

LUIZ ARTHUR CALHEIROS LEITE

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS ABERRANTES
EM PLASMÓCITOS DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO
ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Pau-
lista de Medicina para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2006

LUIZ ARTHUR CALHEIROS LEITE

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS ABERRANTES
EM PLASMÓCITOS DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO
ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Mihoko Yamamoto

**SÃO PAULO
2006**

Calheiros Leite, Luiz Arthur

Estudo da expressão de Antígenos Aberrantes em plasmócitos de portadores de Mieloma Múltiplo através de Citometria de Fluxo Multiparamétrica

Luiz Arthur Calheiros Leite. – São Paulo, 2006.

x, 69f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Hematologia.

Título em inglês: Detection of aberrant antigens in multiple myeloma cells by multiparametric flow cytometry.

1. Mieloma Múltiplo. 2. Plasmócitos. 3. Citometria de Fluxo.
4. Antígenos Aberrantes 5. Imunofenotipagem

LUIZ ARTHUR CALHEIROS LEITE

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS ABERRANTES EM PLASMÓCI-
TOS DE PORTADORES DE MIELOMA MÚLTIPLO ATRAVÉS DE CITOMETRIA
DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA**

Chefe do Departamento:

Profa. Dra. Emilia Inoue Sato

Coordenadora do Curso de Pós-graduação:

Profa. Dra. Dayse Maria Lourenço

Dedicatória

Aos meus falecidos avós paternos, pelo amor e alegrias proporcionadas.

Aos meus Pais Heróis Antônio Jessé Leite e Anaci Calheiros Leite e Irmãos, pelo incentivo, compreensão e apoio para superar as adversidades nesta longa trajetória em busca do conhecimento.

Acredite nos sonhos, lute, persiga e nunca desista, pois eles podem ser as chaves da conquista.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Mihoko Yamamoto, Professora Adjunta da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP-EPM, por ter acreditado que poderia ser um verdadeiro mestre, pela confiança e ajuda em minha maturação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. José Orlando Bordin, Professor Titular da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP-EPM, pelo apoio e incentivo nas horas de dificuldade e pela oportunidade de está realizando este trabalho, o meu obrigado.

À Profa. Dra. Gisele Coleone, professora adjunta e responsável pelo Ambulatório do Mieloma Múltiplo, cuja contribuição foi importante para a realização deste trabalho.

À Eliza Yuriko Sugano Kimura, Farmacêutica Bioquímica do Laboratório de Biologia Celular da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP-EPM, pelos valiosos ensinamentos, paciência, momentos alegres de convivência e incentivo.

Aos meus amigos do laboratório de citometria de fluxo e de pós-graduação, Alex, Wolney, Fábio, Rodrigo, Francielle, Carolina, Lucianne, Carlos, Aníbal, Ranielly, Ângela Anita e Elyse, meus sinceros agradecimentos pela companhia de sempre, a alegria do dia à dia e por estarem lutando pela ciência.

Aos funcionários, pelas alegrias e apoio neste mágico momento de minha vida.

Aos médicos do Ambulatório de Mieloma Múltiplo, especialmente a Dra Manuela Sousa Sampaio e Dra Jandey da Glória Bigonha pelo interesse, dedicação e amizade que demonstrou durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Antônio Jessé Leite pela excelente consultoria prestada na análise estatística dos dados referentes a minha tese. Finalmente, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Este projeto foi desenvolvido graças ao apoio de:

CNPq : bolsa de estudo (processo número 830927/99-9)

FAPESP : auxílio pesquisa (processo número 01/130836-3)

Sumário

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Apoios Financeiros	vi
Sumário	Vii
Lista de Tabelas	Viii
Lista de Abreviaturas	ix
Resumo	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 Casuística	16
2.2 Métodos	16
2.3 Análise estatística.....	22
3. RESULTADOS	23
4. DISCUSSÃO	44
5. CONCLUSÕES.....	50
6. ANEXOS.....	52
7. REFERÊNCIAS	61
Abstract	
Bibliografia consultada	

Lista de Tabelas

Tabela 1. Critérios diagnósticos para o Mieloma Múltiplo (MM) de acordo com Durie&Salmon(D&S) -----	6
Tabela 2. Estadiamento do MM de acordo com os critérios de Durie&Salmon -----	7
Tabela 3. Novo Sistema Internacional de Estadiamento -----	7
Tabela 4. Painel de AcMo utilizados para pesquisa de antígenos aberrantes nos plasmócitos do MM -----	20
Tabela 5. Características Clínicas, hemograma e medula óssea (MO) dos pacientes com MM -----	24
Tabela 6. Exames Bioquímicos dos pacientes com MM-----	25
Tabela 7. Classificação dos pacientes com MM segundo o estadiamentos de D&S e Internacional do MM -----	26
Tabela 8. Imunofenótipo dos plasmócitos normais de doadores sadios de medula óssea -----	27
Tabela 9. Imunofenótipo dos plasmócitos de pacientes portadores de Mieloma Múltiplo -----	28
Tabela 10. Frequência dos Antígenos Aberrantes no MM -----	30
Tabela 11. Associação entre os Antígenos Aberrantes no MM -----	31
Tabela 12. Características clínicas e biológicas dos pacientes CD56 ⁺ e CD56 ⁻ -----	32
Tabela 13. Expressão do CD56 em relação a idade, estadiamento e exames bioquímicos -----	33
Tabela 14. Características clínicas e biológicas dos pacientes com MM em relação aos antígenos mielóides -----	35
Tabela 15. Características Clínicas e Biológicas dos pacientes CD117 ⁺ e CD117 ⁻ com MM -----	36
Tabela 16. Expressão do CD117 em relação a idade, estadiamento, β 2 microglobulina, albumina, creatinina, cálcio séricos e hemoglobina -----	37
Tabela 17. Características Clínicas e Biológicas dos pacientes com Mieloma Múltiplo CD28 ⁻ e CD28 ⁺ -----	38

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AcMo	Anticorpos Monoclonais
Alb	Albumina
APCs	Células apresentadoras de antígenos
β 2M	β 2- microglobulina
CaI	Cálcio Iônico
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CFM	Citometria de Fluxo Multiparamétrica
Cr	Creatinina
DHL	Lactato desidrogenase
DMSO	Dimetilsufóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FA	Fenótipos aberrantes
Hb	Hemoglobina
HLA-DR	Antígeno de Histocompatibilidade Leucocitária-DR
IgA	Imunoglobulina Tipo A
IF	Imunofenotipagem
IgG	Imunoglobulina Tipo G
IgM	Imunoglobulina Tipo M
IL-1	Interleucina - 1
IL- 6	Interleucina - 6
LCP	Leucemia de Células Plasmáticas
M-CSF	Fator estimulador de colônia macrofágica
MM	Mieloma Múltiplo
MO	Medula óssea
NK	<i>natural killer</i>
NCAM	Molécula de adesão neural
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	Proteína C Reativa
PCs	Plasmócitos
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VCAM-1	Molécula de adesão celular do vaso
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VLA-4	<i>very late antigen – 4</i>

RESUMO

Objetivo: Determinar a frequência e o valor prognóstico dos antígenos aberrantes em pacientes com Mieloma Múltiplo (MM), através da imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica. **Métodos** Foram estudados plasmócitos em material de medula óssea de 30 pacientes com MM, ao diagnóstico e sem nenhum tratamento prévio. Como controle normal, foram estudados plasmócitos de doadores de medula, para transplante. Avaliou-se a expressão dos antígenos de superfície e citoplasmáticos por citometria de fluxo (Citômetro FACs calibur, BD, e programa Cell Quest e Paint-a-Gate, BD). Para o estudo antígenos aberrantes nos plasmócitos mielomatosos foi utilizado o painel de anticorpos monoclonais: CD45, CD38, CD138, CD19, CD56, CD117, CD33, CD13, CD14, CD28, CD10, CD20, CD22, HLA-DR. A seleção de plasmócitos foi baseada na expressão do CD138, CD38, CD45. **Resultados:** com exceção de um caso, todos os demais pacientes (96,6%) apresentavam pelo menos um antígeno aberrante e os mais freqüentes foram o CD56⁺, CD117⁺, CD33⁺, CD13⁺, observados em 88% dos pacientes. A expressão de antígenos linfóides foi encontrada nos casos que apresentavam maior número de antígenos aberrantes. Quando avaliada a relação da expressão dos antígenos aberrantes com os parâmetros clínico-laboratoriais, observou-se que os pacientes portadores de MM CD56⁻ possuíam maiores níveis de β 2M e de cálcio ionizável em comparação aos com MM CD56⁺. Além disso, pacientes com MM CD28⁺ também mostraram uma tendência a altos valores de β 2M. **Conclusões:** Os antígenos aberrantes são altamente freqüentes nos plasmócitos do mieloma múltiplo, destacando a importância do CD56, CD117 e do CD28 no prognóstico e na utilidade dos antígenos de alta frequência (CD56⁺, CD117⁺, CD33⁺, CD13⁺) para a detecção da doença residual mínima nesta doença, através da citometria de fluxo multiparamétrica.

1. INTRODUÇÃO

O Mieloma múltiplo (MM) é uma doença neoplásica clonal de plasmócitos caracterizada por expansão dessas células na medula óssea.

Caracteriza-se, clinicamente, por dor óssea resultante da destruição óssea por disfunção dos osteoclastos, hipercalcemia, falência renal, anemia e infecções recorrentes, neuropatia, hiperviscosidade, sangramento e trombose (Bataille et al, 1997, Kyle et al, 2004).

O MM é responsável por 1% de todos os tipos de doença maligna e pouco mais que 10% das malignidades hematológicas. Tipicamente, a doença incide mais em pacientes com idade entre 40 a 70 anos, sendo a idade média ao diagnóstico de aproximadamente 65 anos e apenas 3% dos pacientes encontram-se abaixo de 40 anos de idade.

O MM é uma doença progressiva e quando não tratado, tem uma sobrevida média de 6 meses e cerca de 2,5 a 3 anos, quando tratados com quimioterapia.

Vários fatores têm sido relacionados com a origem da doença, como a exposição ao benzeno, inseticidas ou herbicidas, quimioterápicos, vírus (Herpes-Vírus tipo 8), sendo o contato com radiações ionizantes o principal fator de risco para desenvolvimento da entidade. Fatores genéticos têm sido relatados com descrição em irmãos gêmeos.(Medeiros CR et al, 2001, Williams JW et al, 1996).

Enquanto a origem natural das células do mieloma não é estabelecida, evidências sugerem que a provável sobrevida longa das células plasmáticas pode ser atribuída à exposição antigênica, transformação das células B maduras durante o processo de recombinação da região VDJ da imunoglobulina e a uma hipermutação somática (Ho et al, 2002).

Quadro Clínico do MM

As manifestações clínicas mais freqüentes nos pacientes portadores de MM são, dor “nas costas” provocada pelas lesões osteolíticas, anemia leve, doença renal por depósito de imunoglobulina e desordens no sistema nervoso central. (Grogan TM et al, 2001)

Esses pacientes apresentam intensa atividade dos osteoclastos, gerando elevada reabsorção óssea e diminuição da formação óssea. Os osteoclastos produzem interleucina 6 (IL-6), importante fator de crescimento das células mieloma-

tosas *in vitro* e *in vivo*, que afeta a sobrevivência dessas células do mieloma e gera resistência à apoptose e um ambiente ideal para a proliferação e sobrevivência prolongada dos plasmócitos, inclusive aumentando a resistência aos tratamentos quimioterápicos (Karagad A et al, 2000). A radiografia do esqueleto revela lesões osteolíticas em 60% dos pacientes. As lesões clássicas do MM são as "lesões em saca bocado" e as rarefações ósseas generalizadas. A extensa reabsorção óssea é presumivelmente causada pela produção excessiva de fator ativador de osteoclastos e IL-6, combinados com o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1), resultando na elevação do cálcio sérico em aproximadamente 50% dos pacientes. (Medeiros CR et al, 2001)

O desenvolvimento de lesões ósseas no MM está relacionado com o aumento da expressão do receptor do fator nuclear de ativação de osteoblastos K β , ligante (*RANKL*) e uma redução dos níveis do receptor de osteoprotegerina. O aumento do *RANKL* resulta na ativação de osteoclastos e reabsorção óssea. A super-expressão do *RANKL* é provavelmente mediada pela liberação da proteína inflamatória 1 α de macrófagos. O melhor entendimento desse mecanismo possibilitou o desenvolvimento de uma terapia paliativa com bifosfonatos (Abe M et al, 2002).

A falência renal seguida por dano tubular é provocada pela deposição de um aglomerado de proteína monoclonal, sendo uma das causas de morte desses pacientes. (Grogan TM et al, 2001)

A presença de cadeia leve na urina, kappa ou lambda (proteínas de Bence Jones), está quase sempre relacionada com os casos de acentuada perda da função renal e necessidade de hemodiálise. Aproximadamente 10% dos pacientes são obrigados a permanecer em programas de diálise crônica e apresentam a creatinina sérica acima de 4 mg/dl ao diagnóstico, sendo um fator de prognóstico adverso (Medeiros CR et al, 2001).

A anemia do MM tem duas causas principais: a insuficiência renal com deficiência de produção de eritropoetina e de eritrócitos pela medula óssea e a secundária à infiltração medular pelos plasmócitos neoplásicos, gerando uma hematopoese ineficiente. Na medida em que a doença progride, sintomas como a fraqueza, palidez e taquicardia tornam-se proeminentes.

O quadro neurológico mais freqüente é a radiculopatia provocada pela compressão secundária ao colapso de uma vértebra. A neuropatia periférica é

pouco freqüente, geralmente associada a amiloidose ou ao mieloma com lesões escleróticas (Foerster J et al, 1998).

Exames laboratoriais no MM

O hemograma mostra anemia normocítica normocrômica, com formação de hemácias em “rouleaux”, devido ao excesso de imunoglobulinas e a velocidade de sedimentação dos eritrócitos (VHS) se encontra acelerada (Foerster J, 1998).

O exame de medula óssea (MO) mostra presença de plasmócitos em quantidade variável. Alguns plasmócitos podem exibir morfologia bizarra com formas binucleares ou multinucleares, figuras de mitoses e alta basofilia citoplasmática associada à alta produção de imunoglobulina clonal. Pode ocorrer formação de agrupamento de plasmoblastos malignos com alta relação núcleo-citoplasmática, núcleo grande, cromatina fina e presença de nucléolos evidentes. Para classificação morfológica do MM é necessário realizar uma contagem de 500 células, sendo caracterizada uma morfologia plasmablástica quando possuir 2% ou mais de plasmoblastos (Bataille, 1997).

O envolvimento medular pode ser focal ou difuso e alguns pacientes necessitam de aspirado e biópsia em vários sítios para confirmação do diagnóstico.

O achado laboratorial mais importante é a demonstração de proteína monoclonal no soro ou na urina, através da eletroforese de proteína, que mostra um pico na região de gamaglobulina ou formação de dois picos, um na região de betaglobulina e o outro na porção da gamaglobulina. Em 70% dos casos os pacientes apresentam imunoglobulina G (IgG), 20% IgA e raramente (0,5% dos casos) IgM. A monoclonalidade pode ser demonstrada também pelo estudo das cadeias leves da imunoglobulina, kappa ou lambda. Os subtipos das globulinas são demonstrados pelo método de imunofixação, considerado o exame padrão ouro para diagnosticar gamopatias monoclonais. Os pacientes com mieloma IgA possuem risco elevado de desenvolvimento de uma síndrome de hiperviscosidade, resultante da forte tendência da proteína M de sofrer polimerização, o que pode causar comprometimento da circulação, trombozes e edema pulmonar. (Medeiros CR et al, 2001)

Alterações da função renal são comuns, 48 a 77 % dos pacientes têm creatinina acima do normal e 25 % acima de 2 mg/ml ao diagnóstico.

O nível de β_2 microglobulina (β_2M) é útil para prever sobrevida no MM, pois reflete a quantidade de carga tumoral. A concentração de β_2M sérica está aumentada no MM e é associada com curta sobrevida. O valor de referência comumente utilizado é de 2.7 a 4mg/dL.

A hipercalcemia no MM é causada pela reabsorção óssea e envolve várias citocinas como a IL-1 e IL-6, que são produzidas pelos osteoblastos, as quais estimulam a reabsorção óssea pelos osteoclastos. O nível de cálcio sérico pode encontrar-se normal ou aumentado, mas como o cálcio sérico está ligado à albumina e os níveis dessa proteína, com frequência, diminuem em pacientes com insuficiência renal, é mais indicado avaliar o nível de cálcio através da determinação do cálcio ionizável (Foerster J et al, 1998).

Juntamente com altos níveis de β_2M , níveis elevados de lactato desidrogenase (DHL) e de proteína C reativa (PCR) correlacionam-se com mau prognóstico. Além disso, presença de morfologia plasmablástica ($\geq 2\%$), presença de plasmócitos no sangue periférico e o aumento de IL-6 têm sido também associados a mau prognóstico (Kerbaux J et al, 2003).

Diagnóstico e estadiamento do MM

O diagnóstico é baseado em critérios, maiores e menores, estabelecidos por Durie & Salmon em 1975, conforme mostrado na tabela abaixo. A presença de um critério maior e um menor ou três menores fecham o diagnóstico de MM. Classicamente, a presença de 30% ou mais plasmócitos na medula óssea associada a lesões líticas, confirmam o diagnóstico (Durie BG et al, 1975).

Tabela 1. – Critérios diagnósticos para Mieloma Múltiplo, de acordo com Durie&Salmon.

Critérios Maiores
- Plasmocitoma no tecido Biopsiado
- Plasmocitose Medular > 30%
- Componente Monoclonal M: Proteína Monoclonal M IgG > 3.5 g/dl IgA > 2.0 g/dl Proteína de Bence Jones > 1g/24h na urina
Critérios Menores
- Plasmocitose Medular 10 a 30%
- Componente Monoclonal M presente, porém mais baixo do que o valor acima referido.
- Lesões ósseas líticas
- Imunoglobulina normal reduzida (< 50% normal) IgM < 50 mg/dl IgA < 100 mg/dl IgG < 600 mg/dl

O diagnóstico é confirmado na presença de um critério maior e um critério menor ou quando três critérios menores são documentados em pacientes sintomáticos com doença progressiva.

Novos critérios diagnósticos requerem a presença de pelo menos 10 % de plasmócitos no exame de MO (ou no tecido biopsiado com células clonais) proteína monoclonal no soro e na urina e evidências de danos orgânicos, como lesão óssea, insuficiência renal, anemia, hipercalcemia. Ocasionalmente, alguns pacientes com MM podem não apresentar componente monoclonal, levando ao diagnóstico de mieloma não secretor (Kyle et al, 2003).

O estadiamento é baseado em uma combinação de fatores que se relacionam com a massa tumoral, doença óssea e renal e quantidade de imunoglobulina clonal. De acordo com o estadiamento de Durie & Salmon, os pacientes podem ser classificados em estágios I, II e III. Este sistema considera o grau de anemia, lesões ósseas, nível de cálcio sérico e de imunoglobulina sérica e urinária (Durie & Salmon SE, 1975) (tabela 2).

Tabela 2. Estadiamento do Mieloma Múltiplo de acordo com os critérios de Durie & Salmon

Estágio I (pequena massa tumoral, $< 0,6 \times 10^{12}$ células/m²)
Todos os achados abaixo:
Hemoglobina > 10 g/dl
IgG < 5 g/dl; IgA < 3 g/dl; Proteinúria de BJ na urina < 4 g/24h
Cálcio normal
Lesões líticas generalizadas
Estágio II (massa tumoral intermediária)
Achados entre estágios I e III
Estágio III (massa tumoral, $> 1,2 \times 10^{12}$ células/m²)
Qualquer achado abaixo:
Hemoglobina $< 8,5$ g/dl
IgG > 7 g/dl; IgA > 5 g/dl; Proteinúria de BJ na urina > 12 g/24h
Cálcio > 12 mg/dl
Lesões líticas generalizadas
Critério acrescido
A - Creatinina ≤ 2 mg/dl
B - Creatinina ≥ 2 mg/dl

Um novo sistema de estadiamento foi desenvolvido para classificar e estratificar de forma mais simples os pacientes com MM. Esse sistema estratifica os pacientes em três estágios levando em consideração os níveis plasmáticos de β_2 -microglobulina (β_2 M) e albumina, não inclusos nos critérios de Durie & Salmon. (Greipp et al, 2005).

Tabela 3. Novo Sistema de Estadiamento Internacional do Mieloma Múltiplo (ISS).

Estágios	Crítérios	Sobrevida Média (meses)
I	β_2 microglobulina $< 3,5$ mg/L Albumina sérica $> 3,5$ g/dl	62
II	β_2 microglobulina 3,5-5,5 mg/L ou β_2 microglobulina $< 3,5$ mg/L Albumina sérica $< 3,5$ g/dl	44
III	β_2 microglobulina $> 5,5$ mg/L	29

Gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) e MM smoldering (SMM).

GMSI e SMM são desordens assintomáticas e consideradas pré-malignas, caracterizadas pela proliferação monoclonal de plasmócitos na medula óssea, e com ausência de lesão em órgãos finais. Os critérios diagnósticos destas condições foram recentemente revistos.

A GMSI é, assim, definida pela presença de proteína monoclonal (proteína M) <3g/dl, plasmócitos medulares <10% e ausência de anemia, hipercalcemia, lesões ósseas líticas ou falência renal atribuíveis à doença proliferativa plasmocitária. O seu risco de malignização tem sido observado em cerca de 1% dos casos por ano (The International Myeloma Working Group, 2003).

O diagnóstico de SMM requer, por outro lado, uma proteína M sérica $\geq 3\text{g/dL}$ ou plasmócitos medulares $\geq 10\%$, na ausência de anemia, hipercalcemia, lesões ósseas líticas ou insuficiência renal atribuíveis à desordem proliferativa plasmocitária. O risco dessa condição de progressão para malignidade é de 10 a 20% por ano (The International Myeloma Working Group, 2003; Raykunar SV et al, 2001).

Progressão para MM

O primeiro passo para desenvolvimento do MM é um aumento no número limite de plasmócitos clonais, clinicamente conhecido como gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI). Pacientes com GMSI não apresenta sintoma nem evidências de danos orgânicos, e apresentam risco de progressão para MM de aproximadamente 1% ao ano (Kyle et al, 2002).

Com a progressão da GMSI para mieloma múltiplo ocorre uma gama de eventos complexos nos plasmócitos neoplásicos e no microambiente medular, incluindo indução de angiogênese, supressão da imunidade celular, desencadeamento de sinalização parácrina que resulta no aumento da produção da IL-6 e do fator de crescimento do endotélio vascular.

A interação entre as células do MM e o estroma medular contribui para a persistência tumoral e para a resistência às drogas. O conhecimento desse mecanismo vem possibilitando o uso de novas drogas no tratamento de MM, como a

talidomina e o bortezomib, que inibem a angiogênese tumoral e diminuem a resistência quimioterápica (Kuehl WM et al, 2002, Seidl et al, 2003).

Leucemia de células plasmáticas e plasmocitomas

O MM é uma patologia que acomete a medula óssea. No entanto, sabe-se que estes pacientes podem apresentar plasmócitos circulantes em pequeno número sem chegar a caracterizar a leucemia de células plasmáticas (LCP), uma forma mais agressiva da doença. Apenas cerca de 2% dos casos de MM evoluem para LCP (Kyle AR, 2003).

A LCP é uma rara leucemia aguda considerada como uma variante do MM e pode ser caracterizada quando são observados mais de 20% de plasmócitos circulantes ou $2 \times 10^9/L$ no sangue periférico (Costelo R, 2001).

A LCP primária é definida como uma proliferação maligna de plasmócitos (> 20% de PCs) sendo considerada uma leucemia aguda ao diagnóstico. Já a LCP secundária corresponde a uma transformação do mieloma múltiplo.

Aproximadamente 60% dos pacientes com LCP são jovens e têm alta incidência de linfonodomegalia, baixa contagem plaquetária, raros achados de lesões líticas, baixo nível sérico de proteína M. O prognóstico é reservado em ambas as LCP, primárias ou secundárias (Costelo R, 2001).

Plasmocitoma extramedular

É um tumor de células plasmáticas que surge fora da medula óssea. O trato respiratório é a localização mais freqüente da lesão. Os plasmocitomas extramedulares podem ocorrer em outros órgãos incluindo, trato digestivo, sistema nervoso central, bexiga, pele, glândula parótida e linfonodos. A predominância é de monoclonalidade por IgA e o diagnóstico é baseado no achado de tumor de células plasmáticas em sítio extramedular com ausência de doença na medula óssea, hipercalcemia, insuficiência renal e anemia, através de estudos radiológicos, hematológicos e bioquímicos completos (Grogan TM et al, 2001).

Imunofenotipagem das células plasmáticas

Antígenos de diferenciação leucocitária no MM

O processo de diferenciação e maturação das células do sistema hemato-poético é acompanhado de ganhos e perdas antigênicas na superfície celular ou no seu citoplasma. Os plasmócitos normais originam-se de células B maduras e são caracterizadas pela expressão de antígenos de superfície CD19, CD45, CD38 e CD138, enquanto os plasmócitos neoplásicos costumam perder o CD19 e CD45, porém expressam fortemente o CD56 ao lado de CD38 e CD138 (Harada et al, 1990).

O CD138 (syndecan-1, proteoglicano ligada ao colágeno) e o CD38 (ribosil ciclase envolvida na mobilização intracelular do cálcio) são marcadores úteis para identificar as células plasmáticas, juntamente com os antígenos anteriormente referidos (Lin P et al, 2004).

Outros antígenos com expressão anormal no MM têm sido demonstrados, como a presença de marcadores linfóides B (CD10, CD19, CD20, CD21, CD22) e mais recentemente antígenos mielóides (CD13, CD14, CD15, CD33, CD117) e moléculas associadas a células NK (CD56) têm sido observados (Lima et al, 2000).

A expressão de marcadores de células B nos plasmócitos mielomatosos tem sido relacionada com a sobrevida dos pacientes e com a evolução clínica da doença. Assim, um estudo recente mostrou a influência do CD10 no curso mais agressivo de doença (Ocqueteau et al, 1998). O antígeno CD10 é expresso em células linfóides imaturas e pode ser visto também em outras células e algumas doenças linfoproliferativas crônicas como no linfoma folicular e mesmo em leucemias linfóides agudas. No MM tem sido relacionado com curso clínico agressivo e prognóstico adverso, porém esse achado e sua associação com a doença agressiva ainda continua controverso (Sahara et al, 2004).

Outro marcador de células B, o CD20, tem sido descrito em 20% dos casos de MM e esse achado é mais comum em estágios avançados da doença. A expressão do CD20 pode ter também valor prognóstico e os casos que mostraram positividade para esse marcador apresentaram um curso mais agressivo e sobrevida menor que os CD20 negativos. Esse fato parece ser mais relevante quando o marcador é expresso simultaneamente com o CD10 (Argüelles RG et al, 1994).

O CD19 pode ser utilizado para diferenciar as células plasmáticas normais das mielomas devido a sua distinta expressão nestas duas condições e Ocqueteau et al encontraram negatividade do CD19 em 97% dos casos de MM estudados (Ocqueteau et al, 1998).

Contudo casos de MM positivos para o CD19 têm sido raramente descritos e estes pacientes mostraram curso clínico mais agressivo, principalmente naqueles com morfologia indiferenciada (plasmoblástica) (Argüelles RG et al, 1994).

A co-expressão de marcadores mielóides (CD13, CD14, CD15, CD33) tem sido também relatada, contudo com menor frequência do que os marcadores de células B (Lima M et al, 2000). A coexpressão de CD13 e CD33 parece ter relação com mau prognóstico e pior resposta aos regimes terapêuticos. Já o CD117, receptor da tirosina quinase, molécula envolvida com a proliferação celular, é expressa em 1/3 dos casos de MM. A expressão desigual entre o CD117 e o CD40 parece implicar em aumento proliferativo das células mielomas (Argüelles RG et al, 1994).

Em um estudo com 65 casos de MM, Ocqueteau et al mostraram que os pacientes que expressavam três ou mais marcadores mielomonocíticos tinham uma sobrevida baixa (Ocqueteau et al, 1998).

Moléculas de adesão e sinalização celular no MM

Os plasmócitos malignos do MM estão predominantemente confinados na MO, onde estimulam a produção de citocinas (IL-1, TNF- β , M-CSF e a IL-6) pelas células estromais e células ósseas levando a ativação de osteoclastos e lesões líticas no esqueleto. A IL-6 é um potente fator de crescimento das células do mieloma e sua secreção pelas células tumorais e células do estroma geram a adesão dos plasmócitos malignos à fibronectina através da ligação com receptor VLA-4 (Helfrich et al, 1997; Chauhan et al, 1996).

As células malignas estão localizadas na medula óssea onde o microambiente oferece suporte para o seu crescimento e sobrevida. Yaccoby & Epstein demonstraram que a adesão das células do MM no estroma mediada por integri- nas e moléculas de adesão celular do vaso (VCAM-1) induz sinalização que protege as células do MM de entrarem em apoptose.(Yaccoby S. et al, 2002).

O CD56 é uma molécula de adesão neural (N-CAM), está envolvido no fenômeno normal de embriogênese do sistema nervoso central, favorecendo o crescimento do axônio. A NCAM é uma caderina cálcio-independente que regula a ligação de célula a célula. Os fenômenos de invasão tumoral e metástases são complexos e acredita-se que o evento gerador desses processos possa ser a liberação da célula do seu sítio de crescimento, através da perda da aderência (Deceunynck C et al, 1998).

É reconhecido que o CD56 opera em duas vias de adesão: aderência NCAM-NCAM e ligação heterofílica com o proteoglicano heparan sulfato ou a vários colágenos. Van Camp et al foram os primeiros a demonstrar que os plasmócitos malignos expressavam o CD56 e as células plasmáticas normais não o exibiam (Van Camp B et al, 1990).

No MM o CD56 está envolvido na interação da célula mielomatosa com a célula óssea. Praticamente 94% dos pacientes com MM expressam CD56, tanto nas células plasmáticas da medula óssea quanto nas circulantes. Foi observado que em diferentes estágios de progressão do MM ocorrem mudanças na expressão dessa molécula de adesão, como superexpressão em fases iniciais e perda de expressão na fase acelerada da doença e esses achados levam a crer que a ausência desse antígeno no MM está associada à expansão tumoral e posterior disseminação extramedular (Sahara et al, 2002).

O CD56 também tem sido estudado na leucemia de células plasmáticas e observado que ocorre perda de expressão do CD56, o que pode estar relacionado com a capacidade de disseminação das células neoplásicas por perda de aderência ao estroma medular e pode ter correlação com agressividade da doença (Deceunynck C et al, 1998).

O CD28 é um antígeno envolvido na ativação de linfócitos T e tem como ligantes receptores de células apresentadoras de antígenos (CD80 e o CD86). Quando estimulados prolonga e aumenta a produção da interleucina 2 e outras citocinas. É uma molécula importante na prevenção da indução de tolerância imunológica. Porém o papel mais importante dessa proteína é a interação com as células apresentadoras de antígenos (APCs) através de seus ligantes, o que desencadeia produção de inúmeras moléculas que participam de processos de diferenciação, proliferação e crescimento celular. Um desses produtos é a IL-6, pro-

duzida pelo macrófago e responsável pela proliferação dos plasmócitos neoplásicos do MM (Feldman M et al, 1998; Abbas KA et al, 2005).

Normalmente o CD28 não é expresso em plasmócitos e, curiosamente, pode ser detectado em plasmócitos malignos de pacientes com MM, provavelmente apenas em estágios mais agressivos da doença, durante a expansão tumoral (Sahara et al, 2004).

Estudos de Pellat-Deceunynck et al mostram que de um total de 14 casos de LCP secundária, 13 expressavam o CD28, fato não encontrado nos casos de LCP primária que não o exibem, demonstrando a utilidade desse marcador na distinção entre as duas entidades. (Deceunynck C et al, 1998).

O CD40 é o membro da família de proteínas de superfície cujo protótipo é o receptor do fator de necrose tumoral (TNF). A síntese e secreção de anticorpos pelos plasmócitos em resposta aos antígenos protéicos, como a proliferação e ativação de células B, são estimuladas por sinais mediados por CD40 e citocinas IL-2, IL-4, IL6 (Feldman M et al, 1998).

Estudos de Pellat-Deceunynck et al mostraram que geralmente células do MM expressam o antígeno CD40, porém essa molécula normalmente também é expressa em plasmócitos normais (Deceunynck C et al, 1994).

Expressão antigênica nas LPC

Pacientes portadores LCP apresentam positividade para o CD38 e expressão negativa para os antígenos associados a células B (CD20, CD10, CD24 e CD22). Porém, antígenos de células B maduras como o CD19 e CD20 podem ser expressos em um quarto dos casos de LCP. Em contrapartida moléculas de adesão, como o CD56, geralmente expressas nos casos de mieloma, são perdidas na fase leucêmica (Costelo R et al, 2001).

1.1 Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Padronizar a técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica para plasmócitos normais e mielomatosos.
2. Identificar os antígenos aberrantes (AA) e a sua frequência nos plasmócitos de pacientes portadores de MM.
3. Relacionar os AA com o prognóstico, através de achados clínicos e laboratoriais ao diagnóstico e estágio da doença.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Casuística

Foram estudados de maneira prospectiva 30 pacientes portadores de MM, sem tratamento prévio, admitidos no período de março de 2003 a outubro de 2004 na Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina e no Serviço de Hematologia Clínica do Hospital do Servidor Público Estadual “Francisco Morato de Oliveira”.

Grupo controle

Para controle, foram estudados imunofenótipos de plasmócitos em amostras de medula óssea de quatro indivíduos saudáveis, doadores de medula óssea, após consentimento informado.

Termo de consentimento

Todos os pacientes, bem como indivíduos do grupo controle, foram esclarecidos a respeito do estudo, sendo a coleta de dados clínicos e de material para exames laboratoriais realizada mediante o livre consentimento prévio e assinatura do Termo de Consentimento, aprovado pelo Comitê de Ética da UNIFESP-EPM e do HSPE FMO (anexos).

2.2 Métodos

- Dados clínicos laboratoriais ao diagnóstico

Os dados clínicos e laboratoriais foram coletados através do levantamento de prontuários. Os resultados da imunofenotipagem dos plasmócitos mielomatosos foram relacionados com a idade dos pacientes e com os exames laboratoriais para o diagnóstico e estadiamento clínico (hemoglobina, níveis séricos de creatinina, cálcio iônico, β 2M, albumina, eletroforese de proteína e imunofixação, para estudo das imunoglobulinas no soro e na urina, demonstração do componente monoclonal M na urina - proteinúria de Bence-Jones e avaliação radiológica do esqueleto). Foi considerada aberrante a presença de um antígeno habitualmente ausente nos plasmócitos normais.

- *Coleta das amostras*

No grupo controle foi utilizada células medulares de doadores de medula óssea, antes da mobilização. O material (cerca de 1,0ml de medula óssea) foi colhido em heparina, através de punção aspirativa por um médico hematologista e enviado para o laboratório e processados no mesmo dia.

Nos pacientes, as amostras de medula óssea foram coletadas para o diagnóstico de MM (mielograma) e para o estudo imunofenotípico. Para o mielograma, foram preparados esfregaços de medula óssea em lâminas, sem anticoagulantes, que foram coradas pela técnica de May Grünwald Giemsa. Foram feitas uma contagem do percentual de plasmócitos e sua análise morfológica.

O material para a realização da imunofenotipagem foi colhido em tubos contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e processado no mesmo dia.

Os materiais para demais exames laboratoriais (hemograma e exames bioquímicos) foram colhidos e processados pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Paulo e do Hospital do Servidor Público Estadual.

- *Separação e Congelamento das amostras*

Inicialmente, enquanto se aguardava a chegada dos reagentes para o estudo, as células dos pacientes foram congeladas, para a posterior imunofenotipagem.

a. Congelamento de medula óssea total em EDTA

Uma alíquota da MO em EDTA, de cerca de 30×10^6 células (10 a 50×10^6) em volume de 900 μ l foi transferida para um tubo de criopreservação. Acrescentou-se 100 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), para manutenção da viabilidade celular. Imediatamente as amostras foram levadas ao freezer a -20°C , sendo retiradas após 24 horas e transportadas para outro freezer a -80°C e posteriormente transferidas para o reservatório de nitrogênio líquido (-160°C) (Fiebig et al, 1997).

b. Congelamento das células mononucleares

Células mononucleares da medula óssea foram obtidas através de gradiente de centrifugação, utilizando a solução FICOLL-PAQUE (Pharmacia, densidade 1077), em tubo de ensaio de 12 ml. Sobre 3,0 ml de FICOLL foram colocados vagarosamente 7,0 ml de medula óssea e o tubo foi centrifugado durante 25 minutos a 1,8g. As células mononucleares (camada de interface entre Ficoll e plasma) foram retiradas e lavadas, três vezes, com tampão salino fosfatado (PBS).

Uma alíquota das células mononucleares lavadas foi retirada para contagem celular no aparelho automatizado de hemograma (Coulter T-890). Após a contagem, a quantidade foi ajustada para o limite de 10×10^6 a 30×10^6 células por ml de solução criopreservante (10% de DMSO, 20% de soro fetal bovino e 70% de meio de cultura RPMI).

As amostras foram levadas ao freezer a -20°C , sendo transportadas para outro freezer a -80°C após 24 horas e posteriormente transferidas para o reservatório de nitrogênio líquido.

- *Descongelamento das amostras*

As células transferidas para o reservatório de N₂ líquido foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37°C com continua homogeneização e imediata adição de solução de RPMI com 10% de soro fetal, a 4°C . Depois a amostra foi centrifugada e o sobrenadante desprezado. O passo final após 2 lavagens foi a ressuspensão da amostra em RPMI com 10% de soro fetal e avaliada a viabilidade celular utilizando-se o corante azul de trypan.

Foram descongeladas oito amostras de MO com EDTA para ensaios de imunofenotipagem, porém a viabilidade das amostras foi baixa (inferior a 25%) fato que conduziu o estudo em outra direção, o uso de amostras frescas ao diagnóstico. Posteriormente, as amostras passaram a serem congeladas utilizando o FICOLL-PAQUE para separar células mononucleares do excesso de proteínas que hipoteticamente polimerizam o plasma gerando esse efeito nas células congeladas.

As amostras (controle, pacientes MM) foram processadas a fresco e no ato da coleta. Para amostras controles utilizamos doadores de MO com amostras mobilizadas.

- *Estudo dos marcadores de superfície celular (utilização de células a fresco)*

Em tubos falcon previamente identificados, foram colocados 50 a 100 μ l da amostra de medula contendo cerca de 1×10^6 células, com posterior adição de anticorpos monoclonais conjugados com isotianato de fluoresceína (FITC), *Phico-eritrin* (PE), *Peridin chlorophyl protein* (PercP) e *allo phico cyanin* (APC) (anexo 1), na quantidade recomendada pelo fabricante ou acertada pela prévia titulação. As células foram incubadas por 15 minutos protegidos da luz à temperatura ambiente. Após este tempo adicionou-se 2 ml de solução de lise (FACSLysing, BD) com homogeneização e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente e protegidos da luz. Depois do procedimento de lise, as amostras foram lavadas com 4 ml PBS azida e numa fase final as células foram fixadas em 400 μ l de solução de formaldeído a 1%. Foi utilizado um painel de tubos contendo anticorpos monoclonais, conforme listados na tabela 4.

Captação e análise da reatividade celular aos anticorpos foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, San José, CA.). Foram analisados 10.000 a 50.000 eventos em plasmócitos identificados como células CD45⁻, CD38⁺⁺ e CD138⁺⁺⁺ utilizando os programas, CELLQUEST e PAINT-A-GATE-PLUS (Becton-Dickinson). Os antígenos foram definidos como positivos, considerando o limite de 20% de células plasmáticas com expressão positiva.

Tabela 4 - Painel de tubos contendo anticorpos monoclonais, utilizados para a identificação de antígenos de superfície e citoplasmáticos.

PARA ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE

(a) Tubos	(b) FITC	PE	PercP	APC
01	CD4	CD8	CD3	-
02	CD19	CD56	CD45	CD38
03	CD138	CD33	-	-
04	CD138	CD13	-	-
05	CD28	CD138	-	-
06	CD10	CD138	CD45	-
07	CD138	CD20	-	-
08	CD138	CD117	-	-
9	HLA-DR	CD38	CD45	-
10	CD138	CD22	CD45	-
11	γ_1 (GAMA1)	CD138	CD45	-
12	γ_1 (GAMA1)	γ_2 (GAMA2)	CD45	-

Tabela 4 - Painel de tubos contendo anticorpos monoclonais, utilizados para a identificação de antígenos de superfície e citoplasmáticos (continuação).

PARA ANTÍGENOS CITOPLASMÁTICOS

Tubos	FITC	PE
14	Gama γ_1	CD138
15	Kappa (κ)	CD138
16	Lambda (λ)	CD138

- *Estudo dos marcadores citoplasmáticos*

Em três tubos Falcon, foram colocadas $1-2 \times 10^6$ células mononucleares (em volume de 100 μ l da amostra, no máximo) e adicionado o anticorpo de superfície (CD138 PE). As células foram incubadas sob proteção da luz a temperatura ambiente, por 15 minutos. A seguir foram acrescentados 100 μ l do reagente 1 de kit de permeabilização (Intraprep – Coulter Immunotech) em cada tubo e deixados por 15 minutos. As amostras foram lavadas em 4ml de PBS, e acrescidas de 100 μ l do reagente 2 do kit Intraprep para fixação, incubando as células por mais 5 minutos protegidos da luz e em temperatura ambiente.

Procedeu-se a marcação das células com 5 µl de antígeno anti-IgG isótipo controle negativo, anti-kappa e anti-lambda (FITC) em cada tubo e nova incubação de 15 minutos. Após a lavagem com solução de PBS, as células foram fixadas em 400 µl de solução formaldeído a 1%. A captura e análise de reatividade das amostras foram realizadas conforme anteriormente descrita.

- Estudo da doença residual mínima

A avaliação imunofenotípica dos pacientes com MM foi realizada ao diagnóstico e após um ano de realização do transplante de medula óssea. O método utilizado para determinação dos plasmócitos residuais teve como base os estudos de San Miguel et al, 2002. Utilizamos um painel de anticorpos com quatro combinações: CD138/CD56/CD19/CD38, CD138/CD117/CD19/CD38, CD138/CD33/CD19/CD38. Os antígenos aberrantes identificados ao diagnóstico foram utilizados na detecção das células residuais. Para aumentar a sensibilidade técnica utilizamos duas etapas para aquisição. Na primeira realizamos 30.000 eventos totais e na segunda etapa foram adquiridos através de *gates* seqüenciais 300.000 eventos em células CD138⁺. Nos dois casos foram utilizados isótipos controles negativos (FL1/FL2/FL3/FL4).

Para análise dos dados utilizamos o Software Paint-A-Gate Pro que permitiu a purificação da amostra com eliminação de debris e células mortas e a distinção entre os PCs normais e mielomatosos. Os plasmócitos foram considerados normais quando expressavam o seguinte fenótipo: CD138⁺, CD38⁺, CD19⁺, CD56⁻, CD117⁻, CD33⁻.

2.4 Análise Estatística

A relação entre a expressão dos antígenos aberrantes (AA) e os parâmetros clínico-laboratoriais (idade, sexo, hemoglobina, albumina, creatinina, β_2 M, cálcio iônico, relacionados ao prognóstico de MM) foi realizada utilizando-se o test-t (comparando os valores médios e os níveis considerados de corte para o prognóstico). Outros parâmetros como β_2 M e cálcio iônico foi também avaliados através do teste Mann-Whitney. Para análise do CD56 e do CD117 foi também utilizado o método de Fisher. O valor foi considerado estatisticamente significativo quando o p era igual ou inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 - Dados Clínicos e Laboratoriais

A idade média dos 30 pacientes foi de 62,6 anos e mediana de 61,5 anos (variação 27 a 79 anos). A relação entre os sexos foi masculino:feminino = 2,5 : 1 (Tabela 5).

Em relação ao hemograma inicial, o valor da hemoglobina variou de 4,2 g/dl a 13,7 g/dl com média de 8,4 g/dl. Os glóbulos brancos variaram de $3,2 \times 10^9/L$ a $16,5 \times 10^9/L$, com média de $7,0 \times 10^9/L$ e as plaquetas variaram de $66,0 \times 10^9/L$ a $465,0 \times 10^9/L$, média de $200,0 \times 10^9/L$. O valor médio da porcentagem de células plasmáticas na medula óssea foi 40%, com variação de 10% a 89%. Em relação à morfologia, 9 dos 30 pacientes com MM, apresentavam morfologia plasmablástica (com porcentagem média de 8,0%, variação de 3,5 a 12,5 %)

Tabela 5 - Dados clínicos, de hemograma e de medula óssea dos pacientes com MM.

	Sexo M/F	Idade (anos)	Hb (g/dl)	GB ($\times 10^9/L$)	Plaquetas ($\times 10^9/L$)	MO (%plasm)
N	18/12	30	30	30	30	30
média \pm DP		62,6 \pm 12,02	8,4 \pm 2,03	7,0 \pm 2,94	199,0 \pm 96,9	40 \pm 23,2
Mediana		61,5				
Variação		27-79	4,2-13,7	3,2-16,5	66,0-465,0	10 - 89

A imunoglobulina IgG foi a mais freqüente ocorrendo em 60% dos casos, seguida de cadeias leves (26%), predominando casos com cadeia κ (70%) sobre λ (30%), apenas 14% dos casos expressaram IgA. Não foi encontrado no estudo nenhum caso de mieloma não secretor.

Vinte e cinco pacientes tiveram os resultados de $\beta 2$ microglobulina sérica ($\beta 2M$) disponíveis e a grande maioria (23/25 - 92%) apresentou valores aumentados (normal 0,7-2,7 mg/dl). A média dos valores de $\beta 2M$ foi 7,6 mg/dl, com variação entre 2,0 mg/dl e 33 mg/dl. Considerando-se os valores de corte relacionados ao prognóstico (ISS), observamos que quatro dos 25 pacientes (16%) apresentavam valores inferiores a 3,5 mg/dl, sete (28%) entre 3,5 a 5,5 e quatorze (56%) acima de 5,5 mg/dl (tabela 6).

Tabela 6 - Resultados dos exames bioquímicos: β 2 microglobulina, albumina, creatinina e cálcio iônico séricos em pacientes com MM

	β 2 M (mg/dl)	Albumina (g/dl)	Creatinina (mg/dl)	Ca. iônico (mg/dl)
N	25	28	30	25
Média/ Desvio padrão	7,6 \pm 6,33	3,1 \pm 0,68	2,2 \pm 1,83	1,40 \pm 0,81
Variação	2,0 - 33,0	2,2 - 4,8	0,7 - 7,1	1,02 - 2,3
Valor de referência:	> 2,70	< 3,90	> 1,20	> 1,30
Valores Inferiores*	< 3,5 = 04 (16%)	< 3,5 = 08 (29%)	\leq 2,0 = 20 (67%)	> 1,30 = 15 (60%)
Valores Superiores*	3,5 - 5,5 = 7 (28%) \geq 5,5 = 14 (56%)	\geq 3,5 = 20 (71%)	\geq 2,0 = 10 (33%)	< 1,30 = 10 (40%)

* valores superiores e inferiores foram divididos levando em conta os valores de corte estabelecidos pelos sistemas de estadiamento de Durie&Salmon e ISS.

Análise dos valores da albumina sérica de 28 pacientes mostrou que a grande maioria apresentava hipoalbuminemia (< 3,9g/dl) e a média dos valores foi 3,1 g/dl, variando entre 2,2 g/dl e 4,8 g/dl. Em relação ao valor utilizado pelo ISS, notou-se que a maioria (20 pacientes ou 72%) apresentou resultados inferiores a 3,5g/dl e apenas 8 pacientes (28%) resultados acima deste valor (> 3,5 g/dl) (tabela 6).

Os níveis séricos de creatinina variaram de 0,7 mg/dl a 7,1 mg/dl com média de 2,2 mg/dl. Vinte e três pacientes (76%) apresentavam creatinina sérica aumentada (> 1,2mg/dl), enquanto 07 (24%) apresentavam valores ainda dentro da normalidade. Com relação ao valor 2,0 mg/dl, considerado de prognóstico para estadiamento Durie&Salmon, 20 casos (66%) apresentaram resultados inferiores e 10 (32%) resultados superiores a esse valor (tabela 6).

Para avaliação do cálcio foi utilizado o cálcio ionizável, pois reflete melhor a quantidade de cálcio, por não sofrer influência do nível sérico de albumina. Os valores de cálcio iônico variaram de 1,02 a 2,33 mg/dl, com média de 1,40 mg/dl. Dos 25 pacientes com resultados de cálcio ionizável disponíveis, 10 (39%) apresentavam valores inferiores a 1,30 mg/dl e 15 (60%) exibiram valores superiores a 1,30 mg/dl.

A distribuição dos pacientes de acordo com o estadiamento clínico de Durie&Salmon (D-S) está apresentada na tabela 7. Observou-se que a maio-

ria dos pacientes incluídos no estudo possuía doença avançada, com 90% dos casos pertencentes ao estágio III, 6,4% ao estágio II e apenas um caso (3,6%) foi classificado como estágio I. Assim, por essa razão, a análise dos imunofenótipos em relação ao estadiamento D-S ficou prejudicada.

Em relação ao estadiamento internacional do MM (ISS), que leva em consideração apenas o nível sérico de β_2 microglobulina e de albumina sérica, houve uma melhor distribuição dos pacientes: quatro casos (16%) eram estágio I, oito casos (32%) eram estágio II e 13 (52%) estágio III (tabela 7).

Tabela 7 - Classificação dos pacientes com MM de acordo com o sistema de estadiamento Durie&Salmon (D-S) e ISS (sistema de escore internacional).

Sistema. DS	N		sistema ISS	N	
estádio I	01	3%	estádio I	04	16,0%
estádio II	02	6%	estádio II	08	32,0%
estádio III	27	91 %	estádio III	13	52.0%
(IIIa)	(17)	(58%)			
(IIIb)	(10)	(33%)			
Total	27			25	

3.2 - IMUNOFENOTIPAGEM DOS PLASMÓCITOS

3.2.1. Imunofenótipo dos plasmócitos normais

Foram estudados plasmócitos de medula óssea de 4 indivíduos saudáveis, doadores de MO para transplante alogênico e avaliados quanto à expressão dos antígenos CD38, CD138, CD45, CD19 e CD56 para caracterização imunofenotípica (tabela 8). Todos os casos apresentaram reação positiva para CD19, CD45, CD38 e CD138 e cadeias leves kappa e lambda. A reatividade do CD38 e CD138 foi alta e com elevada intensidade. No entanto, a reatividade do CD45 e CD19 foi mais baixa, sendo que a média do CD45 foi 50%

(43% a 60%) e a média do CD19 foi 44,8% (28% a 60%). A intensidade do CD45 e do CD19 foi moderada em quatro casos e um caso apresentou CD19 de alta intensidade. O CD56 foi negativo (<20%). Não houve reatividade aos antígenos CD10, CD20, CD22, CD28, CD13, CD33, CD56 e CD117 em nenhum deles.

Tabela 8 - Imunofenótipos dos plasmócitos de doadores saudáveis de medula óssea (controle normal)

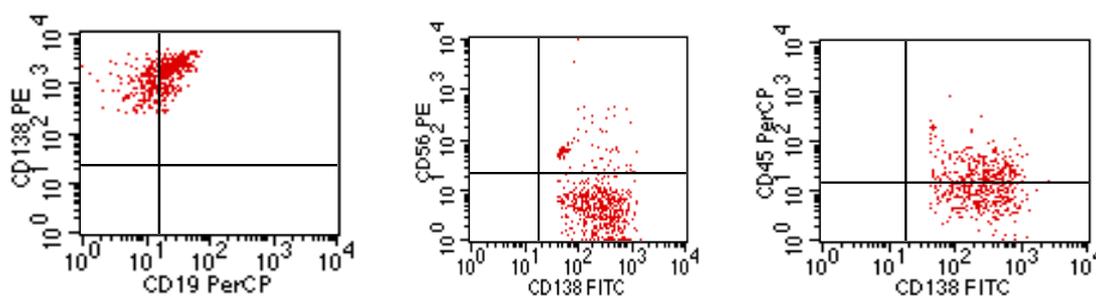
No	CD38/138* (N = 4)	CD45 (N = 4)	CD19 (N = 4)	CD56 (N = 4)	κ (N = 4)	λ (N = 4)	CD40 (N = 3)
1	++/+++	50%	54%	10%	50%	16%	98%
2	++/+++	44%	35%	10%	62%	39%	-
3	++/+++	59%	60%	13%	63%	20%	95%
4	++/+++	54%	28%	06%	NR	NR	97%
<i>M</i>		45,8%	44,8%		61	26	97,2%

Obs. a expressão foi considerada positiva quando $\geq 20\%$ das células eram positivas.
seleção dos plasmócitos em células CD38 e CD138⁺⁺⁺

M - média de células positivas.

Na figura 1 encontra-se o gráfico em *dot plot* da expressão de CD45, CD19, CD138 e CD56 nos plasmócitos normais de um caso controle.

FIGURA 1 - Exemplo de um gráfico em *dot plot* mostrando a expressão do CD45, CD19, CD138 e CD56 em um doador de MO (controle normal).



3.2.2. Imunofenótipo dos plasmócitos de pacientes com MM

Os plasmócitos mielomatosos também expressaram CD38 e CD138 de forte intensidade em todos os casos e, ao contrário dos normais, a maioria foi negativa para CD19, CD45. Houve um caso que expressou CD19 em alta intensidade. Além disso, a maioria dos casos de MM (74,2 %) apresentou reatividade para CD56 e a intensidade de expressão foi alta; houve positividade variável para os demais antígenos estudados. Os antígenos citados na tabela abaixo não foram considerados aberrantes e foram utilizados para distinção entre os plasmócitos normais e os dos pacientes portadores de MM.

Tabela 9 – Imunofenótipo dos plasmócitos dos 30 pacientes com MM

AcMo	N	Positivo % (N)	Média	Varição
CD138	30	100 (30)	95	88,0 - 100,0
CD38	30	100 (30)	90	85 - 100
CD45	30	19 (6)	13	30 - 98,0
CD19	30	3,2 (1)	-	86
CD40	28	100 (28)	91	65 - 100
Kappa	30	70 (21)	81,6	40,0 – 97,0
Lambda	30	30 (9)	83,8	65,0 - 100

Esses antígenos não foram considerados aberrantes

A expressão dos antígenos foi considerada positiva quando presente em $\geq 20\%$ das células.

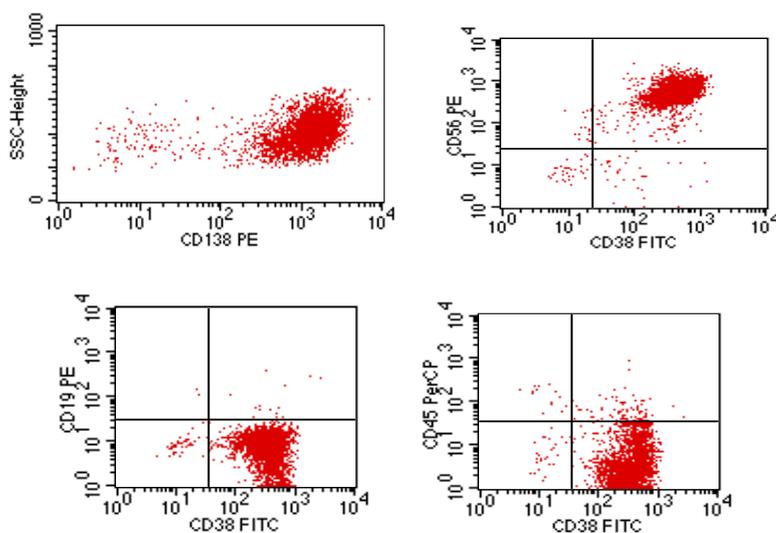
Média - valor médio do número de células positivas para cada antígeno

AcMo - anticorpo monoclonais; variação = mínima e máximo das células positivas

Seleção para análise em células CD38 e CD138 positivas.

A figura 2 apresenta gráficos em dot plot da expressão de CD138, CD38, CD56, CD19 e CD45 em plasmócitos de um paciente com MM, através da forte expressão dos AcMo CD138⁺⁺⁺ e CD38⁺⁺⁺ e da expressão negativa do CD56 e CD45.

FIGURA 2 - Exemplo de um gráfico em dot plot mostrando a expressão do CD38, CD138 e CD56 CD45 CD19 em um paciente com MM



Na tabela 10 encontram-se os resultados da avaliação dos outros marcadores nos plasmócitos mielomatosos, habitualmente ausentes em plasmócitos normais e considerados antígenos aberrantes (CD56, CD117, CD33, CD13, CD28, CD10, CD22, CD20, CD14, CD16, HLA-DR). Plasmócitos de todos os nossos controles normais também foram negativos para esses antígenos.

Tabela 10 – Frequência dos antígenos aberrantes nos plasmócitos medulares dos pacientes com MM de acordo com a expressão de CD56, CD117, CD33, CD13, CD28, CD10, CD22, CD20, CD14, HLA-DR.

AcMo	N	Positivo % (N)	Média	Variação
CD56	30	76,7 (23)	96,0	55,0 - 100,0
CD117	30	60 (18)	69,9	28,7 - 99,5
CD33	30	30,0 (9)	59,7	21,1 - 99,5
CD13	30	26,7 (8)	44,3	20,7 - 96,9
CD28	30	20,0 (6)	57,2	20,4 - 95,9
CD10	30	10,0 (3)	30,6	28,6 - 34,2
CD22	30	10,0 (3)	48,0	33,5 - 67,8
CD20	30	10,0 (3)	65,5	29,8 - 97,9
HLA-DR	25	4,0 (1)	65,5	65,5

A expressão dos antígenos foi considerada positiva quando presente em $\geq 20\%$ das células.

Média - valor médio do número de células positivas para cada antígeno

AcMo - anticorpo monoclonais; variação = mínima e máximo das células positivas

Vinte e nove dos 30 (96,6%) pacientes com MM apresentaram expressão de pelo menos um marcador aberrante. O mais freqüente de todos foi o CD56 (76,7% dos casos), seguido de CD117 que ocorreu em dezenove dos 30 pacientes estudados (60%). A média de células positivas para CD117 foi 69,9%, com variação de 28,7 a 99,8%.

Com relação a outros antígenos mielóides (CD13 e CD33), nove pacientes (30%) expressaram CD33, com média de positividade de 59,7% das células e oito pacientes (26,7%) foram positivos para o CD13, com valor médio de positividade de 44,7% das células.

O CD28 estava presente em 6 pacientes (20%), com média de 57,2%, porem quatro casos positivos apresentaram alta intensidade de expressão.

Os antígenos linfóides apresentaram baixa freqüência com três casos (10%) expressando o CD10, CD20 e/ou CD22, sendo que todos os casos CD10 positivos foram de baixa intensidade. O CD20 foi expresso em alta intensidade em dois casos (65,5% e 98% das células). O antígeno leucocitário humano (HLA-DR) também foi expresso em apenas um caso com positividade para 69% das células plasmáticas.

Em relação à associação entre os antígenos mielóides, seis casos (19,3%) expressaram simultaneamente o antígeno CD13 e CD117, quatro casos co-expressaram CD33 e CD117 (13%) e apenas um caso apresentou expressão dos três antígenos mielóides (CD13, CD33, CD117), sendo esse último o único caso de co-expressão entre o CD13 e o CD33.

Os antígenos aberrantes foram comumente expressos em associação (tabela 11). Dentre 30 pacientes apenas um (3,4%) não expressou nenhum antígeno aberrante e seis pacientes (20%) expressaram apenas um antígeno. Dez pacientes (33,6%) expressavam dois antígenos concomitantemente e 7 pacientes (23,7%) três antígenos; além disso, um paciente expressou cinco antígenos aberrantes e um apresentou seis antígenos. A associação mais freqüente foi entre o CD56 e CD117 incluídos nos pacientes que apresentavam associação de dois antígenos.

Tabela 11. Associação dos antígenos aberrantes expressos concomitantemente em 30 pacientes com MM.

Número de Antígenos aberrante	Tipos de Fenótipos	Número de Pacientes	Total Pacientes (%)
0		1	1 (3,4)
1	CD56+ CD117+ CD28+	3 2 1	6 (20)
2	CD13+/CD56+ CD117+/CD56+ CD33+/CD56+ CD10+/CD33+ CD13+/CD117+ CD28+/CD56+	1 4 1 1 1 2	10 (33,6)
3	CD13+/CD117+/CD28+ CD33+/CD117+/CD56+ CD20+/CD117+/CD56+ CD13+/CD117+/CD56+ CD28+/CD117+/CD56+ CD10+/CD33+/CD56+	2 1 1 1 1 1	7 (23,3)
4	CD13+/CD22+/CD117+/CD56+ CD13+/CD33+/CD117+/CD56+ CD13+/CD33+/CD28+/CD117+ CD13+/CD20+/CD117+/CD56+	1 1 1 1	4 (13,4)
5	CD10+/CD22+/CD13+/CD117+/CD56+	1	1 (3,4)
6	CD13+/CD117+/CD20+/CD22+/CD28+/HLA-DR+	1	1 (3,4)
Total (N)		30	30 (100)

3.3 - Relação entre a expressão dos antígenos aberrantes e os dados clínico-laboratoriais.

3.3.1 - Análise da expressão do CD56

Na tabela 12 encontram-se o resumo da análise estatística para caracterização clínica e biológica dos pacientes com MM em relação aos parâmetros CD56⁻ e CD56⁺.

Tabela 12 - Características Clínicas e Biológicas dos pacientes com Mieloma Múltiplo CD56⁻ e CD56⁺

	CD56- (n = 7)	CD56+ (n = 23)	p
Idade (em anos)*	59,1 ± 3,2	63,7 ± 13,5	
Hemoglobina (g/dl)*	8,2 ± 1,7	8,6 ± 2,1	0,636
Creatinina (mg/dl)*	2,6 ± 2,1	2,1 ± 1,8	0,578
Albumina (g/dl)*	2,9 ± 0,6	3,2 ± 0,7	0,319
Cálcio Ionizável (mg/dl)*	1,6 ± 0,5	1,3 ± 0,2	0,033
β2-microglobulina (mg/dl)*	13,4 ± 9,1	5,4 ± 2,9	0,003
Componente monoclonal			
IgG N (%)	2 (29)	16 (70)	
IgA N (%)	1 (14)	3 (13)	
Cadeia leve kappa N (%)	6 (86)	15 (65)	
Cadeia leve lambda N (%)	1 (14)	8 (35)	
Estágio Clínico de Durie&Salmon			
I N (%)	0	1 (4)	
II N (%)	0	1 (4)	
III A N (%)	3 (42)	14 (62)	
III B N (%)	4 (58)	7 (30)	
Estágio Clínico Internacional			
I N (%)		5 (25)	
II N (%)	1 (14)	7 (30)	
III N (%)	6 (86)	11(47)	

* Os resultados expressam a média ± SD:

* Método estatístico teste t.

Em relação à distribuição etária dos pacientes, os dois grupos apresentaram idades médias próximas, com média de 63,7 anos para os pacientes CD56⁺ e 59,1 anos para o grupo CD56⁻.

Os pacientes que perderam a expressão do CD56 apresentaram associação com elevados níveis de β₂-microglobulina, sendo o valor médio do grupo CD56 negativos de 13,4 mg/dl e no grupo CD56 positivos de 5,4 mg/dl . Essa diferença foi significativa ($p= 0,003$).

Outro parâmetro que mostrou diferença foi o cálcio iônico. O valor médio do cálcio ionizável (marcador relacionado com atividade óssea) estava mais elevado (1,60 mg/dl) nos pacientes com perda de expressão dessa molécula de adesão em relação aos CD56⁺ (1,30 mg/dl) ($p = 0.033$).

Não foi encontrada diferença clínica significativa quando comparados os CD56⁻ e CD56⁺ e os demais exames laboratoriais (creatinina, hemoglobina, albumina).

Tabela 13 - Expressão do CD56 em relação a idade, estadiamento, $\beta 2$ - microglobulina, albumina, creatinina, cálcio séricos e hemoglobina.

Dados clínicos laboratoriais	CD56 +	CD56 -	p
Idade			
mediana	63,7	59	
média \pm DP	63,7 \pm 13,5	60,8 \pm 5,7	
N	N = 18	N = 8	
Estadiamento ISS			
I	1 (4,0%)	1 (12,5)	
II	10 (57%)		
III	7 (39%)	7 (87,5)	
N	N =18	N = 08	
$\beta 2M$ (mg/dl)			
<5,5	11 (61%)	01 (12,5%)	0,03 *
$\geq 5,5$	07 (39%)	07 (87,5%)	
Média \pm DP	5,4 \pm 2,9	13,4 \pm 9,2	0,003**
Albumina (g/dl)			
N	N = 20	N = 08	
< 3,5	13 (65%)	06 (75%)	1,0*
$\geq 3,5$	07 (35%)	02 (25%)	
Média \pm DP	3,2 \pm 07	2,9 \pm 06	0,18**
creatinina (mg/dl)			
N	N = 23	N = 07	
< 2,0	16 (70%)	05 (62,5%)	1,0*
$\geq 2,0$	07 (30%)	03 (37,5%)	
Média \pm DP	2,1 \pm 1,8	2,6 \pm 2,0	0,9**
Calcio iônico (mg/dl)			
N	N = 20	N = 06	
<1,25	06 (30%)	01 (16,6%)	1,0*
$\geq 1,25$	14 (70%)	05 (83,3%)	
Média \pm DP	1,3 \pm 2,0	1,6 \pm 0,5	0,03**
Hemoglobina (g/dl)			
n	n=23	n=08	
< 8,5	12 (52%)	04 (50%)	1,0 *
$\geq 8,5$	11 (48%)	04 (50%)	
Média \pm DP	8,6 \pm 2,1	8,4 \pm 1,7	0,7**

*Método estatístico de Fisher,

** Método de Mann Whitney

Em relação ao componente monoclonal nos pacientes com CD56⁺, constatou-se a predominância de IgG (69,6%), seguido de IgA (14,2%). Apenas quatro pacientes (17,4%) expressaram cadeias leves kappa ou lambda. A cadeia leve predominante foi a kappa com 65,2% e 34,8% eram lambda.

Já no grupo CD56⁻, apenas 28,7% eram IgG e 14,2% IgA. A cadeia leve kappa predominou sobre a lambda, 85,8% e 14,2%, respectivamente.

Em relação ao estadiamento clínico de Durie&Salmon, todos os pacientes CD56⁻ pertenciam ao estágio III. Já entre os pacientes CD56⁺ um era estágio I (4,3%), dois estágio II (4,3%) e diferente dos pacientes CD56⁻, 60,9% pertenciam ao estágio IIIA (creatinina < 2mg/dl) e 30,5% eram IIIB (com função renal alterada com creatinina acima de 2mg/dl).

Quando separamos os grupos levando em conta o estadiamento internacional do MM (ISS), dos 8 pacientes com CD56⁻ apenas um (12,5%) era estágio I e 7 (87,5%) eram estágio III enquanto no grupo CD56⁺, apenas 7 pacientes (39%) eram estágio III, sendo um (4%) no estágio I, 10 (57%) no estágio II.

3.3.2 - Análise da expressão dos antígenos mielóides

A análise dos antígenos mielóides (CD13, CD14, CD33, CD117) foi realizada considerando dois grupos: os pacientes com expressão de 0-1 antígeno mielóide, denominado de grupo mielóide 1 (19 pacientes) e os pacientes que expressaram mais que um antígeno mielóide, denominado grupo mielóide 2 (11 pacientes) (tabela 14).

Quando comparamos esses grupos encontramos que a média da idade foi semelhante nos dois grupos: média de 63,7 para os pacientes do grupo mielóide 1 e de 60,7 para os pacientes do grupo 2).

Em relação às características clínicas e laboratoriais os pacientes de ambos os grupos não apresentaram diferença significativa nos diferentes parâmetros. Apenas a creatinina sérica mostrou uma tendência a valores médios mais elevados no grupo mielóide 1 ($p=0,06$).

Em relação ao componente monoclonal, no grupo mielóide 1, 53% dos pacientes apresentavam IgG, 30% cadeias leves e apenas 17% IgA. A fre-

qüência de cadeia kappa foi maior (70%) que lambda (30%). Já no grupo mielóide 2, em 75% dos casos o componente monoclonal foi IgG, seguido de 16,7% de cadeia leve e 8,3% de IgA. Na análise das cadeias leves observou-se também predominância de kappa (75%), com apenas 25% de cadeia lambda.

Tabela 14 - Características Clínicas e Biológicas dos pacientes com Mieloma Múltiplo em relação aos antígenos mielóides.

	Mielóides 1 (n = 19)	Mielóides 2 (n = 11)	p
Idade (em anos)*	63,7 ± 10,1	60,7 ± 15,1	
Hemoglobina (g/dl)*	8,4 ± 1,6	8,7 ± 2,6	0,731
Creatinina (mg/dl)*	2,7 ± 2,2	1,5 ± 0,6	0,065
Albumina (g/dl)*	3,2 ± 0,6	3,2 ± 0,9	0,713
Cálcio Ionizável (mg/dl)*	1,5 ± 0,4	1,3 ± 0,1	0,500
β2-microglobulina (mg/dl)*	6,9 ± 3,8	8,8 ± 9,1	0,467
Componente monoclonal			
IgG N (%)	10 (53)	8 (73)	
IgA N (%)	3 (17)	1 (9)	
Cadeia leve kappa N (%)	13 (70)	9 (75)	
Cadeia leve lambda N (%)	6 (30)	2 (25)	
Estágio Clínico de Durie&Salmon			
I N (%)	0	1 (9,0)	
II N (%)	2 (10)	0	
III A N (%)	9 (48)	7 (64)	
III B N (%)	8 (42)	3 (27)	
Estágio Clínico Internacional			
I N (%)	5 (26)	3 (25)	
II N (%)	7 (37)	3 (25)	
III N (%)	5 (26)	5 (50)	

* Os resultados expressam a média ± SD:

Mielóide 1 = Marcadores Mielóide 0 e 1

Mielóide 2 = Marcadores Mielóide maior do que 1

A comparação nos diferentes estádios Durie e Salmon foi prejudicada pelas características da amostra, havendo predomínio de estágio III e praticamente ausência de estágios precoces.

Em relação ao estadiamento internacional do MM, observamos que tanto no grupo mielóide 1 quanto no mielóide 2 houve homogeneidade entre os estágios com predominância do estágio III (40% dos casos no grupo mielóide 1 e 50% no mielóide II).

3.3.2.1 Análise da expressão do CD117

Quando analisamos os parâmetros clínicos e laboratoriais não encontramos diferenças significantes entre os grupos CD117⁺ e CD117⁻. Os resultados da análise de todos os parâmetros estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15 - Características Clínicas e Biológicas dos pacientes CD117⁺ e CD117⁻ com MM.

	CD117- (n = 12)	CD117+ (n = 18)	p
Idade (em anos)*	63,8 ± 9,6	61,8 ± 13,6	
Hemoglobina (g/dl)*	7,3 ± 4,1	7,9 ± 7,6	0,605
Creatinina (mg/dl)*	2,4 ± 1,7	2,1 ± 1,9	0,636
Albumina (g/dl)*	3,2 ± 0,6	3,2 ± 0,7	0,921
Cálcio Ionizável (mg/dl)*	1,6 ± 0,4	1,3 ± 0,1	0,028
β2-microglobulina (mg/dl)*	8,3 ± 1,3	8,7 ± 2,4	0,605
Componente monoclonal			
IgG N (%)	6 (50)	12 (66)	
IgA N (%)	1 (16)	2 (10)	
Cadeia leve kappa N (%)	8 (65)	14 (78)	
Cadeia leve lambda N (%)	4 (25)	4 (22)	
Estágio Clínico de Durie&Salmon			
I N (%)	1 (8,0)	1 (5,0)	
II N (%)	1 (8,0)	1 (5,0)	
IIIA N (%)	7 (59)	10 (56)	
IIIB N (%)	3 (25)	6 (34)	
Estágio Clínico Internacional			
I N (%)	1 (8,0)	1 (5,0)	
II N (%)	3 (25)	2 (26)	
III N (%)	8 (67)	12 (68)	

* Os resultados expressam a média ± SD:

Análise destes dados utilizando-se os valores de corte relacionados ao prognóstico encontram-se na tabela 15.

Pacientes de ambos os grupos apresentavam idade mediana semelhante : 62 anos no grupo CD117⁺ e 64 anos no grupo CD117⁻.

Da mesma forma, os pacientes CD117⁺ e CD117⁻ apresentaram valores médios semelhantes de β2M, 8,7 mg/dl e 8,3 mg/dl, respectivamente. Com relação aos valores de albumina, maior número de pacientes (13 de 19 = 67%) CD117⁺ apresentaram níveis inferiores a 3,5 g/dl, enquanto que no grupo CD117⁻, ao contrário, houve predomínio de valores > 3,5 g/dl (6 de 9 = 67%) (tabela 16). Essa diferença, no entanto, não foi significante.

Tabela 16 - Expressão do CD117 em relação a idade, estadiamento, β 2 microglobulina, albumina, creatinina, cálcio séricos e hemoglobina.

Dados clínicos laboratórios	CD117 +	CD117 -	p
Idade			
Mediana	62	61	
Média \pm DP	62,4 \pm 13,5	63,7 \pm 4,7	
N	N = 19	N = 12	
Estadiamento ISS			
I			
II			
III			
β 2M(mg/dl)	n= 16	n=10	
<5,5	08 (50%)	04 (40%)	0,70 *
\geq 5,5	08 (50%)	06 (60%)	
média \pm DP	7,7 \pm 7,4	7,3 \pm 4,1	0,80**
Albumina (g/dl)	n=19	n=09	
< 3,5	13 (67%)	03 (33%)	1,0*
\geq 3,5	06 (33%)	06 (67%)	
média \pm DP	3,1 \pm 07	3,2 \pm 06	0,90**
Creatinina (mg/dl)	n= 19	n=12	
\leq 2,0	14 (74%)	07 (59%)	0,44*
\geq 2,0	5 (26%)	05 (41%)	
média \pm DP	2,0 \pm 1,9	2,4 \pm 1,7	0,55**
Calcio iônico (mg/dl)	n=15	n= 10	
< 1,25	05 (33%)	02 (20%)	0,65*
\geq 1,25	10 (67%)	08 (80%)	
média \pm DP	1,3 \pm 0,1	1,6 \pm 0,4	0,02**
Hemoglobina (g/dl)	n=19	n=12	
< 8,5	09 (47%)	07 (59%)	0,7 *
\geq 8,5	10 (53%)	05 (41%)	
média \pm DP	8,7 \pm 2,4	8,3 \pm 1,2	0,55**

Em relação aos níveis de creatinina sérica, os pacientes CD117⁻ apresentaram média de 2,4 mg/dl e os pacientes CD117⁺ exibiam níveis médios de 2,1 mg/dl.

A análise do cálcio ionizável mostrou que dos quinze pacientes CD117⁺, dez (67%) apresentavam valores superiores a 1,25 mg/dl e cinco (33%) pacientes possuíam níveis inferiores a 1,25 mg/dl. No grupo CD117⁻, também a maioria apresentou valores $>1,25$ (8/10=80%). No entanto, o valor médio de cálcio ionizável dos pacientes CD117⁺ foi menor que a média nos

pacientes CD117- (1,30 mg/dl e 1,60 mg/dl, respectivamente), com diferença significativa entre os grupos ($p = 0,02$).

3.3.3 - Análise da expressão do CD28

A análise da expressão do CD28 foi realizada em 30 pacientes ao diagnóstico e foi comparada com as variáveis clínicas e laboratoriais. A expressão do CD28 foi negativa em 24 (80,0%) pacientes e positiva em 6 (20%), variando a positividade da expressão nas células entre 20,4% e 95,9%, com média de 15,5%.

A tabela 17 ilustra a análise dos grupos CD28⁻ e CD28⁺ em relação aos dados clínicos e biológicos dos pacientes com MM.

Tabela 17 – Características Clínicas e Biológicas dos pacientes com Mieloma Múltiplo CD28⁻ e CD28⁺

	CD28- (n = 24)	CD28+ (n = 6)	p
Idade (em anos)*	63,0 ± 13,1	61,0 ± 6,4	
Hemoglobina (g/dl)*	8,5 ± 2,0	8,9 ± 2,4	0,683
Creatinina (mg/dl)*	2,4 ± 2,0	1,6 ± 0,6	0,370
Albumina (g/dl)*	3,2 ± 0,7	2,7 ± 0,6	0,151
Cálcio Ionizável (mg/dl)*	1,4 ± 0,3	1,6 ± 0,6	0,191
β2-microglobulina (mg/dl)*	6,5 ± 3,9	12,5 ± 11,5	0,057
Componente monoclonal			
IgG N (%)	13 (54)	4 (66)	
IgA N (%)	3 (16)	1 (17)	
Cadeia leve kappa N (%)	18 (75)	4 (66)	
Cadeia leve lambda N (%)	6 (25)	2 (34)	
Estágio Clínico de Durie&Salmon			
I N (%)	1 (4)	0,0	
II N (%)	1 (4)	1 (18)	
IIIA N (%)	13 (54)	3 (50)	
IIIB N (%)	9 (36)	2 (32)	
Estágio Clínico Internacional			
I N (%)	0,0	1 (10)	
II N (%)	4 (16)	2 (30)	
III N (%)	20 (84)	3 (50)	

* Os resultados expressam a média ± SD:

Não houve diferença na idade dos pacientes entre os dois grupos. Dos 30 pacientes estudados, seis apresentaram expressão do CD28, os quais mostraram uma tendência a níveis maiores de β₂-microglobulina (média 12,5 mg/dl) que os pacientes com MM CD28⁻ (média 6,5 mg/dl) ($p = 0,05$).

Os demais parâmetros clínicos (hemoglobina, creatinina, albumina, cálcio ionizável), não apresentaram diferença nos resultados entre ambos os grupos.

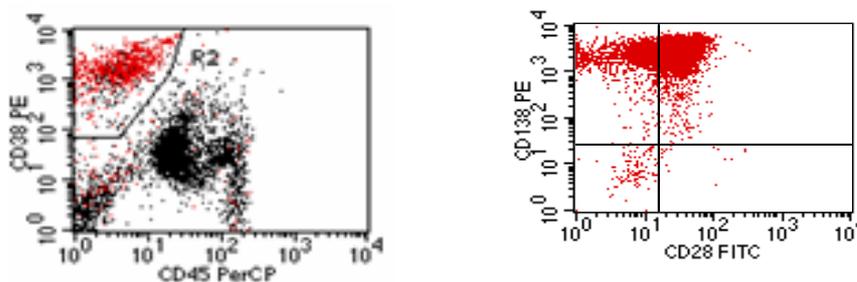
Em relação ao componente monoclonal, houve predominância de IgG em ambos os grupos MM CD28⁺ e MM CD28⁻ e a cadeia leve predominante foi kappa, estando de acordo com a característica da amostra estudada.

Dos seis pacientes que apresentaram expressão do CD28, 82% pertenciam ao estágio III (50% eram IIIa e 32% IIIb) e no grupo CD28 negativo, 90% dos pacientes eram estágio III, com distribuição semelhante (IIIa 54% e IIIb 36%).

Em relação ao estadiamento internacional do MM, encontramos que os pacientes expressaram o CD28 pertenciam em sua maioria (84%) ao estágio III (grupo de mau prognóstico), e apenas um paciente (16%) pertenciam ao estágio II. Já no grupo CD28 negativo houve uma distribuição bastante homogênea com 28% pertencentes ao estágio I, 36% ao estágio II e 36% ao estágio III.

A figura 3 ilustra a análise da expressão do CD28 em citometria, mostrando um caso CD28⁺, em gráficos de dot plot.

Figura 3 - Identificação dos plasmócitos do MM através da forte expressão dos AcMo CD38⁺⁺⁺ PE CD45⁻ PercP (Região R2), co-expressão aberrante entre os antígenos CD138 e CD28.



3.3.4 - Análise da expressão do CD45

O antígeno CD45 foi estudado nos 30 pacientes com MM e apenas seis (19%) expressaram esse marcador; 81% eram negativos para o CD45.

Os pacientes CD45⁺ apresentaram idade média de 69 anos, superior aos pacientes CD45⁻ com idade média de 62 anos, porém a diferença não foi significativa.

Em relação aos parâmetros clínicos e laboratoriais, os pacientes CD45⁺ apresentaram valor médio de hemoglobina de 9,2 g/dl e nos CD45⁻, esse valor foi 8,4 g/dl ($p = 0,391$).

O valor médio da creatinina sérica dos pacientes CD45⁺ foi 2,7 mg/dl, enquanto no grupo CD45⁻, a média foi de 2,0 mg/dl.

Os valores de albumina foram praticamente iguais para o CD45⁺ e CD45⁻, com médias de 3,1 g/dl e 3,0 g/dl, respectivamente.

Em relação ao nível sérico de cálcio ionizável, os pacientes CD45⁺ apresentaram valor médio de 1,47 mg/dl e os pacientes CD45⁻ apresentaram média de 1,38 mg/dl ($p = 0,554$). Todos os pacientes CD45⁺ possuíam valor sérico de cálcio iônico superior a 1,20 mg/dl.

Em relação aos valores de β 2-microglobulina foi observado que o grupo CD45⁺ possuía média de $5,9 \pm 1,6$ mg/dl, enquanto o valor médio dos pacientes CD45⁻ foi de $7,8 \pm 6,7$ mg/dl ($p = 0,594$).

O grupo de pacientes CD45⁺ possuíam predominância de componente monoclonal IgG com frequência de 83,3%, seguido de 16,7% de cadeia leve. Nenhum paciente CD45⁺ apresentou expressão de cadeia pesada IgA. Já nos pacientes negativos para o CD45, 56% pertenciam a cadeia pesada IgG, 16% eram IgA e 28% expressaram cadeia leve.

Em relação a frequência das cadeias leves (kappa e lambda), em ambos os grupos de MM CD45⁺ e CD45⁻ houve predomínio de cadeias kappa (60% e 76%, respectivamente).

No estadiamento clínico de Durie&Salmon houve novamente predomínio do estágio III, com 100 % dos pacientes CD45⁺ pertencentes ao estágio III (66,7% IIIa e 33,3% IIIb). No grupo de pacientes CD45⁻, 88% eram estágio III (56% IIIa e 32% IIIb) e 12% pertenciam aos estádios I e II.

Já distribuição dos pacientes em relação ao estadiamento internacional do MM, o grupo CD45+ ocorreu uma distribuição homogênea com predominância do estágio III (44%), seguido do estágio II (38%) e do estágio I (24%). Os pacientes negativos para o CD45 apresentavam doença mais agressiva com 50% dos casos pertencente ao estágio III, apresentando $\beta 2M > 5,5$ mg/dl e 50% dos pacientes eram estágio II.

3.3.5 - Análise da expressão dos antígenos linfóides

Dentre os 30 pacientes estudados apenas 7 (23%) apresentavam marcadores linfóides (CD10, CD19, CD20, CD22). Três (10%) expressaram CD20, CD22 com intensidade de expressão moderada a forte. Já nos três pacientes (10%) positivos para o CD10, a expressão do antígeno foi fraca, variando de 28,57 a 34,21% dos eventos. Apenas um paciente (3,2%) apresentou reatividade ao antígeno CD19 com expressão forte (99,87%), sendo este um raro fenótipo encontrado entre os plasmócitos do MM.

Em relação aos aspectos clínico-laboratoriais, quatro pacientes eram do sexo masculino e três do sexo feminino. A idade média desse grupo com marcadores linfóides foi de 55 anos de idade. Houve predominância de cadeia pesada IgG (72%) e apenas dois pacientes expressaram cadeias leves no soro. Nenhum paciente expressou a cadeia pesada IgA. Ocorreu também predominância de cadeia leve kappa (72%) sobre a cadeia lambda (28%).

O valor médio de $\beta 2$ -microglobulina foi de 5,8 mg/dl variando de 2,6 a 9,9 mg/dl. O valor médio de albumina sérica foi de 3,1 g/dl, variando de 2,0 a 4,1 g/dl. Em relação ao nível sérico de cálcio ionizável o valor médio foi de 1,30 mg/dl com variação de 1,18 a 1,41 mg/dl.

No estadiamento clínico de Durie&Salmon, todos os pacientes positivos para antígenos linfóides pertenciam ao estágio IIIa, com valor médio de creatinina de 1,4 mg/dl e valor médio de hemoglobina de 7,7 g/dl, variando de 4,2 g/dl a 9,1 g/dl.

Já no estadiamento internacional do MM, três pacientes pertenciam ao estágio III, três ao estágio II e apenas um ao estágio I.

3.4 Limitações técnicas do uso de amostras congeladas

Os materiais previamente congelados foram processados após o recebimento dos anticorpos monoclonais, tendo o descongelamento sido realizado após tempo variável de 1 mês a cerca de 10 meses. Os ensaios, no entanto, foram totalmente prejudicados uma vez que não foi possível a obtenção de suspensão de células após o descongelamento. Observou-se uma “gelatinização” do material e a viabilidade das células foi extremamente baixa (em torno de 25%). O fato possivelmente se deve a características próprias da doença (grande quantidade e polimerização de proteínas). Os métodos de congelamento e descongelamento têm sido utilizados com sucesso em nosso laboratório para outras células neoplásicas ou normais.

A partir dessa constatação, resolveu-se realizar todos os ensaios utilizando-se apenas amostras frescas. Os resultados iniciais das tentativas de estudo em material congelado não foram utilizados para a análise final.

3.5 Estudo da doença residual mínima no MM

O estudo das células residuais do MM foi realizado baseado em estudos de Miguel S et al, 2002, no qual os antígenos utilizados eram os mesmos encontrados nos pacientes ao diagnóstico, permitindo assim a detecção de ganho ou perda antigênica e posterior detecção da doença residual.

Para avaliar a possibilidade de detecção de doença residual mínima pela citometria de fluxo, estudamos 2 casos de MM para determinar a quantidade de células residuais em pacientes após 1 ano de tratamento, através dos fenótipos aberrantes evidenciados no diagnóstico (CD56⁺, CD45⁺, CD33⁺, CD117⁺, CD38⁺, CD138⁺).

O primeiro paciente com idade de 27 anos com os seguintes exames laboratoriais: β 2M 4,70 mg/dl, albumina de 4,20 g/dl, creatinina de 1,80 mg/dl, hemoglobina de 7,20 g/dl e cálcio iônico de 1,18 mg/dl. Exibia 0,02 % de células residuais identificadas através dos marcadores aberrantes CD56⁺, CD117⁺, CD38⁺ e CD138⁺.

Já no segundo caso detectou-se uma quantidade superior de células residuais, 0,33% das células nucleadas da medula óssea, que apresentavam os marcadores CD56⁺, CD117⁺, CD33⁺, CD45⁺, CD38⁺ e CD138⁺. Apresentava as seguintes características clínico-laboratoriais: β 2M 3,80 mg/dl, albumina de 4,80 g/dl, creatinina de 0,70 mg/dl, hemoglobina de 9,90 g/dl e cálcio iônico de 1,26 mg/dl.

Em ambos os casos foram demonstrados a clonalidade, utilizando-se também os anticorpos anti-kappa e anti-lambda nessas células residuais.

4. DISCUSSÃO

Em nosso estudo relatamos a freqüência dos antígenos aberrantes (AA) nos PCs de MM e sua associação com a progressão da doença.

Harada e cols (1993) demonstraram que PCs normais expressavam o antígeno CD19 e não mostravam reatividade ao antígeno CD56. Nossos dados estão de acordo, pois os PCs normais de todos os doadores normais de MO apresentavam positividade para os antígenos CD19⁺, CD45⁺, CD38⁺⁺ e CD138⁺⁺⁺ e não expressavam os antígenos CD56, CD117, CD33, CD13, CD28, CD10, CD20, CD22.

Uma das melhores estratégias para a identificação dos PCs normais e do MM é a utilização do antígeno CD138 que garante mais especificidade devendo ser associado aos antígenos CD19 e CD56, (kappa e lambda) permitindo assim a distinção entre os PCs normais e os neoplásicos.

Lin P et al (2004), relataram a freqüência de alguns AA em 306 pacientes com MM. Dentre estes, o antígeno mais freqüente foi o CD56, observado em 75% dos casos de MM, seguido do CD117 presente em 35,2%. O CD45 e o CD20 foram encontrados em apenas 23% e 17%, respectivamente.

Adicionalmente, Ocqueteau e cols (1996) descreveram a freqüência de outros AA em 65 pacientes estudados, como os antígenos associados a linhagem mielóide CD33 (24%), CD13 (28%), CD28 (41%). Os antígenos relacionados a linhagem linfóides (CD19, CD20, CD22 e CD10) estavam presentes em baixa freqüência (3%, 23%, 4% e 7%, respectivamente).

A alta freqüência dos AA observada no presente estudo está de acordo com os dados mais recentes da literatura, exceto para o antígeno CD117 presente em freqüência mais alta, em 60% dos casos e o CD28 expresso em baixa freqüência, 20%.

O CD56 é uma molécula de adesão expresso aproximadamente em 74% dos pacientes com MM. Van Camp e cols (1990) demonstraram que oito de 12 pacientes CD56⁻ apresentavam doença progressiva e refratária. Já Deceunynck e cols (1998) relataram que a expressão do CD56 tinha relação inversa com a presença de doença extra-medular (Sahara et al, 2002; Deceunynck et al, 1998, Van Camp et al, 1990).

Em nosso estudo as células do MM freqüentemente expressaram o CD56 (77%), sendo a expressão desse antígeno associada a presença de doença extra-medular (plasmocitoma). Porém detectamos que os pacientes que não expressa-

ram o antígeno CD56 pertenciam a grupo de mau prognóstico por possuírem altos níveis de β 2M e cálcio iônico, estando essa observação de acordo com os dados de literatura. Acreditamos que esse marcador possa ser útil também durante o acompanhamento clínico dos pacientes com MM, definindo a doença como estável ou progressiva com a perda da molécula de adesão CD56.

Ocqueteau et al (1996) demonstraram que 1/3 dos casos de MM (56 pacientes) expressavam antígeno CD117 (c-kit), considerado um antígeno restrito às células tumorais do MM. Porém não foi encontrada diferença clínica significativa entre os casos CD117⁺ e CD117⁻.

Recentemente um estudo de Mateo e cols (2005) mostraram que ausência do CD117 nos plasmócitos de MM está associada com a presença de t(11;14) e del (13q), relacionando, assim, esse achado a mau prognóstico.

Em nosso estudo observamos também que o antígeno CD117 estava ausente no grupo controle normal, porém presente em 60% dos casos e foi o AA mais freqüente dos antígenos por nós investigados. Além disso, os pacientes CD117⁻ exibiam valores elevados de cálcio iônico, sugerindo que a ausência do CD117 pode ter relação com o mau prognóstico em MM, concordando com relatos de literatura. Outros estudos seriam interessantes para confirmar a relação entre a ausência do CD117 (c-kit) e a progressão da doença.

O antígeno CD28 (raramente encontrado nos PCs normais) é uma proteína de superfície que tem sido descrita estar expressa em 1/3 dos casos de MM. No entanto a expressão aberrante desse antígeno vem sendo associada a comprometimento extra-medular (90% dos casos com expressão do CD28) e conseqüentemente com o avanço da doença. (Shapiro et al 2004).

Em um recente relato Mateo et al (2005), estudaram 915 pacientes com MM e detectaram associação entre a expressão do CD28 com anormalidades cromossômicas e hipoploidia de DNA.

A freqüência de positividade do CD28 em nosso estudo foi menor do que o relatado na literatura, tendo sido detectado em apenas 20% dos casos. Esse fato pode ser devido a diferença na expressão do clone utilizado ou mesmo devido às características da nossa população estudada, uma vez que ela difere já na distribuição por diferentes estádios clínicos (D&S ou ISS), com predomínio total de pacientes em doença avançada. Caso confirme a associação da sua expressão com

a progressão da doença, esperar-se-ia uma frequência maior de CD28 na nossa população estudada. Estudos adicionais são necessários para o esclarecimento da frequência na população brasileira.

Por outro lado, observamos também que os pacientes CD28⁺ apresentavam altos níveis de β 2M, sendo mais um dado útil para confirmar a associação da expressão aberrante desse antígeno com o avanço da doença.

S Kumar et al (2005) analisaram a expressão do CD45 em 75 pacientes com MM e relacionam a ausência da expressão do CD45 com a progressão da doença. Moureau et al (2004) em um estudo com 95 pacientes submetidos a altas doses de quimioterapia demonstraram que os pacientes que perderam a expressão do CD45 tiveram baixa sobrevida.

No presente estudo, não encontramos relação entre os parâmetros clínicos e negatividade para o CD45 nos seis casos, provavelmente devido ao estágio avançado da maioria dos nossos pacientes com MM e ao número da amostra analisada.

Há raros estudos associando a presença ou a co-expressão de antígenos mielóides (CD13, CD14, CD33, CD117) com prognóstico adverso, baixa sobrevida e pior resposta ao tratamento (Lima et al, 2000).

Em nosso estudo não foi possível confirmar os achados dos poucos relatos da literatura, pois observamos que os pacientes que expressavam menos de 2 antígenos mielóides possuíam valores elevados de creatinina sérica, fato este que poderia sugerir que a presença de mais de 2 antígenos mielóides nos plasmócitos de MM pode estar associada com prognóstico favorável. No entanto, a avaliação pode estar novamente prejudicada devido às características da nossa população estudada, constituída por pacientes predominantemente em estágios avançados da doença.

Os plasmócitos do MM podem expressar antígenos associados à linhagem linfóide B em baixa frequência. Raros estudos têm relacionado a presença do CD10 e do CD20 com pior prognóstico e baixa sobrevida (Lima M, 2000; Argüelles G, 1994).

Em nosso estudo com 30 pacientes, as células mielomatosas ocasionalmente expressaram antígenos associados a células B (CD10, CD19, CD20, CD22). Com isso não foi possível demonstrar associação dos antígenos B com os parâmetros

clínicos e laboratoriais para avaliar a sua implicância no prognóstico. Estudos multicêntricos serão importantes para avaliar a frequência e a relação com o prognóstico de outros marcadores linfóides como o CD10, o CD20 e CD22.

Sahara et al (2000), relataram um caso de MM com expressão CD19⁺ CD56⁻, um raro fenótipo encontrado em MM, pois normalmente os plasmócitos do MM expressam o antígeno CD56 e perdem a expressão do marcador pan B CD19 (antígeno presente apenas nos PCs normais). Nesse relato o paciente tinha 70 anos, apresentava Hb 8,4 g/dl, β 2M 12 mg/dl e 73% de plasmócitos ao exame de medula óssea.

Em nosso estudo identificamos também um caso que expressava o fenótipo CD19⁺ CD56⁻, porém, este paciente apresentava 7 antígenos aberrantes (CD19, CD20, CD22, CD13, CD28, CD117, HLA-DR) além de não expressar o CD56. Apresentava anemia (Hb 7,5 g/dl), doença progressiva (β 2M 7,2 mg/dl), albumina baixa (2 mg/dl), e comprometimento ósseo (estágio IIIa de Durie & Salmon, com múltiplas lesões ósseas e cálcio iônico elevado, 140 mg/dl). O paciente foi a óbito por pneumonia após um mês de tratamento quimioterápico. Com isso acreditamos que, além da perda da expressão do CD56, a presença de vários antígenos aberrantes pode ter contribuído com a rápida progressão da doença.

Nossos ensaios foram iniciados com amostras congeladas, porém não conseguimos realizar a fenotipagem desses casos devido à baixa viabilidade e a formação de uma camada gelatinosa de células. Portanto, recomendamos que os ensaios imunofenotípicos dos plasmócitos mielomatosos sejam realizadas em amostras frescas possibilitando a suspensão celular e identificação dos antígenos aberrantes no MM.

Com o avanço no tratamento das neoplasias hematológicas, obtêm-se cada vez mais altos índices de remissão e remissões prolongadas e, inclusive, de cura em algumas situações, como nas leucemias. Assim, tornou-se cada vez mais importante, a avaliação da DRM no acompanhamento desses pacientes em remissão para tentar prever a evolução e da possibilidade de recaídas.

Para comprovar a utilidade dos AA na identificação da DRM em MM, realizamos dois ensaios para determinar a quantidade de células residuais. Nos dois casos foi possível identificar com facilidade a quantidade residual de células neo-

plásicas e sugerimos que sejam utilizados os marcadores detectados em células mielomatosas ao diagnóstico. Assim, para detecção de DRM deve-se utilizar o painel de anticorpos monoclonais para diferenciação entre plasmócitos normais e mielomatosos com adição de anticorpos para identificação dos AA detectados ao diagnóstico (sendo o mais freqüente o CD117), além de caracterização de clonalidade. Assim, sugerimos para este fim o uso racional de anti-CD138, associado ao anti-CD38, anti-CD19, anti-CD56 e por exemplo o anti-CD117, anti-kappa, anti-lambda. Os anticorpos CD138 e CD38 permitem excelente identificação dos plasmócitos e a distinção dos PCs normais dos neoplásicos seria realizada através do CD19 e os marcadores CD56, CD117, presentes somente nas células do MM e a clonalidade determinada através das cadeias leves (k e λ)

Em resumo concluímos que os AA estão presentes na maioria dos pacientes com MM e podem estar relacionados ao prognóstico. A expressão negativa do antígeno CD56, CD117 (c-kit) e a positiva do CD28 podem ser associados ao avanço da doença. Além disso, a alta freqüência de AA mostra a sua utilidade na detecção e quantificação da DRM ao longo do acompanhamento de pacientes com MM.

Estudos adicionais devem ser realizados com maior casuística para melhor caracterizar o valor prognóstico dos diferentes AA em MM.

5. CONCLUSÕES

1. O estudo de plasmócitos em MM requer utilização de material medular fresco ou células separadas pelo gradiente de Ficoll-Hypaque (F-H)
2. Quando necessário, pode-se congelar plasmócitos incluídos entre as células mononucleares separadas pelo Ficoll-Hypaque.
3. Os plasmócitos de MM exibem alta frequência de antígenos aberrantes, sendo os antígenos CD56 e o CD117 os mais frequentes, 76,7% e 60%
4. A ausência da molécula de adesão CD56 e do CD117 está relacionada com a agressividade da doença e deve ser incorporada como fator de mau prognóstico em MM.
5. A expressão do antígeno CD28 mostra uma tendência à associação com a agressividade da doença e estudo com maior número de casos deve ser realizado.
6. A detecção da doença residual mínima em MM, através da identificação de AA em citometria de fluxo é útil e de fácil realização.

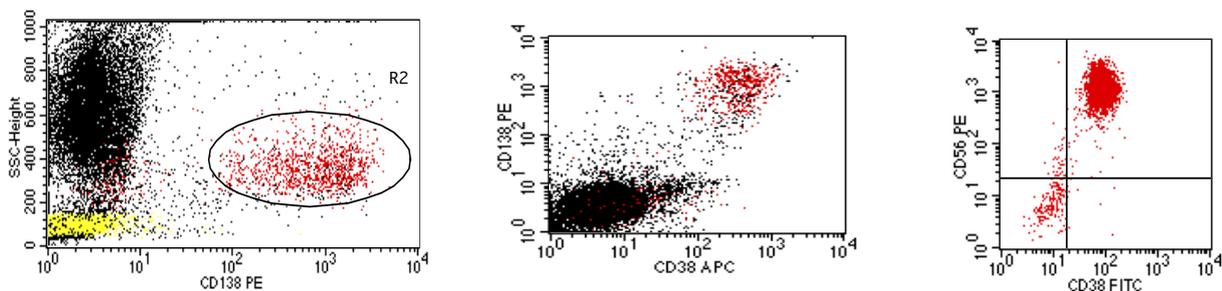
6. ANEXOS

Anexo 1 – principais anticorpos utilizados no estudo

fluorocromos	FITC	PE	PerCP	APC
Anticorpos monoclonais (CD)	IgG 1	IgG 1	CD45	CD38
	Anti- kappa	CD13		CD19
	Anti-lambda	CD19		
	CD 10	CD20		
	CD14	CD22		
	CD15	CD33		
	CD16	CD40		
	CD28	CD56		
	CD34	CD117		
		CD138		

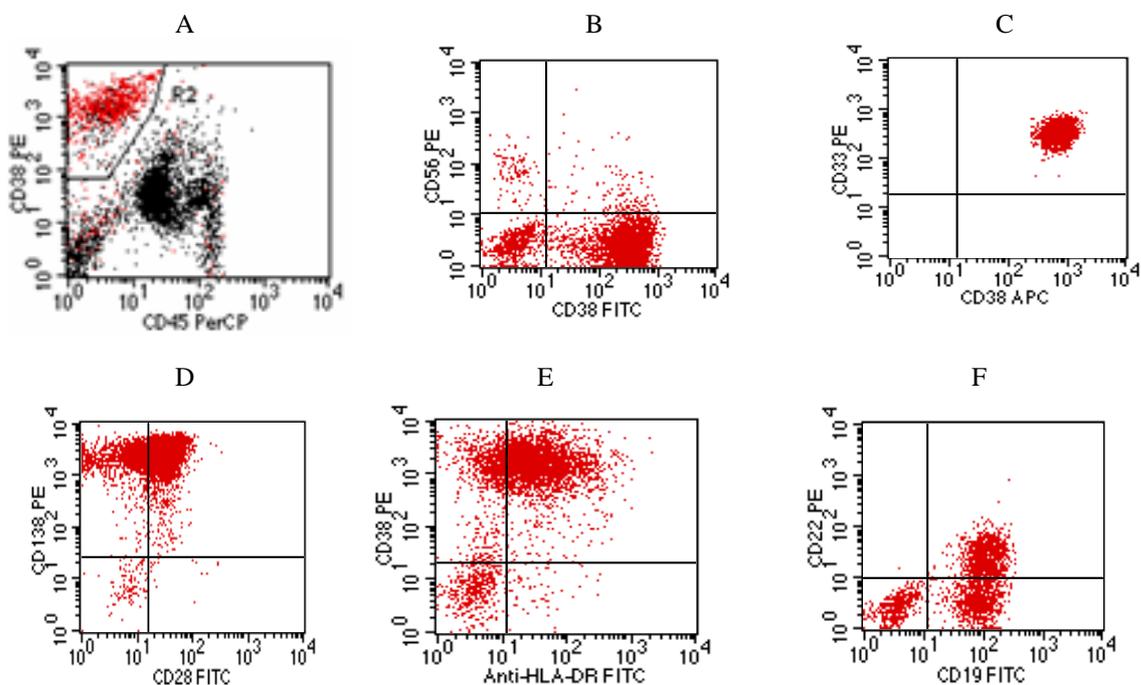
Obs. FITC = isotianato de fluoresceína; PE= Phicoeritrin; PerCP= Peridin Chlorophil Protein; APC=Allo Phyco Cyanin

Anexo 2 – Figura ilustrando a identificação dos plasmócitos do MM (vermelho) através do CD138⁺⁺⁺ e CD38⁺⁺⁺ utilizando 4 fluorocromos (FTIC, PE, PercP e APC), nítida separação dos linfócitos (amarelo) através do CD138 e super-expressão aberrante do antígeno CD56.



Anexo 3 – Representação gráfica de AA em *dot plot* pela citometria de fluxo.

- A – Seleção dos plasmócitos mielomatosos através do CD38⁺⁺ e CD45 negativo.
- B – Perda da molécula de adesão CD56.
- C - Expressão do marcador mielóide CD33 em plasmócitos mielomatosos.
- D – Expressão da molécula de sinalização CD28 plasmócitos neoplásicos CD138⁺⁺
- E – Expressão aberrante do antígeno HLA-DR em plasmócitos CD38⁺⁺.
- F - Rara co-expressão aberrante entre o CD19 e o CD22 nos plasmócitos do MM.

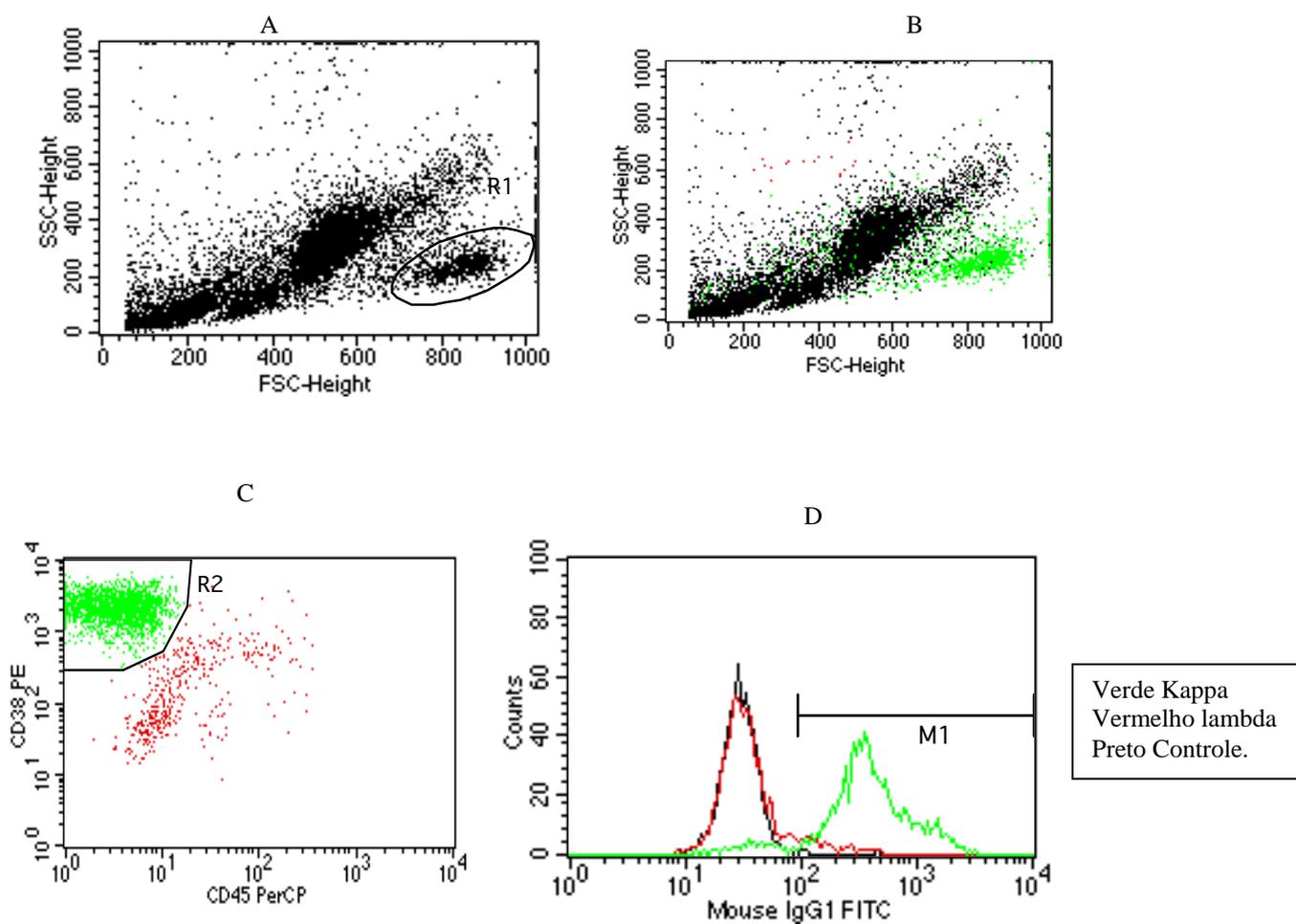


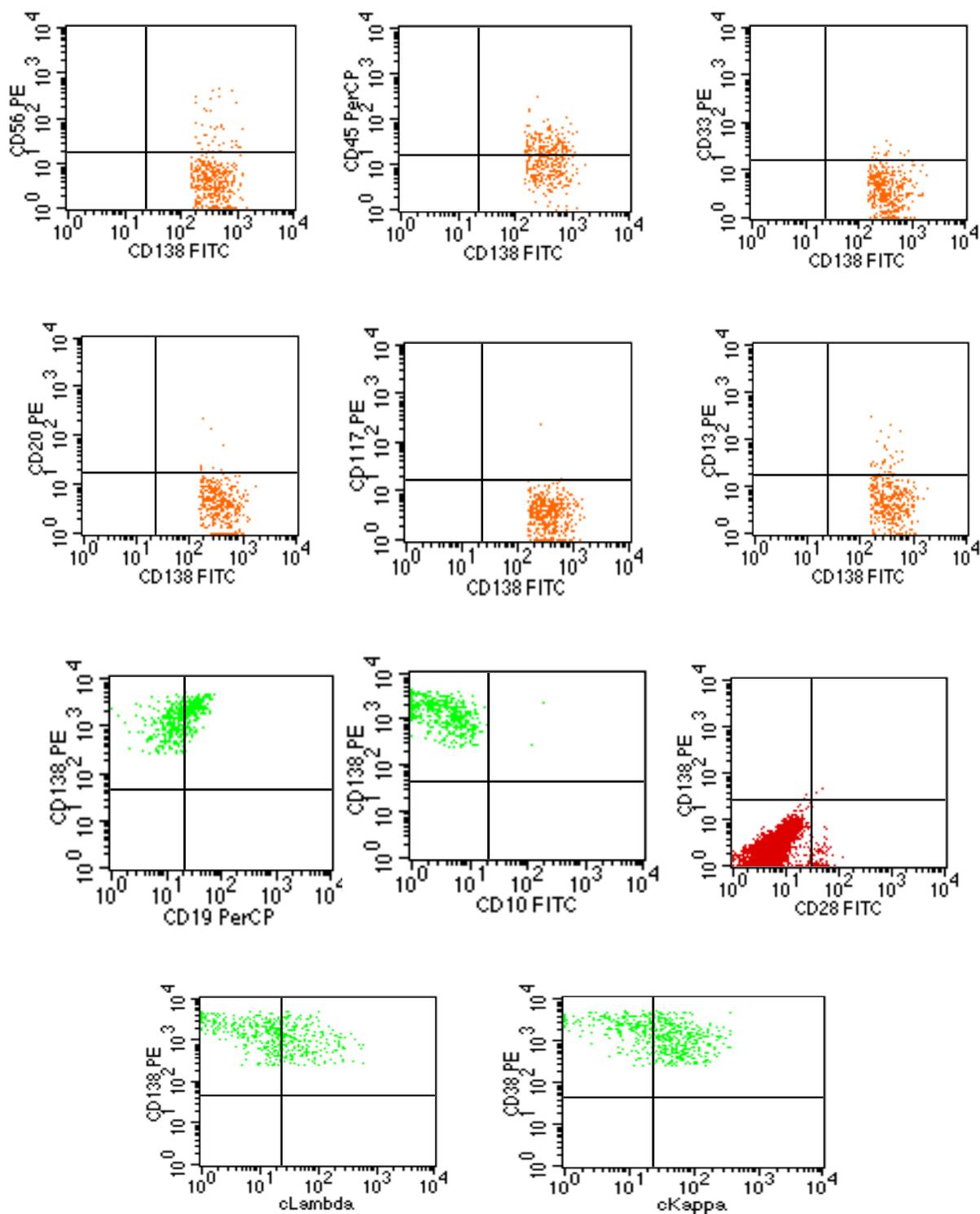
Anexo 4 – Demonstração citoplasmática de monoclonalidade dos plasmócitos mielomatosos.

A e B– Seleção dos plasmócitos mielomatosos (verde) através do tamanho (FSC) e complexidade (SSC).

C – Seleção dos plasmócitos mielomatosos através do CD38⁺⁺ e CD45 negativo.

D – Histograma ilustrando a restrição de cadeia leve kappa (verde) em plasmócitos mielomatosos.



Anexo 5 – Imunofenótipo dos plasmócitos normais (Grupo Controle).

Anexo 6 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 3 de dezembro de 2004.
CEP 1407/04

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) LUIZ ARTHUR CALHEIROS LEITE
Disciplina/Departamento: Hematologia e Hemoterapia/Medicina da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Caracterização imunofenotípica das células plasmáticas do mieloma múltiplo**".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **01/junho/2005**.
5. Apresentar segundo relatório parcial em **28/novembro/2005**.

Atenciosamente

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são: potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

Rua Bótucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS PLASMÁTICAS DO MIELOMA MÚLTIPLO

Você é portador de uma neoplasia de medula óssea, denominada mieloma múltiplo (MM), que compromete as células denominadas plasmócitos.

O diagnóstico do MM é feito através de exames de sangue e da medula óssea para o estudo das características dos plasmócitos, pela microscopia comum e também pela técnica chamada imunofenotipagem (método que consiste em analisar marcadores que podem estar relacionados com melhor caracterização de sua doença), utilizando-se um aparelho automático chamado citômetro.

Estas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária nesta pesquisa que tem como objetivo avaliar as anormalidades nas células neoplásicas encontradas pela imunofenotipagem, na tentativa de identificar alterações que pudessem estar relacionadas com a evolução da doença.

A medula óssea (fábrica do sangue) é um material gelatinoso que se encontra dentro das cavidades ósseas e, para o seu estudo, habitualmente é coletada através de punção dos ossos chamados esterno ou crista ilíaca, utilizando-se uma agulha própria, sob anestesia local. Este é um exame simples, realizado por médico hematologista ambulatorialmente, não necessitando de internação. Inicialmente você receberá anestesia local com uma agulha fina para que não sinta dor onde será coletada a medula óssea. Em seguida, com outra agulha colocada no mesmo lugar, retira-se o material através de aspiração com uma seringa, não havendo riscos adicionais para você.

Você receberá toda informação necessária quanto aos procedimentos, andamento do estudo ou qualquer dúvida que possa aparecer com o Dra. Manuela de Souza Sampaio Almeida do serviço de Hematologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Fone: 5579-1550 ou 5576-4240.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa na Rua Botucatu, 572, 1^o andar, cj 14, telefones: (11) 5539-7162.

Além disso, você pode retirar-se do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento nesta instituição, em qualquer etapa do estudo. Será mantido sigilo médico rigoroso. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Não há despesas pessoais para participação em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Eu _____
 _____ acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações contidas na carta informativa, que li ou que leram para mim, referente ao trabalho “CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS PLASMÁTICAS DO MIELOMA MÚLTIPLO”.

Eu discuti com a Dra. Manuela de Souza Sampaio Almeida sobre a minha decisão de participar do estudo. Ficaram claros para mim os propósitos do trabalho, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, e a garantia de acesso ao tratamento necessário nesta instituição. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, podendo retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

_____ RG _____ Data:
 ____/____/____

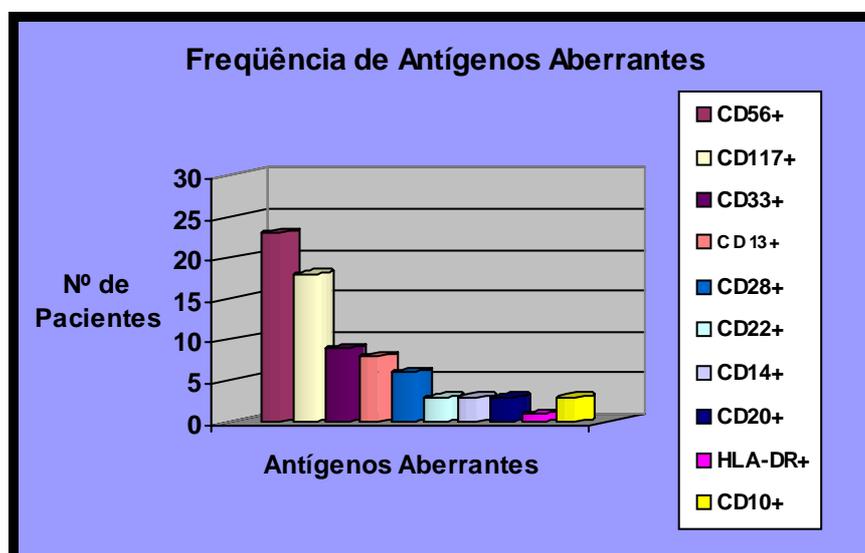
Assinatura do Paciente ou Responsável.

 Assinatura da Testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação nesse estudo.

_____ Data: ____/____/____
 Assinatura do Pesquisador Responsável CRM/SP _____.

Anexo 8

Gráfico 1 – Freqüência de Antígenos Aberrantes em 30 pacientes com MM.

7. REFERÊNCIAS

Abbas KA, Lichtman. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 5 ed, 2005.

Abe M, Hiura K, Wilde J, et al. Role for macrofage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* 2002, 100: 2195-202.

Bataille R and Harousseau JL. Multiple myeloma, Review. *N Engl J Med* 1997, 336: 1657-64.

Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Anderson K. Multiple Myeloma Cell Adhesion-Induced Interleukin 6 Expression in Bone Marrow Stromal Cells Involves Activation of NF-KB. *Blood* 1996, 87: 1104-12.

Costelo R, Sainty D, Bouabdallah R, Femand J, Delmer A, Diviné M, Marolleau J, Gastaut J, Olive D, Rousselot P and Chaibi P. Primary Plasma cell leukemia: a report of 18 cases. *Leukemia Research* 2001, 25: 103-7.

Durie BGM. and Sydney E. Salmon. A Clinical Staging System For Multiple Myeloma. *Cancer* 1975, 36: 842-54.

Durie BGM, Kyle R, Belch A, Bensinger W, Bláde J, Boccadoro M, et al. Myeloma management guidelines: a consensus report from the scientific Advisors of the Internacional Myeloma Foundation. *The Hematology Journal* 2003, 4: 380-96.

Deceunynck C, Barrilé S, Puthier D, Bataille RN, Harousseau J, and Amiot M. Adhesion Molecules on Human Myeloma Cells: Significant chances in expression related to malignation tumor spreading and immortalization. *Cancer Res* 1995, 55: 3647-53.

Deceunynck C, Barillé S, Jego G, Puthier D, Robilard N, Harousseau J, Bataille R: The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia* 1998, 12: 1977-82.

Fiebig E, Johnson D, Hirschhorn D, Knape C, Webster H, Lowder J and Busch. Lymphocyte Subset Analysis on Frozen Whole Blood. *Cytometry* 199, 29:340-50.

Feldman M, Lydyard P, Grossi C. Development of the Immune System, Cell Cooperation in the Antibody Response. In Roitt I, Brostoff J, Male D (Eds): *Immunology*. Londres: Mosby, 5 ed, 1998. p. 139-155, 156-70.

Foerster J. Discrasias de Células Plasmáticas: Mieloma Múltiplo in: G. Richard Lee, Thomas C Bithell, John Foerster, John W. Athens, John N. Lukes (Eds). *Wintrobe Hematologia Clínica*. São Paulo: Manole, 1998. p. 2444-78.

Fonseca R, Conte G and Greipp PR. Laboratory correlates in multiple myeloma: how useful for prognosis. *Blood Reviews* 2001, 15: 97-102.

Grogan TM, Van Camp B, Kyle RA, Müller-hermelink HK & Harris NL. Plasma cell neoplasms. IN: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds). *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics - tumours of haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC press, Lyon, 2001; p. 142-50.

Guikema JE, Hovenga S, Vellenga E and Bos N. Heterogeneity in the Multiple Myeloma Tumor Clone. *Leuk Lymphoma* 2004, 45: 857-71.

Harada H, Kawano M, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, Tanaka H, Sakai A., Asaoku H. and Kuramoto A. Phenotypic Difference of normal Plasma Cell From Mature Myeloma Cells *Blood* 1993, 81: 2658-63.

Helfrinch MH, Livingston E, Franklin LM, Soutar RL. Expression of adhesion molecules in malignant plasma cells in multiple myeloma: comparison with normal plasma cells and functional significance *Blood Reviews* 1997, 11: 28-38.

Hideshima T, Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma *Nat Rev Cancer* 2002, 2: 927-37.

Ho P, Campbell L, Gibson J, Brown R and Joshua D. The Biology and Cytogenetics of Multiple Myeloma Rev Clin Exp Hematol 2002, 63: 276-300.

Karagad A, Oyajobi B, Apperley J, Russell G, Croucher P. Human myeloma cells promote the production of interleukin 6 by primary human osteoblasts. Brit J Haematol 2000, 108: 383-90.

Kerbaux J, Colleoni GWB. Hematologia: Mieloma Múltiplo. In PRADO Cintra F, RAMOS J e VALLE J Ribeiro. Durval Rosa Borges, Hanna A Rothschild (Eds). Atualização Terapêutica, Manual Prático de Diagnóstico e Tratamento. São Paulo: Artes Médicas, 2003. p. 767-73.

Kyle AR and Rajkumar SV. Multiple Myeloma. N Engl J Med 2004, 351: 1860-73.

Kyle AR, The International Myeloma Working Group: Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: Brit J Haematol 2003, 121: 749-57.

Kyle AR, Therneau TM and Rajkumar SV et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undertermined significance. N Engl J Med 2002, 346: 564-9.

Kuehl WM, Breggsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. Nat Rev Cancer 2002, 2: 175-87.

Kumar S, Rajkumar SV, Kiminger T, Greipp PR and Witzig TE. CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations. Leukemia 2005, 19: 1466-70.

Lima M, Teixeira M, Fonseca S, Gonçalves C, Guerra M, Queirós M. Immunophenotypic Aberrations, DNA Content, and Cell Cycle Analysis of Plasma Cells in Patients with Myeloma and Monoclonal Gammopathies. Blood Cells, Molecules and Diseases 2000, 26: 634-45.

Mateo G, Castellanos M, Rasillo, Guitiérrez NC, Miguel S, Orfao A, et al. Genetic Abnormalities and Patterns of Antigens Expression in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 2005 , 11: 3661-7.

Mahmoud MS, Fujji R, Ishikawa H and Kawano, MM. "Enforced CD19 expression leads to growth inhibition and reduced tumorigenicity. *Blood* 1999, 94: 3551-8.

Medeiros CR. Distúrbios dos Plasmócitos e Doenças Correlatas. In Zago MA, Falcão PR e Pasquini R (Eds). *Hematologia, Fundamentos e Prática*. São Paulo: Atheneu, 2001.p. 677-88.

Moureau P, Robillard N, Loiseau H, Pineau D, Harousseau JL, Bataille R, et al. Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. *Haematologica* 2004, 89: 547-51.

Ocqueteau M, Orfao A, Garcia-Sanz, Almeida J, Gonzalez M, San Miguel J. Expression of the CD117 antigen (C-kit) on normal and myelomatous plasma cells. *Brit J Haematol* 1996, 95: 489-93.

Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, Sanz R, Berges C, Moro M, Hernandez J, Escibano L, Caballero M, and Miguel J. Immunophenotypic Characterization of Plasma Cells from Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance Patients. *Am J Clin Pathol* 1998, 152: 1655-65.

P Lin, Owens R, tricot G, Wilson C. Flow Cytometric Immunophenotypic Analysis of 306 Cases of Multiple Myeloma. *Am J Clin Pathol* 2004, 121: 482-8.

Rajkumar SV, Dispenzieri A, Fonseca R, et al. Thalidomide for previously untreated indolent or smoldering multiple myeloma. *Leukemia*; 2001; 15:1274-6.

Robillard N, Deceunynck C and Bataille R. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood* 2005, 12: 1-15.

Ruiz Argüelles GJ and San Miguel J. Cell Surface in Multiple Myeloma. *Mayo Clin Proc* 1994, 69: 684-90.

Sahara N, Ihara M, Ono T, Tamashima S, Matsul H, et al. Multiple Myeloma Expressing CD19+ CD56- Phenotype. *Blood* 2000, 64: 311-3.

Sahara N, Takeshita A, Snigeno K, Fujisawa S, Takeshita K, Naito K, Ihara M, Ono T, Tamashima S and Nara K. Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma. *Brit J Haematol* 2002, 117: 882-885.

Sahara N and Takeshita A. Prognostic Significance of Surface of Markers Expressed in Multiple Myeloma: CD56 and Other antigens. *Leuk Lymphoma* 2004, 45:61-5.

Shapiro SV, Mollenauer M, Weiss A. Endogenous CD28 expressed on myeloma cells up-regulates interleukin-8 production: implicated for myeloma progression. *Neoplasia*, 98: 187-93.

Seidl S, Kaufmann H, Drach J. New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2003, 4: 557-64.

The International Myeloma Working Group criteria for the classifications of monoclonal gamopathies, multiple myeloma and related disorders : a report of the The International Myeloma Working Group. *Brit J Haematol* 2003;121:749-57.

Umeda M, Okuda S, Izumi H, Sugasawa Y, et al. Prognostic factors in elderly multiple myeloma patients aged 65 years or older: Comparison with nonelderly patients with mutiple myeloma. *Geriatrics and Gerontology Int* 2004, 4: 238-44.

Van Camp B, Durie B, Spier C, Waele M, Riet I, Vela E, Frutiger Y, Richter L and Grogan T. Plasma Cells in Multiple Myeloma Express a Natural Killer Cell Associated Antigen: CD56. *Blood* 1990, 76 (2): 377-82.

Van VJJ, Reilly JT, Richards S, et al. Diagnosis of plasma cell leukaemia: findings of the UK NEQAS for leucocyte Immunophenotyping scheme. *Clin Lab Haem* 2004, 26: 37-42.

Williams JW, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. *Hematology*, 1996

Yaccoby S, Pearse R, Johnson C, Barlogie B, Choi Y and Epstein J. Myeloma interacts with the bone marrow microenvironment to induce osteoclastogenesis and is dependent on osteoclast activity. *Brit J Haematol* 2002, 116: 278-90.

Abstract

The aims of this study were to determine aberrant antigens (AA) in MM cells and to evaluate their prognostic value and frequency. **Methods** : bone marrow plasma cells of an homogeneous cohort of 30 newly diagnosed patients with MM were studied. As normal control, bone marrow plasma cells from 4 healthy marrow donors were also evaluated. Surface and cytoplasmic antigens were analysed using multiparametric flow cytometry (FACS calibur cytometer and Cell Quest and Paint-a-Gate softwares – BD). Plasma cells were identified by gating CD45-/CD38⁺⁺/CD138⁺⁺⁺ expressing cells and AA were identified using a panel of fluorochrome conjugated monoclonal antibodies : CD45, CD38, CD138, CD19, CD56, CD117, CD13, CD33, CD28, CD14, CD10 CD20, CD22 and HLA-DR. **Results** - All the patients but one (96,6%) showed at least one AA and the most frequent ones were CD56⁺, CD117⁺, CD33⁺, CD13⁺. The expression of lymphoid antigens was more frequently found in those cases that expressed a great number of AA. The absence of the adhesion molecule CD56 was associated with high levels of β 2- microglobulin ($p = 0,009$) and ionic calcium ($p = 0,03$), showing its prognostic value in MM. The CD28⁺ also showed a tendency of association with high levels of β 2- microglobulin. We also found one case of CD19⁺ MM (rare phenotype in neoplastic plasma cells).

Conclusions : The myeloma cells show a high frequency of AA and it should be highlighted the importance of CD56, CD117 and CD28 as prognostic markers, as well as the utility of FC for the study of minimal residual disease in MM patients by detection of the AA, through multiparametric flow cytometry.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Rother ET & Braga MER. Como elaborar sua tese: Estrutura e Referências. São Paulo, 2001.