparar de forma quantitativa sua proporção com os plasmócitos normais, com um nível de sensibilidade em torno de 10^{-4} a 10^{-5} .

Uma das vantagens da citometria em relação aos métodos moleculares para pesquisa de DRM é que consome tempo menor de execução, aproximadamente duas horas, podendo ser utilizada na prática clínica de forma mais rotineira. Ademais, possui aplicabilidade maior quando comparada ao PCR (90 vs 75%).¹⁸ Além disso, na maioria dos casos, o marcador de clonalidade é o mesmo para todos os pacientes e o estudo não necessariamente requer avaliações feitas ao

Tabela 4. Diferenças entre a citometria de fluxo e o PCR na pesquisa de doença residual mínima

	Aplicabilidade	Sensibilidade	Tempo de realização
Citometria de fluxo	90%	10^{-4} a 10^{-5}	2-3 horas
PCR qualitativo	75%	10^{-6}	2-3 dias
PCR quantitativo	75%	10^{-5}	2-3 dias

diagnóstico para cada paciente. Este método pode ainda fornecer informações sobre a recuperação imunológica de cada paciente após o tratamento. A principal desvantagem quando comparada ao PCR é seu menor nível de sensibilidade (Tabela 4).

Aplicações clínicas da pesquisa de DRM em mieloma múltiplo

Monitorar resposta ao tratamento

Atualmente, o grau de resposta ao tratamento quimioterápico, um dos principais indicadores de prognóstico em doenças neoplásicas, é avaliado na prática clínica apenas por métodos convencionais que incluem a avaliação morfológica da medula óssea, pesquisa de lesões em órgãos-alvo da doença (principalmente alterações renais e ósseas), eletroforese e imunofixação de proteínas séricas e urinárias. Assim, o grau de resposta terapêutica de cada paciente baseia-se nesses exames, e os critérios mais utilizados para remissão completa (RC) ou parcial (RP) são atualmente aqueles preconizados pelo European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation (EBMT).¹⁹

O tratamento do mieloma múltiplo com esquemas quimioterápicos múltiplos é capaz de induzir remissão completa em cerca de 25% dos pacientes. Quando utilizado tratamento em altas doses com transplante autólogo de medula óssea, as taxas de RC e RP chegam, respectivamente, a 31%-51% e 41%-65%.

A citometria é capaz de identificar plasmócitos neoplásicos em cerca de 21% a 27% dos pacientes que têm imunofixação negativa.^{9,18} O PCR, por sua vez, identifica doença em 34% dos pacientes com imunofixação negativa.¹⁸ Classicamente, o nível de resposta ao tratamento é importante marcador prognóstico de sobrevida. Nesse contexto, tanto a citometria de fluxo quanto a pesquisa molecular de rearranjos IgH por PCR tornam-se, na atualidade, novas ferramentas de avaliação prognóstica pós-tratamento em mieloma múltiplo.

Os estudos que demonstram associação entre DRM e sobrevida ainda são escassos e com pequeno número de pacientes. Rawstron *et al*⁹ demonstraram que, em pacientes avaliados três meses após o transplante, todos com imunofixação negativa, a sobrevida livre de progressão foi maior

naqueles e não se identificou a presença de plasmócitos neoplásicos residuais na MO por citometria (35 meses vs 20 meses; $p=0,04$).

Fenk *et al*,²⁰ ao avaliarem 11 pacientes com MM pós-TMO autólogo através da técnica ASO-RQ-PCR para IgH, demonstraram que um índice IgH/ β actina $>0,03\%$ foi capaz de prever uma menor sobrevida livre de progressão, independente dos parâmetros clínicos de resposta. Bakkus *et al*²¹ revelaram que um nível de 0,015% no PCR quantitativo foi um excelente limite para subdividir grupos de bom e mau prognóstico em relação à sobrevida livre de progressão após TMO autólogo. Da mesma forma, Sarasquete *et al*¹⁸ demonstraram que tanto a citometria quanto o PCR podem ser utilizados para subdividir grupos com prognóstico diferente após o tratamento com autotransplantes.

Assim, a detecção de doença residual mínima no mieloma é importante para prever o risco e pode identificar quais pacientes se beneficiariam de tratamentos adicionais em um estágio precoce pós-TMO autólogo. Apesar de ainda haver poucos estudos em pacientes submetidos a transplantes alogênicos, os resultados citados anteriormente podem ser extrapolados para esse contexto, balizando decisões terapêuticas como a retirada precoce de imunossupressão, infusão de linfócitos do doador, etc. O papel do chamado efeito "enxerto *versus* mieloma" no contexto de doença residual mínima também não foi adequadamente estudado até o momento.

Avaliar material colhido para TMO autólogo

Utilizando a técnica de PCR qualitativo, já foi demonstrado que praticamente todos os produtos de aférese, colhidos para autotransplantes, contêm células provenientes do clone neoplásico. Por isso, esforços vêm sendo realizados no intuito de reduzir o grau de contaminação nas bolsas de aférese, e o PCR quantitativo é capaz de medir com eficiência essa redução. O procedimento mais utilizado para essa descontaminação (*purging*) *in vitro* é a seleção positiva de células CD34 positivas, utilizando-se técnicas imunomagnéticas que conseguem induzir uma redução de 3-log na contaminação das bolsas.¹⁴

O valor de se quantificar a presença de plasmócitos neoplásicos nas bolsas de células-tronco colhidas por aférese ainda permanece questionável, uma vez que estudos demonstraram ausência de benefício para sobrevida global e livre de eventos nos pacientes em que foram utilizados produtos "descontaminados".

Assim, ainda não se sabe qual o grau de contribuição das células neoplásicas contaminantes reinfundidas para as recaídas pós-TMO. Por enquanto, não há evidências na literatura médica que permitam a utilização da descontaminação *in vitro* fora de estudos clínicos. Parece que a carga tumoral do paciente no momento do transplante é um fator muito mais importante do que o grau de contaminação das bolsas de aférese para prever prognóstico.

Abstract

Normal plasma cells can be differentiated from multiple myeloma by their immunophenotype. Normal cells are CD45⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD38⁺⁺, CD56^{-dim}, CD138⁺, mIg- and polyclonal cIg. On the other hand, with multiple myeloma, plasma cells are monoclonal (cIg) and approximately 80% are CD19⁻ CD56⁺ and 20% CD19⁻ CD56⁻. The profile in plasma cell leukemia is similar to myeloma, but the CD56 is positive in 45% of cases. In the monoclonal gammopathy of undetermined significance there is a mixture of normal and neoplastic plasma cells. Residual disease in bone marrow is important to determine the efficacy of treatment and can be evaluated by flow cytometry or polymerase chain reaction of rearranged heavy chains of Ig. Flow cytometry has a sensitivity of 10⁻⁴ to 10⁻⁵, is performed in 2-3 hours and is applicable in 90% of cases. Qualitative PCR has a sensitivity of 10⁻⁶ and quantitative PCR of 10⁻⁵. Both tests are performed in 2-3 days and their applicability is around 75%. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007; 29(1):3-9.

Key words: Plasma cells; multiple myeloma; immunophenotype; flow cytometry, minimal residual disease.

Referências Bibliográficas

- Almeida J, Órfao A, Ocqueteau M, Mateo G, Corral M, Caballero MD, *et al*. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1999;107:121-31.
- Ford WL. The lymphocyte - Its transformation from a frustrating enigma to a model of cellular function. In: Wintrobe MM, editor. *Blood, pure and eloquent*. New York: MacGraw-Hill Book Company; 1980. p. 457-508.
- Dalton WS, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC, Harousseau JL. Multiple myeloma. *Hematology* 2001;157-174.
- Delves PJ, Roitt IM. The immune system. *N Eng J Med* 2000 Jul 13; 108-17.
- Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, *et al*. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993;81(10):2.658-63.
- Garcia-Sanz R, Órfão A, Gonzalez M, Tabernero MD, Blade J, Moro MJ, *et al*. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 1999;93(3):1.032-37.
- Kawano MM, Huang N, Harada H, Harada Y, Sakai A, Tanaka H, *et al*. Identification of immature and mature myeloma cells in the bone marrow of human myelomas. *Blood* 1993;82(2): 564-70.
- Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky, K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Eng J Med* 1999;1.520-29.
- Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT, *et al*. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cell predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002;100:3.095-100.
- San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, Blade J, López-Berges MC, Caballero MD, *et al*. Immunophenotypic evaluation of plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002;99:1.853-56.

11. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica* 2001;86:837-43.
12. San Miguel JF, Blade CJ, Garcia-Sanz R. Treatment of multiple myeloma. *Haematologica* 1999;84:36-58.
13. Cave J, *et al*. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med* 1998;339:591-8
14. Fenk R, Haas R, Kronenwett R. Molecular monitoring of minimal residual disease in patients with multiple mieloma. *Hematology* 2004;9(1):17-33.
15. Davies FE, Rawstron AC, Owen RG, Morgan GJ. Minimal residual disease monitoring in multiple mieloma. *Best Prac Res Cli Haematology* 2002;15:197-222.
16. Rasmussen T, Knudsen LM, Huynh TK, Johnsen HE. Molecular and clinical follow-up after treatment of multiple mieloma. *Acta Haematologica* 2004;112:105-110.
17. Zhao X, Huang Q, Slovak M, Weiss L. Comparison of ancillary studies in the detection of residual disease in plasma cell mieloma in bone marrow. *Am J Clin Pathol* 2006;125:895-904.
18. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, *et al*. Minimal residual disease monitoring in multiple mieloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow citometry. *Haematologica* 2005;90:1.365-1.372.
19. Blade J, *et al*. Mieloma Subcommittee of the EBMT. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high dose therapy and haematopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology* 1998; 102:1.115-1.123.
20. Fenk R, Ak M, Kobbe G, *et al*. Levels of minimal residual disease detected by quantitative molecular monitoring herald relapse in patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2004;89:557-566.
21. Bakkus MHC, Bouko Y, Samsom D, *et al*. Post-transplantation tumor load in bone marrow, as assessed by quantitative ASO-PCR, is a prognostic parameter in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 2004;126:665-674.

O tema apresentado e o convite ao(s) autor(es) consta da pauta elaborada pelo co-editor.

Avaliação: Co-editor e um revisor externo.
Publicado após revisão e concordância do editor.
Conflito de interesse: não declarado.

Recebido: 02/08/2006
Aceito: 15/01/2007