

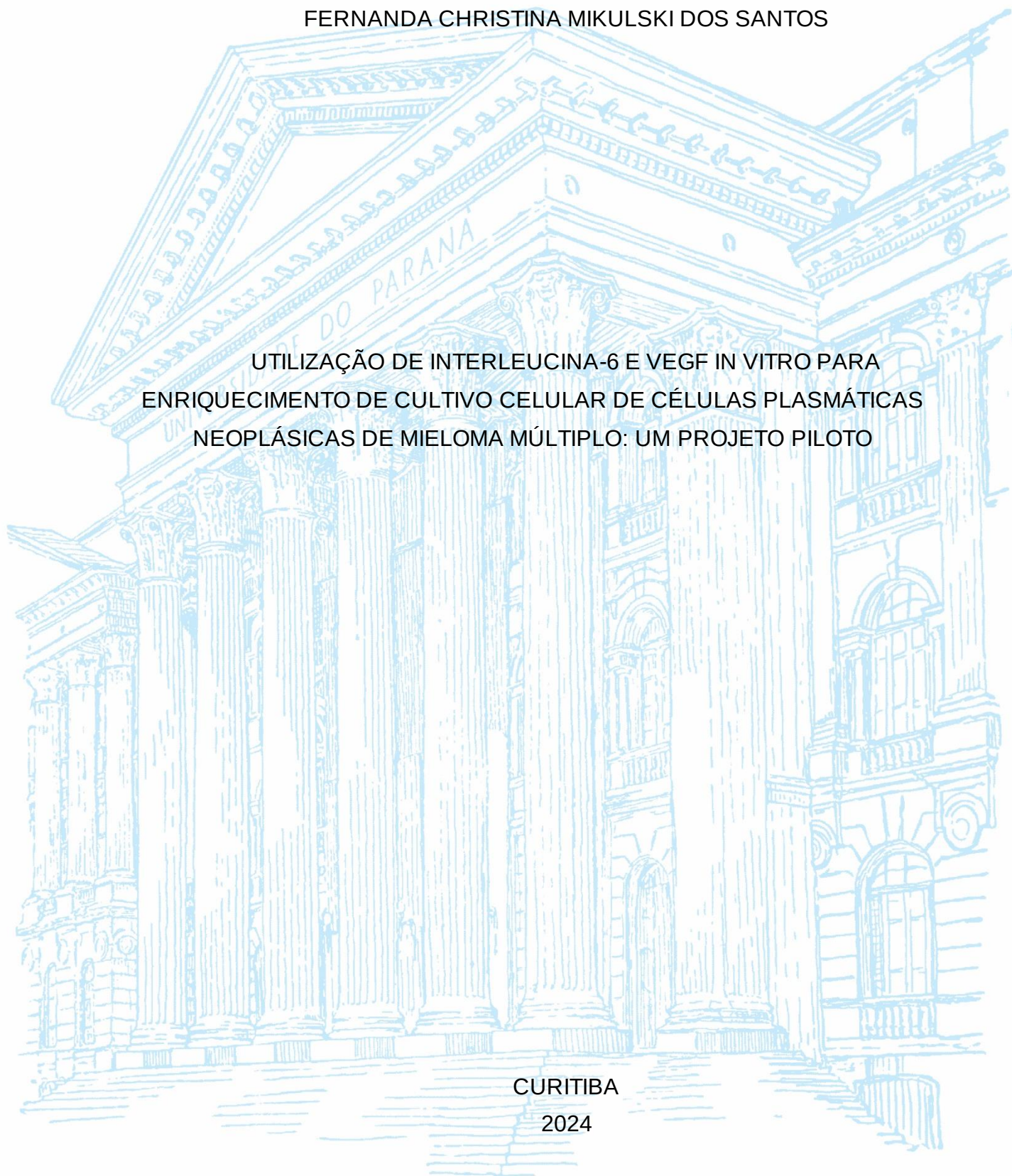
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA CHRISTINA MIKULSKI DOS SANTOS

UTILIZAÇÃO DE INTERLEUCINA-6 E VEGF IN VITRO PARA
ENRIQUECIMENTO DE CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS PLASMÁTICAS
NEOPLÁSICAS DE MIELOMA MÚLTIPLO: UM PROJETO PILOTO

CURITIBA

2024



FERNANDA CHRISTINA MIKULSKI DOS SANTOS

UTILIZAÇÃO DE INTERLEUCINA-6 E VEGF IN VITRO PARA
ENRIQUECIMENTO DE CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS PLASMÁTICAS
NEOPLÁSICAS DE MIELOMA MÚLTIPLO: UM PROJETO PILOTO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao curso de graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi

Coorientador: Prof. Ms. Bruno Rizzo Osterneck

Coorientadora: Dra. Miriam Perlingeiro Beltrame

CURITIBA

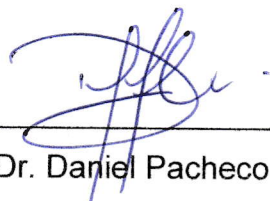
2024

TERMO DE APROVAÇÃO

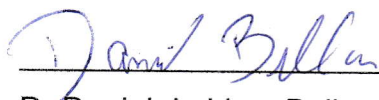
FERNANDA CHRISTINA MIKULSKI DOS SANTOS

UTILIZAÇÃO DE INTERLEUCINA-
E VEGF IN VITRO PARA ENRIQUECIMENTO DE CULTIVO CELULAR DE
CÉLULAS PLASMÁTICAS NEOPLÁSICAS DE MIELOMA MÚLTIPLO: UM
PROJETO PILOTO.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em
Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.



Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi
Orientador – Departamento de Genética, UFPR.



Dr. Daniel de Lima Bellan
Departamento de Genética, UFPR.

Cidade, 20 de dezembro de 2024.

Dedico este trabalho à Deus que me ajudou a superar todos os obstáculos encontrados no decorrer dessa jornada. E aos meus pais, que me deram todo o suporte necessário e me impulsionaram todos os dias com suas palavras de apoio, tornando esse sonho possível.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus, pelo dom da vida e por me permitir vencer a todos os obstáculos encontrados.

Agradeço aos meus pais, por sempre me apoiarem e me envolverem em um cerco de amor e proteção inigualáveis. Em especial, gostaria de agradecer a minha mãezinha, Heliana Cristina Mikulski, por sempre me impulsionar na jornada, me ensinando e incentivando a cumprir a minha trajetória com excelência e fé. Agradeço também, o Afonso Henrique Iurk (mãe 2) pelas caronas e cházinhos para acalmar.

Agradeço aos meus avós, Catarina Saade Mikulski (in memoriam) e Hélio Oswaldo Mikulski, por todo carinho, cuidados com a minha educação, caronas e docinhos em dia de prova e, em especial, gostaria de agradecer pelas orações do meu vózinho em dias de prova, que pedia para Deus retirar o meu SNC na prova.

Agradeço aos preciosos amigos que fiz durante a vida acadêmica pelas sessões de terapia e bons momentos compartilhados.

Sou especialmente grata ao meu orientador, Daniel Pacheco Bruschi, por me acolher com tanto carinho em seu laboratório, por seus diversos ensinamentos e conselhos e por sempre me apoiar nas minhas ideias.

Agradeço ao meu coorientador Bruno Rizzo Osternack por toda paciência em responder as minhas incontáveis dúvidas e curiosidades.

Agradeço a Dra. Miriam Perlingeiro Beltrame por toda sua colaboração nesse projeto, analisando os gráficos de citometria de fluxo, encontrando soluções de problemas e me aconselhando de maneira tão carinhosa. Agradeço também ao laboratório de citometria de fluxo e ao setor de oncohematologia do hospital Erasto Gaertner por toda colaboração com este projeto.

Agradeço a Duca por me ensinar citogenética com tanta paciência e excelência.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná por tornar este sonho possível.

Por fim, gostaria de agradecer profundamente ao projeto “Desenvolvimento de uma plataforma multidimensional de identificação, diagnóstico e rastreamento de biomarcadores de mieloma múltiplo no estado Paraná”, processo registro 01.23.0348.00, financiado pela FINEP, por financiar e acreditar neste projeto.

" Não tenha medo nem desanime, pois o próprio Senhor irá adiante de
você. Ele estará com você, não os deixará nem os abandonará"

Deuteronômio 31:8

RESUMO

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação anormal e desregulada de células plasmáticas, que infiltram a medula óssea, e pela produção excessiva de uma paraproteína monoclonal, denominada de proteína M. Em 2020 o MM foi responsável por 117.077 óbitos, o que corresponde a uma taxa de mortalidade mundial igual a 1,1 óbitos/100 mil habitantes e foram registrados 176.404 novos casos da doença, sendo a taxa de incidência mundial igual a 1,8 casos/100 mil habitantes. É uma doença progressiva e incurável, porém, na atualidade, existem tratamentos clínicos e terapêuticos que, se iniciados precocemente, podem melhorar a qualidade de vida e sobrevida do paciente. O plano terapêutico para o MM é baseado na genética do tumor e nas condições clínicas do paciente. Nesse sentido, a análise citogenética é uma importante ferramenta diagnóstica e prognóstica de extrema relevância para a estratificação de risco em pacientes com mieloma múltiplo, auxiliando no processo de tomada de decisão em relação ao tratamento adequado e adaptado ao risco. Apesar da sua importância clínica e biológica, o poder diagnóstico da análise citogenética é limitado pelo baixo índice mitótico das células plasmáticas do MM em cultivo celular. Este trabalho propõe um novo método de enriquecimento de plasmócitos, utilizando Interleucina 6 (IL-6) e Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) para enriquecer meio de cultivo, visando aumentar a porcentagem de plasmócitos na amostra. A amostragem incluiu dois casos, um paciente com suspeita de MM e um paciente com MM para análise de doença residual mínima (DRM) pós-tratamento. Os dados foram analisados por citometria de fluxo utilizando marcadores diferenciais para plasmócitos. Testes de viabilidade celular também foram conduzidos nas amostras cultivadas. As comparações foram realizadas dentro de cada caso, sempre considerando o meio de cultivo convencional como controle experimental. Não foi observado diferença na porcentagem de plasmócitos anormais no caso do paciente com suspeita de MM entre os cultivos controle, enriquecido com VEGF, enriquecido com IL-6 e enriquecido com VEGF e IL-6. Na amostra de DRM houve um aumento de plasmócitos anormais nos meios enriquecidos isoladamente com IL-6 e VEGF, conforme dados de citometria de fluxo. Foi realizado teste de viabilidade celular na amostra utilizada para o cultivo celular por citometria de fluxo e observada uma rápida perda da viabilidade celular das células plasmáticas no intervalo de tempo entre a coleta e o cultivo celular. Nossos dados abrem novas perspectivas para a construção de meios de cultivo enriquecidos com fatores de crescimento medular como uma estratégia para aumentar a eficiência do cultivo celular de plasmócitos, visando análises citogenéticas.

Palavras-chave: MIELOMA MÚLTIPLO, CITOGÉNÉTICA, CULTIVO CELULAR, IMUNOFENOTIPAGEM, IL-6 e VEGF.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: METÁFASE DO CASO DE SUSPEITA DE MM21

FIGURA 2: METÁFASE DO CASO DE DRM DE MM.....21

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Viabilidade celular das células CD138+ no aspirado de MO em heparina no caso de suspeita de MM19

GRÁFICO 2: Viabilidade celular das células CD138+ no aspirado de MO em heparina no caso de DRM MM.19

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: QUANTIFICAÇÃO DE PLASMÓCITOS E VIABILIDADE DAS CÉLULAS CD138+ NOS MEIOS E NA AMOSTRA DO PACIENTE COM SUSPEITA DE MM.....18

QUADRO 2: QUANTIFICAÇÃO DE PLASMÓCITOS E VIABILIDADE DAS CÉLULAS CD138+ NOS MEIOS E NA AMOSTRA DO PACIENTE COM DIAGNÓSTICO PRÉVIO DE MM PARA ANÁLISE DE DRM.....18

QUADRO 3: CARACTERIZAÇÃO FENÓTIPICA DOS MEIOS E DA AMOSTRA DO PACIENTE COM SUSPEITA DE MM.....20

QUADRO 4: CARACTERIZAÇÃO FENÓTIPICA DOS MEIOS E DA AMOSTRA DO PACIENTE COM DIAGNÓSTICO PRÉVIO DE MM PARA ANÁLISE DE DRM:.... 20

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Quantificação das citocinas presentes no sobrenadante de cultura de mieloma múltiplo.....	14
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

GMSI	- GAMOPATIA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INDETERMINADO
HSCs	- HEMATOPOIETIC STEM CELLS
IFISH	- HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE DE NÚCLEOS INTERFÁSICOS
MDE	- SIGLA EM INGLÊS PARA EVENTOS DEFINIDORES DE MIELOMA
MM	- MIELOMA MÚLTIPLO
MMPs	- MULTIPOTENT PROGENITORS
MO	- MEDULA ÓSSEA
OMS	- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE

SUMÁRIO

1.	
INTRODUÇÃO.....	01
1.1.CONTEXTO	01
1.2. PROBLEMA.....	02
1.3. OBJETIVOS.....	02
1.3.1. Objetivo geral.....	02
1.3.2. Objetivos específicos.....	02
1.4. JUSTIFICATIVA.....	03
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. DESENVOLVIMENTO DA CÉLULA B.....	04
2.2. ATIVAÇÃO DE CÉLULA B E DIFERENCIAÇÃO EM PLASMÓCITOS.....	05
2.3. FUNDAMENTOS GENÉTICOS PRIMÁRIOS DAS GAMOPATIAS	06
2.4.MIELOMA MÚLTIPLO.....	07
2.5. DIAGNÓSTICO DE MM POR IMUNOFENOTIPAGEM.....	09
2.6. DIAGNÓSTICO DE MM POR CITOGENÉTICA.....	10
2.7. MICROAMBIENTE MEDULAR QUE FAVORECE O MM.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. AMOSTRAGEM.....	14
3.2. ENRIQUECIMENTO DOS MEIOS COM INTERLEUCINA-6 E COM O FATOR DECRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF).....	14
3.3. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E FATOR DE CÁLCULO PARA O CULTIVO CELULAR.....	15
3.4. COLHEITA E PROCESSAMENTO CITOGENÉTICO	15
3.4. IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	16
3.5. PREPARO DE LÂMINAS, BANDEAMENTO G E COLORAÇÃO.....	16
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	17
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22

1 INTRODUÇÃO

1.1. CONTEXTO:

O Mieloma múltiplo (MM) é neoplasia hematológica maligna caracterizada pela proliferação desregulada e clonal de células plasmáticas na medula óssea (MO) (GUEDES; BECKER; TEIXEIRA, 2023). O MM é responsável por 1% de todos os cânceres e aproximadamente 10% das neoplasias hematológicas (RAJKUMAR, 2024).

Conforme a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde (OMS), o MM foi responsável por 117.077 óbitos em 2020, o que corresponde a uma taxa de mortalidade mundial igual a 1,1 óbitos/100 mil habitantes e foram registrados 176.404 novos casos, sendo a taxa de incidência mundial igual a 1,8 casos/100 mil habitantes (CONITEC, 2022). No Brasil, os dados do Painel de oncologia Brasil revelaram cerca de 3.480 casos de MM diagnosticados em 2020 (DATASUS, 2024).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do MM são idade, sexo, raça e histórico familiar (CONITEC, 2022). A incidência do MM aumenta com a idade, sendo mais prevalentes em adultos com mais de 65 anos (CONITEC, 2022). Em relação ao sexo e raça, é mais frequente em homens do que mulheres e em afrodescendentes, quando comparados a caucasianos e asiáticos (GUEDES; BECKER; TEIXEIRA, 2023 e CONITEC, 2022).

O MM inicia-se com um quadro não maligno definido como gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI), que pode progredir para um quadro de mieloma assintomático ou latente, e menos frequentemente, progride para o mieloma múltiplo, estado correspondente a doença sintomática (RAUBER E AMÂNCIO, 2023). Fisiologicamente, as células plasmáticas produzem e secretam imunoglobulinas com a função biológica de auxiliar no combate a infecções e outras doenças. Porém, no MM ocorre a produção excessiva de paraproteína monoclonal, uma globulina também denominada de proteína M, com níveis elevados no soro e urina (RAUBER E AMÂNCIO, 2023). Os sintomas do MM são inespecíficos, em sua maioria, decorrentes da deposição da proteína M nos tecidos e órgãos. Os sinais e sintomas mais recorrentes são dores e lesões ósseas, hipercalcemia, anemia, infecções por disfunção leucocitária e insuficiência renal (GUEDES; BECKER; TEIXEIRA, 2023).

1.2. PROBLEMA:

O MM é uma doença progressiva e incurável. Entretanto, na atualidade, existem tratamentos clínicos e terapêuticos que podem melhorar a qualidade de vida e sobrevida do paciente. Nesse contexto, o estabelecimento do plano terapêutico mais indicado para cada paciente baseia-se na genética do tumor e na condição clínica do paciente, levando em consideração a idade e as comorbidades (CALDEIRA, 2019). Para que haja melhor prognóstico e decurso clínico, é necessário o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, um tratamento precoce (SALEMA E CARVALHO, 2019). Nesse sentido, a análise citogenética é uma importante ferramenta diagnóstica e prognóstica que pode contribuir para o diagnóstico precoce de pacientes com MM, contribuindo conseqüentemente para a melhora na qualidade de vida e sobrevida. Entretanto, o maior limitante dessa modalidade de análise é o baixo índice mitótico das células plasmáticas neoplásicas de MM em cultivo celular, considerando os meios de cultivo comercialmente disponíveis (AYDIN et al., 2020).

1.3. OBJETIVOS:

1.3.1. OBJETIVO GERAL:

Analisar o efeito de dois diferentes fatores de crescimento presentes no microambiente tumoral do MM sobre o crescimento *in vitro* de células plasmáticas, assim como testar sua funcionalidade como agentes mitóticos. Nesse sentido, visa-se aumentar o índice mitótico das células plasmáticas de MM para aumentar a sensibilidade de testes citogenéticos (cariótipo e FISH) para o diagnóstico citogenético de MM

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- I. Avaliar o efeito do enriquecimento do meio de cultivo para medula óssea com interleucina-6 e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) sobre o crescimento de plasmócitos *in vitro*, visando reproduzir *in vitro*, o microambiente tumoral do MM.

- II. Aumentar o crescimento de plasmócitos em cultivo e a sensibilidade dos testes citogenéticos em decorrência do enriquecimento do meio de cultivo.
- III. Avaliar o potencial da Interleucina-6 e do VEGF como agentes mitóticos em cultivo celular de curta duração.

1.4. JUSTIFICATIVA:

A avaliação citogenética é de extrema importância para a estratificação de risco em pacientes com MM (CORDEIRO et al., 2022), e auxilia na decisão médica sobre o esquema terapêutico a ser utilizado (CONITEC, 2022). A maior limitação da análise citogenética é a pequena porcentagem de plasmócitos presente na amostra de MO de pacientes com suspeita de MM (PALUMBO et al., 2015). Para superar esse problema, atualmente se utiliza a técnica de iFISH após o enriquecimento por Micro Beads Magnéticas com anti-CD138 (PALUMBO et al., 2015). Porém o enriquecimento de células plasmáticas encarece o custo do exame e requer rápido processamento da amostra (HARTMANN et al., 2011), além de adicionar elevado custo ao exame por se tratar de reagentes caros e que requerem importação. Esse trabalho propõe um novo método de enriquecimento, que busca aumentar o índice mitótico de células plasmáticas em cultivo celular e, conseqüentemente, aumentar a sensibilidade da citogenética convencional e do FISH por um custo menor.

2 REVISÃO DE LITERATURA:

2.1 DESENVOLVIMENTO DA CÉLULA B:

As células B são produzidas a partir de uma célula-tronco hematopoiética pluripotente (HSCs- hematopoietic stem cells) que reside na MO com célula rara (RAMÍREZ, LUKIN E HAGMAN, 2010; ABDELHAY et. al. 2009,). A HSCs que perderam a sua extensa capacidade de autorrenovação se tornam progenitores multipotentes (MMPs- multipotent progenitors), que produzem progenitores preparados por linfoides, que se diferenciam, posteriormente, em progenitores linfoides comuns (NUTT E KEE, 2007; KWON et al., 2008). O progenitor linfoide comum dá origem as células B, T e natural Killer (KWON et al., 2008). A especialização linfoide e a perda do potencial mieloide é processo gradual que está envolvido com o aumento na expressão do receptor de tirosina quinase Flt3 (NUTT e KEE, 2007).

A diferenciação do progenitor linfoide comum em células B envolve vários estágios. Inicialmente, a atividade dos fatores de transcrição EBF, E2A e Pax5 contribui para o comprometimento com a linhagem B e na diferenciação em célula pró-B (NUTT e KEE, 2007; RAMÍREZ et al, 2010; CARVALHO, 2021). Esses fatores de transcrição induzem a síntese de proteínas transferases e recombinases, necessárias para iniciar a recombinação V(D)J (CARVALHO, 2021). É no estágio pró-B que ocorre a recombinação dos genes de Ig no locus da cadeia pesada. (CARVALHO, 2021). Quando o rearranjo da cadeia pesada é bem-sucedido, a célula passa a expressar em sua superfície celular o pré-BCR, tornando-se uma célula pré-B. (CARVALHO, 2021). No estágio pré-B, inicia-se o rearranjo do loci da cadeia leve. Quando o rearranjo da cadeia é bem-sucedido, a célula passa a ser chamada de célula B imatura, passando a expressar um BCR completo (CARVALHO, 2021). A montagem completa do BCR ativa moléculas sinalizadoras que fornecem sinais de sobrevivência e são responsáveis pela seleção positiva de células B (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Caso alguma célula B imatura reconheça com alta avidéz autoantígenos presentes na medula óssea, essa célula poderá sofrer edição do receptor ou morte celular, em um processo denominado seleção negativa (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). As células imaturas que expressam o BCR completo e não apresentam forte autorreatividade deixam a medula óssea e migram para o baço ou

outros órgãos linfoides secundários para completarem sua maturação (BARWICK et al., 2019).

2.2 ATIVAÇÃO DE CÉLULA B E DIFERENCIAÇÃO EM PLASMÓCITOS:

As células B maduras ingênuas, isto é, células que não produzem anticorpos e que nunca entraram em contato com o antígeno, permanecem mitoticamente e transcritionalmente quiescentes, vigiando o ambiente a procura de antígenos que possam ser reconhecidos pelos receptores do tipo Toll-like (TLR), presente nas células T, e pelo seu próprio BCR (BARWICK et al., 2019). Para ser capaz de produzir e secretar anticorpos, as células B precisam ser ativadas, o que culminará em um intenso processo de proliferação celular e diferenciação em plasmócitos (MESQUITA JÚNIOR et al, 2010). As células B podem ser ativadas de duas formas: através da ativação T independente e através da ativação T dependente. Na ativação T independente, antígenos não proteicos e poliméricos estimulam a produção de imunoglobulinas de baixa afinidade, pertencentes a classe IgM MESQUITA JÚNIOR et al, 2010). Essa forma de ativação resulta em uma resposta aguda e de baixa duração, caracterizada por menor tempo de vida das células B e plasmablastos (BARWICK et al., 2019). Em contrapartida, a resposta T dependente necessita do reconhecimento do antígeno pelas células T auxiliares, que cooperam com os linfócitos B, estimulando a expressão clonal, o switch de classe, a maturação da afinidade e a diferenciação dos linfócitos B em células de memória (MESQUITA JÚNIOR et al, 2010). A resposta decorrente da ativação T dependente é mais duradoura e seletiva, porém esse processo está sujeito a erros genômicos que contribuem para a oncogênese, devido aos próprios mecanismos genéticos, intrínsecos do seu processo de maturação (BARWICK et al., 2019) .

Inicialmente na ativação T dependente, antígenos proteicos são reconhecidos pelos BCRs, sendo endocitados, processados e apresentados às células T, através das moléculas de MHC de classe II presentes nas células B (BARWICK et al., 2019). Quando a célula T reconhece o antígeno apresentado, através do seu receptor TCR, ocorre uma indução sináptica imunológica, que resulta na estimulação da célula T e na expressão do ligante CD40 (CD40L) (BARWICK et al., 2019). A expressão de CD40L pelas células T, induz a liberação das interleucinas IL4, IL21 e IL6 pelas células T, e estimula a sinalização de CD40 nas células B (BARWICK et al., 2019). Esses

eventos resultam em uma potente ativação das células B, sendo responsáveis pela rápida proliferação de células B e formação de centros germinativos, que são estruturas linfoides, localizadas nos tecidos linfoides secundários, onde ocorre a expansão clonal de células B, hipermutação somática e seleção baseada em afinidade para a produção de anticorpos com alta afinidade (BARWICK et al., 2019; VICTORA E NUSSENZWEIG, 2012; MACLENNAN, 1994). Após passarem por hipermutação somática produtiva, a seleção de antígeno e a troca de classe de IgH, também conhecida como switch de classe, as células B ativadas se tornam plasmoblastos que migram para o ambiente da medula óssea para se diferenciar em células plasmáticas de longa duração (CHNG et al., 2007).

Estudos sugerem que os eventos primários que dão origem ao mieloma múltiplo podem ser resultados de alterações genéticas que ocorrem durante a exposição à mecanismos de hipermutação somática no centro germinativo (CANTADORI, 2024; SAHOTA et al., 1997). As análises dos genes V, em especial do gene V_H, mostraram que a célula maligna passou por um extenso processo de hipermutação somática, e que não há heterogeneidades intraclonal entre a população de células tumorais, o que sugere que a célula maligna do MM pode ser uma célula B de memória ou plasmablasto que já passou pelo estágio de hipermutação somática e seleção de antígeno (SAHOTA et al., 1997; BAKKUS et al., 1992). Isso explica o porquê os principais isótipos das paraproteínas no MM são IgG ou IgA, ao invés de IgM (BAKKUS et al., 1992).

2.3. FUNDAMENTOS GENÉTICOS PRIMÁRIOS DAS GAMOPATIAS

As células neoplásicas de MM apresentam uma combinação complexa de alterações genéticas e citogenéticas (BRAGGIO E RENAULT, 2007). Na maioria dos casos, as alterações genéticas são responsáveis pelos eventos que iniciam a proliferação anormal de plasmócitos, constituindo assim o evento genético fundador das gamopatias (BARWICK et al., 2019). Todos os casos de MM são precedidos por um estado precursor e assintomático denominado de gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) (RASMUSSEN et al., 2010; LANDGREN et al., 2009). Muitos estudos de análise citogenética e de perfil de expressão gênica comprovaram que a maioria das alterações citogenéticas detectadas nas células

neoplásicas de MM também podem ser detectadas em células GMSI (MIKULASOVA et al., 2016; FONSECA, et al., 2002; RASMUSSEN et al., 2010; DHODAPKAR, 2016)

As principais alterações genéticas que constituem o evento genético fundador das gamopatias monoclonais são as translocações IGH, isto é, translocações envolvendo o cromossomo 14, e as trissomias de vários cromossomos ímpares (AKSENOVA et al., 2021). Outras alterações estruturais, como ganho do cromossomo 1q, deleção do cromossomo 13q e deleção do cromossomo 17p, são menos frequentemente encontradas no estágio de GMSI (AKSENOVA et al., 2021).

As translocações envolvendo os loci das imunoglobulinas são translocações recíprocas, isto significa que são alterações estruturais onde ocorre a troca de segmentos cromossômicos entre dois cromossomos (BERGSAGEL E KUEHL, 2001; MALUF et al., 2011). As principais translocações IGH encontradas são t(4;14), t(6;14), t(11;14), t(14;16) e t(14;20) (AKSENOVA et al., 2021). Essas translocações resultam na expressão de oncogenes devido à justaposição de intensificadores de imunoglobulinas com oncogenes, incluindo Ciclina D, WHSC1, MAF ou MAFB (BARWICK et al., 2019).

As trissomias de cromossomos ímpares são alterações numéricas, classificadas como aneuploidia do tipo hiperdiploide. As principais trissomias descritas envolvem os cromossomos 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21 (AKSENOVA et al., 2021).

2.4- MIELOMA MÚLTIPLO

O mieloma múltiplo (MM), também conhecido como doença de Kähler, mielomatose ou mieloma plasmocítico, é uma neoplasia hematológica maligna de células plasmáticas, caracterizado pela proliferação desregulada e clonal de células plasmáticas na medula óssea (GUEDES; BECKER E TEIXEIRA, 2023). Existe um conjunto de alterações, genéticas, citogenéticas e epigenéticas responsáveis pela transformação maligna das células plasmáticas, que resultam no crescimento descontrolado dessas células na medula óssea e em grande secreção de anticorpos monoclonais não funcionais, conhecidos como paraproteína ou proteína M (TORRES et al, 2022).

Quase todos os pacientes com MM evoluem a partir de um estágio pré-maligno e assintomático, denominado de gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) (RAJKUMAR,2024). O GMSI é a gamopatia monoclonal mais comum, sendo a taxa de progressão para o MM de 1% ao ano (THERNEAU et al., 2012; FARIA E SILVA, 2007; RAJKUMAR,2024). O estágio de GMSI é caracterizado por nível sérico de imunoglobulina monoclonal maior que 3g/dL, infiltrado de plasmócitos na medula óssea inferior a 10% e ausência de danos aos órgãos terminais (ou órgãos-alvo), isto é ausência dos sintomas CRAB (THERNEAU et al., 2012; (RAJKUMAR,2024). Em alguns pacientes é encontrado um estágio pré-maligno intermediário mais avançado, denominado mieloma múltiplo latente (SMM) (RAJKUMAR,2024). Esse estágio apresenta maior risco de progressão para MM quando comparado ao GMSI, sendo a taxa de progressão para o MM de aproximadamente 10% ao ano durante os primeiros 5 anos após o diagnóstico. Essa taxa de progressão é influenciada pela carga da doença e pelo tipo citogenético subjacente da doença, como a presença de translocação t(4:14), del(17p) e gain(1q) (RAJKUMAR,2024).

O diagnóstico atual de MM é baseado nos critérios revisados do International Myeloma Working Group (IMWG) de 2014. O diagnóstico de MM requer a presença de um ou mais eventos definidores de mieloma (MDE), que consiste nos sintomas CRAB e na presença de três biomarcadores específicos (RAJKUMAR,2024). Os sintomas CRAB incluem hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões líticas ósseas, e os três biomarcadores específicos são presença de células plasmáticas clonais na medula óssea $\geq 60\%$, razão de cadeia leve livre (FLC) sérica ≥ 100 e mais de uma lesão focal vista em ressonância magnética (RAJKUMAR,2024).

Com base nas Diretrizes Diagnósticas Terapêuticas do MM de 2022 do Ministério da Saúde, a investigação inicial dos pacientes com suspeita de MM deve levar em consideração o hemograma completo, os níveis séricos de ureia e creatinina, cálcio, eletroforese e imunofixação de proteínas séricas e urinárias, dosagem sérica de imunoglobulinas, dosagem de cadeias leves (kappa e lambda) livres, albumina e desidrogenase láctica (CONITEC,2022). Uma vez que a suspeita diagnóstica de MM seja apoiada pela investigação inicial, exames complementares devem ser realizados, isto inclui, mielograma, biópsia de medula óssea, imunofenotipagem, citogenética

convencional ou, preferencialmente testes citogenéticos por Hibridização in Situ por Fluorescência- FISH (CONITEC, 2022).

2.5 DIAGNÓSTICO DE MM POR IMUNOFENOTIPAGEM

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é utilizada para detectar plasmócitos anormais e determinar a clonalidade (BRASIL, 2015). O achado de células plasmáticas fenotipicamente aberrantes é útil para o diagnóstico diferencial entre GMSI, mieloma múltiplo e condições reativas (RAWSTRON et al, 2008).

Para o diagnóstico de MM, a quantificação precisa da carga de células plasmáticas é essencial (RAWSTRON et al, 2008). Comumente, a análise da extensão da infiltração de células plasmáticas nas amostras de medula óssea é realizada por mielograma, sendo a análise por citometria mais limitada (RAWSTRON et al, 2008). Nesse sentido, a limitação do uso da imunofenotipagem para o diagnóstico de MM provavelmente se deve a discrepância na porcentagem de células plasmáticas observadas na citometria de fluxo em comparação a microscopia convencional (RAWSTRON et al, 2008). Essas discrepâncias afetam todas as investigações laboratoriais, isto inclui a citogenética convencional e por FISH e as análises moleculares. Provavelmente a principal causa dessas discrepâncias é o uso do aspirado primário para a avaliação morfológica e o uso do aspirado secundário para as demais análises laboratoriais (RAWSTRON et al, 2008).

As células plasmáticas, de maneira geral, são identificadas pela marcação de CD138 (RAWSTRON et al, 2008). Um plasmócito normal é fenotipicamente CD138+, CD19+, CD45+, CD38+, CD79a+, CD27+++, CD81+, CD56-, CD117-, CD20-, CD28-/dim e CD200dim. Já o plasmócito fenotipicamente mais encontrado no MM é CD138+, CD19-, CD45-/dim, CD38+, CD79a+, CD27dim/-, CD81dim/-, CD56+, CD117+, CD20+, CD28+++ e CD200+++ (BRASIL, 2015).

2.6- DIAGNÓSTICO DE MM POR CITOGENÉTICA

No Brasil, desde 2022, a avaliação por Hibridização Fluorescente de núcleos interfásicos (iFISH) é obrigatória para o diagnóstico de MM (CONITEC, 2022).

Os estudos citogenéticos apresentam um papel fundamental na estratificação de risco em pacientes com MM (CORDEIRO et al., 2022), sendo a presença del(17p), t(4;14), t(14;16), t(14;20), gain 1q, del 1p ou mutação p53 considerado MM de alto risco (RAJKUMAR,2024). E, a presença de duas alterações citogenéticas de alto risco é considerado MM de duplo impacto e a presença de três alterações de alto risco é considerado MM de triplo impacto (RAJKUMAR,2024). Aproximadamente 40% dos casos de MM apresentam trissomias de cromossomos ímpares nas células plasmáticas, sendo classificado como MM hiperdiploide (AKSENOVA et al., 2021; RAJKUMAR,2024), enquanto, a maioria restante apresenta uma translocação envolvendo o locus da cadeia pesada de imunoglobulina (IgH), no cromossomo 14q32, classificado como MM translocado por IgH (RAJKUMAR,2024). Além disso, as informações citogenéticas podem ser utilizadas na tomada de decisão sobre o esquema terapêutico a ser utilizado (CONITEC, 2022).

O maior desafio, considerado como fator limitante da citogenética convencional é baixo índice mitótico das células plasmáticas neoplásicas de MM, resultando em reports falso negativos (AYDIN et al.,2020; KADAM AMARE et al.; 2023). Para superar esse problema, a recomendação atual do Sistema de Estadiamento Internacional Revisado para Mieloma Múltiplo de 2015, sugere a utilização de Hibridização Fluorescente in Situ interfásica - iFISH após a purificação de células plasmáticas CD138 por meio do enriquecimento por MicroBeads magnéticas revestidas com anti-CD138, visto que a sensibilidade do FISH também é limitada pela porcentagem de células plasmáticas na amostra de medula óssea (PALUMBO et al., 2015). Porém, o enriquecimento com MicroBeads magnéticas encarece o custo do ensaio e necessita que a amostra seja processada, preferencialmente em até 24 horas após a coleta para manter a sua sensibilidade, visto que estudos mostraram que a porcentagem de células plasmáticas após o enriquecimento diminui conforme o tempo após a coleta aumenta (HARTMANN et al., 2011).

2.7- MICROAMBIENTE MEDULAR QUE FAVORECE O MM:

O câncer pode ser entendido com um distúrbio hiperproliferativo que envolve a transformação morfológica celular, a desregulação da apoptose, a proliferação descontrolada, a angiogênese, a invasão de outros tecidos com o surgimento das metástases (LIN E KARIN,2007). A percepção do câncer na atualidade é definida como um microambiente tumoral, onde componentes celulares, incluindo células geneticamente alteradas, células normais e vasos sanguíneos, interagem com componentes moleculares, contribuindo como determinantes da progressão tumoral (ONUCHIC E CHAMMAS, 2010). Nesse sentido, o microambiente da medula óssea é determinante para a sobrevivência e proliferação de células plasmáticas malignas (COTOVIO, 2020). A interação entre as células plasmáticas malignas com o microambiente tumoral facilita a diferenciação, migração, proliferação e resistência à fármaco por essas células (COTOVIO 2020). O microambiente tumoral pode ser funcionalmente dividido em dois compartimentos, um compartimento celular, composto por células hematopoiéticas e não hematopoiéticas, e um compartimento não celular, composto pela matriz extracelular, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e exossomos (BRIGLE, 2017). Os componentes celulares desse microambiente incluem células hematopoiéticas, osteoclastos, osteoblastos, células do estroma da medula óssea e células endoteliais (BRIGLE, 2017; COTOVIO, 2020). Essas células podem contribuir para a migração e proliferação de células plasmáticas malignas pela secreção de diversos fatores, que correspondem ao componente não celular do microambiente tumoral (COTOVIO, 2020).

Diversos estudos relatam o papel fundamental da interleucina-6 como fator de crescimento e sobrevivência das células plasmáticas malignas do MM (ANDERSON et al., 1989; KLEIN et al., 1989; JR Et al, 2010). Em situações fisiológicas, a interleucina-6 induz a diferenciação de células plasmáticas e, na patogênese do MM, induz a proliferação celular e a inibição da apoptose (JR et al, 2010). Existem diversos eventos dentro do microambiente tumoral que levam a secreção de interleucina-6 (JR et al, 2010). Apesar das células plasmáticas secretarem IL-6 como fator de crescimento, são as células do estroma da medula óssea as principais responsáveis por sua secreção (JR et al, 2010). Essas células aumentam a secreção de interleucina-6, mediante a interação com as células plasmáticas neoplásicas do MM (JR et al, 2010). As células plasmáticas de MM secretam VEGF, que estimula o aumento da secreção

de interleucina-6 pelas células do estroma da medula óssea (JR et al, 2010). O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é o primeiro e a principal citosina angiogênica associada ao MM, envolvida não apenas na angiogênese, mas também, na regulação da adesão das células do MM, aumentando a adesão celular (JR et al, 2010; SANTOS, 2015). Existem outras citosinas angiogênicas secundárias, isto é, citosinas ativadas à medida que a massa tumoral se multiplica (JR et al, 2010). Essas citocinas são o fator de crescimento fibroblástico beta (β FGF) e o fator transformador de crescimento beta ($\text{TGF}\beta$) (JR et al, 2010).

A interleucina-6, o VEGF e outros fatores de crescimento podem ativar vias de sinalização relacionadas a inflamação e envolvidas no desenvolvimento tumoral, como a via JAK/STAT (Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription) (SANTOS, 2015; ONUCHIC e CHAMMAS, 2010). Estudos demonstraram que a via JAK/STAT está constitutivamente ativa nas células plasmáticas de pacientes com MM (BHARTI, 2003; FALCONE, 1999), sendo a principal forma de ativação dessa via a secreção autócrina e parácrina de IL-6, que induz a hiperatividade de STAT3, que é um fator de transcrição da família de proteínas transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT), através de mecanismos compartilhados com muitas citocinas (FALCONE, 1999). A ativação de receptores de citocinas presentes na superfície celular das células de MM ativa a família Janus Kinase (JAK) de proteínas tirosina quinases, responsáveis pela fosforilação e ativação de proteínas STAT citoplasmáticas (FALCONE, 1999). Uma vez que o STAT3 é ativado ele é dimerizado e translocado para o núcleo, onde vai induzir a expressão de genes regulados por STAT (FALCONE, 1999). A sinalização mediada por STAT3 resulta no aumento da expressão do gene Bcl-X_L (FALCONE, 1999), que resulta no aumento da proteína antiapoptótica BCL-XL, que confere resistência a apoptose e contribui para a progressão tumoral no MM (FALCONE, 1999; SANTOS, 2015; ONUCHIC e CHAMMAS, 2010). A atividade do STAT3 também estimula a síntese de citocinas e fatores de crescimento, que impedem a maturação de células dendríticas, impedindo a atividade antitumoral das células T citotóxicas e das células NK. (ONUCHIC e CHAMMAS, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. AMOSTRAGEM:

Utilizamos uma amostra de aspirado de MO de um paciente com suspeita de MM e uma amostra de aspirado de MO de um paciente com diagnóstico prévio de MM. Ambas as amostras foram encaminhadas do Hospital Erasto Gaertner. As amostras foram coletadas em tubo de heparina e armazenadas em temperatura ambiente até o momento da semeadura da amostra em meios de cultivo. Os pacientes analisados preencheram o TCLE respectivo ao projeto, de acordo com o Protocolo 73835923.0.0000.0102 (Comitê de ética Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná - SCS/UFPR, aprovação em 06/12/2023) e Protocolo 73835923.0.3001.0098 (Comitê de ética Hospital Erasto Gaertner - Liga Paranaense de Combate ao Câncer, aprovação em 09/04/2024)

3.2. ENRIQUECIMENTO DOS MEIOS COM INTERLEUCINA-6 E COM O FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF):

Para cada paciente foram preparados quatro meios de cultivo: um meio controle, um meio enriquecido com IL-6, um meio enriquecido com VEGF e um meio enriquecido com IL-6 e VEGF. Para o enriquecimento dos meios foi utilizado a proteína Recombinant Human Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF) da Thermo Fisher Scientific e Human Interleukin-6 (rhIL-6) da Thermo Fisher Scientific. A concentração de cada fator de crescimento foi definida com base no trabalho de Bohatch Jr et al., de 2003, no qual foi realizado uma quantificação de vários fatores de crescimento, incluindo o VEGF e a IL-6, no sobrenadante de cultura de MM, conforme TABELA1.

TABELA 1 – Quantificação das citocinas presentes no sobrenadante de cultura de mieloma múltiplo:

Fator de Crescimento	Média (pg/mL)	Desvio Padrão
VEGF	247,30	± 3,296
IL-6	8033,30	± 8,963

FONTE: Adaptado de Bohatch Jr et al, 2003.

O meio utilizado para o controle e para o enriquecimento é o meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino, Sulfato de Gentamicina 50 mg/L e Anfotericina 2mg/L da Vitrocell. Este meio é próprio para a realização do cariótipo em amostras de medula óssea pois, de maneira geral, as células presentes na medula óssea apresentam capacidade de multiplicação em meio de cultura sem o uso de mitógenos.

3.3. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E FATOR DE CÁLCULO PARA O CULTIVO CELULAR:

Para manter a celularidade recomendada correspondente à 5×10^6 células no meio, foi realizada a contagem de leucócitos na câmara de Neubauer. Para isso, foi utilizado a solução de Tuck da RenyLab, para lisar as hemácias e diluir os leucócitos na proporção 1:20, conforme recomendado pelo fabricante. Para determinar o volume de amostra a ser semeado no meio de cultivo, foi utilizado a seguinte fórmula:

$$\text{Volume de amostra (}\mu\text{L)} = \frac{5.000.000}{\text{WBC (mm}^3\text{)}}$$

Foi utilizado o mesmo volume de amostra no meio controle e nos meios enriquecidos. Além do resultado da fórmula, foi levado em consideração o volume de amostra disponível para a semeadura. O tempo de cultivo realizado foi de 72 horas, à 37°C.

3.4. COLHEITA E PROCESSAMENTO CITOGENÉTICO:

Um pouco antes de finalizado o tempo de 72 horas de cultivo celular, foi adicionado Colcemid para bloquear a divisão celular. Para a hipotonia foi utilizado a solução hipotônica de KCl na concentração de 0,075M. A interrupção da hipotonia e a fixação celular foi obtida pelo uso da solução de Carnoy. Antes do processamento citogenético, foi separado uma alíquota de 1 mL de cada meio para a realização da imunofenotipagem por citometria de fluxo.

3.5. IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO:

Para quantificar a % de plasmócitos normais e anômalos presente em cada meio foi utilizado imunofenotipagem por citometria de fluxo. O citômetro utilizado foi o BD FACSLyric de 10 cores e 12 parâmetros da Becton Dickinson (BD) Biosciences. Os marcadores de superfície utilizados foram CD45, CD138, CD38, CD56, CD19 e C28. Para avaliar a viabilidade celular foi utilizado o corante 7-AAD (7-Amino-Actinomicina D), que é um corante de ácido nucleico que se liga seletivamente às regiões GC do DNA. Este corante é utilizado para distinguir células viáveis de células mortas, visto que a permeabilidade da membrana e a intensidade da marcação por 7-AAD aumenta na apoptose mais tardia. (ZEMBRUSKI et al., 2012). Também foi realizada imunofenotipagem, com os mesmos marcadores, na amostra de heparina em até 24 horas após a coleta.

3.6. PREPARO DE LÂMINAS, BANDEAMENTO G E COLORAÇÃO:

As lâminas foram preparadas em banho-maria, à 60°C. Foi realizado o bandejamento G com a utilização de Tripsina 0,2% e coloração de Giemsa-Wright, conforme ROONEY e CZEPULKOWSKI 1992 com modificações.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS:

Nossa amostragem incluiu dois pacientes, um paciente com suspeita de MM e um paciente com diagnóstico confirmado de MM para análise de doença residual mínima (DRM). O paciente com suspeita de MM é do sexo masculino, de 48 anos. A análise por imunofenotipagem realizada pelo laboratório de citometria de fluxo do Hospital Erasto Gaertner resultou em sugestivo de gamopatia monoclonal de significado indeterminado. Foi observado 1,6% células anormais, sendo o fenótipo dessa célula: CD28-/+, CD38++, CD138+, CD56-, CD19-e CD45-. O paciente com diagnóstico prévio de MM é do sexo masculino, de 66 anos, foi diagnosticado com MM em janeiro de 2021, apresenta lesões ósseas e anemia. A imunofenotipagem realizado no hospital Erasto Gaertner resultou em DRM positiva, com 2,9% de células anormais, sendo o fenótipo dessa célula CD28++, CD38++, CD138++, CD56++ CD19-e CD45-.

Para obter êxito na cultura de células e, consequentemente na análise citogenética, é necessário que a célula com possível a alteração genética e citogenética esteja viva e em boa proporção na amostra que está sendo cultivada e analisada. Nesse sentido, foi realizada a quantificação de CD138+ por imunofenotipagem na amostra de aspirado de MO em heparina para avaliar a proporção de células CD138 viáveis para o cultivo celular, isto é, para avaliar a porcentagem de células CD138 vivas na amostra.

No caso da suspeita de MM, a porcentagem total de células plasmáticas anormais presentes na amostra igual a 0,37% e a viabilidade igual a 1,9%, sendo a porcentagem de células viáveis para o cultivo celular igual à 0,007% (QUADRO 1 e GRÁFICO 1). No caso da DRM de MM, a porcentagem de células anormais igual a 0,20%, a viabilidade igual a 14% e a porcentagem de células plasmáticas anormais viáveis para o cultivo celular igual a 0,028% (QUADRO 2 E GRÁFICO 2). Houve uma diferença considerável entre a porcentagem de células anormais encontrada na amostra de EDTA, utilizada na imunofenotipagem, em relação a porcentagem encontrada na amostra de heparina. Essa diferença pode ser explicada pela perda na viabilidade celular na amostra de heparina, visto que nesta amostra a imunofenotipagem foi realizada 24 horas após a coleta. Entretanto, a porcentagem de plasmócitos encontrado nos dois casos e nos dois tipos de anticoagulante é menor do

que a porcentagem esperada de plasmócitos na MO de um paciente com MM. Essa discrepância é explicada pelo uso do aspirado primário de MO para determinar a infiltração de plasmócitos por mielograma e o uso do aspirado secundário para as demais análises laboratoriais (RAWSTRON et al, 2008).

QUADRO 1 – QUANTIFICAÇÃO DE PLASMÓCITOS E VIABILIDADE DAS CÉLULAS CD138+ NOS MEIOS E NA AMOSTRA DO PACIENTE COM SUSPEITA DE MM:

	Aspirado de MO em heparina	Meio Controle	Meio enriquecido com VEGF	Meio enriquecido com IL-6	Meio enriquecido com VEGF e IL-6
Nº de eventos adquiridos:	808.631	522,292	447.125	442.618	450.046
Nª eventos analisados:	715.467	381.517	265.978	178.502	268.380
% CD138 normal	0,07%	0,10%	0,02%	0,02%	0,05%
% CD138 anormal	0,37%	0,33%	0,39%	0,39%	0,40%
Viabilidade da célula CD138 normal	3,0%	100,0%	61,7%	100%	93,7%
Viabilidade da célula CD138 anormal	1,9%	92,9%	85,4%	98,8%	94,5%

QUADRO 2 – QUANTIFICAÇÃO DE PLASMÓCITOS E VIABILIDADE DAS CÉLULAS CD138+ NOS MEIOS E NA AMOSTRA DO PACIENTE COM DIAGNÓSTICO PRÉVIO DE MM PARA ANÁLISE DE DRM:

	Aspirado de MO em heparina	Meio Controle	Meio enriquecido com VEGF	Meio enriquecido com IL-6	Meio enriquecido com VEGF e IL-6
Nº de eventos adquiridos	1.000.000	181.184	180.126	242.113	223.897
Nª eventos analisados	895.169	99.682	86.001	126.374	97.183
% CD138 normal	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%
% CD138 anormal	0,20%	0,05%;	0,12%	0,11%	0,03%
Viabilidade da célula CD138 normal	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%
Viabilidade da célula CD138 anormal	14,00%	93,30%	83,7%	70,20%	100,00%

GRÁFICO 1 – Viabilidade celular das células CD138+ no aspirado de MO em heparina no caso de suspeita de MM: Em azul escuro estão marcadas as células vivas e em vermelho estão marcadas as células mortas.

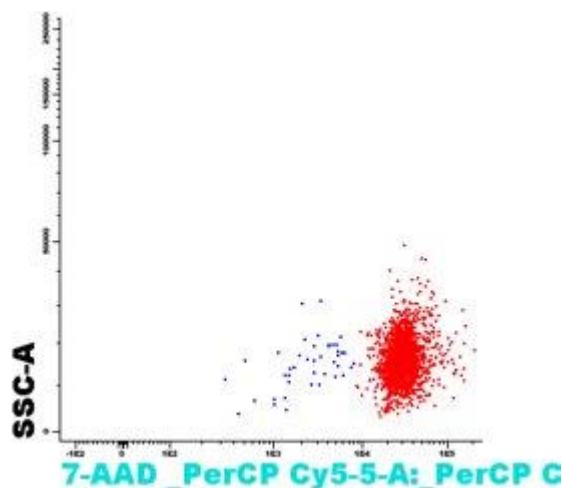
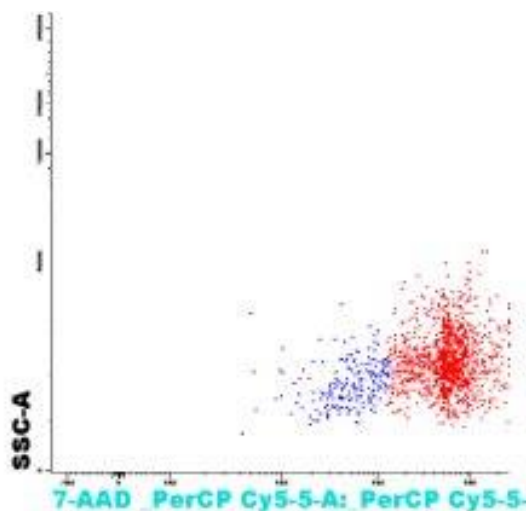


GRÁFICO 2 – Viabilidade celular das células CD138+ no aspirado de MO em heparina no caso de DRM MM: Em azul escuro estão marcadas as células vivas e em vermelho estão marcadas as células mortas.



Em relação à porcentagem de plasmócitos nos meios de cultivo, no caso da suspeita de MM não houve diferença aparente entre o meio controle e os meios enriquecidos. Porém, neste caso, a porcentagem de células viáveis para o cultivo na amostra era muito baixa e o resultado da imunofenotipagem sugere um quadro de GMSI ao invés de MM. No caso da DRM de MM, houve uma porcentagem maior de

plasmócitos anormais nos meios enriquecidos com VEGF ou com IL-6, isoladamente (QUADRO 2). A caracterização fenotípica dos plasmócitos nos meios de cultivo foi semelhante a caracterização fenotípica realizada no aspirado de MO em heparina e na amostra em EDTA realizada pelo laboratório de citometria do Hospital Erasto Gaertner. Para diferenciar o plasmócito anormal do plasmócito normal foi utilizado os marcadores CD19, CD28, CD45 e CD56. O plasmócito normal expressa CD138, CD38, CD19 e CD45, mas não expressa CD28 e CD56. O plasmócito anormal geralmente expressa CD138, CD38, CD56 e CD28 e não expressa CD45 e CD19 (QUADRO 3 e 4).

QUADRO 2 – CARACTERIZAÇÃO FENÓTIPICA DOS MEIOS E DA AMOSTRA DO PACIENTE COM SUSPEITA DE MM:

Marcador	Plasmócito Normal:						Plasmócito Anormal:					
	CD 138	CD 38	CD 56	CD 45	CD 19	CD 28	CD 138	CD 38	CD 56	CD 45	CD 19	CD 28
Aspirado de MO em heparina	-/+	+/++	-	++	+	-	+/++	+/++	-	-	-	-
Meio Controle	-/+	++	-	++	+	-	++	++	-	-	-	+
Meio com VEGF	+/++	+/++	-	++	-/+	-	+/++	+/++	-	-	-	+
Meio com IL-6	+/++	+/++	-	++	-/+	-	+/++	+/++	-	-	-	+
Meio com VEGF e IL-6	-/+	+/++	-	++	-/+	-/+	+/++	+/++	-	-	-	+

LEGENDA: (-) negativo, (-/+) fraco, + positivo, ++ positivo forte.

QUADRO 3 – CARACTERIZAÇÃO FENÓTIPICA DOS MEIOS E DA AMOSTRA DO PACIENTE COM DIAGNÓSTICO PRÉVIO DE MM PARA ANÁLISE DE DRM:

Marcador	Plasmócito Normal:						Plasmócito Anormal:					
	CD 138	CD 38	CD 56	CD 45	CD 19	CD 28	CD 138	CD 38	CD 56	CD 45	CD 19	CD 28
Aspirado de MO em heparina	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-/+	++	+/++	-	-/+	++
Meio Controle	NE	NE	NE	NE	NE	NE	++	++	++	-	+	+
Meio com VEGF	NE	NE	NE	NE	NE	NE	+/++	++	++	-	+	+/++
Meio com IL-6	NE	NE	NE	NE	NE	NE	+/++	+/++	++	-	+	++
Meio com VEGF e IL-6	+/++	++	-	+	+	-	+/++	++	-/+	-/+	+	-/+

LEGENDA: (NE) Não encontrado, (-) negativo, (-/+) fraco, + positivo, ++ positivo forte.

Em relação a análise citogenética, foram obtidas diversas metáfases (FIGURA 1 e 2), porém devido ao curto prazo para realização do presente trabalho, não foi possível analisar uma quantidade suficiente de metáfases para gerar o laudo citogenético.

FIGURA 1: METÁFASE DO CASO DE SUSPEITA DE MM. $2n = 46$ cromossomos.

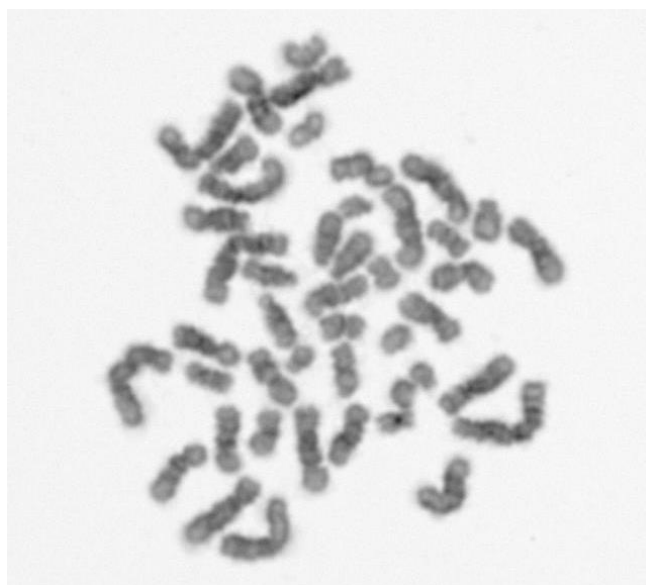
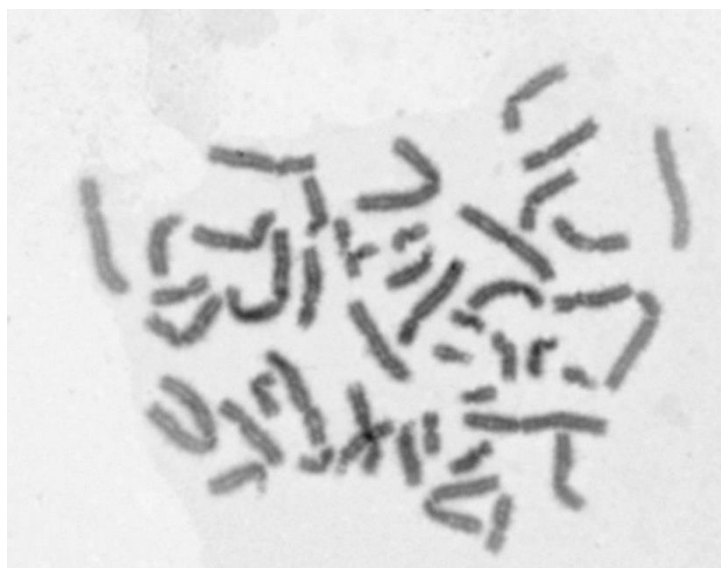


FIGURA 2: METÁFASE DO CASO DE DRM DE MM, $2n = 46$ cromossomos



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O projeto tinha por objetivo inicial encontrar fatores de crescimento que pudesse estimular a atividade proliferativa de plasmócitos em cultivos celulares de curta duração para obtenção de cromossomos metafásicos, pensando na proposição de um novo método de enriquecimento visando o aumento da sensibilidade das técnicas de citogenética convencional e da técnica de FISH.

Ao comparar a porcentagem de plasmócitos anormais no meio controle em relação aos meios enriquecidos, não houve diferença significativa no caso do paciente com suspeita de MM entre o meio de cultivo controle e os meios enriquecidos. No caso do paciente para análise de DRM de MM, no qual espera-se uma quantidade ainda mais baixa de plasmócitos na amostra obtida do paciente, a porcentagem plasmócitos anormais foi maior nos meios enriquecidos isoladamente com VEGF ou IL-6 quando comparada ao meio de cultivo controle. Apesar de interessantes para confirmar o efeito do enriquecimento com fatores que compõem o microambiente medular sobre a porcentagem de plasmócitos é necessário aumentar o número amostral. Nosso projeto piloto teve como objetivo projetar meios de cultivo potenciais para avançar em investigações mais aprofundadas no futuro.

Uma descoberta importante deste trabalho é a rápida perda da viabilidade celular das células plasmáticas que ocorre no período entre a coleta e o cultivo celular, o que torna a porcentagem de plasmócitos viáveis para o cultivo celular muito baixa. Essa perda de viabilidade celular no período entre a coleta e o cultivo celular, sugere que o baixo índice mitótico das células neoplásicas de MM seja resultado da baixa porcentagem de células viáveis para crescer em meio de cultivo, e talvez não esteja relacionada com a capacidade da célula crescer em meio de cultivo. A partir disso, sugere-se para trabalhos futuros, buscar estratégias que preservem a viabilidade celular dos plasmócitos no intervalo de tempo entre a coleta e o cultivo celular.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAY, E. S. W. et al. Células-tronco de origem hematopoéticas: expansão e perspectivas de uso terapêutico. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, p. 2–8, maio 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000019>.
- AKSENOVA, A. Y. et al. Genome Instability in Multiple Myeloma: Facts and Factors. *Cancers (Basel)*, v.13, n.23, p. 5949, novembro 2021. DOI:10.3390/cancers13235949.
- BERGSAGEL, P.L; KUEHL, W.M. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*, v.20, n.40, p.5611-5622, setembro 2001. DOI: 10.1038/sj.onc.1204641.
- BAKKUS, M. H.C.et al. Evidence That Multiple Myeloma Ig Heavy Chain VDJ Genes Contain Somatic Mutations But Show No Intraclonal Variation. *Blood: American society of hematology*, v. 80, n.9, p. 2326-2335, novembro 1992. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V80.9.2326.2326>.
- BARWICK, B.G. et al. Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n.1121, maio 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01121
- BHARTI, A.C. et al. Nuclear factor- κ B and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. *Blood: American society of hematology*, v. 103, n.8, p. 3175–3184, abril 2004. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2151>
- BRAGGIO, E; RENAULT, I.Z. Alterações moleculares no Mieloma Múltiplo. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, n. 1, p. 10–16, jan. 2007.DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000100004>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Atenção à Saúde, portária nº708, de agosto de 2015.

BRIGLE, K.; ROGERS, B. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Seminars in Oncology Nursing*, v. 33, n.3, p. 225-236, agosto 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2017.05.012>.

CANTADORI, L.O. Efeito do bortezomibe no tratamento do mieloma múltiplo: uma revisão sistemática e metanálise. 2024. 86f. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, São Paulo, 2024.

CARVALHO, P.S. Caracterização do Perfil de Expressão de Genes Associados à Resposta Imune em Pacientes HIV+ com Linfoma Difuso de Grandes Células B.217f. Tese (Mestrado)- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Rio de Janeiro, 2021.

CATLETT-FALCONE, R. et al. Constitutive Activation of Stat3 Signaling Confers Resistance to Apoptosis in Human U266 Myeloma Cells. *Immunity*, v. 10, n.1, p. 105-115, janeiro 1999. DOI: [10.1016/S1074-7613\(00\)80011-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80011-4).

CORDEIRO, M.G. et al. CITOGENÉTICA CONVENCIONAL E MOLECULAR EM MIELOMA MÚLTIPLO: ANÁLISE DE 1462 CASOS EM UM LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA DE ROTINA. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, v.44, n.2, p. S242, outubro 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.409>.

DATASUS. tabnet.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm. Painel de Oncologia Brasil. Data de atualização dos dados: 15 de novembro de 2024.

DHODAPKAR, M.V. MGUS to myeloma: a mysterious gammopathy of underexplored significance. *Blood: American society of hematology*, v.128, n.23, p.2599-2606, outubro 2016. DOI: [10.1182/blood-2016-09-692954](https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-692954)

FARIA, R.M.D.; SILVA, R.O.P. Gamopatias monoclonais: critérios diagnósticos e diagnósticos diferenciais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia [online]*, v.29, n.1, p. 17-22, março 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000100005>.

FONSECA, R. et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood: American society of hematology*, v.100, n.4, p. 1417-1424, agosto 2002. DOI: https://doi.org/10.1182/blood.V100.4.1417.h81602001417_1417_1424.

GUEDES, A.; BECKER, R.G.; TEIXEIRA, L.E.M. Multiple Myeloma (Part 1) - Update on Epidemiology, Diagnostic Criteria, Systemic Treatment and Prognosis. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 58, n. 3, p. 361–367, maio 2023. DOI: 10.1055/s-0043-1770149.

HARTMANN, L. et al. Detection of Genomic Abnormalities in Multiple Myeloma: The Application of FISH Analysis in Combination With Various Plasma Cell Enrichment Techniques. *American Journal of Clinical Pathology*, v.136, n.5, p.712-720, novembro 2011. DOI: <https://doi.org/10.1309/AJCPF7NFLW8UAJEP>.

KADAM AMARE, P. et al. Cytogenetic Abnormalities in Multiple Myeloma: Incidence, Prognostic Significance, and Geographic Heterogeneity in Indian and Western Populations. *Cytogenetic and genome research*, v. 162, n.10, p. 529–540, fevereiro 2023. DOI: 10.1159/000529191.

KWON, K. et al. Instructive Role of the Transcription Factor E2A in Early B Lymphopoiesis and Germinal Center B Cell Development. *Immunity*, v. 28, n.6, p.751-762, junho 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.04.014>.

LANDGREN, O. et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood: American society of hematology*, v.113, n. 22, p. 5412–5417, maio 2009. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-194241>.

MACLENNAN, I.C.M. Germinal Centers. *Annual Review of Immunology*, v.12, p. 117-139, abril 1994. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.001001>.

MALUF, S. W. et al. *Citogenética humana*. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. Revista Brasileira de Reumatologia [online], v. 50, n.5, p. 552-580, novembro 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000500008>.

MIKULASOVA, A. et al. Genomewide profiling of copy-number alteration in monoclonal gammopathy of undetermined significance. European journal of haematology, v. 97, n.6, p.568-575, maio 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejh.12774>.

PALUMBO, A. et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology vol. 33, n. 26, p.2863–2869, agosto 2015. DOI: 10.1200/JCO.2015.61.2267.

RAJKUMAR, S.V. Multiple myeloma: 2024 update on diagnosis, risk-stratification, and management. American Journal of Hematology, v. 99, n. 9, p. 1802-1824, junho 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajh.27422>.

RAMÍREZ, J.; LUKIN, K.; HAGMAN, J. From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. Curr Opin Immunol., v. 22, n.2, p.177-184, março 2010. DOI: 10.1016/j.coi.2010.02.003.

RASMUSSEN, T. et al. Identification of translocation products but not K-RAS mutations in memory B cells from patients with multiple myeloma. Haematologica, v. 95, n.10, p. 1730-1737, maio 2010. DOI:10.3324/haematol.2010.024778.

RAWSTRON, A.C. et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. Haematologica, V. 93, n. 3, p. 431- 438, março 2008. DOI: doi.org/10.3324/haematol.11080, hdl.handle.net/1765/29683.

ROONEY, D.E; CZEPULKOWSKI, B.H. Human Cytogenetics. Oxford University Press, agosto 1992. DOI: <https://doi.org/10.1093/oso/9780199632909.001.0001>.

RAUBER, S.G; AMÂNCIO, N. de F.G. Mieloma múltiplo: indivíduos mais acometidos, seus sintomas, diagnóstico e tratamento: uma análise literária. Revista Brasileira de Revisão de Saúde, v.6, n.1, p. 1307–1317, janeiro, 2023. DOI: 10.34119/bjhrv6n1-100.

SAHOTA, S.S. et al. Myeloma VL and VH Gene Sequences Reveal a Complementary Imprint of Antigen Selection in Tumor Cells. Blood: American society of hematology, v.89, n.1, p. 219-226, janeiro 1997. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V89.1.219>.

THERNEAU, T.M. et al. Incidence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Estimation of Duration Before First Clinical Recognition. Mayo Clinic proceedings, v. 87, n.11, p. 1071–1079, novembro 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2012.06.014>.

TORRES, L.L. et al. Uma análise acerca das características do Mieloma Múltiplo: revisão de literatura. Revista Eletrônica Acervo Médico, v. 15, agosto 2022. DOI:<https://acervomais.com.br/index.php/medico/article/download/10723/6405/>.

VAN DONGEN, J.J.M. et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia, v. 26, n.9, p. 1908-1975, setembro 2012. DOI:10.1038/leu.2012.120

VICTORA, G.D; NUSSENZWEIG, M.C. Germinal Centers. Annual Review of Immunology, v.30, p.429-457, abril 2012. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075032>.

WJ CHNG, M.D. et al. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. Blood: American society of hematology, v.20, n.1, p.571-596, dezembro 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.beha.2007.08.004>.

ZEMBRUSKI, N. C.L et al. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. Analytical Biochemistry, v. 429, n.1, p.79-81, outubro 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.005>.