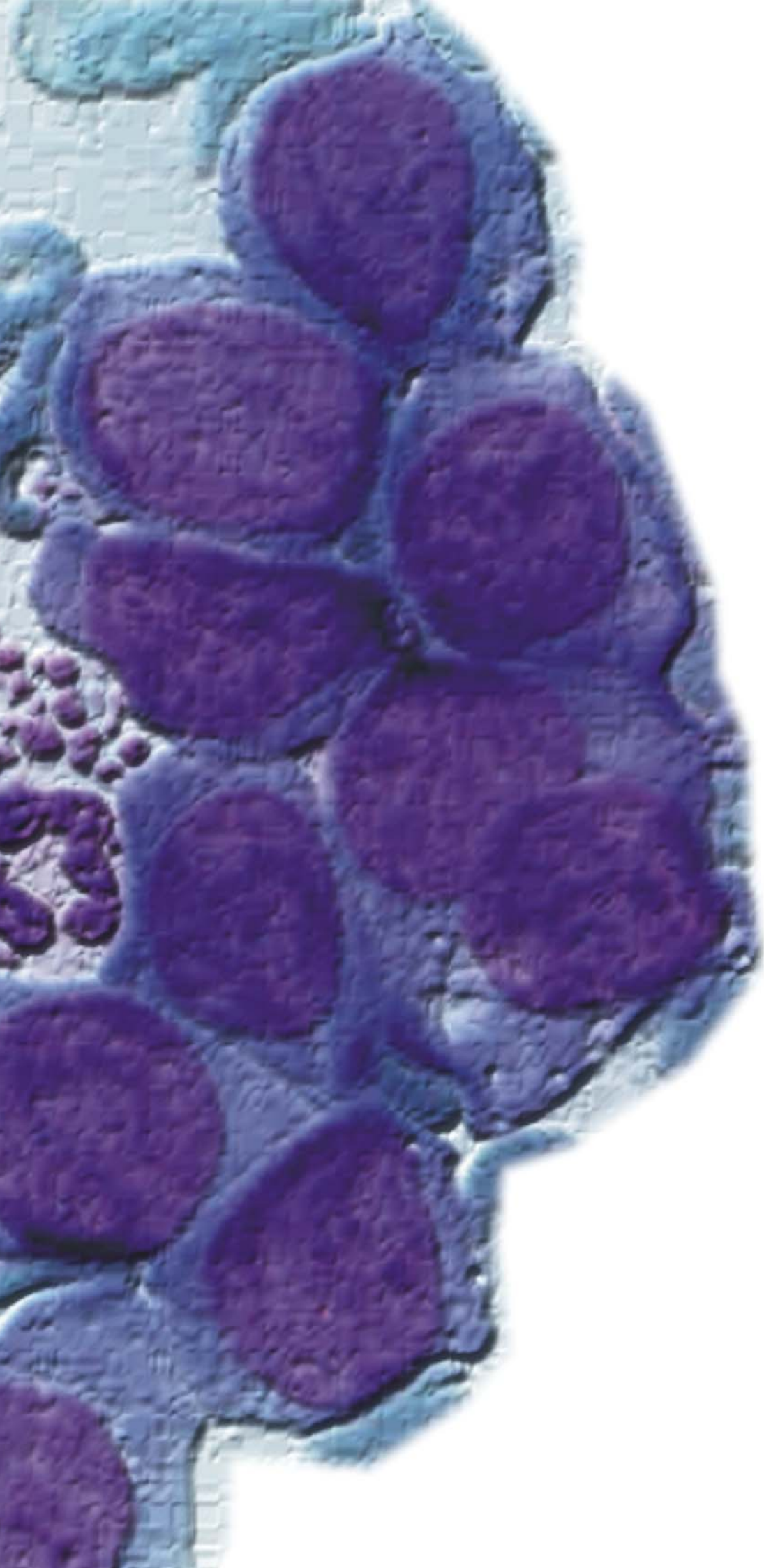




Ana Lucia Coradazzi

**Fatores Associados à Expressão da Molécula de
Adesão CD56 por Plasmócitos Tumoriais em Medula
Óssea de Pacientes com Mieloma Múltiplo e seu
Impacto na Sobrevida Global**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica – Área de Concentração em Metabolismo e Nutrição – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção do título de doutora.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lígia Niero-Melo (UNESP)

Estatística: Prof^a. Dr^a. Maria do Rosário Dias de Oliveira Latorre (USP)

**Botucatu
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Coradazzi, Ana Lucia.

Fatores associados à expressão da molécula de adesão CD56 por plasmócitos tumorais em medula óssea de pacientes com mieloma múltiplo e seu impacto na sobrevida global / Ana Lucia Coradazzi. – 2005.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2005.

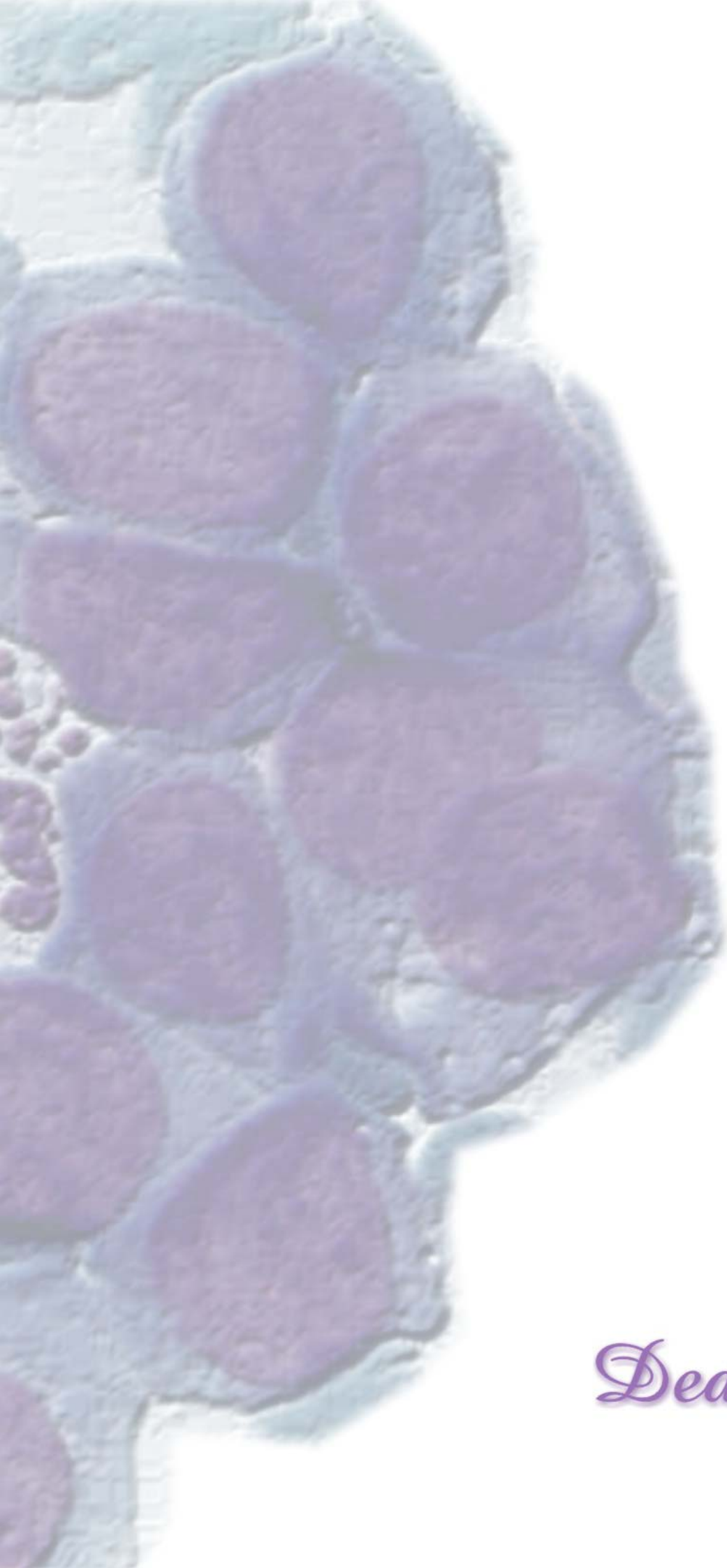
Orientador: Lígia Niero-Melo

Assunto CAPES: 40101002

1. Mieloma múltiplo 2. Câncer

CDD 636.994

Palavras-chave: Câncer; CD56; Grau nuclear; fatores prognósticos; Imuno-histoquímica; Receptor de estrógeno; Receptor progesterona



Dedicatória

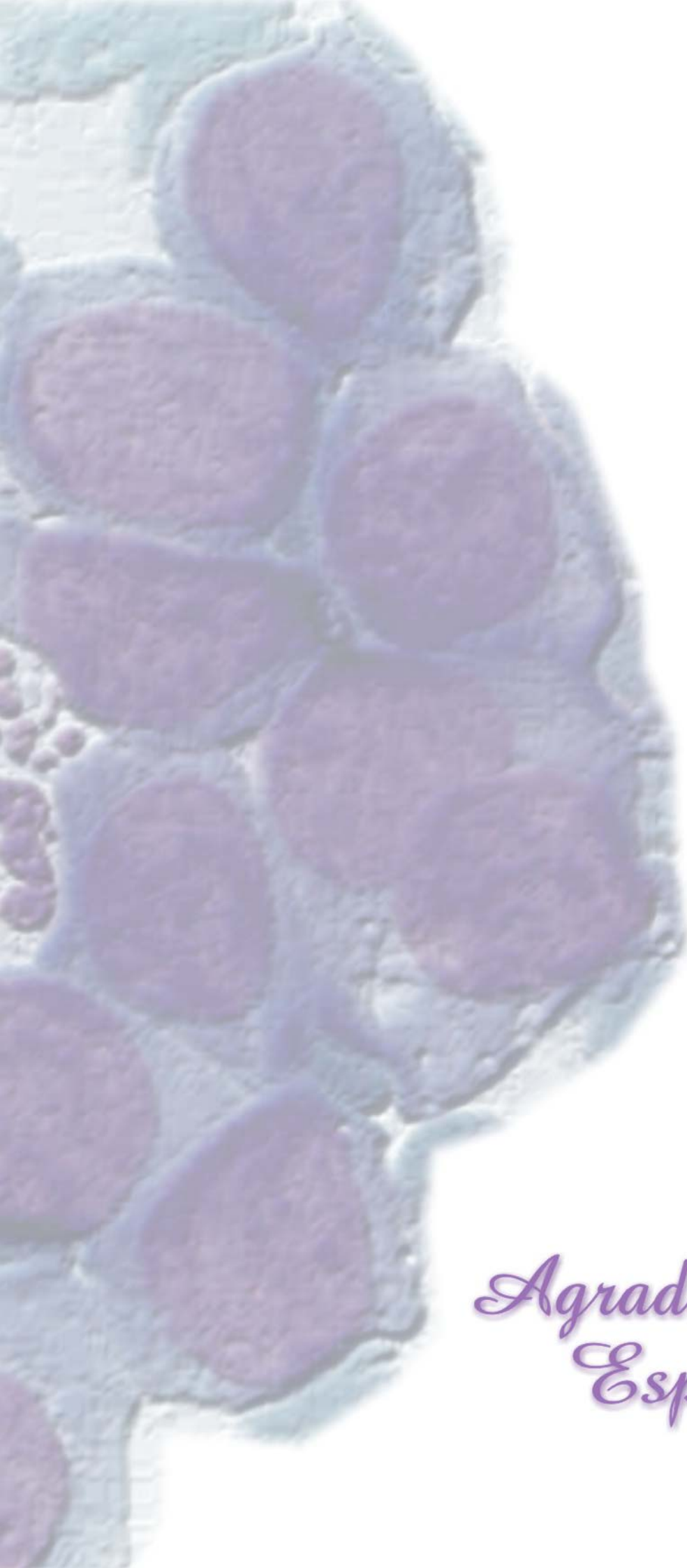
*“When my life is through,
and the angels ask me to recall
the thrill of them all,
then I shall tell them
I remember you.”*

*(“...e quando os anjos me perguntarem do que eu lembro,
direi que lembro de você...”)*

Johnny Mercer/Victor Schertzinger

(“I remember you” - 1942)

Aos meus pais, para quem a mais sincera palavra de gratidão ainda seria muito pouco. Ao meu marido Fábio, pela extrema paciência, carinho e pelo amor que me foram dedicados durante todos esses anos. Aos meus irmãos Ana Cláudia e Luiz, por estarem sempre ao meu lado, inclusive quando não era possível estarmos perto. Às minhas avós, Irmgard (in memoriam) e Helena, e à minha tia Bernadete, por acreditarem em mim em todos os momentos, sem exceção.



*Agradecimentos
Especiais*

*Ao Prof. Emérito Mário Rubens Guimarães Montenegro
(in memoriam), que despertou minha paixão pela pesquisa ética e
amor ao trabalho, e cuja dedicação e paciência me servem de exemplo
em todos os momentos, até os dias de hoje.*



*À Profa. Dra. Lígia Niêro Melo,
professora assistente doutora da Disciplina de Hematologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu, por ter ultrapassado os limites
de orientadora desta tese para se tornar uma grande amiga e uma
verdadeira luz no meu caminho.*



*Ao Dr. Carlos Augusto de Mendonça Beato,
chefe da Oncologia Clínica do Hospital Amaral Carvalho,
pelo empenho em eliminar quaisquer barreiras à conclusão
deste trabalho e, principalmente, por sua personalidade
peculiar, capaz de promover a agregação de pessoas
incrivelmente diferentes em torno de um objetivo comum.*

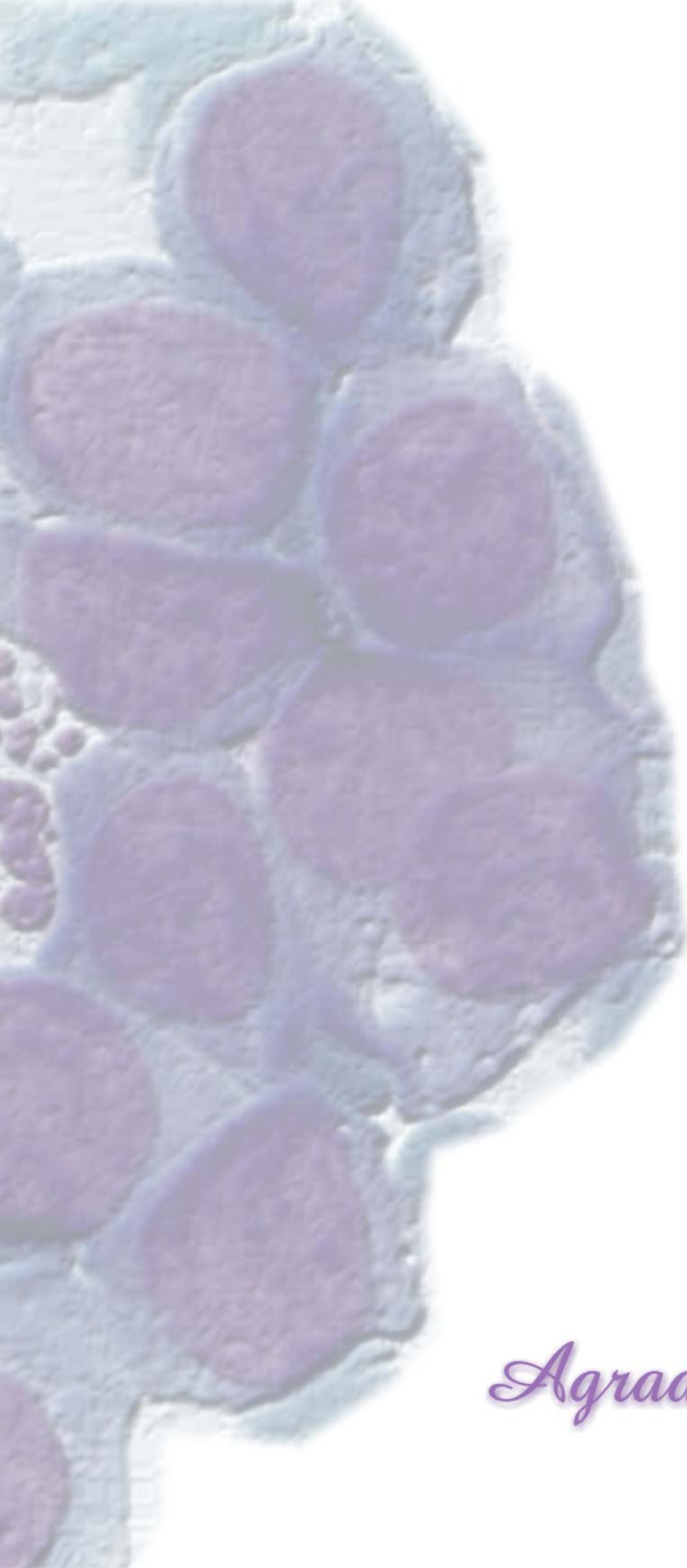


*Ao Dr. Vergílio Antônio Kensi Colturato,
pelo exemplo de rigor, seriedade e determinação com que
exerce seu trabalho, inspirando o desejo de aperfeiçoamento
em todos os que o cercam.*



*Ao staff médico do
Departamento de Oncologia Clínica, Hematologia e
Oncologia Pediátrica do Hospital Amaral Carvalho,
pelo apoio e confiança a mim dedicados, e pelas lições diárias de
profissionalismo, seriedade, perseverança e amor ao trabalho, as
quais me inspiram e me guiam os passos em todos os momentos.*





Agradecimientos

À Dra. Lucilene da Silva Ruiz e Resende, pela grande ajuda desde o início deste trabalho, e pelo exemplo profissional e ético que nos manteve próximas durante todos esses anos.

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, na pessoa da Profa. Dra. Maura Moscardi Bacchi, pela orientação e boa vontade desde as primeiras idéias deste projeto.

Ao Departamento de Patologia do Hospital Amaral Carvalho, Jaú, nas pessoas do Dr. Francisco Carlos Quevedo, pela disponibilização de seus laboratórios e funcionários sempre que foi necessário, e do Dr. Francisco Alves Moraes Neto, pelo empenho, disposição e disponibilidade em todos os momentos.

À Pós-Graduação em Clínica Médica, nas pessoas da Profa. Dra. Thaís Helena A. Queluz e Profa. Dra. Célia Nogueira, pelo carinho e dedicação com que exercem seu trabalho, proporcionando o desenvolvimento de centenas de profissionais.

Às minhas grandes amigas Cláudia Teresa de Oliveira, Ana Eléa dos Santos Andrade e Andriara Vasconcelos Cantarelli, por todas as palavras de apoio, pelo incentivo incondicional ao meu trabalho (mesmo quando ele nem mesmo tinha uma forma) e pela confiança em mim depositada, em todos os aspectos.

Ao colega Dr. Gustavo Fernando Veraldi Ismael, pela visão crítica e construtiva, e pelo exemplo de sensatez e responsabilidade, tanto no âmbito pessoal quanto no profissional.

Aos colegas Dr Marcos Augusto Mauad e Dr Mair Pedro de Souza, pelos exemplos, obstinação e amor ao trabalho, e por me convencerem de que limites não existem.

Ao colega Dr. Fábio Veloso Alexandrino, pela compreensão, paciência e pelos inúmeros momentos em que priorizou meus interesses em detrimento dos seus próprios.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado e Dr. José Getúlio M. Segalla, cujas ações pioneiras na Faculdade de Medicina de Botucatu e no Hospital Amaral Carvalho de Jaú proporcionaram as diretrizes para a realização deste trabalho.

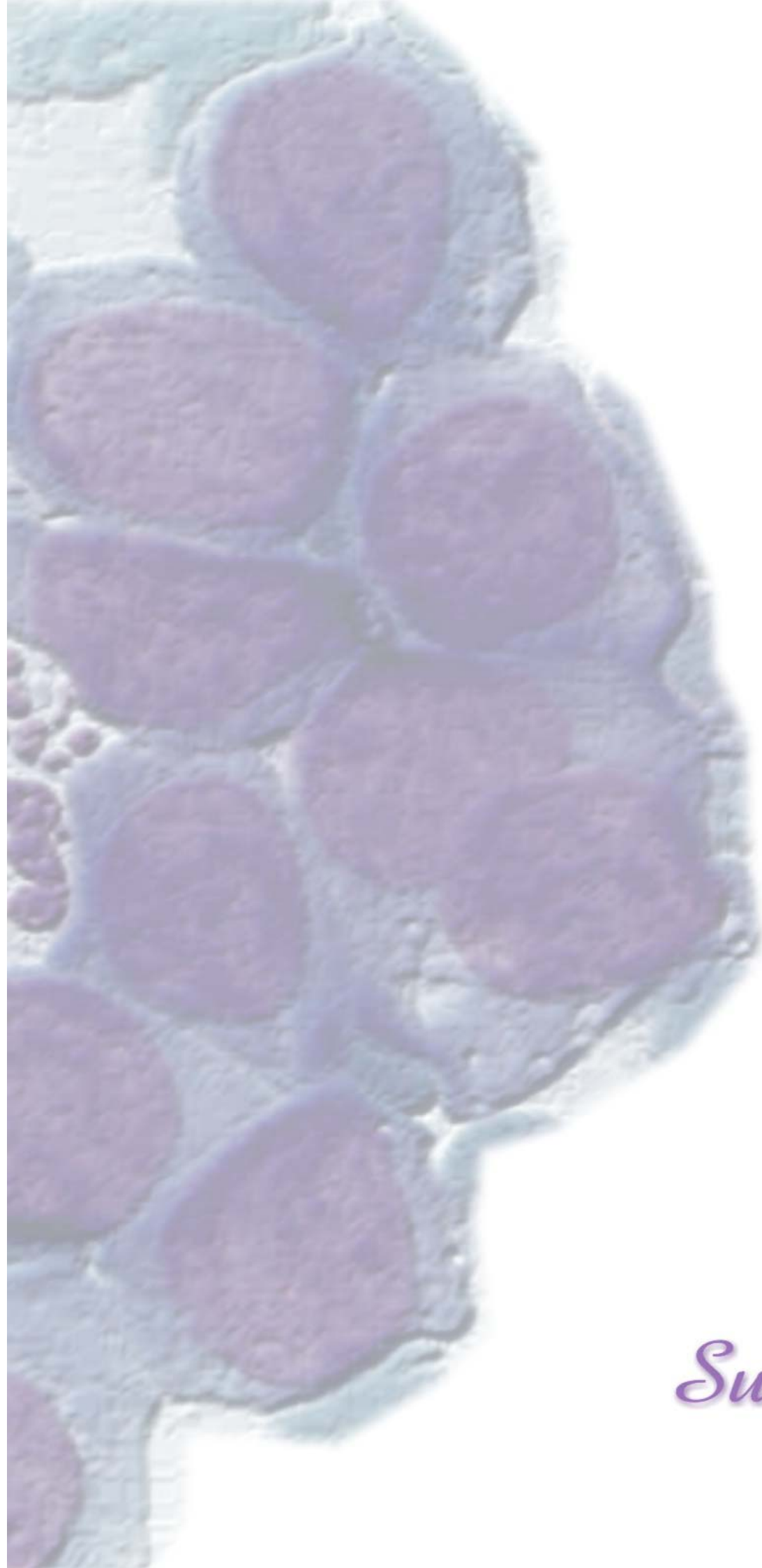
Às secretárias Silvia Simões e Márcia Morelli, por sua incomparável capacidade de organizar qualquer coisa que lhes caia nas mãos.

Ao Marquinhos, técnico do Laboratório de Imunohistoquímica da FMB – Unesp, pela incrível disponibilidade, boa vontade e capricho, sem os quais este trabalho não teria sido concluído.

Aos pacientes envolvidos neste trabalho que, muitas vezes sem ter consciência da importância de sua contribuição, não hesitaram em colaborar.

Aos médicos e residentes da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp e do Hospital Amaral Carvalho de Jaú, responsáveis pela assistência aos pacientes e coleta das amostras de medula óssea utilizadas neste trabalho.

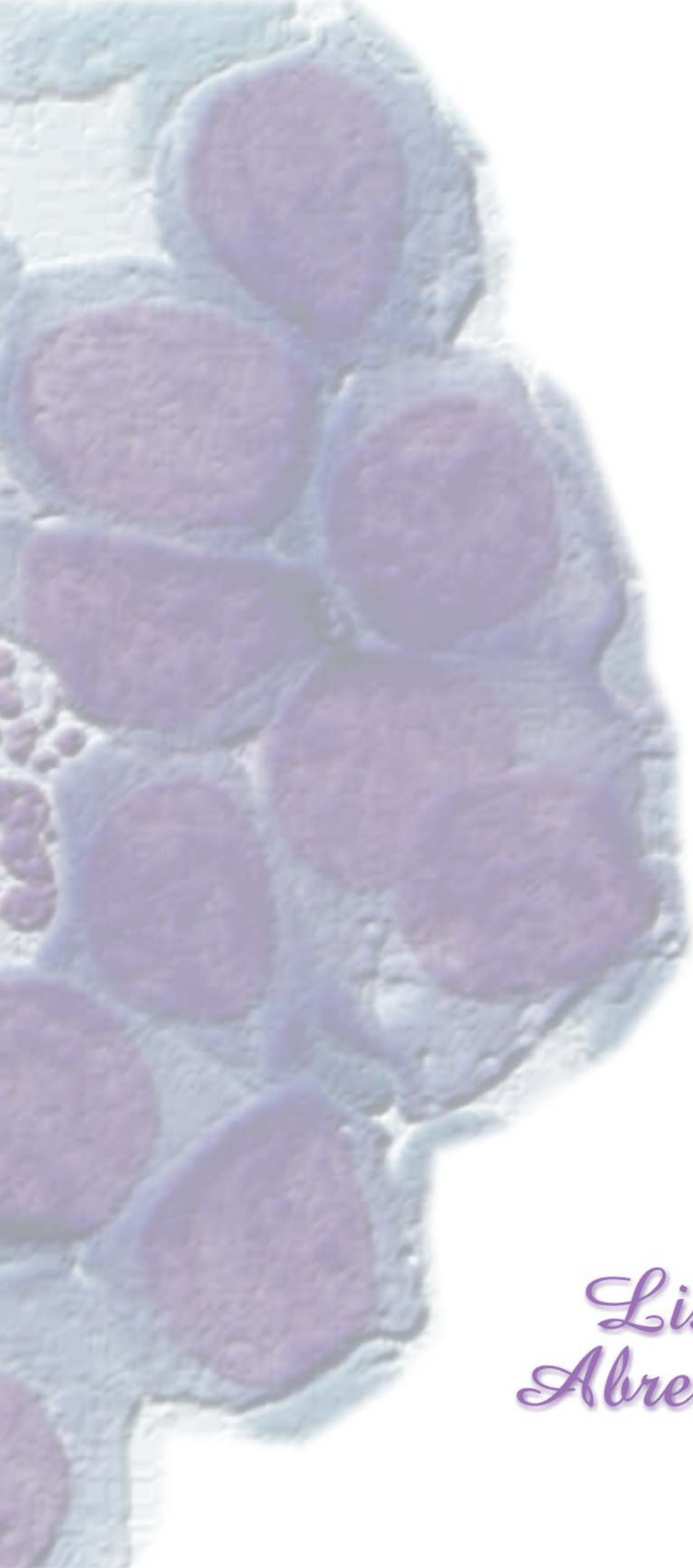
À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e ao Centro de Pesquisas Clínicas da Fundação Amaral Carvalho - Jaú, pelo apoio técnico e financeiro dispensados a este trabalho.



Sumário

Lista de Abreviaturas	17
Lista de Figuras	20
Lista de Tabelas	23
Lista de Gráficos	26
1. Introdução	28
1.1. Mieloma Múltiplo	29
1.2. Fatores Prognósticos	41
1.3. A Origem das Células do Mieloma Múltiplo	45
1.4. Desenvolvimento das Células Neoplásicas e Microambiente Tumoral	52
1.5. A Molécula de Adesão CD56	55
2. Hipótese	61
3. Objetivos	63
4. Pacientes e Metodologia	65
4.1. Seleção de Pacientes e Levantamento de Dados	66
4.2. Estudo Piloto	69
4.3. Variáveis de Estudo	72
4.3.1. Características Demográficas	72
4.3.2. Características Clínicas	72
4.3.3. Características Histopatológicas e Imunohistoquímicas	73
4.4. Análise Estatística	80
5. Resultados	81
5.1. Caracterização da População de Estudo	82
5.2. Associação entre Expressão de CD56 e Variáveis Clínicas e Laboratoriais	89
5.3. Análise de Fatores Prognósticos	97
6. Discussão	103
7. Conclusões	121

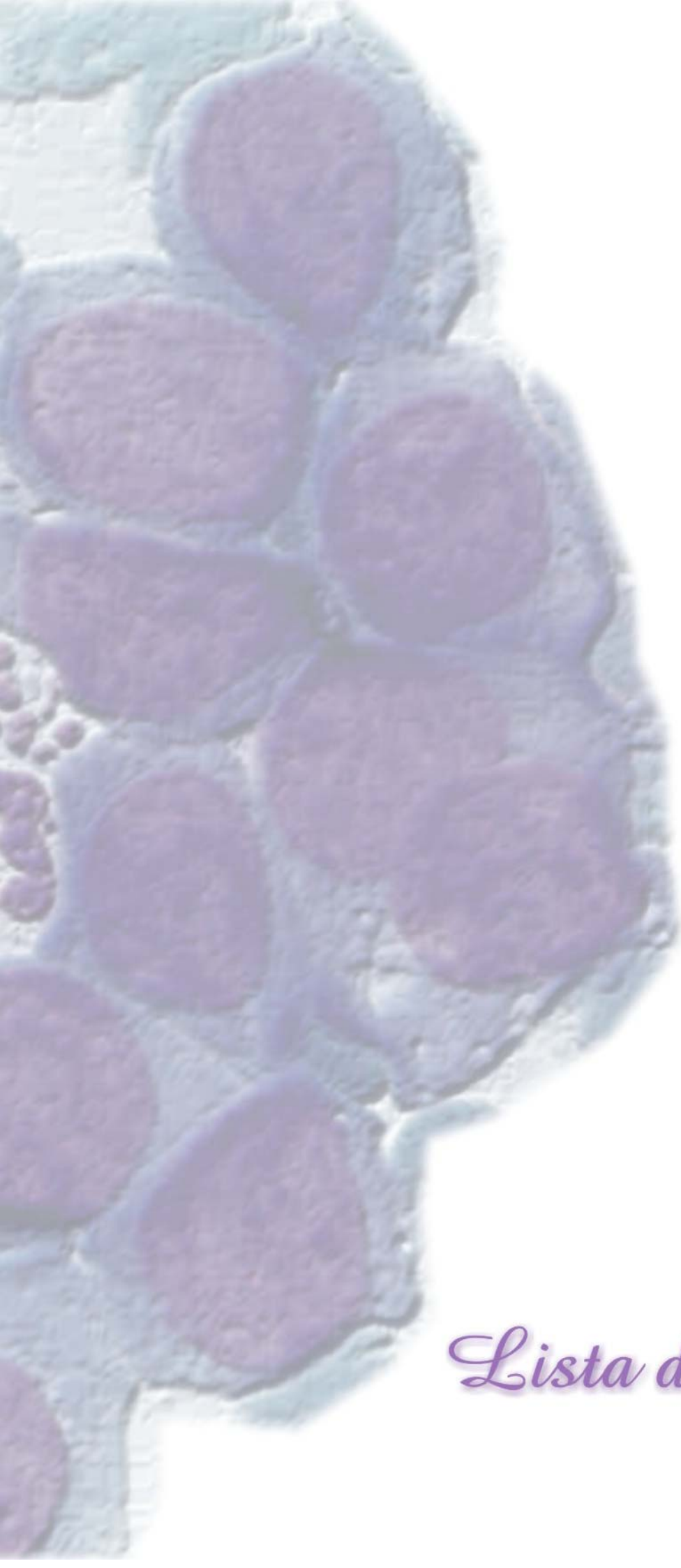
8. Referências Bibliográficas	124
Resumo	146
Abstract.....	148
Anexos	150



Lista de Abreviaturas

Acm	Anticorpo monoclonal
Ag	Antígeno
DHL	Desidrogenase láctica
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
FNIII	Fibronectina tipo III
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HAC	Hospital Amaral Carvalho
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina-eosina
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HR	Hazard ratio
Ig	Imunoglobulina
Igm	Imunoglobulina de membrana
IL	Interleucina
MGUS	Gamopatia Monoclonal de Significância Indeterminada
MM	Mieloma Múltiplo
MO	Medula óssea
MP	Melphalan e Prednisona
NCAM	Molécula de adesão da célula neural
OR	Odds ratio
ORaj	Odds ratio ajustada
PCR	Proteína C reativa
PMEC	Proteínas da matriz extra-celular

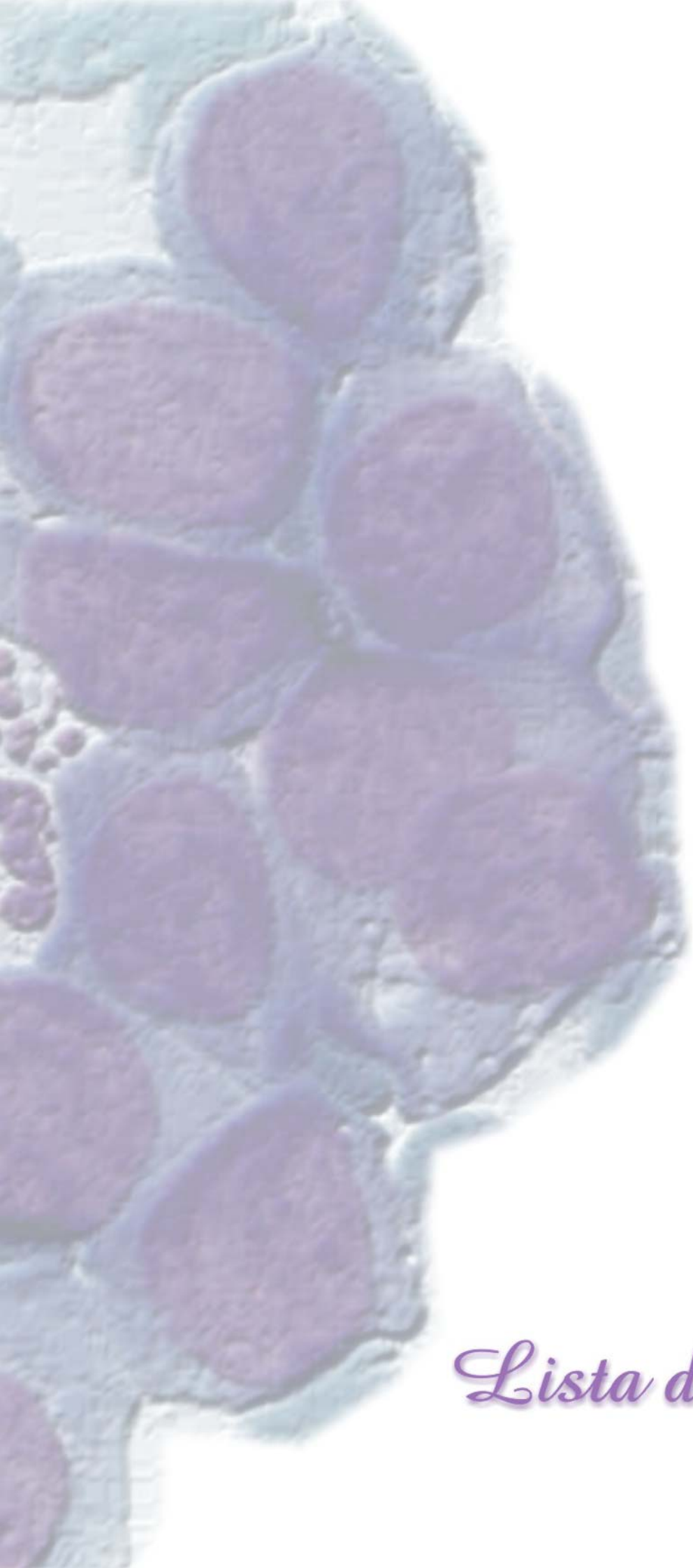
RC	Resposta Completa
RHC	Registro Hospitalar de Câncer
RO	Resposta Objetiva
RP	Resposta Parcial
SR	Sem Resposta
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de células T
TMO	Transplante de medula óssea
TNF	Fator de necrose tumoral
VAD	Vincristina, Adriamicina e Dexametasona
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VB MCP	Vincristina, Bleomicina, Melphalan, Ciclofosfamida e Prednisona



Lista de Figuras

Figura 1	Sarah Newbury Solly, 1844.....	29
Figura 2	A) Esterno de Sarah Newbury Solly, 1844 B) Fêmur de Sarah Newbury.....	30
Figura 3	Desenhos de plasmócitos observados em vértebras lombares de paciente com mieloma múltiplo John Darlymple, 1846.....	32
Figura 4	Lesões osteolíticas em calota craniana (A) e rádio (B) observadas em radiografias de paciente com mieloma múltiplo Atlas of Diagnostic Oncology 3ª edição, editado por Skarin Elsevier Science Ltd.....	33
Figura 5	Eletroforese de proteínas séricas no mieloma múltiplo Atlas of Diagnostic Oncology 3ª edição, editado por Skarin Elsevier Science Ltd.....	35
Figura 6	Plasmócitos tumorais infiltrando a medula óssea em pacientes com mieloma múltiplo Atlas of Diagnostic Oncology 3ª edição, editado por Skarin Elsevier Science Ltd.....	38
Figura 7	Células de Mott (A) e “flame cells” (B) www med-ed virginia edu	40
Figura 8	Esquema simplificado do processo de diferenciação dos linfócitos B, dos pontos de vista morfológico e funcional, e antígenos expressos nas diversas etapas	45
Figura 9	Esquema simplificado das modificações antigênicas durante o processo de diferenciação linfocitária B.....	47

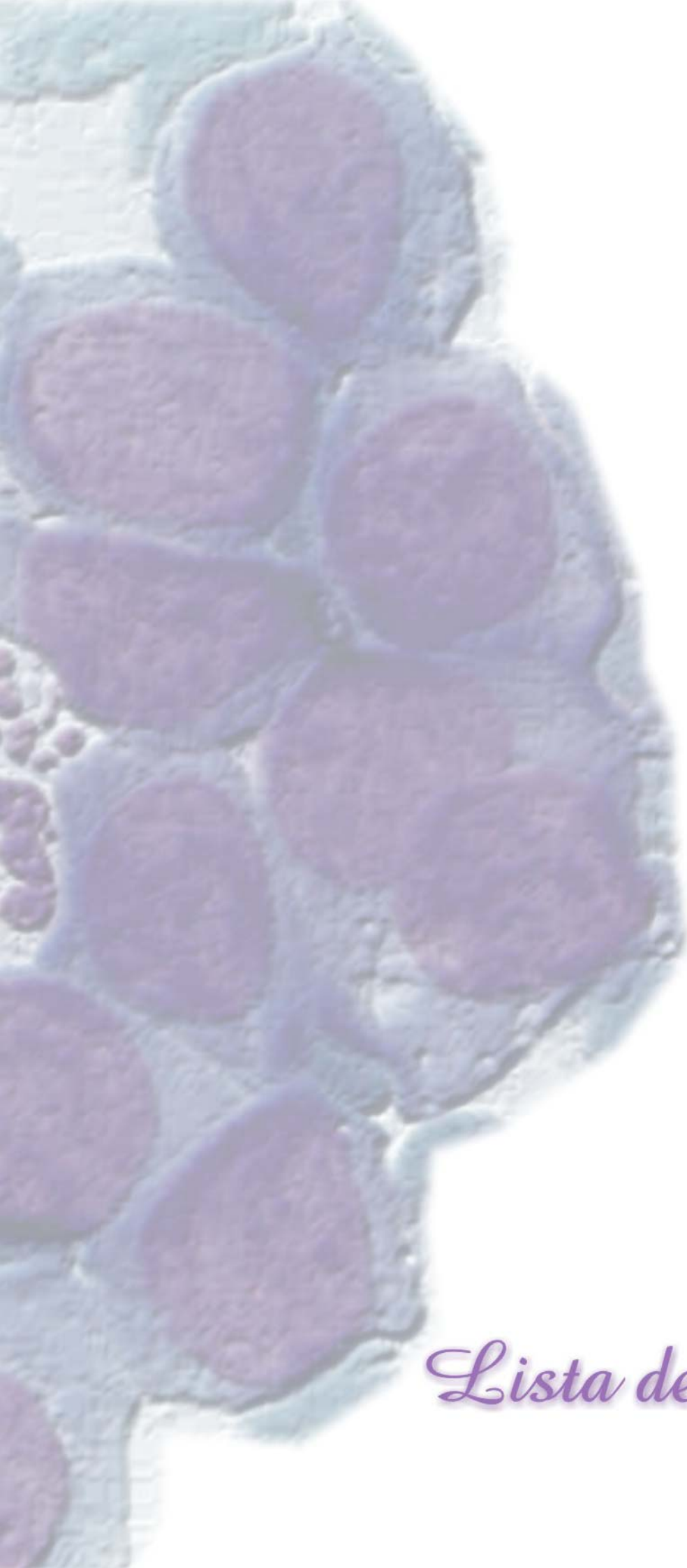
Figura 10	Estrutura molecular esquemática das moléculas NCAM, compostas por um domínio Ig e um domínio fibronectina tipo III.....	56
Figura 11A	Padrão intersticial de infiltração medular por plasmócitos tumorais.....	74
Figura 11B	Padrão difuso de infiltração medular por plasmócitos tumorais.....	74
Figura 11C	Padrão difuso de infiltração medular por plasmócitos tumorais.....	75
Figura 11D	Padrão de substituição medular por plasmócitos tumorais.....	76
Figura 12	Estudo imunohistoquímico positivo para expressão da cadeia leve kappa por plasmócitos tumorais.....	76
Figura 13A	Ausência de expressão de CD56 por plasmócitos tumorais ao estudo imunohistoquímico.....	78
Figura 13B	Expressão discreta de CD56 por plasmócitos tumorais ao estudo imunohistoquímico.....	78
Figura 13C	Expressão moderada de CD56 por plasmócitos tumorais.....	79
Figura 13D	Expressão importante de CD56 por plasmócitos tumorais.....	79



Lista de Tabelas

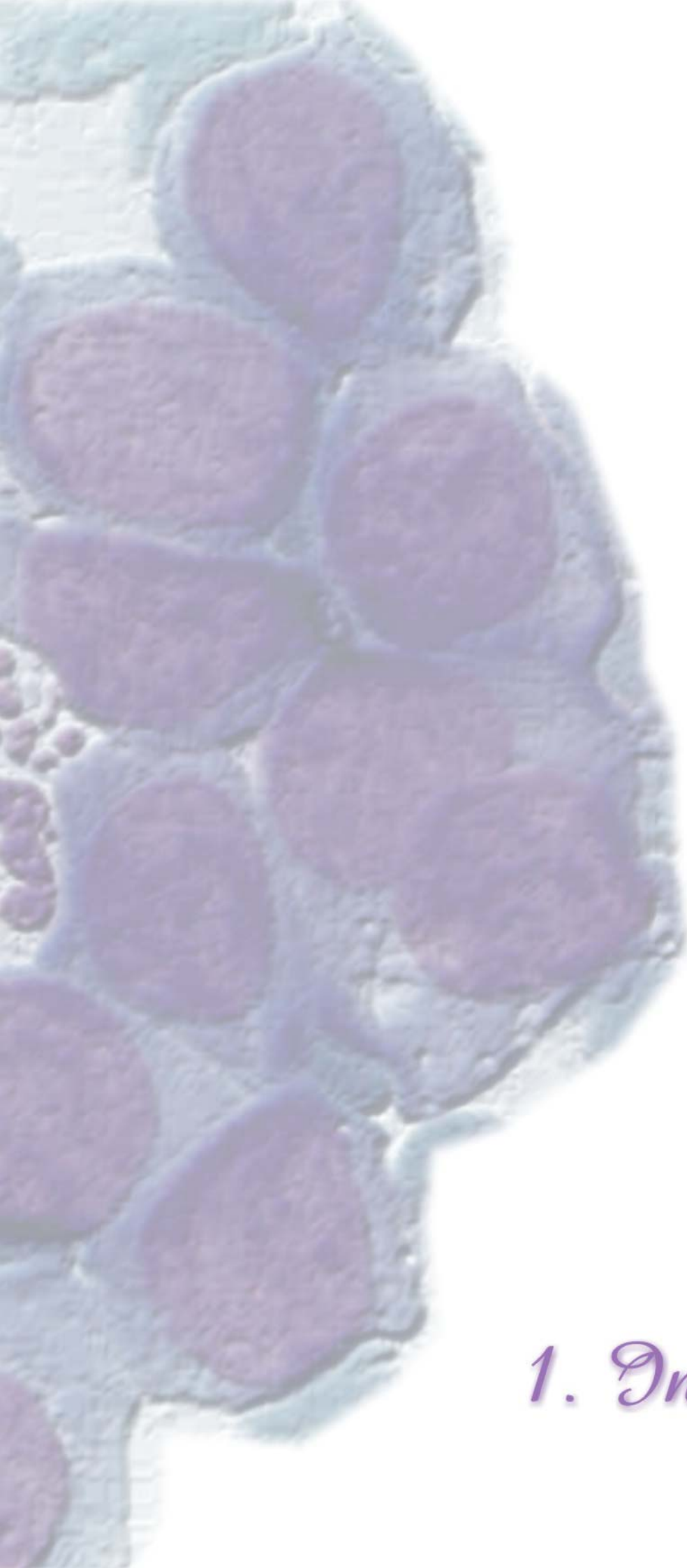
Tabela 1	Número e percentagem de pacientes segundo características demográficas, clínicas e laboratoriais..	84
Tabela 2	Número e percentagem de pacientes segundo análise histológica e estudo imunohistoquímico para <i>kappa</i> , <i>lambda</i> e CD56 em amostras de medula óssea de portadores de MM.....	86
Tabela 3	Número e percentagem de pacientes segundo variáveis clínicas estudadas e expressão de CD56 por plasmócitos tumorais.....	88
Tabela 4	Número e percentagem de pacientes segundo variações dos níveis séricos de proteínas monoclonais e de globulinas totais e expressão de CD56 por plasmócitos tumorais.....	90
Tabela 5	Número e percentagem de pacientes segundo variáveis histopatológicas estudadas e expressão de CD56 por plasmócitos tumorais.....	91
Tabela 6	Resultados da regressão logística univariada dos fatores clínicos e laboratoriais associados à expressão de CD56.....	92
Tabela 7	Resultados da regressão logística univariada dos fatores histopatológicos associados à expressão de CD56.....	93
Tabela 8	Resultados da regressão logística múltipla dos fatores associados à expressão de CD56.....	95

Tabela 9	Modelos estatísticos baseados em interações de variáveis e sua associação com a expressão de CD56 por plasmócitos tumorais em MM.....	96
Tabela 10	Probabilidade de sobrevida em 12, 36 e 60 meses e mediana de sobrevida de pacientes com MM e variáveis clínicas e laboratoriais.....	98
Tabela 11	Probabilidade de sobrevida em 12, 36 e 60 meses e mediana de sobrevida em portadores de MM e características histológicas e imunohistoquímicas.....	99
Tabela 12	Análise univariada dos fatores prognósticos para pacientes portadores de mieloma múltiplo.....	101
Tabela 13	Análise múltipla dos fatores prognósticos para pacientes portadores de mieloma múltiplo.....	102



Lista de Gráficos

Gráfico 1	Percentagem de pacientes segundo padrão histológico de distribuição de plasmócitos tumorais na medula óssea.....	85
Gráfico 2	Número de pacientes segundo padrão de expressão de CD56 por plasmócitos tumorais na medula óssea..	87
Gráfico 3	Representação gráfica das curvas de sobrevida de pacientes com diagnóstico de MM segundo padrão de infiltração medular tumoral (Kaplan-Meier).....	100
Gráfico 4	Representação gráfica das curvas de sobrevida de pacientes com diagnóstico de MM segundo expressão da molécula CD56 por plasmócitos tumorais na medula óssea (Kaplan-Meier).....	100



1. Introdução

1.1. Mieloma Múltiplo

Inglaterra, maio de 1840. Ao inclinar-se para pegar um objeto no chão, Sarah Newbury, londrina, 39 anos, sente fortes dores nas costas. Oito meses depois, ela refere dores ósseas cada vez mais intensas em braços e pernas, e começa a caminhar com dificuldade. Em abril de 1842, suas dores já são excruciantes, principalmente na coxa direita, e Sarah não consegue mais andar. Ao ser admitida no Saint Thomas Hospital, em Londres, Sarah descreve seu próprio sofrimento “como se seus membros estivessem se quebrando em centenas de pedaços” (figura 1).



Figura 1 - Sarah Newbury. Solly, 1844.

O Dr. Samuel Solly, médico responsável por Sarah, verifica múltiplas fraturas em clavículas, fêmures, úmero direito e rádio direito, que o levam a pedir sua autópsia alguns dias depois, quando ela falece por asfixia.

Seus ossos apresentam-se completamente substituídos por uma substância vermelha e gelatinosa (figura 2), que inspiram Solly a batizar a doença com o termo “mollities and fragilitas ossium” (ossos moles e frágeis) em sua publicação em 1844 (1), sem ter idéia de que Sarah o faria entrar para a história da Medicina como o primeiro relato da doença que hoje conhecemos como mieloma múltiplo (MM) (2-3).

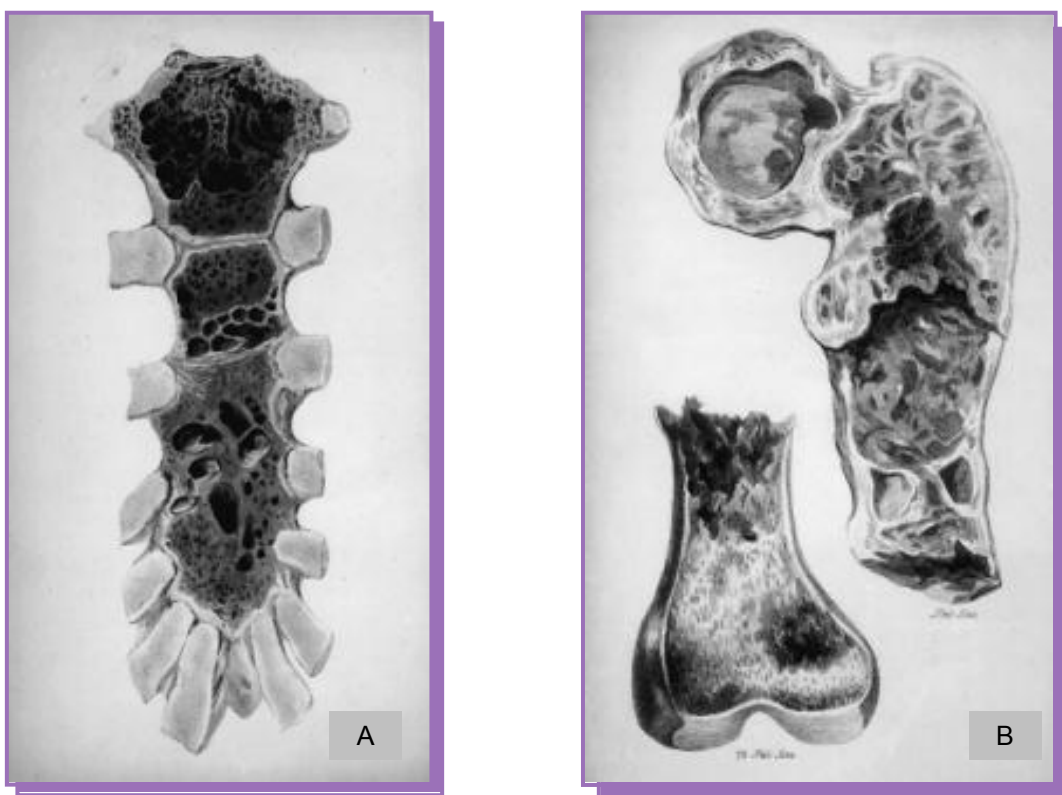


Figura 2- A) Esterno de Sarah Newbury. B) Fêmur de Sarah Newbury. Solly, 1844.

O mieloma múltiplo é hoje compreendido como uma neoplasia hematológica maligna, manifestada no estágio terminal de diferenciação da linhagem linfocitária B, caracterizada pela proliferação neoplásica de um único clone plasmocitário, produtor de imunoglobulinas (monoclonais) (Igs) (4), o qual compromete a medula óssea e tecidos extra-ósseos de forma multifocal. Sua definição clara e completa, que envolve os aspectos clínicos, citológicos e moleculares da doença, é o resultado dos árduos caminhos trilhados desde 1844 até os tempos atuais por médicos e cientistas em busca da compreensão desta neoplasia. A primeira descrição completa da doença foi publicada em 1850, em Saint Marylebone, Londres, pelo Dr. William Macyntire, que associou a doença óssea de um de seus pacientes — Sr. Thomas Alexander McBean — a alterações urinárias pouco comuns, na época atribuídas, pelo Dr. Henry Bence Jones, à presença de uma proteína específica em quantidade anormalmente alta (2-3; 5). Após o falecimento do Sr. McBean, duas de suas vértebras lombares foram examinadas pelo Dr. John Dalrymple, cirurgião do Royal Ophthalmic Hospital, em Londres, que descreveu a presença de células ovaladas, uni ou binucleadas, na substância gelatinosa que preenchia as vértebras (figura 3) (6).

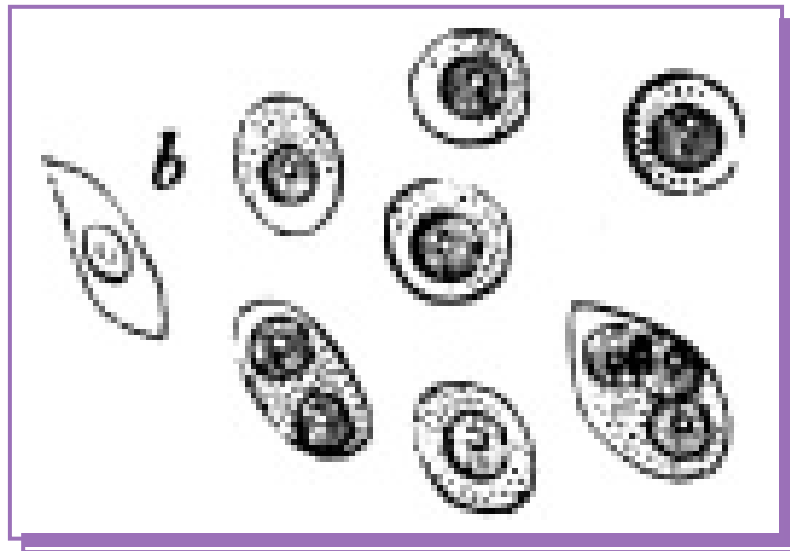


Figura 3 - Desenhos de plasmócitos observados em vértebras lombares de paciente com mieloma múltiplo. John Darlymple, 1846.

O termo "mieloma múltiplo", no entanto, só foi introduzido por J. von Rustizky, em 1873, na Alemanha, para designar a presença de múltiplos tumores ósseos à autópsia de um de seus pacientes (7). Rutzinsky descreveu apenas vagamente as células tumorais como sendo arredondadas e com núcleos localizados na periferia, próximos à membrana citoplasmática. A primeira descrição acurada dos plasmócitos foi feita por Marschalkó, também na Alemanha, em 1895, que caracterizou a posição excêntrica do núcleo, a cromatina em grumos, a área mais pálida perinuclear ("hof") e o citoplasma esférico ou irregular (8). Em 1900, no Johns Hopkins Hospital, Baltimore, Estados Unidos, Wright descobriu que as células constituintes dos tumores medulares no

MM eram os plasmócitos de Marschalkó (9). Os primeiros registros radiográficos das lesões ósseas foram publicados em 1903, por Weber, que descreveu alterações em vários arcos costais em um paciente portador de MM, apenas três anos após a descoberta dos raios X (10) (figura 4). O diagnóstico rotineiro do MM, no entanto, permaneceu difícil até os anos 30s, quando os aspirados de medula óssea começaram a ser utilizados em grande escala (11).



Figura 4 - Lesões osteolíticas em calota craniana (A) e rádio (B), observadas em radiografias de paciente com mieloma múltiplo. Atlas of Diagnostic Oncology 3^a edição, editado por Skarin Elsevier Science Ltd.

A descoberta das proteínas monoclonais envolvidas na fisiopatologia do MM e sua caracterização foram também decisivas para a definição dos critérios diagnósticos desta neoplasia. A descrição, em 1847, pelo Dr. Henry Bence Jones, de uma proteína anômala na urina de um paciente com “*mollities ossium*”, que precipitava ao resfriamento e retornava ao normal após o reaquecimento, foi o primeiro passo para a caracterização das proteínas monoclonais do MM (12). No entanto, somente em 1922 foram identificados subtipos da proteína de Bence Jones, descritos inicialmente como I e II (13). Em 1956, Korngold e Lipari caracterizaram os dois diferentes tipos de proteínas de Bence Jones. Eles demonstraram que anticorpos séricos contra proteínas de Bence Jones reagiam também com as proteínas séricas do MM (14). Em tributo a Korngold e Lipari, as duas classes de proteínas de Bence Jones foram designadas *kappa* e *lambda*. Quase simultaneamente, Putnam e Hardy descobriram que a síntese de proteínas séricas monoclonais e de proteínas de Bence Jones eram processos independentes (15). Além disso, as proteínas séricas também foram divididas em diferentes subgrupos, identificados por Tiselius em sua dissertação de doutorado, em 1930, onde descreveu o método para eletroforese de proteínas séricas. Ele próprio batizou os subgrupos como alfa, beta e gama, em 1937 (16) (figura 5).

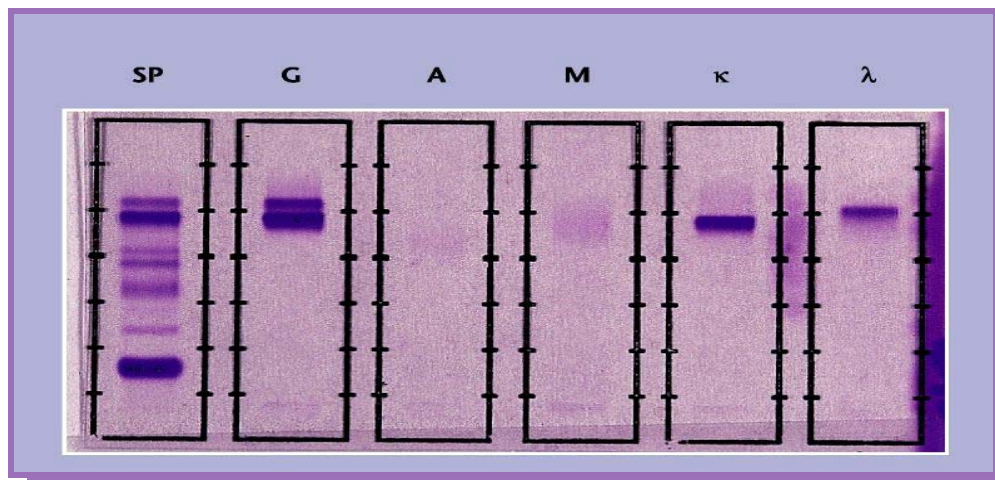


Figura 5 - Eletroforese de proteínas séricas no mieloma múltiplo. Atlas of Diagnostic Oncology 3^a edição, editado por Skarin Elsevier Science Ltd.

Concomitantemente às descobertas envolvendo a fisiopatologia da doença, as buscas por medidas terapêuticas eficazes começaram a gerar frutos. O primeiro tratamento efetivo para a doença foi a sarcolisina, descoberta em 1958, da qual é derivado o Melphalan dos tempos atuais (17). Em 1969, foram publicados resultados mais satisfatórios com a associação de Melphalan e Prednisona (MP). Desde então, vários esquemas quimioterápicos foram utilizados — M2 (vincristina, bleomicina, melphalan, ciclofosfamida e prednisona), VAD (vincristina, adriblastina e dexametasona), entre outros — sem que houvesse, no entanto, melhora significativa da sobrevida com relação ao esquema tradicional MP (18).

O primeiro transplante de medula óssea (TMO) em MM foi realizado em 1982, entre dois irmãos gêmeos, e dois anos depois surgiram as primeiras publicações de TMOs alogênicos (19). Iniciaram-se, então, estudos avaliando os resultados do uso de quimioterapia em altas doses com suporte de células-tronco autólogas, obtendo-se resultados promissores, porém ainda longe do que se possa considerar ideal. O uso da talidomida e a descoberta de novas drogas, como o bortozomib e CC-5013, têm contribuído para melhores resultados, mas a cura da doença ainda não foi possível (20). Os esforços para reduzir a morbidade e melhorar a sobrevida através de novos tratamentos têm sido direcionados para a descoberta de novos alvos biológicos e abordagens terapêuticas cada vez mais específicas, induzindo os estudos mais recentes a concentrarem-se cada vez mais nas bases fisiopatológicas da doença e suas implicações clínicas.

Atualmente, o MM é a neoplasia linfóide mais comum entre negros e a segunda mais freqüente em caucasianos, representando 10 a 15% de todas as neoplasias hematológicas malignas (21-22). Devido às novas técnicas diagnósticas e maior facilidade de acesso da população aos serviços médicos nas últimas décadas, a incidência do MM nos Estados Unidos aumentou de 0,8 por 100000 em 1949 para 1,7 por 100000 em 1963, e para cerca de 3,2 por 100000 em 1988 (23). Sua incidência aumenta com a idade, observando-se índices muito baixos entre pacientes com menos de 40 anos (menos de 2% de todos os

portadores de MM) e atingindo um pico de incidência na oitava década de vida (21).

Dor óssea, anemia e insuficiência renal constituem uma tríade fortemente sugestiva da doença, uma vez que anemia ocorre na absoluta maioria dos pacientes, dor óssea em 75%, e comprometimento renal em mais de 50% dos casos (24-25). No entanto, os critérios mínimos para o diagnóstico da doença são, classicamente, a presença de 10% ou mais de plasmócitos na medula óssea (ou demonstração histológica de plasmocitoma), associada a pelo menos um dos seguintes: proteína monoclonal sérica (geralmente em nível maior que 3 g/dl), proteína monoclonal urinária ou lesões ósseas líticas (facilmente detectáveis às radiografias convencionais). Para definir-se o diagnóstico, é necessária a exclusão de doenças do tecido conectivo, carcinomas, linfomas ou infecções crônicas que justifiquem os achados descritos acima (4;26-30). A avaliação da carga tumoral na medula óssea (M.O.) pode ser realizada através de análise citológica (esfregaços obtidos a partir de aspirados de M.O.) e histológica (fragmentos ósseos obtidos por trepanação). Além disso, aspectos morfológicos dos plasmócitos, como assincronismo núcleo-citoplasmático, anormalidades nucleares e variações no tamanho das células, auxiliam no diagnóstico definitivo do MM (29) (figura 6).

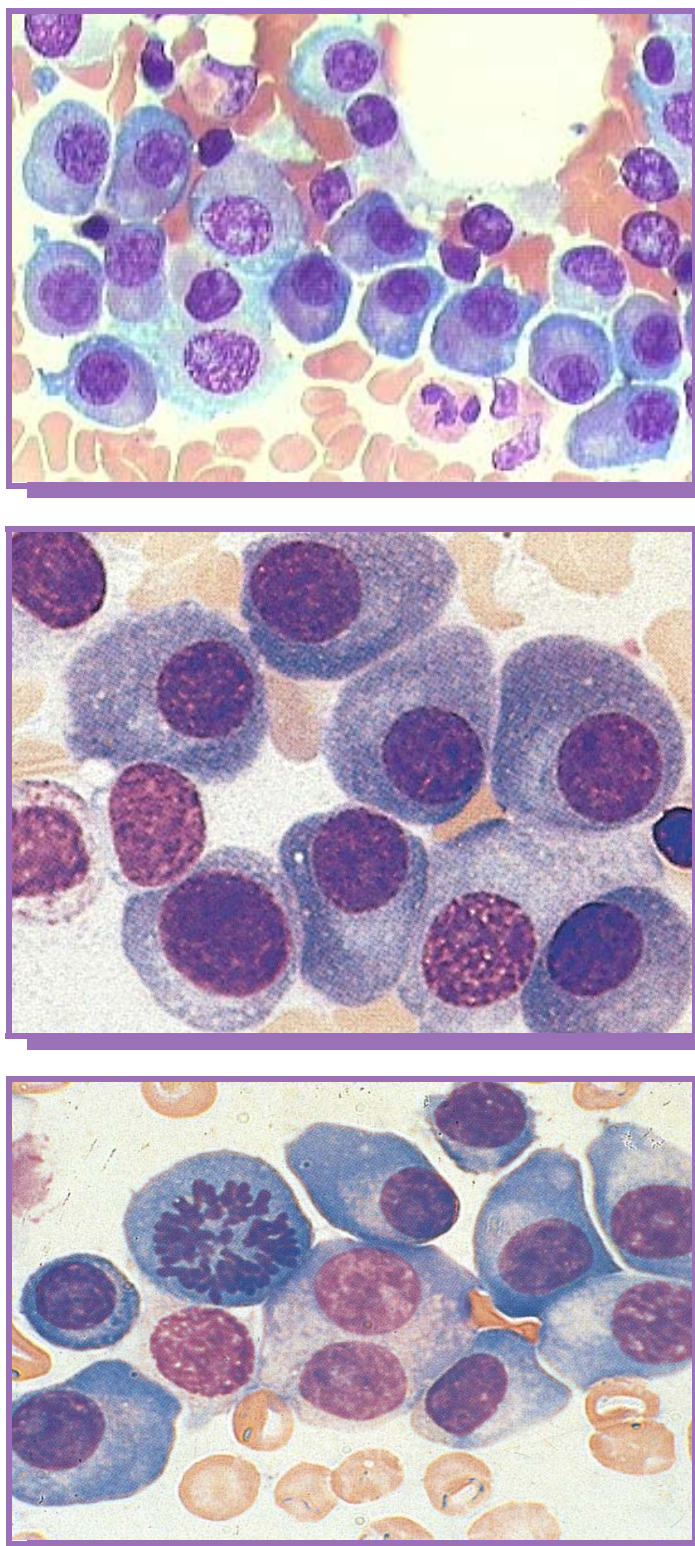


Figura 6 - Plasmócitos tumorais infiltrando a medula óssea em pacientes com mieloma múltiplo. Atlas of Diagnostic Oncology 3ª edição, editado por Skarin Elsevier Science Ltd.

A presença de anormalidades citoplasmáticas, como inclusões de imunoglobulina com aspecto de cachos de uva (células de Mott) (figura 7A), corpúsculos de Russell, coloração avermelhada na periferia citoplasmática (“flame-cells”) (figura 7B) ou aspecto semelhante às células de Gaucher, apesar de notáveis, não são patognomônicas das neoplasias plasmocitárias, uma vez que podem ser observadas em plasmocitoses reativas, particularmente em doenças inflamatórias crônicas (21).

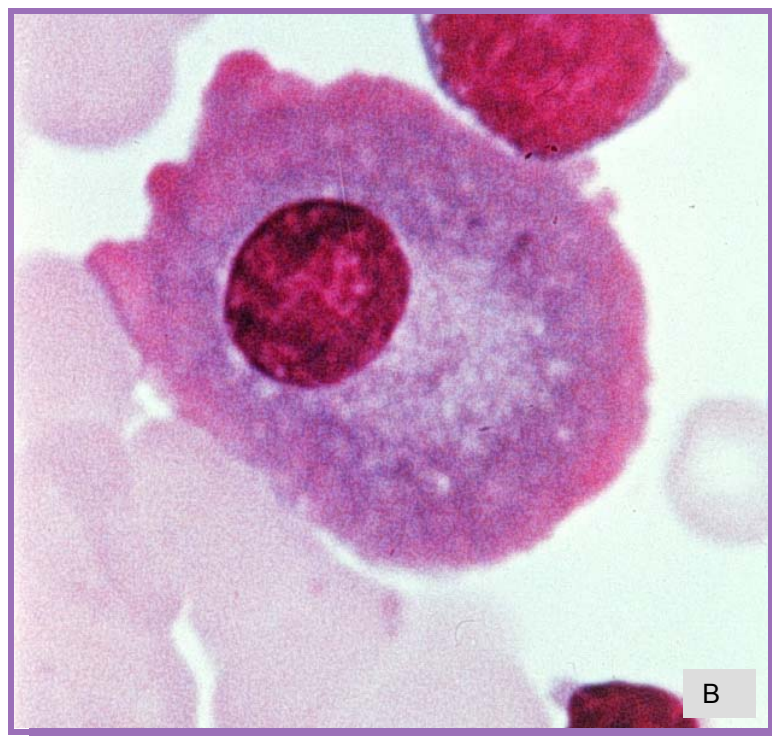
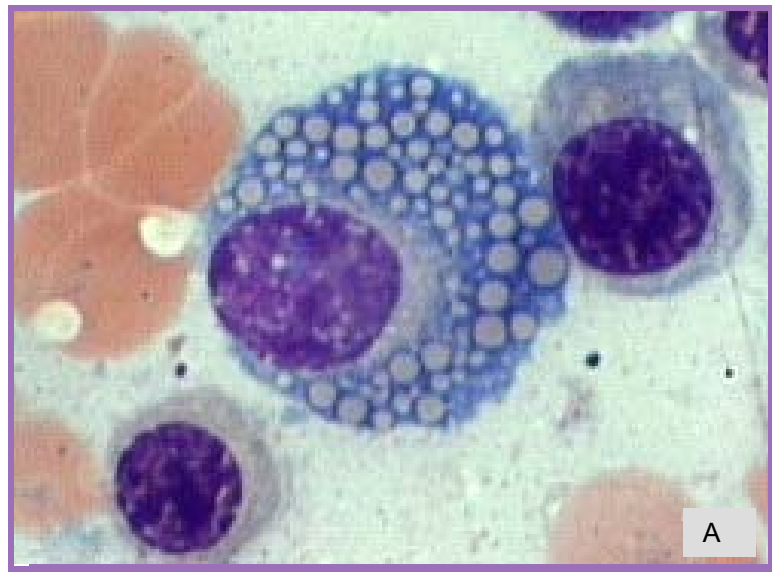


Figura 7- Células de Mott (A) e “flame cells” (B). www.med-ed.virginia.edu

1.1. Fatores Prognósticos e Alvos Terapêuticos

A primeira tentativa bem sucedida de estabelecimento de um sistema de estadiamento capaz de definir grupos de pacientes portadores de MM com prognósticos diferentes foi publicada por Durie e Salmon, em 1975 (31). O sistema procurava correlacionar os valores iniciais de hemoglobina, calcemia, extensão de lesões ósseas, quantidade de proteína M sérica, dosagem de imunoglobulinas séricas e dosagem de cadeias leves urinárias com a evolução clínica dos pacientes, dividindo-os em três subgrupos. Diferenças estatisticamente significativas na sobrevida nos três estadios foram observadas em alguns estudos, porém em outros não houve diferença entre os estadios II e III (32).

A diversidade de comportamento biológico e evolução clínica entre pacientes com o mesmo estadio clínico, bem como as controvérsias em torno do real valor do sistema como preditor de prognóstico, levaram à busca de outros sinalizadores para avaliação prognóstica dos portadores de MM. Outros fatores começaram a ser então utilizados, em associação ou não com os sistemas anteriores, especialmente a dosagem sérica de β_2 microglobulina. A β_2 microglobulina é uma proteína de baixo peso molecular que representa a cadeia leve das moléculas dos antígenos leucocitários humanos (HLA) classe I. É detectada na membrana citoplasmática de todas as células nucleadas, e

seus níveis na circulação possivelmente elevam-se devido à morte celular ou "turnover" aumentado, refletindo a carga tumoral (33-34). Análises multivariadas revelam a β_2 microglobulina como o fator prognóstico independente de maior significado entre os parâmetros relacionados à carga tumoral no MM, associando altas dosagens séricas (> 6 mg/l) a sobrevida mais curta (35-36). Sua associação com os níveis séricos de albumina tem sido recentemente utilizada para definição do prognóstico. A importância deste novo sistema de avaliação prognóstica tem sido ressaltada, especialmente pela facilidade com que pode ser aplicada rotineiramente (37-38).

Anormalidades citogenéticas, especialmente relacionadas ao cromossomo 13, conferem um prognóstico desfavorável aos portadores de MM, proporcionando menor tempo de sobrevida livre de doença e menor tempo de sobrevida global. Podem ser detectadas em cerca de 14% dos casos e correlacionam-se de forma significativa com a carga tumoral, atividade proliferativa e desidrogenase láctica (DHL) (39-40).

A morfologia dos plasmócitos tumorais parece ter papel no diagnóstico e na evolução clínica da doença, determinando um curso mais brando (MM plasmacítico) ou mais agressivo (MM plasmablástico) (42-43). No entanto, ainda há controvérsias sobre seu significado como fator prognóstico (34;44-45). O grau de infiltração medular por plasmócitos tumorais, por sua vez, pode ser utilizado para avaliação prognóstica dos

portadores de MM, com piora progressiva do tempo de sobrevida, de acordo com o aumento da percentagem de células tumorais infiltrando a M.O. (estágio I, <20%; estágio II, 20-50%; estágio III, > 50%) (46). A associação de tal classificação com as características morfológicas das células tumorais (percentagem de células plasmablasticas) modifica as medianas de sobrevida distintas entre os grupos (47). No entanto, a subjetividade deste tipo de avaliação e a qualidade variável das amostras analisadas podem prejudicar seu valor no uso rotineiro da técnica.

O subtipo de imunoglobulina monoclonal produzido pode também influenciar a evolução clínica dos pacientes (34), assim como a proteína C reativa (PCR) (4;24), os níveis séricos de receptores solúveis da IL-6 e DHL (4) e a percentagem de plasmócitos circulantes (29), mas as controvérsias em torno destes marcadores ainda limitam sua utilização na prática clínica.

A dificuldade para prever a evolução clínica dos portadores de MM permanece presente na prática clínica de hematologistas e oncologistas. Sua busca constante por novos fatores prognósticos resultou no interesse crescente sobre as características biológicas das células mielomatosas, as quais têm freqüentemente se revelado como potenciais alvos terapêuticos.

A tendência atual das pesquisas em torno do MM tem sido a compreensão cada vez mais profunda dos mecanismos

fisiopatológicos envolvidos na iniciação e progressão da neoplasia. A detecção de marcadores biológicos mais específicos, a definição do seu papel no comportamento biológico do MM e a identificação de grupos de risco caracterizados pela combinação de alguns destes marcadores parecem apontar para um caminho promissor, permitindo a definição de protocolos terapêuticos personalizados de acordo com as características biológicas de cada paciente. Os primeiros passos na direção desta potencial revolução no tratamento do MM foram as descobertas em torno da origem das células tumorais, especialmente as interações entre as células tumorais e seu microambiente e o papel das moléculas de adesão – entre elas a CD56 – neste processo.

1.2. A Origem das Células do MM

Os plasmócitos constituem a última fase da diferenciação dos linfócitos B, representando o resultado final de um longo processo evolutivo, no qual a célula adquire e perde características sob a influência de fatores intrínsecos ou externos, determinando modificações morfológicas e comportamentais adequadas à sua função (figura 8).

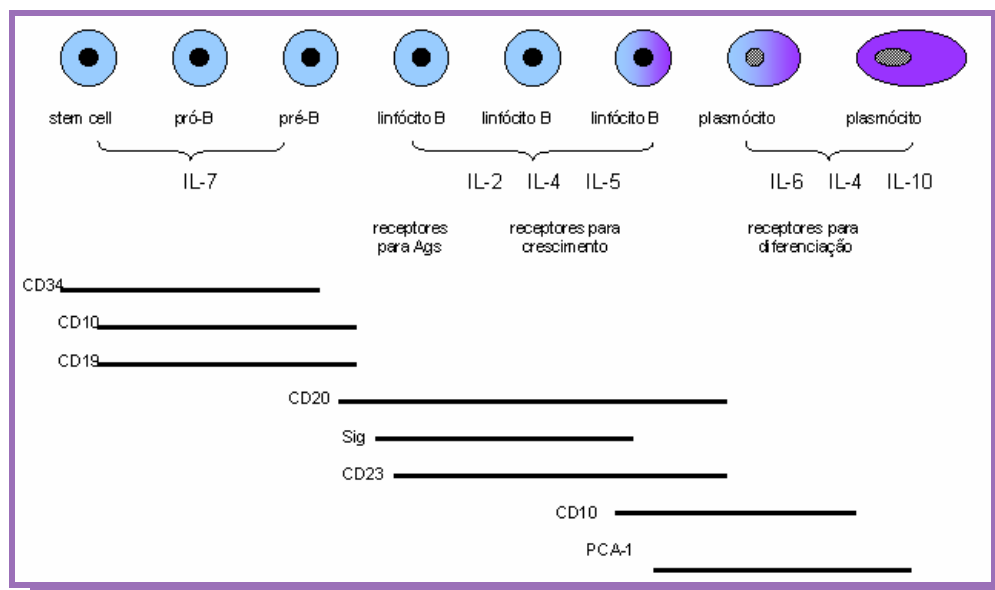


Figura 8 - Esquema simplificado do processo de diferenciação dos linfócitos B, dos pontos de vista morfológico e funcional, e antígenos expressos nas diversas etapas.

Os linfócitos são células hematopoiéticas que expressam receptores específicos para antígenos (Ags). Existem dois tipos principais de receptores: a imunoglobulina de membrana (Ig_m) dos linfócitos B e o receptor de células T (TCR) dos linfócitos T. O estado de imunocompetência dos linfócitos T ou B é determinado pela expressão de seus receptores na membrana da célula (48). Os estudos mais recentes sobre a diferenciação linfocitária têm sido baseados no uso de anticorpos monoclonais (Ac_m) e em técnicas de biologia molecular. Estas técnicas permitiram aos pesquisadores ultrapassar os limites da caracterização morfológica e citoquímica das diferentes linhagens linfocitárias, auxiliando a compreensão das várias etapas da diferenciação e da heterogeneidade funcional dos linfócitos. Assim, há Ags exclusivos das linhagens T, enquanto outros são característicos dos linfócitos B, e são utilizados como marcadores das linhagens linfocitárias. Em ambas as linhagens, alguns Ags são expressos apenas nas etapas mais precoces da diferenciação, e desaparecem durante a maturação celular. Tais Ags são considerados marcadores de maturação. Atualmente, as técnicas de biologia molecular são capazes de identificar os genes codificadores dos receptores TCR e Ig_m , que ocorrem nas etapas mais precoces da diferenciação. Assim, os rearranjos genéticos envolvendo TCR e Ig_m são considerados marcadores de diferenciação linfocitária. Eles representam também marcadores de clonalidade, uma vez que, para cada clone, um único rearranjo dos genes V, D e J resulta num único receptor específico de Ags (48).

Anticorpos monoclonais são capazes de reconhecer epítomos de moléculas presentes no citoplasma ou na membrana celular. Uma determinada molécula pode expressar vários epítomos, reconhecidos pelo seu respectivo Ac_m . Da mesma forma, vários Ac_m s podem identificar uma única molécula através do conjunto (“cluster”) de epítomos que ela contém. Este processo forma a base para a nomenclatura dos Ags de diferenciação (“clusters of differentiation” ou simplesmente “CDs”), utilizados no reconhecimento da fase maturativa em que uma determinada célula se encontra (48) (figura 9).

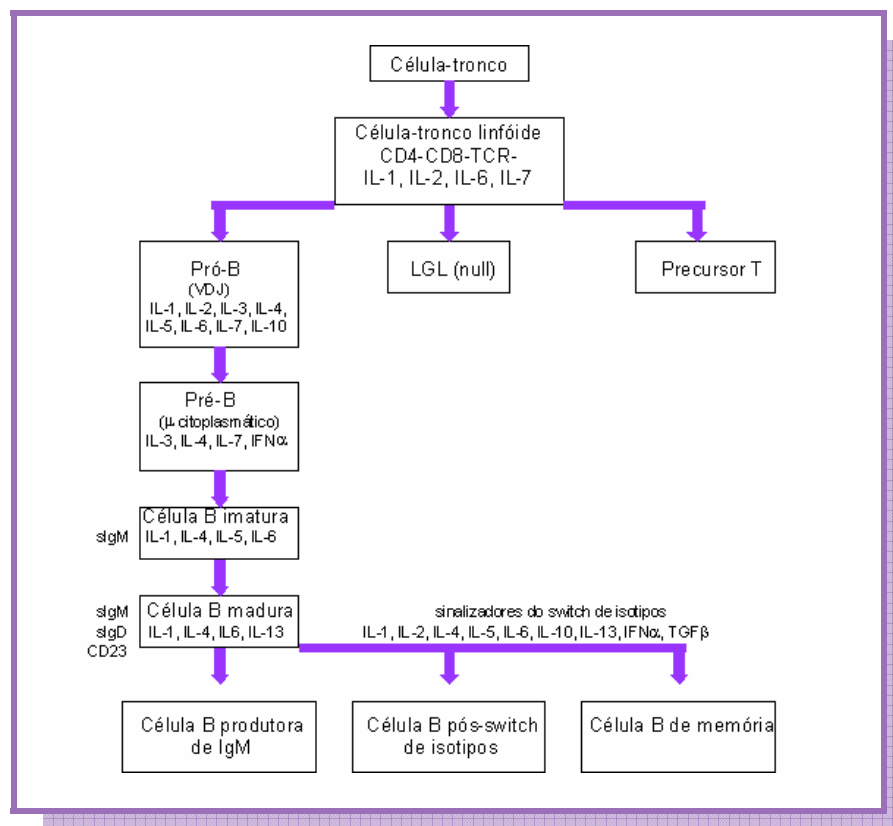


Figura 9 - Esquema simplificado das modificações antigênicas durante o processo de diferenciação linfocitária B.

O estudo das moléculas expressas pelas células linfocitárias B permitiu a determinação de um perfil de Ags característicos em sua fase terminal de diferenciação, ou seja, o plasmócito. Plasmócitos normais caracteristicamente expressam CD38, CD54, CD44, CD31, CD24, CD40 e PCA-1 em sua superfície. Expressam Ig citoplasmática, mas ao contrário dos linfócitos B circulantes, perdem sua Ig de membrana durante ao processo de diferenciação, e são tipicamente CD20 e CD21 negativos (49).

As células do MM expressam os mesmos antígenos de superfície dos plasmócitos normais (especialmente CD38, CD24 e PCA-1) e, funcionalmente, comportam-se como eles: têm baixa atividade proliferativa e são capazes de sintetizar proteínas. No entanto, a fenotipagem completa das células mielomatosas demonstra grande heterogeneidade na expressão dos marcadores associados à linhagem B e à diferenciação celular (50).

Apesar de as células do MM comportarem-se morfológica e funcionalmente como plasmócitos maduros, estudos recentes postulam que a etiopatogenia da doença tem seu início numa fase mais precoce da diferenciação celular, provavelmente nas células pré-B (50).

A evolução dos linfócitos B pode ser compreendida como um processo biológico com duas fases principais: uma Ag-independente e outra Ag-dependente. A fase Ag-independente envolve a geração de

células B a partir das células-tronco e sua subsequente diferenciação em linfócitos B maduros virgens. Em adultos, estas etapas ocorrem na M.O., a qual oferece uma estrutura bem organizada de células, coletivamente chamadas células estromais, responsáveis pela produção de proteínas da matriz extracelular (PMEC) e de grande variedade de citocinas (51).

A diferenciação do precursor B em célula B madura é marcada por dois eventos: o rearranjo dos segmentos V, D e J no "loci" gênico das imunoglobulinas, formando os exons codificadores das cadeias leves (V e J) e pesadas (V, D e J) das moléculas de anticorpos, e a aquisição e/ou perda de marcadores de superfície. O rearranjo do segmento VDJ é seguido pela síntese de cadeias pesadas de IgM (μ), e após sua cessação, pelo início dos rearranjos dos genes das cadeias leves *kappa* (κ) e *lambda* (λ). O pareamento $V\kappa-J\kappa$ resulta na síntese de cadeias leves κ . Caso o pareamento $V\kappa-J\kappa$ não ocorra por duas vezes consecutivas, inicia-se a síntese de cadeias leves λ , caracterizando a determinação da cadeia leve como resultante de um processo de exclusão alélica (52). Estas células B virgens migram para os órgãos linfóides periféricos, principalmente para o baço. Se não entrarem em contato com Ags específicos, sua meia-vida é bastante curta, e a maioria morre "in situ" por apoptose dentro de poucos dias (51).

O contato com o Ag específico inicia a fase Ag-dependente, nos centros germinativos dos órgãos linfóides periféricos,

sob regulação de citocinas, estruturas de adesão e moléculas de superfície. Esta fase é caracterizada por dois processos genéticos, altamente especializados: a mudança de classes, conhecida como "switching" de isotipos de imunoglobulinas, e a hipermutação somática (50-51;53). O "switching" de isotipos ocorre nas células que expressam receptores IgD e IgM em sua superfície, proporcionando a troca irreversível de tais receptores por IgG, IgA ou IgE. As moléculas de Acs resultantes do "switching" expressam um novo isotipo e novas funções biológicas, mas sua especificidade antigênica permanece intacta, pois sua cadeia leve e a região variável das cadeias pesadas não se altera. O "switching" é controlado por uma combinação de fatores, incluindo agentes ativadores das células B (como Ags), contato com células T helper e algumas citocinas (interleucina 4, interferon γ e fator de crescimento tumoral β). A hipermutação somática na região variável dos genes para cadeias leves e pesadas aumenta o repertório antigênico e as possibilidades de afinidade a diversos Ags (52). Esses processos permitem que a célula B seja capaz de produzir anticorpos com a maior especificidade possível, sendo assim selecionada para expansão e sobrevivência. Dessa forma, os centros germinativos atuam como um propulsor da máquina imunológica, onde a modulação celular tem que ser, paradoxalmente, diversa o suficiente para abranger qualquer estímulo antigênico e específica o suficiente para reconhecer cada agente agressor.

As células não selecionadas nos centros germinativos morrem "in situ" por apoptose e são fagocitadas por macrófagos (51). O resultado final de todo o processo é o desenvolvimento de células B de memória ou de plasmablastos / plasmócitos. A análise fenotípica dos plasmócitos tumorais sugere que eles mantenham o mesmo padrão de diferenciação dos plasmócitos maduros, e que o evento de transformação tumoral ocorra numa fase pós-"switching" (51;53-55).

A migração das células precursoras do MM à M.O., no entanto, é um dos pontos mais complexos da fisiopatologia da neoplasia. Há indícios de que ocorra através da expressão de moléculas de adesão específicas, que permitiriam a fixação e permanência destas células no favorável ambiente medular, seguidas pelo desenvolvimento tumoral e sua disseminação. Vários estudos têm identificado moléculas de adesão envolvidas na interação tumoral com o estroma, com interesse especial na influência que tal interação é capaz de exercer sobre o crescimento e progressão tumorais (56).

1.3. Desenvolvimento das Células Neoplásicas e Microambiente Tumoral

Após sua migração para a M.O., as células precursoras do MM iniciam uma nova fase, na qual os principais objetivos são sua própria sobrevivência e o desenvolvimento tumoral. A sobrevivência de células tumorais depende essencialmente de vias de sinalização que estimulem o crescimento, a quimiotaxia, a angiogênese e/ou a produção de fatores anti-apoptóticos, sem os quais torna-se inviável o desenvolvimento e a disseminação do tumor. O local onde tais interações celulares ocorrem tem sido apropriadamente chamado de microambiente tumoral (57) que, no caso do MM, seria a M.O..

As células tumorais, em geral, exibem anormalidades fenotípicas específicas que as auxiliam em seu processo de desenvolvimento. Tais anormalidades podem incluir perda da capacidade de diferenciação, aumento da motilidade e invasividade e até mesmo diminuição da sensibilidade a drogas. No entanto, uma anormalidade virtualmente patognomônica de todos os tipos de células tumorais é a desregulação do controle do ciclo celular, seja favorecendo a capacidade proliferativa, seja proporcionando a imortalização do clone celular tumoral (58). Assim, esta interação plasmócito-microambiente medular é um processo dinâmico e altamente versátil, onde as sinalizações intra e extracelulares proporcionam a aquisição ou perda de determinadas características, favoráveis ao tumor, capazes de alterar seu

comportamento, reforçando a não-obediência ao ciclo celular normal (59-61).

A estreita correlação entre citocinas e moléculas de adesão na M.O. busca regular a adesão celular, a qual pode, por sua vez, regular a resposta celular às diversas citocinas presentes no microambiente (48). A IL-6 é o principal fator de crescimento para o MM (62) dentro da M.O.. É uma proteína pleiotrópica, composta de 185 aminoácidos, pertencente à classe das citocinas, capaz de promover a comunicação intercelular. A adesão da célula tumoral às células estromais da M.O. desencadeia a produção e secreção de IL-6 pelas células do estroma medular (secreção parácrina) e, embora em muito menor quantidade, pelas próprias células tumorais (secreção autócrina) (63-68). O papel principal da IL-6 parece estar relacionado à diferenciação da célula precursora em célula mielomatosa, mais do que à proliferação das mesmas (33;63). A IL-6 é também responsável pela prevenção da apoptose dos plasmócitos tumorais, através da inibição do antígeno *Fas* (59) e, segundo Teoh, promoveria a perda gradativa das moléculas de adesão, propiciando a migração das células tumorais para a circulação quando a carga tumoral se tornasse "excessiva" (leucemia plasmocitária) (63). As células tumorais circulantes, quando distantes do microambiente medular e, portanto, da ação da IL-6, adquiririam novamente suas moléculas de adesão, o que permitiria sua ligação a sítios metastáticos extramedulares (63). Assim, o contato das células neoplásicas com a IL-6 pode ser considerado primordial para o pleno desenvolvimento tumoral,

revelando a importância das moléculas de adesão na gênese e perpetuação do MM.

De maneira geral, o microambiente da M.O. no MM é altamente organizado, em termos de propriedades adesivas, para capturar os precursores circulantes das células tumorais, assim favorecendo a produção das citocinas que oferecerão, a estas células, condições ótimas para o crescimento local e diferenciação final. Forma-se assim uma parceria fortuita na qual, à medida que o clone tumoral aumenta, há maior secreção de citocinas capazes de recrutar e ativar células acessórias desse microambiente (incluindo osteoclastos). Tais células poderiam, então, produzir maiores quantidades de IL-6 e contribuir assim para a expansão tumoral, levando ao crescimento progressivo e à disseminação da doença (51;67).

A interação plasmócito-estroma-células endoteliais resulta ainda na secreção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), capaz de estimular a angiogênese no microambiente tumoral, a qual é reconhecidamente um fator obrigatório para o crescimento, invasão e disseminação do clone tumoral (21;69). Outras citocinas envolvidas na estimulação do desenvolvimento e expansão do clone tumoral são IL-1 β , IL-3, IL-5, IL-10, interferon- α , fatores de necrose tumoral α e β (TNF α e β), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), entre outras (65; 70).

1.4. A Molécula de Adesão CD56

A adesão celular tem sido um dos processos mais estudados na tentativa de compreender melhor a biologia das neoplasias, especialmente no MM. Da mesma forma como as células estromais medulares expressam moléculas de adesão capazes de "capturar" as células precursoras, as células tumorais exibem, em sua superfície, algumas destas moléculas, entre as quais a CD56. Dependendo da fase de desenvolvimento tumoral em que se encontram, as células neoplásicas podem precisar suprimir ou expressar estas moléculas de adesão em sua superfície, assim como os receptores para moléculas de adesão provenientes do microambiente (59; 71). Esta capacidade de alterar as respostas aos estímulos provenientes do microambiente em favor de suas próprias necessidades biológicas torna as células tumorais mais independentes, mais agressivas e menos responsivas à terapêutica.

A molécula CD56 é uma isoforma da molécula de adesão da célula neural (NCAM), a qual foi a primeira molécula de adesão completamente caracterizada no cérebro (72). Durante o desenvolvimento embrionário, as NCAMs são expressas pelas três linhagens germinativas, enquanto na fase adulta apresentam-se predominantemente no tecido neural. Processos como o crescimento axonal, a histogênese da retina e o desenvolvimento do sistema olfatório estão relacionados à regulação da expressão de NCAMs (73). O estudo da sequência protéica destas

moléculas e sua análise estrutural permitiram incluí-las na superfamília das imunoglobulinas, a maior família de moléculas relacionadas já descrita (74). As NCAMs são proteínas transmembrana, formadas por dois domínios principais: Ig e fibronectina tipo III (FNIII). O domínio Ig é composto por 70 a 110 aminoácidos e usualmente tem dois resíduos de cisteína característicos, distantes 55 a 75 resíduos um do outro. Além disso, há um resíduo de triptofano aproximadamente 10 a 15 resíduos abaixo da primeira cisteína (75). O domínio FNIII é formado por cerca de 90 aminoácidos, cuja estrutura é bastante semelhante à observada na fibronectina. O conjunto de 5 domínios Ig e 2 domínios FNIII caracteriza a maioria das moléculas NCAM (75) (figura 10).

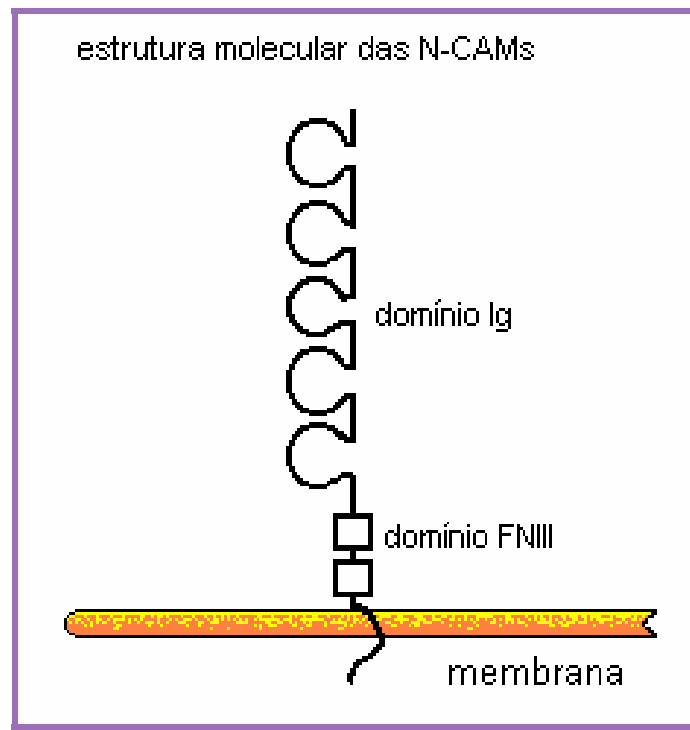


Figura 10 - Estrutura molecular esquemática das moléculas NCAM, compostas por um domínio Ig e um domínio fibronectina tipo III.

Caracteristicamente, as NCAMs promovem a ligação de uma célula à outra (adesão homotípica), desempenhando papel importante no crescimento axonal (75). Têm sido descritas principalmente em neoplasias sólidas (76), como tumor de Wilms (77), carcinoma pulmonar de pequenas células (78-79), neuroblastoma (80), sarcoma de Ewing (81) e outras neoplasias neuroendócrinas (82). Há ainda descrições recentes sobre a expressão de NCAMs em pacientes com leucemia mielóide aguda (83-84). Nos tecidos hematopoiéticos normais, as NCAMs são expressas por células "natural-killer" e linfócitos T citotóxicos (85).

As primeiras descrições de expressão de NCAMs por células tumorais do MM datam do início dos anos 90s, quando foi identificada a NCAM-1 (CD56) na superfície plasmocitária da maioria dos pacientes portadores da doença (62 - 78% dos casos) (86-89). Entre plasmócitos normais, o fenótipo comumente encontrado é CD19+CD56-. Entre os neoplásicos, o fenótipo mais freqüente é CD19-CD56+, podendo ser observados CD19-CD56- e CD19+CD56+. A inexistência da expressão de CD56 em plasmócitos normais sugere que a molécula exerça algum papel na biologia da doença (89-90).

A heterogeneidade imunofenotípica observada nos plasmócitos mielomatosos tem sido associada à heterogeneidade no comportamento clínico dos pacientes. Dois subgrupos principais foram descritos: a) plasmócitos "precoces", que coexpressam marcadores de

linfócitos B e de plasmócitos; e b) plasmócitos "tardios", que expressam apenas marcadores plasmocitários, entre eles CD56 (91).

O papel da CD56 na fisiopatologia do MM permanece ainda pouco claro. O fato das NCAMs, caracteristicamente, promoverem a adesão celular homotípica, sugere que a presença da NCAM-1 na superfície plasmocitária levaria à formação de nódulos ou agrupamentos ("clusters") de células tumorais na M.O. A perda de CD56 tem sido, inclusive, associada a um curso mais agressivo da doença, onde seria responsável pela disseminação (leucemização) de células tumorais para o sangue periférico (53;92-94). A expressão fraca ou ausente da CD56 tem sido ainda associada a menor potencial osteolítico e maior tendência ao comprometimento extramedular (94-95).

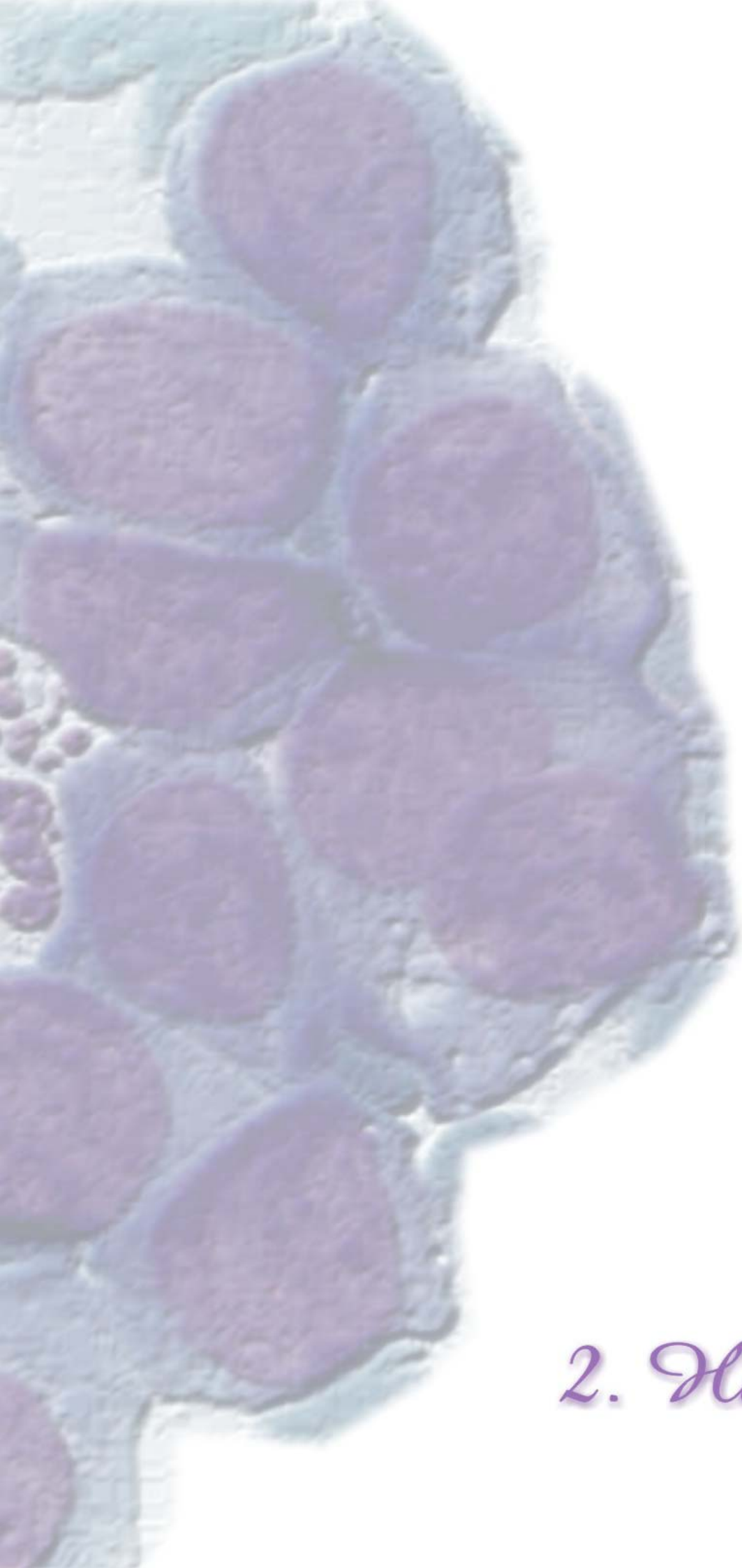
A utilidade clínica da identificação e caracterização da expressão da molécula no MM não está, no entanto, totalmente esclarecida. É útil na diferenciação de plasmócitos normais e tumorais, bem como entre plasmócitos do MM e das gamopatias monoclonais de significância indeterminada (MGUS) e dos plasmocitomas extramedulares (86; 96-97). É possível, também, utilizá-las durante o acompanhamento clínico de pacientes portadores de MM, discriminando doença estável e em progressão, através de um painel de Ags: há evidências de que ocorra aumento progressivo de plasmócitos com fenótipo CD38+ CD19- CD56+ syndecan1+ em pacientes que apresentam recaída da doença (98).

Todos estes dados sugerem que as moléculas de adesão, especialmente a CD56, desempenhem papel significativo na evolução biológica do MM.

O estudo dos processos de adesão celular tumoral tem contribuído também para a compreensão dos mecanismos de resistência das células tumorais às drogas quimioterápicas, responsáveis por grande parte das falhas terapêuticas no MM. Os estudos mais recentes têm demonstrado que plasmócitos neoplásicos aderidos uns aos outros ou ao microambiente são mais resistentes a determinadas drogas do que quando estão isolados (57; 99-100).

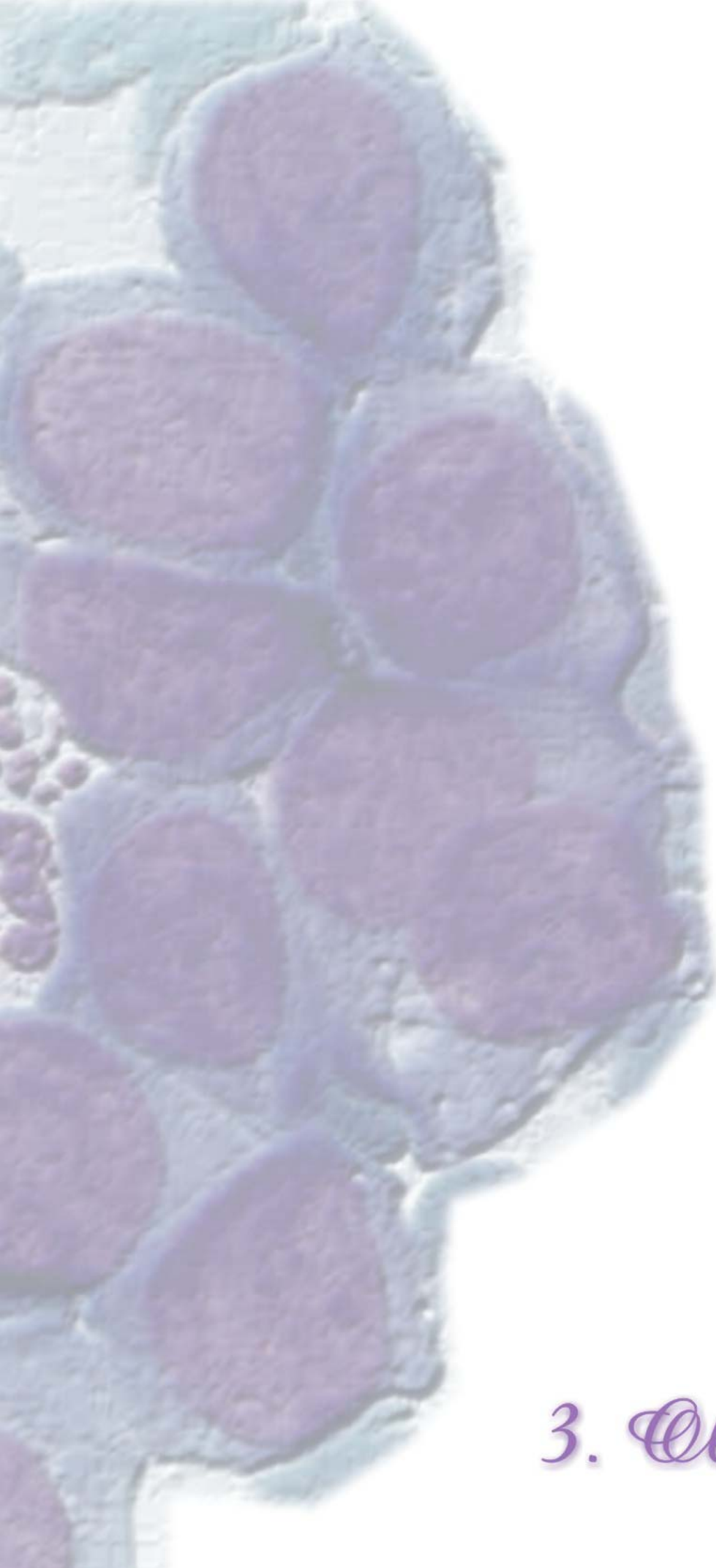
Apesar do desenvolvimento tecnológico intenso das últimas décadas, associado à descoberta de novos agentes quimioterápicos e procedimentos terapêuticos, o tempo de sobrevida e a história natural dos portadores de MM ainda estão distantes de uma situação ideal, com muitas frentes de pesquisa em busca de cura para a doença. A maior compreensão a respeito do microambiente tumoral e dos mecanismos responsáveis pela permanência da célula neoplásica neste microambiente tem proporcionado implicações clínicas importantes. Os estudos mais recentes sugerem que o alvo das terapias contra o câncer não precisaria ser exclusivamente a célula tumoral, mas também o microambiente que a sustenta e as moléculas necessárias para seu desenvolvimento (57;60).

Assim, a busca de dados que esclareçam a fisiopatologia da doença, seus processos biológicos e eventos determinantes de seu comportamento clínico poderão ser de grande importância para a futura abordagem dos pacientes com MM.



2. Hipótese

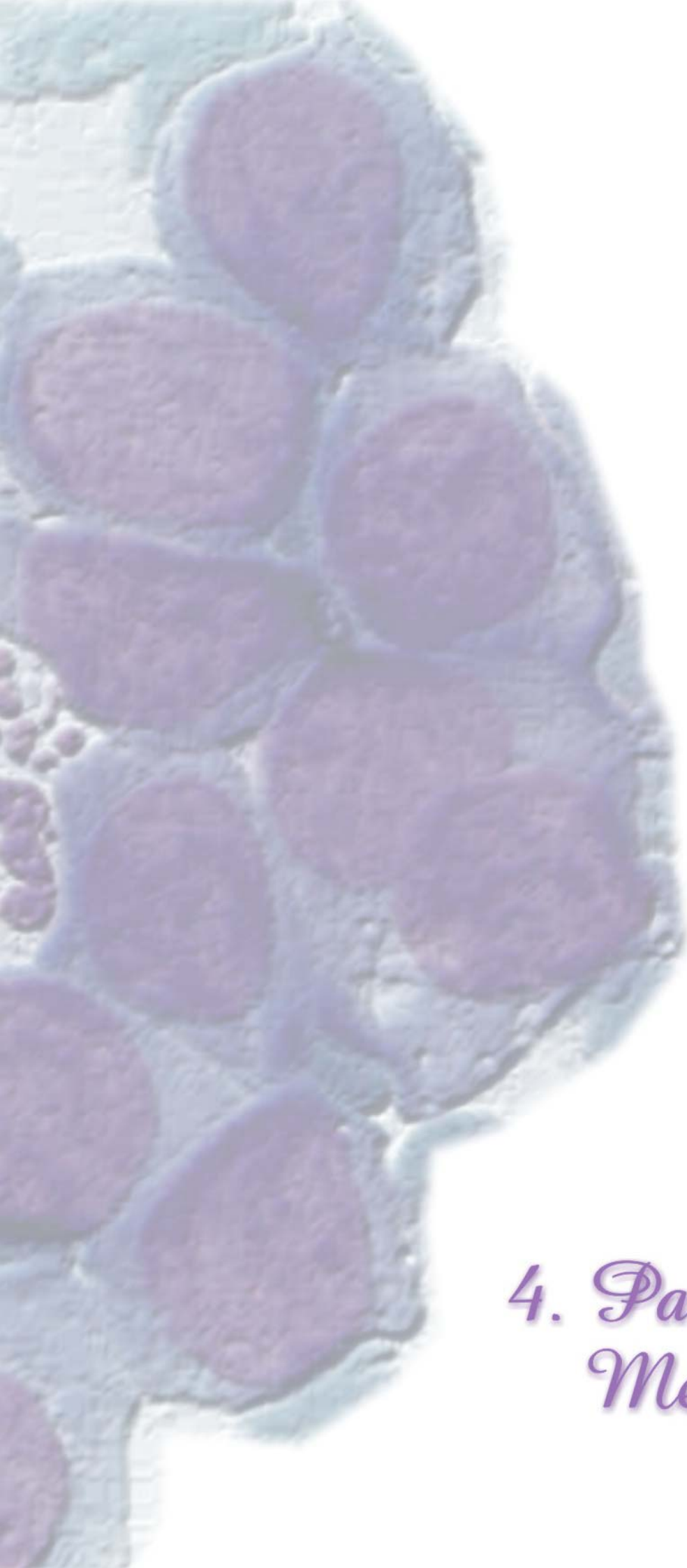
A expressão da molécula CD56 por plasmócitos tumorais no MM está associada ao comportamento biológico e poderia influenciar o tempo de sobrevida dos pacientes.



3. Objetivos

Analisar a associação entre expressão de CD56 pelas células tumorais do MM e o comportamento biológico da doença, especificamente:

- a) verificar a possível associação entre expressão da molécula de adesão CD56 por plasmócitos tumorais do MM e características demográficas e clínicas;
 - b) analisar os fatores prognósticos em pacientes portadores de MM, com ênfase na expressão de CD56.
-

A microscopic image showing a cluster of cells with prominent, dark purple nuclei. The cells are arranged in a somewhat organized pattern, with some nuclei appearing larger and more distinct than others. The background is a light, textured grey.

4. Pacientes e Metodologia

4.1. Seleção de pacientes e levantamento de dados

Foram estudados todos os casos de MM diagnosticados pela Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) - UNESP, no período de 1979 a 2002, e todos os casos de MM diagnosticados no Hospital Amaral Carvalho, em Jaú, no período de 1999 a 2002. O período de tempo mais restrito determinado para a segunda Instituição foi devido à inexistência de dados do Registro Hospitalar de Câncer (RHC) no período anterior a 1999.

Foram identificados todos os casos cadastrados nos arquivos de medula óssea da Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) - Unesp cujo diagnóstico citológico foi compatível com MM entre 1979 e 2002. No Hospital Amaral Carvalho (HAC), os pacientes com diagnóstico de MM foram identificados a partir dos dados do RHC, referentes ao período de 1999 a 2002.

Os critérios adotados para exclusão de pacientes do estudo foram:

- a)** material histológico — fragmento ósseo ou coágulo de M.O. inadequado para análise ou extraviado;
 - b)** prontuário médico do paciente — informações clínicas disponíveis no prontuário médico insuficientes para diagnóstico de MM ou extravio do prontuário.
-

A partir dos arquivos de medula óssea da Disciplina de Hematologia da FMB - Unesp, foram identificados 104 pacientes com diagnóstico citológico de MM, no período de janeiro de 1979 a dezembro de 2002. Não foi possível localizar os prontuários médicos de 41 pacientes. Em 22 casos foram detectados critérios de exclusão (os prontuários não forneciam informações suficientes para diagnóstico de MM, o material histológico mostrou-se inadequado para estudo imunohistoquímico, ou não foi possível localizar o material histológico referente ao diagnóstico). Foram incluídos no estudo 41 pacientes provenientes do HC da FMB – Unesp.

A partir do RHC do Hospital Amaral Carvalho – Jaú, foram identificados 132 pacientes com diagnóstico de MM, no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2002. Não foi possível localizar os prontuários médicos de 10 pacientes. Em 66 casos foi detectado pelo menos um dos demais critérios de exclusão já descritos, principalmente a impossibilidade de localizar o material histológico referente ao diagnóstico (29 casos). Foram incluídos no estudo 56 pacientes provenientes do HAC – Jaú.

Foram revistas as lâminas dos coágulos e biópsias de M.O. referentes à época do diagnóstico, selecionando-se os casos que ofereceram material histológico suficiente para a realização de estudo imunohistoquímico. Nos casos em que não houve biópsia por trepanação disponível, ou quando o fragmento ósseo apresentou-se inadequado para a histologia ou para imunohistoquímica, foram analisados os coágulos de

medula óssea incluídos em parafina, obtidos por punção de M.O. ao diagnóstico.

A história clínica, os exames realizados ao diagnóstico (calcemia, hemograma, nível de proteína M sérica e/ou urinária, creatinina sérica, dosagens séricas de β_2 microglobulina e DHL) e evolução clínica foram coletados nos prontuários médicos, utilizando-se um instrumento específico (anexo1). O tratamento inicial (primeiros seis meses após o diagnóstico) foi registrado de acordo com as drogas utilizadas e suas doses, bem como a utilização ou não de radioterapia.

Os pacientes selecionados para o estudo foram estadiados conforme os critérios estabelecidos por Durie e Salmon (31).

O presente estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do HC da FMB – Unesp (anexo 2) e do HAC – Jaú (anexo 3), antes da inclusão de pacientes. Foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 4) aos pacientes envolvidos no estudo que ainda permaneciam vivos na época do levantamento de dados, incluindo-se no estudo apenas materiais biológicos e dados de pacientes que assinaram o TCLE ou de pacientes que tinham evoluído a óbito. Ambas as instituições dispõem ainda de um termo de consentimento próprio, assinado no momento do cadastro do paciente, onde o mesmo autoriza a utilização de dados disponíveis em seu prontuário médico.

4.2. Estudo piloto

Não havia, até a realização do presente estudo, uma rotina de aplicação de critérios para avaliação do grau e padrão de infiltração medular por MM, assim como não havia uma rotina técnica específica para o estudo imunohistoquímico da molécula CD56 nas Instituições envolvidas. Assim, optou-se por realizar um estudo piloto anteriormente ao início do projeto, com o objetivo de padronizar tais critérios e estabelecer a rotina de avaliação histológica e imunohistoquímica de pacientes com diagnóstico de MM.

Para o estudo piloto, foram utilizados os materiais histológicos, corados com hematoxilina-eosina (HE), de 14 pacientes, escolhidos ao acaso. As 14 amostras histológicas foram classificadas, de acordo com os critérios estabelecidos, pelas duas pesquisadoras responsáveis pelo estudo, sem que tivessem acesso a dados de identificação dos pacientes. Os resultados obtidos por ambas foram confrontados e, nos casos de discrepâncias, os critérios classificatórios foram revistos em conjunto, chegando-se a um consenso. Tal procedimento foi repetido diversas vezes, objetivando-se o treinamento das pesquisadoras e a consolidação dos critérios adotados.

Na segunda fase do estudo piloto, foi realizado o estudo imunohistoquímico para identificação da molécula CD56 e das cadeias de imunoglobulina *kappa* e *lambda* para os 14 casos. Conforme a técnica

padronizada pelo Departamento de Patologia da FMB (101), foram desparafinizados cortes de 4 a 5 μm imediatamente antes do procedimento, os quais foram hidratados e lavados com solução salina tamponada. Após a desparafinização, os cortes foram incubados em forno de microondas convencional por 15 minutos, em solução tampão de citrato, pH 6,0. Foram, a seguir, incubados "overnight" em refrigerador convencional, à temperatura de 4°C. Após lavagem em solução salina tamponada, as lâminas foram incubadas por 60 minutos com o anticorpo secundário biotilado anti-CD56, clone 1B6 (Vector Corp., Burlingame, CA, EUA), nas diluições de 1:25, 1:50, 1:100 e 1:150, por 45 minutos. Para visualização, as lâminas foram tratadas com solução de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA), sendo contra-coradas com hematoxilina. A interpretação foi realizada à microscopia óptica.

Para identificação de *kappa* e *lambda*, foi aplicada a mesma técnica padronizada descrita, utilizando-se os anticorpos monoclonais anti-*kappa* e anti-*lambda* (Dako A/S, DK, Denmark).

O estabelecimento de critérios para interpretação do estudo imunohistoquímico foi a etapa seguinte. Os isotipos de cadeias leves de imunoglobulinas *kappa* e *lambda* foram classificados apenas quanto à sua presença ou ausência no material em estudo.

A expressão da molécula de superfície CD56 pelas células tumorais foi avaliada utilizando-se as diluições 1:25, 1:50, 1:100 e 1:150, com o objetivo de definir a diluição que permitisse a visualização das células tumorais positivas de forma mais precisa e com o mínimo de artefatos. Foi definida a diluição 1:50 como padrão para a realização da técnica neste estudo. Foi utilizada uma biópsia de amígdala normal para controle de positividade da expressão de CD56.

Para definir os critérios de interpretação da expressão de CD56, foram utilizadas duas variáveis: quantificação das células positivas através do método de contagem por campos, com cálculo de percentagem, e padrão da coloração apresentada. Os campos escolhidos para observação foram aqueles nos quais a coloração das células mostrou-se mais intensa. Foi calculada a percentagem de células tumorais positivas para CD56 através da contagem de 200 plasmócitos nos campos observados. Para auxiliar na identificação das células tumorais, recorreremos às lâminas coradas para *kappa* ou *lambda*, observando o padrão de infiltração e locais de maior concentração de plasmócitos tumorais, e comparando tais áreas ao material em estudo.

Para treinamento das pesquisadoras, as lâminas foram repetidamente observadas, à cegas, até que um padrão uniforme de classificação fosse definido.

Após a consolidação dos critérios, tanto para classificação histológica, como para estudo imunohistoquímico, os mesmos foram aplicados aos pacientes restantes. Os resultados obtidos foram registrados no protocolo II (anexo 1).

4.3. Variáveis de estudo

4.3.1. Características demográficas

- a)** sexo: feminino e masculino;
- b)** cor: branca, negra, amarela ou parda;
- c)** idade ao diagnóstico: < 55 anos, 55 a 75 anos ou > 75 anos.

4.3.2. Características clínicas

- a)** estadiamento (Durie e Salmon): I, II ou III;
 - b)** lises ósseas extensas: presentes ou ausentes;
 - c)** nível de hemoglobina (g/dl): > 10, entre 8,5 e 10 ou < 8,5;
 - d)** creatinina sérica: normal ou elevada;
 - e)** calcemia: normal ou elevada;
 - f)** proteína monoclonal sérica: presente ou ausente;
 - g)** quantificação de proteína M sérica (g/dl): negativa, ≤ 2 , 2.1-4, 4.1-6 ou > 6;
 - h)** proteína monoclonal urinária: presente ou ausente;
-

- i) β_2 microglobulina: normal ou elevada ;
- j) DHL: normal ou elevada;
- k) grau de resposta à quimioterapia:
 - resposta completa (RC): redução em 75% no nível sérico da proteína M (e em 90% da urinária) ou completa eliminação do componente M sérico e urinário, associada à ausência de evidências da doença na medula óssea;
 - resposta parcial (RP): redução entre 50 e 75% nos níveis de proteínas;
 - resposta objetiva (RO): redução entre 25 e 50% nos níveis de proteínas;
 - sem resposta (SR): redução menor que 25% nos níveis de proteínas;
- l) status final: óbito ou data do último contato até julho de 2004.

4.3.3. Características histopatológicas e imunohistoquímicas

- a) padrão de infiltração medular tumoral:
 - padrão intersticial: plasmócitos isolados ou em pequenos clusters entre os adipócitos ou células hematopoéticas (figura 11A);
-

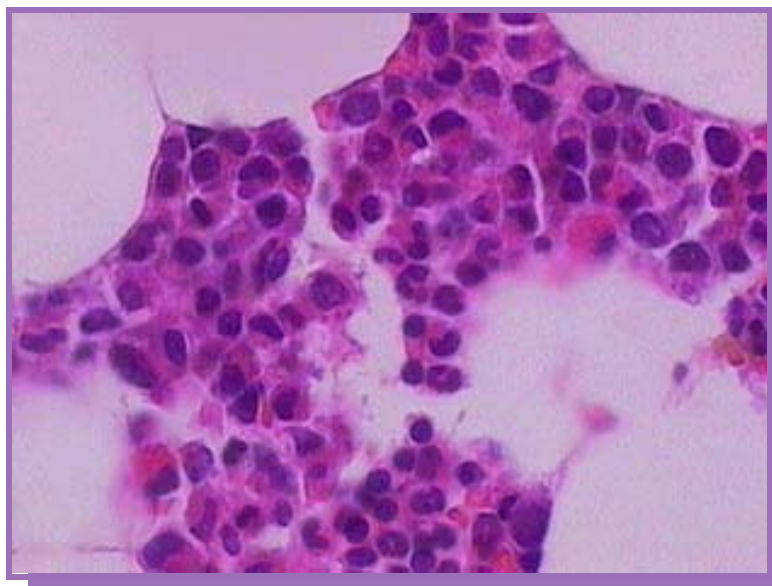


Figura 11A - Padrão intersticial de infiltração medular por plasmócitos tumorais.

- padrão difuso: grandes regiões medulares preenchidas por lençóis confluentes de plasmócitos (figura 11B);

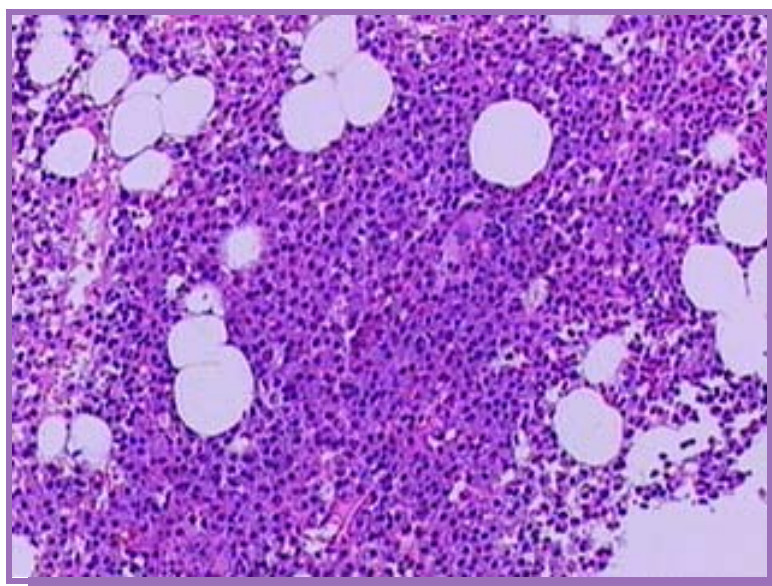


Figura 11B - Padrão difuso de infiltração medular por plasmócitos tumorais

- padrão misto (intersticial e difuso): plasmócitos principalmente com distribuição intersticial, mas com áreas ocasionais de preenchimento difuso focal (figura 11C);

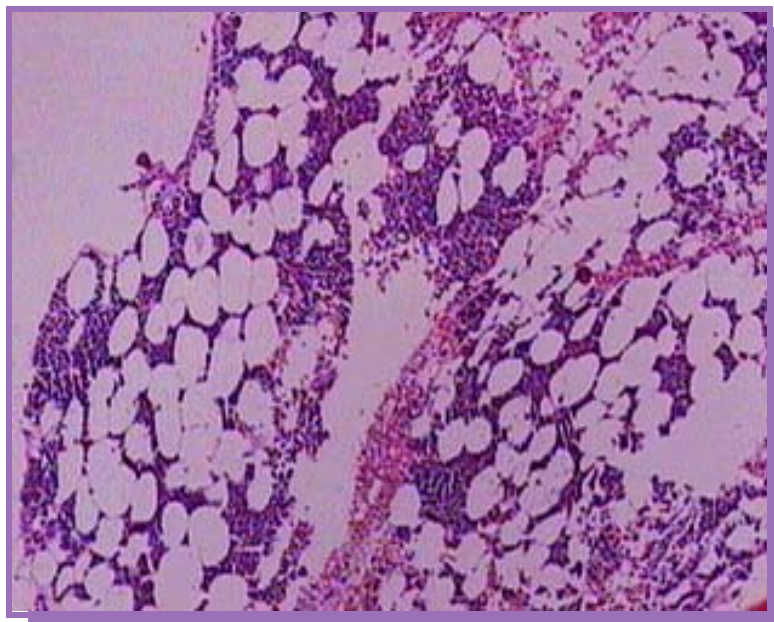


Figura 11C - Padrão difuso de infiltração medular por plasmócitos tumorais.

- padrão de substituição: a maior parte do tecido hematopoético encontra-se substituído por plasmócitos tumorais (figura 11D).

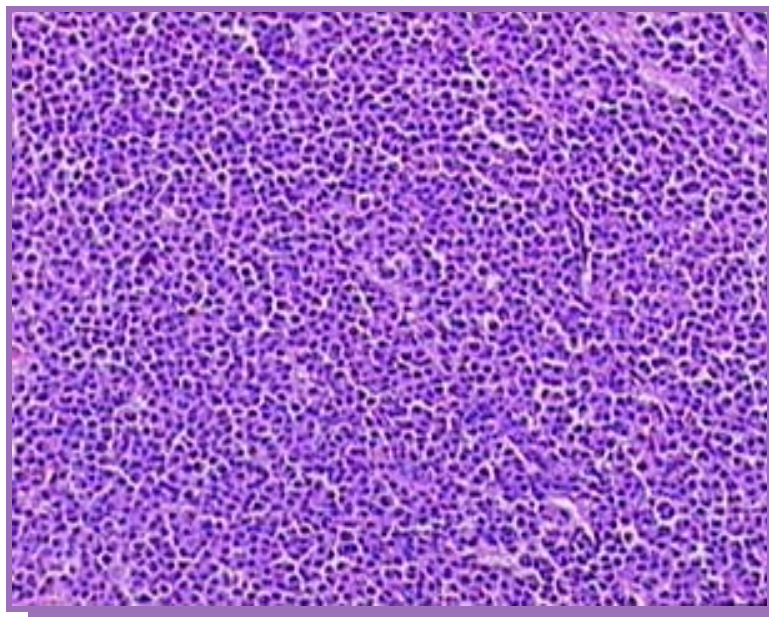


Figura 11D - Padrão de substituição medular por plasmócitos tumorais.

b) expressão de kappa e lambda ao estudo imunohistoquímico: presente ou ausente (figura 12);

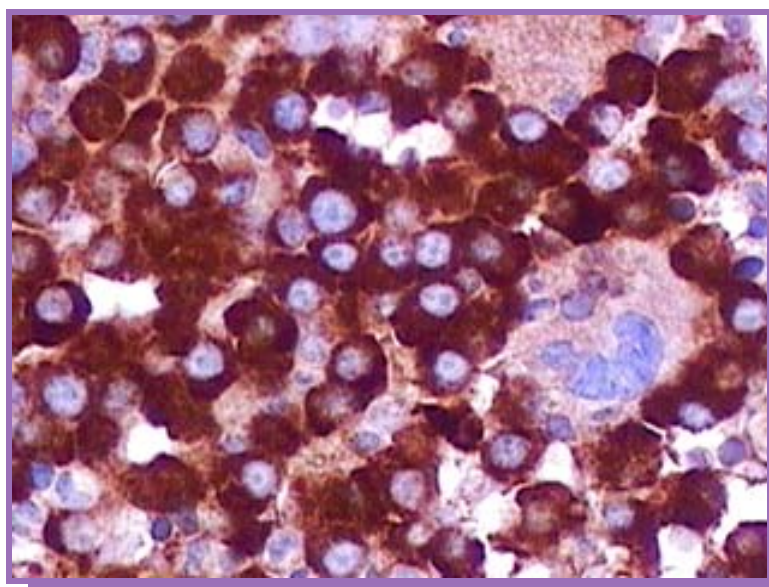


Figura 12- Estudo imunohistoquímico positivo para expressão da cadeia leve kappa por plasmócitos tumorais.

c) padrão da expressão de CD56 na membrana plasmocitária:

- - : ausência de qualquer coloração;
- +: coloração tênue/escassa da membrana plasmocitária, observando-se apenas parcialmente o contorno celular;
- ++: coloração completa de toda a membrana plasmocitária, com padrão delicado ou finamente granular;
- +++: coloração completa de toda a membrana plasmocitária, com padrão forte e bem definido;

d) classificação da expressão de CD56 por plasmócitos tumorais:

- negativo: nenhuma coloração foi observada (figura 13A);
-

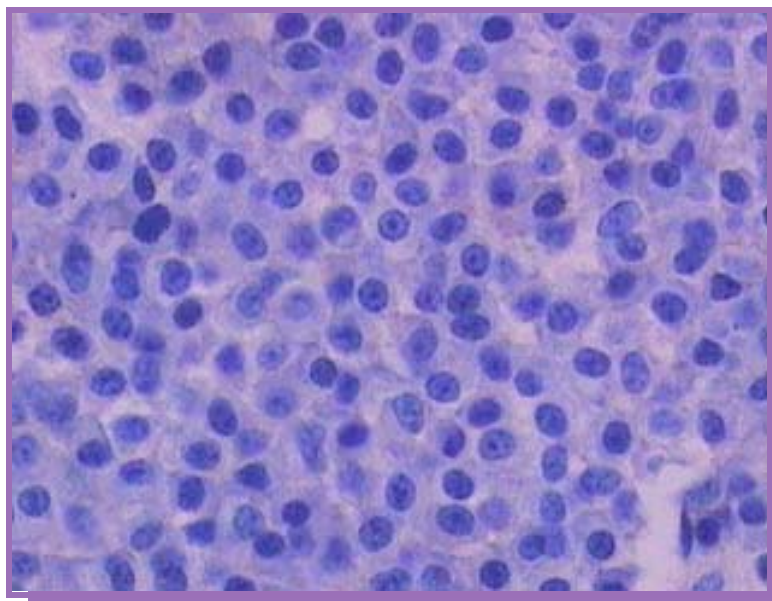


Figura 13A - Ausência de expressão de CD56 por plasmócitos tumorais ao estudo imunohistoquímico.

• discreto: menos de 10% dos plasmócitos foram corados, detectando-se coloração tênue/escassa das membranas (+) (figura 13B);

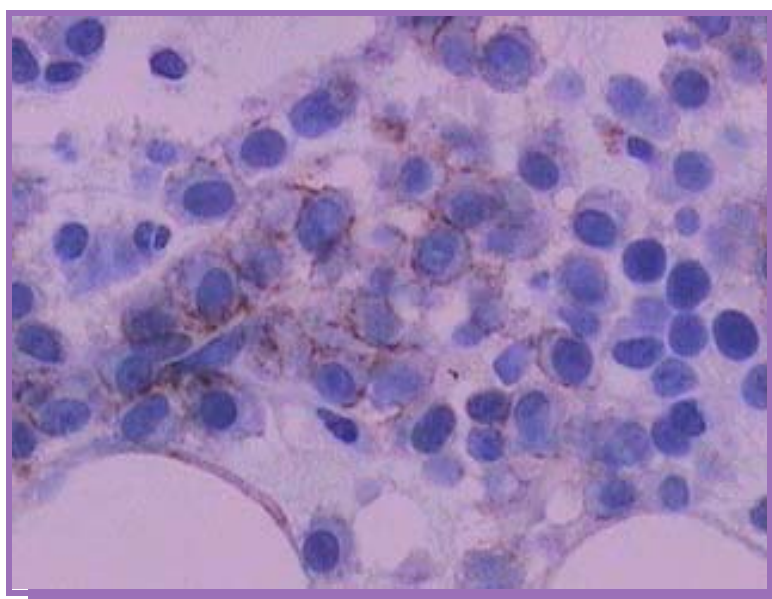


Figura 13B - Expressão discreta de CD56 por plasmócitos tumorais ao estudo imunohistoquímico.

- moderado: mais de 10% dos plasmócitos foram corados, com coloração completa das membranas, de fraca a moderada intensidade (++)(figura 13C);

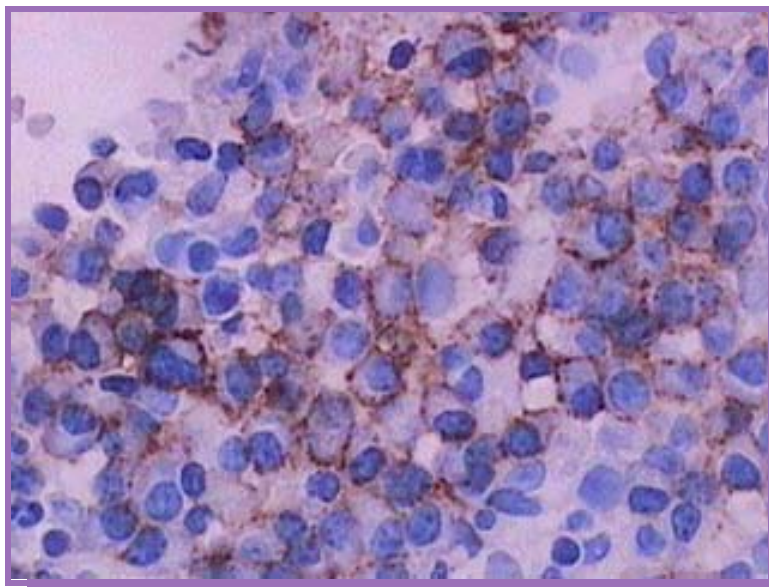


Figura 13C - Expressão moderada de CD56 por plasmócitos tumorais.

- importante: mais de 50% dos plasmócitos foram corados, detectando-se coloração forte e completa das membranas (+++)(figura 13D).

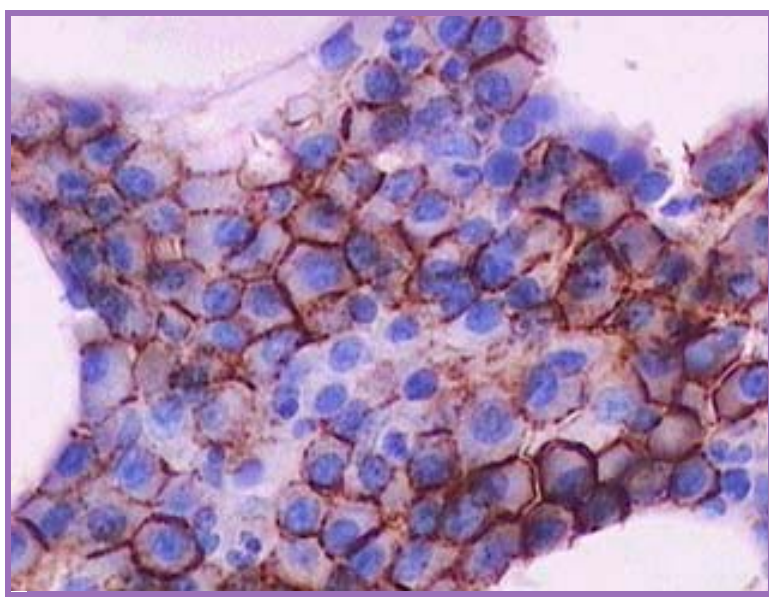


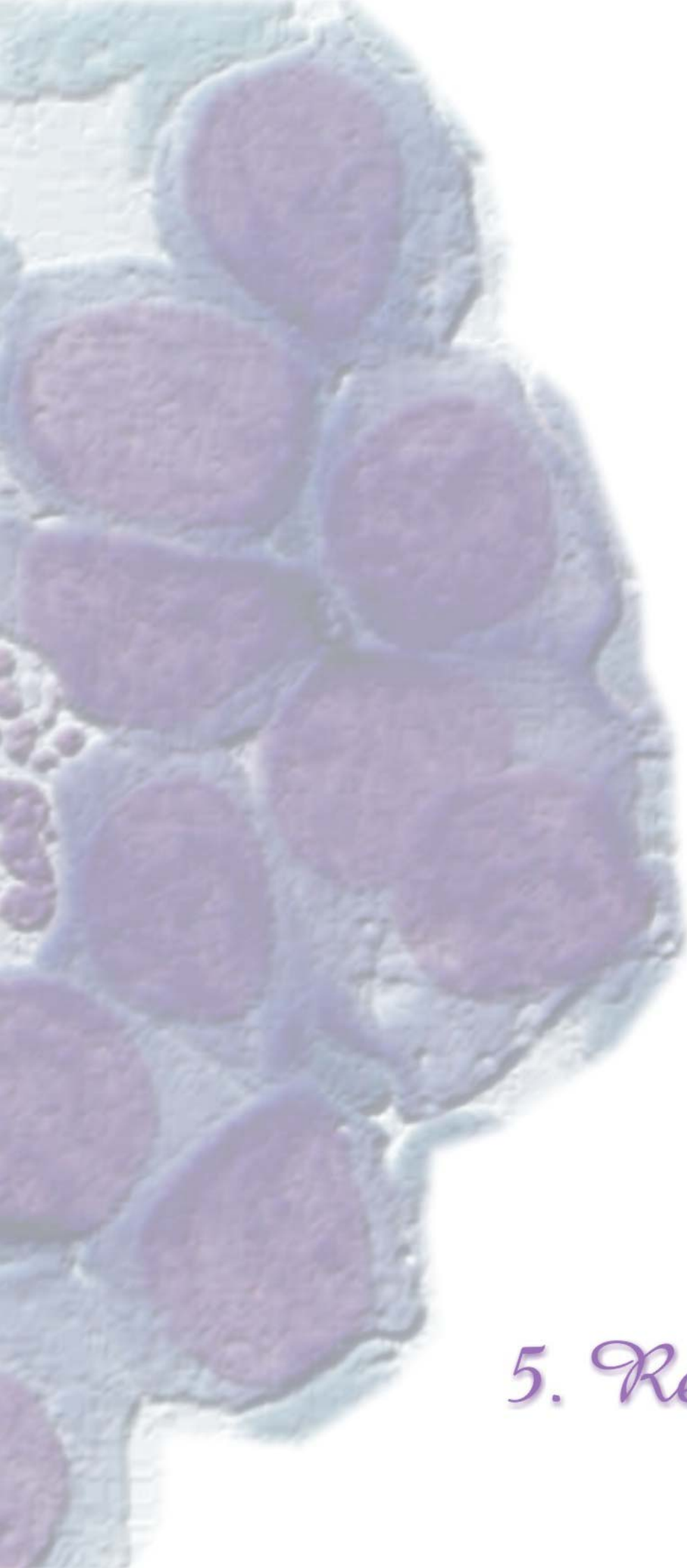
Figura 13D- Expressão importante de CD56 por plasmócitos tumorais.

4.4. Análise estatística

Primeiramente foi realizada a caracterização dos pacientes, utilizando-se as frequências absoluta (n) e relativa (%) e a mediana. A seguir, foi analisada a associação entre a expressão de CD56 (positiva ou negativa) e as características demográficas, clínicas, histopatológicas e imunohistoquímicas, utilizando-se o teste do qui-quadrado e modelos de regressão logística univariado e múltiplo. A medida de risco foi o odds ratio (OR) e o ajuste do modelo final foi avaliado pelo teste de Hosmer-Lemeshow (quanto mais próximo de 1, melhor o ajuste).

Foi então realizada a análise dos fatores prognósticos através do estimador produto-limite de Kaplan-Meier e modelos de riscos proporcionais de Cox (univariado e múltiplo). Para comparar as curvas de probabilidade de sobrevida acumulada, foi utilizado o teste de log rank. Nesta análise, a medida de risco foi a hazard ratio (HR).

Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%.



5. Resultados

4.5. Caracterização da população de estudo

Entre os 97 pacientes incluídos no presente estudo, a maioria (60,8%) era do sexo masculino, e a idade mediana foi de 65 anos (31 a 85 anos). A maioria dos pacientes apresentava lises ósseas ao diagnóstico (89,7%), sendo este o achado clínico mais freqüente. A anemia também foi freqüentemente observada, com níveis de hemoglobina inferiores a 8,5 g/dl em 44,3% dos casos. Cerca de 38% dos pacientes apresentavam elevação dos níveis séricos de creatinina, e em 36,1% observou-se hipercalcemia, embora apenas a minoria apresentasse alterações clinicamente significativas. A presença de proteína monoclonal à eletroforese de proteínas séricas foi detectada em 74,2% dos pacientes. Em 5,6% dos casos, a quantidade de proteínas monoclonais era inferior a 2 g/dl. Em 37,8% a quantidade apresentava-se entre 2,1 e 4 g/dl, em 17,8% entre 4,1 e 6 g/dl e em 18,9% era superior a 6 g/dl. A quantidade total de globulinas séricas também foi avaliada, detectando-se quantidades inferiores a 4 g/dl em 30,4% dos pacientes com resultados disponíveis, 4,1 a 6 g/dl em 34,8 %, 6,1 a 8 g/dl em 19,6 % e superiores a 8 g/dl em 15,2 %. Proteinúria estava presente em 38,1% dos casos (tabela 1).

A dosagem sérica de β_2 microglobulina mostrou-se elevada em 38,1% dos casos, e os níveis séricos de DHL estavam acima

dos parâmetros normais em 18,6%. Não foi possível obter os valores referentes a estas duas variáveis em cerca de metade dos casos estudados (tabela 1).

A maioria absoluta dos pacientes (84,5%) foi classificada como estadio III ao diagnóstico, de acordo com a classificação de Durie e Salmon, encontrando-se apenas um paciente em estadio I (tabela 1). Observou-se a utilização de três alternativas principais de tratamento como primeira linha, nos seis meses seguintes ao diagnóstico. O tradicional MP foi utilizado em 78,4% dos casos. Os esquemas de combinação de drogas, como VBMCP e VAD, e os esquemas de quimioterapia em altas doses com suporte de células-tronco autólogas, somaram 16,5%. Houve ainda uma pequena percentagem de pacientes (5,2%) cujo quadro clínico inicial impediu a instituição de qualquer tratamento específico para a neoplasia, administrando-se apenas cuidados de suporte clínico, como hidratação, antibioticoterapia, suporte transfusional e diálise. A resposta ao tratamento foi completa em 26,8%, objetiva em 11,3%, parcial em 17,5% e ausente em 12,4%. Não foi possível avaliar a resposta ao tratamento quimioterápico em 32% dos pacientes devido a insuficiência de dados ou perda de seguimento.

Tabela 1 - Número e percentagem de pacientes segundo características demográficas, clínicas e laboratoriais.

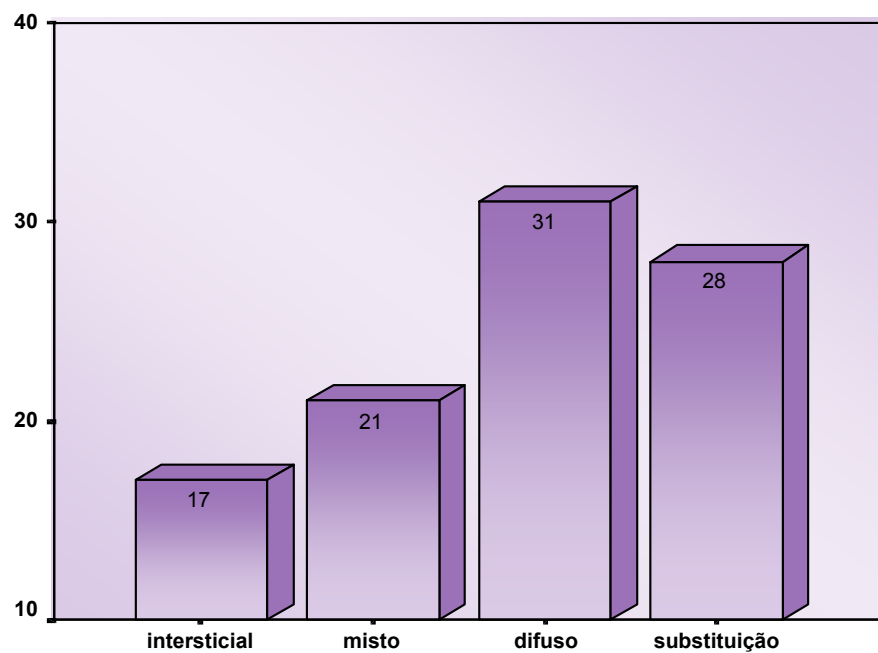
Dados clínicos/laboratoriais	Variáveis	n	%
sexo	masculino	59	60,8
	feminino	38	39,2
idade	< 55 anos	17	17,5
	55 - 75 anos	66	68,0
	> 75 anos	14	14,5
lises ósseas	presentes	87	89,7
	ausentes	09	9,3
	desconhecido	01	1,0
hemoglobina (g/dl)	< 8,5	43	44,3
	8,5 - 10,0	18	18,6
	> 10,0	35	36,1
	desconhecido	01	1,0
creatinina	normal	58	59,8
	elevada	37	38,1
	desconhecido	02	2,1
cálcio	normal	55	56,7
	elevado	35	36,1
	desconhecido	07	7,2
prot. M sérica	presente	72	74,2
	ausente	18	18,6
	desconhecido	07	7,2
prot. M urinária	presente	37	38,1
	ausente	48	49,5
	desconhecido	12	12,4
β_2 microglobulina	normal	07	7,2
	elevada	37	38,1
	desconhecido	53	54,6
DHL	normal	35	36,1
	elevada	18	18,6
	desconhecido	44	45,3
estadio	1	1	1,0
	2	14	14,4
	3	82	84,5
resposta à QT	completa	26	26,8
	objetiva	11	11,3
	parcial	17	17,5
	sem resposta	12	12,4
	desconhecido	31	32,0
Total		97	100,0

n = número de pacientes

prot. M sérica = proteína monoclonal sérica; prot. M urinária = proteína monoclonal urinária

A classificação histológica para padrão de infiltração medular por plasmócitos neoplásicos foi realizada para todos os pacientes incluídos, assim como o estudo imunohistoquímico para expressão de *kappa*, *lambda* e CD56. Observou-se padrão intersticial de infiltração medular em 17,5% dos casos, misto em 21,6%, difuso em 32% e substituição em 28,9% (gráfico 1). Houve discreto predomínio de expressão de *kappa* em relação a *lambda* (tabela 2).

Número de pacientes



Padrão histológico de distribuição dos plasmócitos tumorais

Gráfico 1 - Percentagem de pacientes segundo padrão histológico de distribuição de plasmócitos tumorais na medula óssea.

Tabela 2 - Número e percentagem de pacientes segundo análise histológica e estudo imunohistoquímico para *kappa*, *lambda* e CD56 em amostras de medula óssea de portadores de MM.

Variáveis	Classes	n	%
padrão histológico	intersticial	17	17,5
	misto	21	21,6
	difuso	31	32,0
	substituição	28	28,9
expressão de <i>kappa</i>	positiva	49	50,5
	negativa	47	48,5
	desconhecido	01	1,0
expressão de <i>lambda</i>	positiva	41	42,3
	negativa	55	56,7
	desconhecido	01	1,0
expressão de CD56 (4 padrões)	negativa	51	52,6
	discreta	12	12,4
	moderada	17	17,5
	importante	17	17,5
expressão de CD56 (2 padrões)	negativa	51	52,6
	positiva	46	47,4
Total		97	100

n = número de pacientes

A expressão da molécula de adesão CD56 foi negativa em pouco mais da metade dos casos. Entre os pacientes com expressão positiva da molécula, não houve predomínio absoluto de nenhum dos padrões de expressão determinados (tabela 2 e gráfico 2).

Não foi encontrada associação entre a expressão de CD56 e resposta inicial ao tratamento, embora a maioria dos pacientes que obtiveram resposta completa (61%) fosse CD56 negativa (tabela 3).

número de pacientes

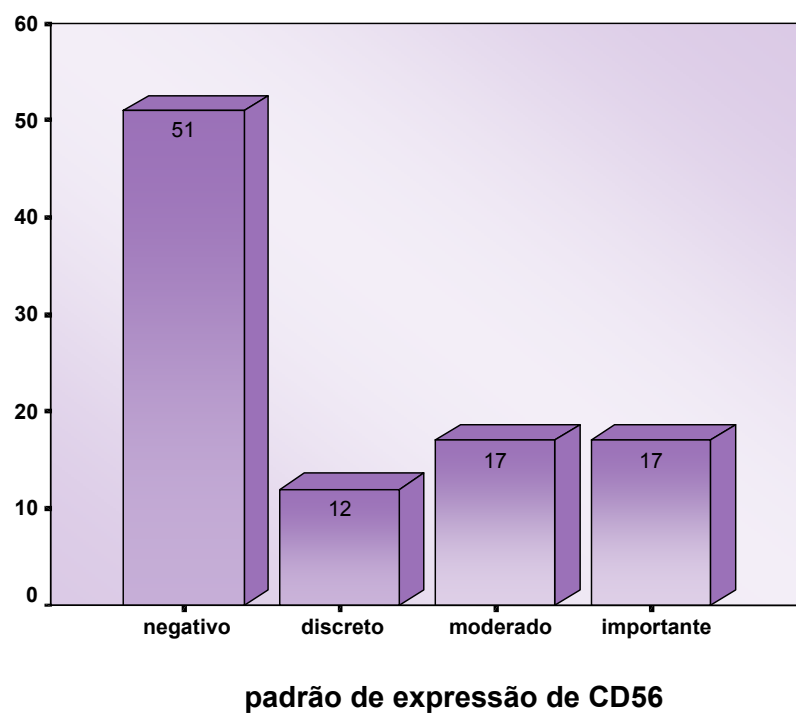


Gráfico 2 - Número de pacientes segundo padrão de expressão de CD56 por plasmócitos tumorais na medula óssea.

Tabela 3 - Número e percentagem de pacientes segundo variáveis clínicas estudadas e expressão de CD56 por plasmócitos tumorais.

Variável	Categoria	Expressão de CD56		Total %	p*
		negativo	positivo		
		n (%)	n (%)		
sexo	masculino	25 (42,4)	34 (57,6)	100	0,012
	feminino	26 (68,4)	12 (31,6)	100	
idade	< 55 anos	09 (52,9)	08 (47,1)	100	0,994
	55 - 75 anos	27 (52,9)	24 (47,1)	100	
	> 75 anos	15 (51,7)	14 (48,3)	100	
lises ósseas	presentes	43 (49,4)	44 (50,6)	100	0,105
	ausentes	07 (77,8)	02 (22,2)	100	
hemoglobina (g/dl)	≥ 10	26 (60,5)	17 (39,5)	100	0,333
	85-10	08 (44,4)	10 (55,6)	100	
	≤ 85	16 (45,7)	19 (54,3)	100	
creatinina ^e	normal	34 (58,6)	24 (41,4)	100	0,086
	elevada	15 (40,5)	22 (59,5)	100	
cálcio	normal	28 (50,9)	27 (49,1)	100	0,962
	elevado	18 (51,4)	17 (48,6)	100	
prot. M sérica ^e	presente	35 (47,3)	39 (52,7)	100	0,058
	ausente	13 (72,2)	05 (27,8)	100	
prot. M urinária ^e	presente	20 (42,6)	17 (44,7)	100	0,840
	ausente	27 (57,4)	21 (55,3)	100	
β ₂ micro-globulina ^e	normal	05 (71,4)	02 (28,6)	100	0,395
	elevada	20 (54,0)	17 (45,9)	100	
DHL ^e	normal	19 (54,3)	16 (45,7)	100	0,206
	elevada	13 (72,2)	05 (27,8)	100	
estadio	I e II	10 (66,7)	05 (33,3)	100	0,183
	III	41 (50,0)	41 (50,0)	100	
resposta à quimioterapia	completa	16 (61,5)	10 (38,5)	100	0,469
	objetiva	04 (36,4)	07 (63,6)	100	
	parcial	09 (52,9)	08 (47,1)	100	
	sem resposta	05 (41,7)	07 (58,3)	100	

n = número de pacientes

prot. M sérica = proteína monoclonal sérica; prot. M urinária = proteína monoclonal urinária

* teste de associação pelo qui-quadrado; $p \leq 0,05$ = significativo

^e excluídos os pacientes com dados não disponíveis

5.2. Associação entre expressão de CD56 e variáveis clínicas e laboratoriais

Houve predomínio de expressão positiva de CD56 entre pacientes do sexo masculino (57,6% X 31,6%; $p=0,012$) (tabela 3). Não foi encontrada associação estatística entre expressão de CD56 e qualquer outra variável clínica ou laboratorial avaliada (tabela 3). Foi observada associação próxima à significância estatística com a presença de proteína monoclonal sérica (52,7% X 27,8%; $p=0,058$) e elevação de creatinina sérica (59,5% X 41,4%; $p=0,086$).

Analisando com maiores detalhes os níveis séricos de proteínas monoclonais (tabela 4), verifica-se associação próxima à significância estatística para diferentes níveis séricos de proteínas monoclonais ($p=0,066$) e para quantidade total de globulinas séricas ($p=0,054$), observando-se menor expressão da molécula quando proteína monoclonal sérica negativa (ou globulinas totais ≤ 4).

Não houve associação significativa entre a expressão de CD56 e o padrão histológico de infiltração medular por plasmócitos tumorais. Houve associação significativa entre expressão de CD56 e expressão de *kappa*, assim como entre a negatividade para CD56 e positividade para *lambda* ($p= 0,050$ e $0,042$, respectivamente) (tabela 5). As tabelas 6 e 7 apresentam os resultados da regressão logística

univariada. Observa-se que os homens (OR=2,94; p=0,013), pacientes com expressão positiva de *kappa* (OR=2,55; p=0,025) e pacientes com expressão negativa de *lambda* (OR=2,68; p=0,021) apresentaram maior probabilidade de expressar CD56 em plasmócitos tumorais.

Tabela 4 - Número e percentagem de pacientes segundo variações dos níveis séricos de proteínas monoclonais e de globulinas totais e expressão de CD56 por plasmócitos tumorais.

Variável	Categoria	Expressão de CD56		Total %	p*
		Negativo	Positivo		
		n (%)	n (%)		
proteína M sérica (g/dl) ^e	negativa	13 (72,2)	05 (27,8)	100	0,066
	≤ 2	02 (40,0)	03 (60,0)	100	
	2,1 – 4	18 (52,9)	16 (47,1)	100	
	4,1 – 6	07 (43,8)	09 (56,3)	100	
	> 6	07 (41,2)	10 (58,8)	100	
globulinas totais (g/dl) ^e	18 (64,3)	10 (35,7)	100	0,054	
	19 (59,4)	13 (40,6)	100		
	06 (33,3)	12 (66,7)	100		
	06 (42,9)	08 (57,1)	100		

n = número de pacientes

* teste de associação pelo qui-quadrado; p ≤ 0,05 = significativo

^e excluídos os pacientes com dados não disponíveis

Tabela 5 - Número e percentagem de pacientes segundo variáveis histopatológicas estudadas e expressão de CD56 por plasmócitos tumorais.

Variável	Categoria	Expressão de CD56		Total	p*
		Negativo	Positivo		
		n (%)	n (%)	%	
histologia	intersticial	12 (70,6)	05 (29,4)	100	0,374
	misto	10 (47,6)	11 (52,4)	100	
	difuso	14 (45,2)	17 (54,8)	100	
	substituição	15 (53,6)	13 (46,4)	100	
kappa	positivo	20 (40,8)	29 (59,2)	100	0,050
	negativo	30 (63,8)	17 (36,2)	100	
lambda	positivo	27 (65,9)	14 (34,1)	100	0,042
	negativo	23 (41,8)	32 (58,2)	100	

n = número de pacientes

* teste de associação pelo qui-quadrado; $p \leq 0,05$ = significativo

^e excluídos os pacientes com dados não disponíveis

Tabela 6 - Resultados da regressão logística univariada dos fatores clínicos e laboratoriais associados à expressão de CD56.

Variáveis	Categorias	Odds ratio	p*
sexo	masculino	2,94	0,013
	feminino	1,00	
idade	< 55 anos	1,00	0,994
	55 – 75 anos	1,00	1,000
	> 75 anos	1,05	0,936
lises ósseas	presentes	3,58	0,124
	ausentes	1,00	
hemoglobina (g/dl)	10,0	1,00	0,336
	8,5 – 10,0	1,91	0,254
	< 8,5	1,81	0,195
creatinina	normal	1,00	0,088
	elevada	2,07	
cálcio	normal	1,02	0,962
	elevado	1,00	
prot. M sérica	presente	2,89	0,065
	ausente	1,00	
prot. M urinária	presente	1,00	0,840
	ausente	0,91	
β2 microglobulina	normal	1,00	0,402
	elevada	2,12	
DHL	normal	2,18	0,211
	elevado	1,00	
estadio	I e II	1,00	0,241
	III	2,00	
resposta à QT	completa	0,44	0,257
	objetiva	1,25	0,795
	parcial	0,63	0,551
	sem resposta	1,00	

prot. M sérica = proteína monoclonal sérica; prot. M urinária = proteína monoclonal urinária

* p ≤ 0,05 = significativo

Tabela 7 - Resultados da regressão logística univariada dos fatores histopatológicos associados à expressão de CD56.

Variáveis	Categorias	Odds ratio	p*
histologia	intersticial	1,00	0,159 0,096 0,263
	misto	2,63	
	difuso	2,91	
	substituição	2,07	
histologia (2 grupos)	< carga (intersticial)	1,00	0,109
	> carga (outros)	2,52	
<i>kappa</i>	positivo	2,55	0,025
	negativo	1,00	
<i>lambda</i>	positivo	1,00	0,021
	negativo	2,68	

* $p \leq 0,05$ = significativo

Analisando-se a associação de cada uma das variáveis clínicas e histopatológicas, ajustadas pela variável sexo (tabela 8), verifica-se que, independentemente do sexo do paciente, houve probabilidade significativamente maior de expressão de CD56 entre pacientes *kappa* positivos (ORaj=2,56; p=0,031), *lambda* negativos (ORaj= 2,40; p=0,047) e/ou presença de proteína monoclonal sérica (ORaj=3,24; p=0,048).

Tomando por base as associações verificadas até este momento, foram estimados dois modelos estatísticos, considerando as interações das variáveis proteína monoclonal sérica, *kappa* e *lambda* (tabela 9). No modelo 1, verifica-se que, independentemente do sexo, o paciente com ausência de proteína monoclonal sérica e *kappa* positivo tem maior probabilidade de expressar CD56 (ORaj=22,56; p=0,025). A presença da proteína monoclonal sérica também aumenta esta chance, independentemente de *kappa* positivo (ORaj=15,13; p=0,015) ou *kappa* negativo (ORaj=10,36; p=0,037). No modelo 2, verifica-se que a ausência de expressão de *lambda* aumenta a possibilidade de expressão de CD56, independentemente da ausência de proteína monoclonal sérica (ORaj=11,86; p=0,062) ou sua presença (ORaj=12,54; p=0,023). Quando é detectada a presença de proteína monoclonal sérica e a expressão de *lambda* é positiva, a probabilidade de expressão de CD56 também aumenta (ORaj=8,69; p=0,057). Os dois modelos iniciais foram corrigidos de acordo com o estadiamento inicial, verificando-se ausência de influência do estadio inicial sobre a expressão da molécula CD56 (tabela 9).

Tabela 8 - Resultados da regressão logística múltipla dos fatores associados à expressão de CD56.

Variáveis	Categorias	Odds ratio ajustada*	Intervalo de confiança	p**
<i>kappa</i>	positivo negativo	2,56 1,00	[1,09;6,02]	0,031
<i>lambda</i>	positivo negativo	1,00 2,40	[1,01;5,71]	0,047
lises ósseas	presentes ausentes	3,16 1,00	[0,60;16,71]	0,174
creatinina	normal elevada	1,00 1,85	[0,78;4,40]	0,163
prot. M sérica	presente ausente	3,24 1,00	[1,01;10,37]	0,048
prot. M urinária	presente ausente	1,00 0,85	[0,34;2,08]	0,728
β_2 microglobulina	normal elevada	1,00 2,11	[0,36;12,32]	0,406
DHL	normal elevada	1,87 1,00	[0,51;6,84]	0,343

prot. M sérica = proteína monoclonal sérica; prot. M urinária = proteína monoclonal urinária

* ajustada pelo sexo

** $p \leq 0,05$ = significativo

Tabela 9 - Modelos estatísticos baseados em interações de variáveis e sua associação com a expressão de CD56 por plasmócitos tumorais em MM.

Modelos	Variáveis	Categorias	Odds ratio ajustada	p*	Hosmer- Lemeshow
1	sexo	masculino	3,14	0,016	0,997
		feminino	1,00		
	PMS/kappa	PMS=aus/k=neg	1,00	0,025 0,037 0,015	
		PMS=aus/k=pos	22,57		
		PMS=pres/k=neg	10,36		
		PMS=pres/k=pos	15,13		
2	sexo	masculino	2,89	0,026	0,991
		feminino	1,00		
	PMS/lambda	PMS=aus/λ=pos	1,00	0,062 0,057 0,023	
		PMS=aus/λ=neg	11,86		
		PMS=pres/λ=pos	8,69		
		PMS=pres/λ=neg	12,54		
3	sexo	masculino	3,04	0,023	0,528
		feminino	1,00		
	PMS/kappa	PMS=aus/k=neg	1,00	0,029 0,038 0,017	
		PMS=aus/k=pos	21,31		
		PMS=pres/k=neg	10,22		
		PMS=pres/k=pos	14,58		
	estadio	I e II	1,00	0,775	
		III	1,21		
4	sexo	masculino	2,78	0,035	0,805
		feminino	1,00		
	PMS/lambda	PMS=aus/λ=pos	1,29	0,770 0,497 0,060	
		PMS=aus/λ=neg	1,00		
		PMS=pres/λ=pos	1,40		
		PMS=pres/λ=neg	0,11		
	estadio	I e II	1,27	0,715	
		III	1,00		

*p ≤ 0,05 = significativo.

5.3. Análise dos fatores prognósticos

Foram verificados 57 óbitos entre os pacientes incluídos no estudo (58,8%), com mediana de sobrevida global de 33,13 meses. A única variável clínica que apresentou significância estatística na avaliação de sobrevida de Kaplan-Meier foi a idade ao diagnóstico, observando-se maior tempo de sobrevida para pacientes com menos de 55 anos de idade ($p=0,011$) (tabelas 10 e 11). Não foram fatores prognósticos significativos aqueles bem estabelecidos, como dosagem sérica de β_2 microglobulina ($p=0,227$). Observou-se curvas de sobrevida discretamente favoráveis para pacientes com padrão misto de infiltração medular plasmocitária e para pacientes com MM CD56 positivos, embora sem significância estatística (gráficos 3 e 4).

A análise univariada pelo modelo de Cox mostrou que houve aumento no risco de óbito para os pacientes entre 55 e 75 anos de idade ($HR=4,60$; $p=0,004$) ou acima de 75 anos ($HR=3,95$; $p=0,014$), com hemoglobina inferior a 8,5 g/dl ($HR=1,91$; $p=0,037$) ou sem resposta à quimioterapia ($HR=2,52$; $p=0,057$). O tipo histológico misto foi um fator protetor quando comparado com o de substituição ($HR=0,31$; $p=0,010$). A expressão de CD56 não foi fator prognóstico em nenhuma das análises (tabela 12).

A idade superior a 75 anos ($HR_{aj}=5,09$; $p=0,030$) foi fator prognóstico significativo, bem como o tipo histológico misto ($HR_{aj}=0,19$; $p=0,018$), independentemente do nível de hemoglobina, resposta à quimioterapia, estadio inicial e expressão de CD56 (tabela 13).

Tabela 10 - Probabilidade de sobrevida em 12, 36 e 60 meses e mediana de sobrevida de pacientes com MM e variáveis clínicas e laboratoriais.

Variáveis	Categorias	Probabilidade de sobrevida (%)			Mediana de sobrevida (meses)	p*
		12 meses	36 meses	60 meses		
sexo	masculino	70	46	26	28,52	0,828
	feminino	70	46	30	33,13	
idade	< 55 anos	100	90	45	52,11	0,011
	55 a 75 anos	62	33	25	18,85	
	> 75 anos	67	40	20	29,41	
estadio	I ou II	80	71	29	33,13	0,646
	III	68	54	28	33,88	
lesões ósseas	presentes	70	45	22	29,41	0,902
	ausentes	64	64	00	39,77	
hemoglobina (g/dl)	> 10,0	77	50	31	45,16	0,148
	8,5 - 10,0	77	56	22	36,25	
	< 8,5	57	35	23	24,05	
creatinina	normal	73	44	23	24,47	0,982
	elevada	64	49	31	33,88	
cálcio	normal	77	51	32	36,25	0,129
	elevado	56	34	20	21,32	
prot. M sérica	presente	71	45	24	33,13	0,462
	ausente	71	49	49	22,86	
prot. M urinária	presente	75	59	47	39,11	0,095
	ausente	74	40	17	24,05	
β_2 microglobulina	normal	85	57	57	...	0,227
	elevada	70	39	19	24,47	
DHL	normal	70	49	22	33,13	0,276
	elevada	76	57	57	...	
resposta à QT	completa	87	63	47	44,28	0,172
	objetiva	80	45	30	28,52	
	parcial	94	68	38	49,11	
	sem resposta	75	37	12	24,05	

prot. M sérica = proteína monoclonal sérica; prot. M urinária = proteína monoclonal urinária

* log rank test; $p \leq 0,05$ = significativo

... = tempo de sobrevida mediano superior a 50 meses

Tabela 11 - Probabilidade de sobrevida em 12, 36 e 60 meses e mediana de sobrevida em portadores de MM e características histológicas e imunohistoquímicas.

Variáveis	Categorias	Probabilidade de sobrevida (%)			Mediana de sobrevida (meses)	p*
		12 meses	36 meses	60 meses		
histologia	intersticial	69	34	26	24,47	0,063
	misto	90	75	46	52,11	
	difuso	73	48	16	33,13	
	substituição	53	29	29	13,39	
histologia (2 categorias)	< carga (intersticial)	69	34	26	24,47	0,784
	> carga (outros)	70	48	28	33,88	
<i>kappa</i>	presente	69	48	31	33,88	0,844
	ausente	73	45	25	29,41	
<i>lambda</i>	presente	74	44	25	29,41	0,937
	ausente	69	47	30	33,88	
CD56 (4 padrões)	negativo	73	46	21	33,13	0,889
	discreto	66	41	31	13,68	
	moderado	64	43	21	33,88	
	importante	70	49	32	24,05	
CD56 (2 padrões)	negativo	73	46	21	33,13	0,600
	positivo	67	45	29	24,47	

* log rank test; $p \leq 0,05$ = significativo

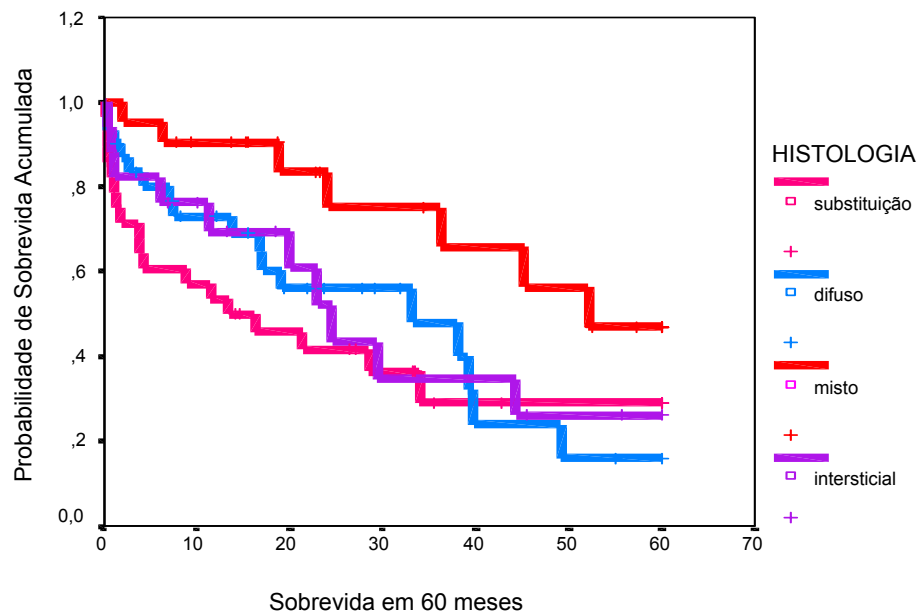


Gráfico 3- Representação gráfica das curvas de sobrevida de pacientes com diagnóstico de MM segundo padrão de infiltração medular tumoral (Kaplan-Meier).

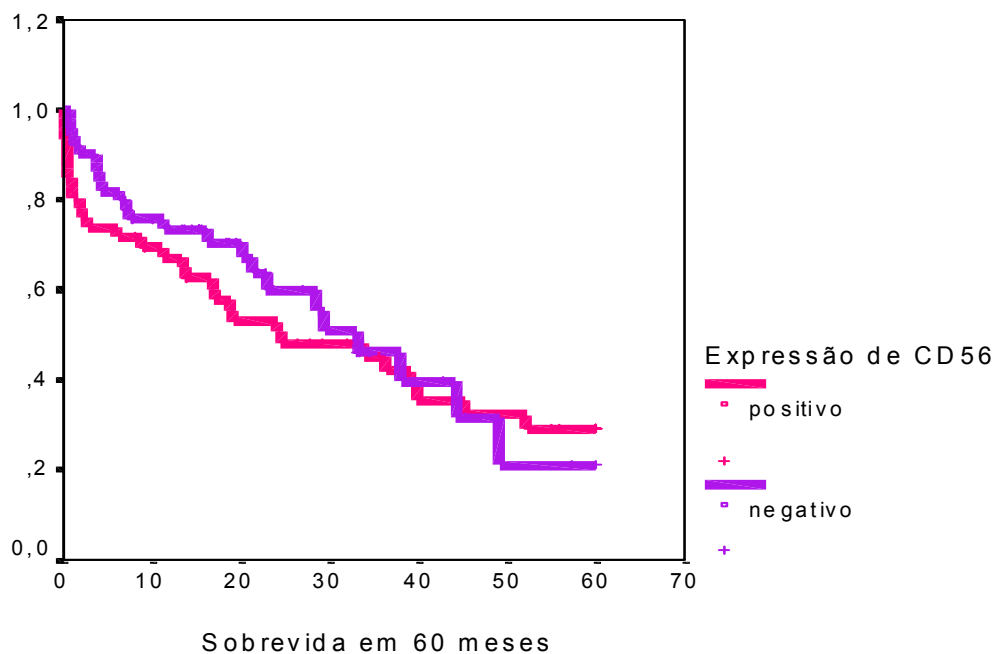


Gráfico 4- Representação gráfica das curvas de sobrevida de pacientes com diagnóstico de MM segundo expressão da molécula CD56 por plasmócitos tumorais na medula óssea (Kaplan-Meier).

Tabela 12- Análise univariada dos fatores prognósticos para pacientes portadores de mieloma múltiplo.

Variáveis	Categorias	Hazard ratio	p*
sexo	masculino	1,06	0,829
	feminino	1,00	
idade	< 55 anos	1,00	0,004 0,014
	55 - 75 anos	4,60	
	> 75 anos	3,95	
lises ósseas	presentes	1,00	0,902
	ausentes	1,06	
estadio	I ou II	1,00	0,647
	III	1,19	
hemoglobina	> 10 g/dl	1,00	0,515 0,037
	8,5 - 10 g/dl	1,29	
	< 8,5 g/dl	1,91	
cálcio	normal	1,00	0,132
	elevado	1,53	
creatinina	normal	0,99	0,982
	elevado	1,00	
prot. M sérica	presente	1,32	0,464
	ausente	1,00	
prot. M urinária	presente	1,00	0,099
	ausente	1,70	
beta 2 microglobulina	normal	1,00	0,242
	elevado	2,40	
DHL	normal	1,72	0,282
	elevado	1,00	
resposta à quimioterapia	completa	1,00	0,194
	objetiva	1,81	0,257
	parcial	1,04	0,926
	sem resposta	2,52	0,057
histologia	intersticial	0,73	0,428
	misto	0,31	0,010
	difuso	0,75	0,396
	substituição	1,00	
kappa	positivo	1,00	0,845
	negativo	1,05	
lambda	positivo	1,02	0,937
	negativo	1,00	
CD56 (4 padrões)	negativo	0,98	0,968
	discreto	1,16	0,744
	moderado	1,28	0,567
	importante	1,00	
CD56 (2 padrões)	negativo	0,86	0,601
	positivo	1,00	

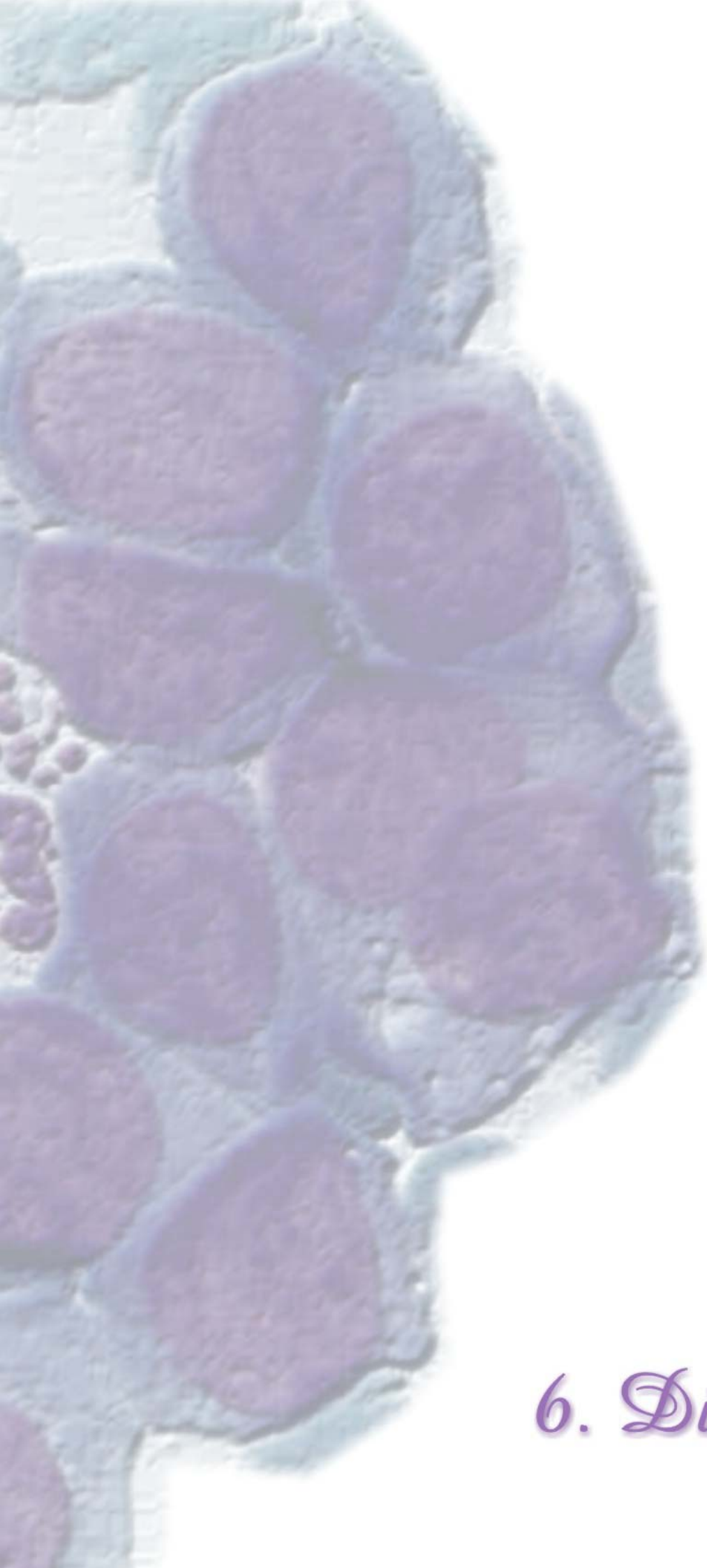
prot. M sérica = proteína monoclonal sérica; prot. M urinária = proteína monoclonal urinária

* análise de riscos proporcionais de Cox; $p \leq 0,05$ = significativo.

Tabela 13 - Análise múltipla dos fatores prognósticos para pacientes portadores de mieloma múltiplo.

Variáveis	Categorias	Hazard ratio ajustada	p*
idade	< 55 anos	1,00	0,089 0,030
	55 - 75 anos	3,25	
	> 75 anos	5,09	
estadio	I ou II	1,00	0,857
	III	0,90	
hemoglobina	> 10 g/dl	1,00	0,331 0,637
	8,5 - 10 g/dl	1,75	
	< 8,5 g/dl	1,27	
resposta à quimioterapia	completa	1,00	0,599 0,924 0,130
	objetiva	1,36	
	parcial	0,95	
	sem resposta	2,14	
histologia	intersticial	0,29	0,106 0,018 0,347
	misto	0,19	
	difuso	0,60	
	substituição	1,00	
CD56 (2 padrões)	negativo	1,00	0,999
	positivo	1,00	

p ≤ 0,05 = significativo



6. Discussão

Estudos fisiopatológicos a respeito das gamopatias monoclonais — especialmente MM — foram alvo de crescente interesse de onco-hematologistas durante os últimos anos. O tênue progresso no prognóstico dos pacientes com os diversos esquemas quimioterápicos, associado ao desenvolvimento expressivo das técnicas diagnósticas (citoquímica, imunohistoquímica, citometria em fluxo, citogenética e biologia molecular), redirecionaram as linhas de pesquisa na área das gamopatias clonais. O esclarecimento dos eventos fisiopatológicos envolvidos, bem como sua relação com os comportamentos clínico e biológico das neoplasias da linhagem linfocitária B, têm adquirido importância devido à possibilidade de terapêuticas mais específicas e, conseqüentemente, melhores resultados para os pacientes.

Apesar das evidências do envolvimento das moléculas de adesão nas várias etapas do desenvolvimento das neoplasias, sua função específica e seu valor como preditor prognóstico permanecem pouco claros. Além disso, a caracterização da população portadora de MM no Brasil, do ponto de vista molecular, tem sido pouco relatada. Considerando a crescente influência que o perfil molecular das neoplasias – e até mesmo o perfil molecular específico de cada paciente – tem exercido sobre as decisões terapêuticas, a não caracterização desta doença, em bases populacionais, pode trazer conseqüências sobre o resultado final da terapêutica instituída. Assim, a caracterização dos pacientes portadores de MM assistidos pelas duas instituições envolvidas

no estudo adquiriu um papel epidemiológico significativo com relação à população brasileira, visto que abrange uma região do Estado de São Paulo cujas instituições são responsáveis pelo atendimento oncológico de cerca de cinco milhões de pessoas. Ambas dedicam-se quase que exclusivamente à assistência a pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS), destacando-se como serviços de referência em tratamento oncológico no interior do Estado de São Paulo. A casuística alcançada neste trabalho (97 pacientes) pode ser considerada representativa da população da região, sendo viabilizada devido à cooperação científica que vem se desenvolvendo entre as duas instituições nos últimos anos.

A idade mediana ao diagnóstico dos pacientes envolvidos no estudo foi de 65 anos. Na literatura, a mediana de idade para MM é bastante semelhante, variando em torno de 59 a 68 anos (102-104). Anemia foi referida em cerca de 80% dos casos, índice superior ao descrito pela literatura: cerca de dois terços dos portadores de MM apresentam anemia (4). No grupo analisado de pacientes, observou-se a presença de lesões esqueléticas radiologicamente identificáveis em quase 90% deles, disfunção renal em 38,1%, e hipercalcemia em 36,1%, índices superiores aos encontrados na literatura (em torno de 50 a 75% para lesões ósseas, 20 a 25% para lesões renais e 30% para hipercalcemia) (24;26; 105). Tais achados, associados à predominância absoluta de pacientes em estágio clínico avançado já ao diagnóstico, sugerem que estes pacientes com MM chegam ao serviço médico

especializado em condições clínicas bem mais desfavoráveis que os descritos pela literatura. Acredita-se que tal fato esteja relacionado com o baixo nível sócio-econômico-cultural dos pacientes assistidos pelas duas instituições envolvidas, levando à demora em procurar assistência médica e à dificuldade para descrever os sintomas, bem como ao atraso na obtenção do diagnóstico. Este fato será corroborado mais adiante pelos dados obtidos para carga tumoral. O diagnóstico da neoplasia, muitas vezes, é feito em fases mais avançadas da doença e, conseqüentemente, as complicações renais, ósseas e de insuficiência de medula óssea, além da hipercalcemia, são encontradas com maior freqüência.

Os níveis séricos de β_2 microglobulina mostraram-se elevados em 84% dos casos em que o exame estava disponível, valor semelhante aos descritos por outros autores (79%) (36). O fato deste dado não estar disponível em cerca de metade dos pacientes deveu-se à inclusão de pacientes cujo diagnóstico foi feito antes dos anos 90s, quando a dosagem de β_2 microglobulina não era realizada rotineiramente na ocasião do diagnóstico. Por este motivo, não utilizamos, no presente estudo, o recentemente descrito estadiamento baseado nas dosagens de albumina e β_2 microglobulina (38). Assim, observou-se que a população incluída no estudo caracteriza-se por pacientes com doença em estágio avançado e com altos índices de complicações renais e ósseas já no momento do diagnóstico, o que certamente agrava o prognóstico destes pacientes e o comportamento biológico da doença neste grupo.

Através do estudo imunohistoquímico, foi possível avaliar minuciosamente a expressão de CD56 pelos plasmócitos, caracterizando sua intensidade e distribuição na superfície celular, e permitindo a identificação de padrões distintos de expressão da molécula. No entanto, não se encontrou resultados significativos que justificassem a classificação dos pacientes de acordo com o padrão de expressão da molécula. Não houve associação de tais padrões a qualquer variável clínica, laboratorial ou histológica. Assim, com o intuito de aumentar o poder estatístico do estudo, optou-se por manter a definição de apenas dois grupos para CD56: negativo e positivo, sendo que este último incluiu expressão discreta, moderada e importante.

A positividade para CD56 em 47,4% dos casos, observada neste estudo, é inferior aos dados obtidos na literatura, os quais variam de 55 a 92% (87-88; 106-109). A maioria dos estudos envolvendo a expressão de CD56 por plasmócitos utilizou o citômetro em fluxo para identificação da molécula, sendo bastante infreqüente a descrição do estudo imunohistoquímico da medula óssea para este objetivo. A técnica de imunohistoquímica é amplamente difundida nos laboratórios de Patologia no Brasil, o que não ocorre com a citometria em fluxo. O estudo imunohistoquímico tem sido preconizado em publicações recentes, exaltando-se seu papel no diagnóstico de neoplasias plasmocitárias (especialmente para expressão de *kappa* e *lambda*), avaliação de doença residual mínima em pacientes com MM após

transplante autólogo de medula óssea (através do padrão de expressão de CD38/CD138/CD56 pós-TMO) e identificação de novos alvos biológicos terapêuticos (106; 109-111). Martín e colaboradores publicaram recentemente um estudo no qual foi avaliada a expressão de CD56 por plasmócitos tumorais em amostras de medula óssea de pacientes com MM, MGUS e plasmocitose reacional, utilizando a técnica de imunohistoquímica para tal (109). Foi detectada positividade para expressão da molécula em 78% dos aspirados de medula óssea dos portadores de MM, e em 92% das biópsias por trepanação destes pacientes, mas o número de pacientes estudados foi pequeno (n=14). O índice inferior de expressão de CD56 observado no presente estudo não parece estar relacionado a problemas técnicos, uma vez que foi utilizado o anticorpo anti-CD56 clone 1B6, específico para materiais biológicos embebidos em parafina, o mesmo descrito no estudo de Martín (109), e com técnica idêntica. Além disso, os casos que mostraram expressão negativa ou discreta foram submetidos a repetição da técnica, obtendo-se sempre os mesmos resultados.

Uma das justificativas para esta discrepância poderia ser atribuída às fases avançadas da doença em que o diagnóstico dos pacientes é realizado. A expressão de CD56 tem sido utilizada como parâmetro para avaliação do estágio de progressão da doença. Em 1995, Zandecki e colaboradores publicaram estudo onde evidenciaram positividade para expressão de CD56 em 55% dos pacientes com MM

(112). Esta percentagem elevava-se para 62% quando apenas pacientes em estadio I eram considerados, sugerindo a perda da expressão da molécula no decorrer da doença. Rasmussen e colaboradores (113) publicaram recentemente um estudo no qual associaram a expressão da molécula a alterações genéticas, especialmente envolvendo o *locus* 14q32, onde se encontram as regiões de mudança de classe da cadeia pesada de Ig. O estudo caracterizou o perfil genético de pacientes portadores de MGUS, MM CD56 positivos, MM CD56 negativos e MM com doença extramedular, considerando, entre outros, a expressão de ciclina D1, C-MYC, C-MAF e ciclina D3 (todos relacionados ao *locus* 14q32). O padrão de expressão genética encontrado nestes subgrupos de pacientes sugeriu a existência de um processo de transformação bem definido entre os plasmócitos, no qual o estágio inicial seria a MGUS, seguida de MMs CD56 positivos, MMs CD56 negativos e, finalmente, MMs com comprometimento extramedular/leucemia plasmocitária. Tais alterações genéticas proporcionariam maior ganho proliferativo aos plasmócitos tumorais e, conseqüentemente, maior agressividade da doença. O perfil genético dos pacientes com MM CD56 positivo foi mais próximo do perfil observado nas MGUS, enquanto os MMs CD56 negativos foram mais semelhantes aos MMs com comprometimento extramedular e leucemias plasmocitárias. Os dados do presente trabalho reforçariam esta hipótese, considerando que os pacientes procuram os serviços de saúde já com carga tumoral avançada. No entanto, foi

verificada ausência de influência do estadiamento inicial sobre a expressão da molécula CD56 através dos modelos estatísticos de interação de variáveis, descritos na tabela 9.

Não se observou qualquer associação entre expressão de CD56 e potencial osteolítico. Os pacientes incluídos neste estudo apresentaram doença inicial avançada, com lises ósseas extensas às radiografias, o que diferencia esta população-alvo dos estudos descritos na literatura, onde já foram observadas evidências de uma possível associação entre negatividade para CD56 e menor potencial osteolítico (94-95). Estes fatos sugerem que, em estádios avançados da doença, onde houve maior capacidade de progressão e destruição do espaço intramedular, outros fatores poderiam ser decisivos na definição do quadro clínico, além da mera associação entre CD56 e osteólise. Esta associação poderia ter sido decisiva no início da doença, onde o panorama apresentado seria de menor carga tumoral e menor índice proliferativo.

O padrão de distribuição das células tumorais na M.O. foi cuidadosamente avaliado. A extensão da infiltração medular no MM foi anteriormente descrita como importante fator prognóstico da doença (43; 114). No entanto, pouco ainda se sabe sobre os fatores que determinam as variações na celularidade medular no MM. Ao classificar a infiltração medular em quatro categorias, observou-se que os padrões cuja carga tumoral era menos expressiva (intersticial e misto) foram menos

freqüentes do que mostra a literatura, representando 39,1% dos casos. Rawstron e colaboradores (92) encontraram estes dois padrões de infiltração em 55,8% de seus pacientes, caracterizando uma população cuja carga tumoral plasmocitária medular era pouco expressiva na maioria dos casos. Tal discrepância poderia ser atribuída, mais uma vez, à fase avançada da doença em que é feito o diagnóstico destes pacientes, em sua maioria de baixa renda e nível sócio-cultural menos favorecido. Este fato é de considerável importância para o estudo, uma vez que não foram encontradas na literatura, até o momento, descrições a respeito do padrão de infiltração medular tumoral no MM para a população brasileira, o que pode influenciar a definição terapêutica destes pacientes. Além disso, Rawstron incluiu entre as amostras estudadas pacientes em recaída da doença, já previamente tratados e que estavam em seguimento clínico rigoroso, permitindo o diagnóstico precoce da recidiva e influenciando seus resultados.

Uma vez postulado que as variações no padrão de infiltração medular plasmocitária poderiam influenciar a compreensão do comportamento biológico da doença, os fatores celulares envolvidos na determinação destas variações tornaram-se alvo de boa parte dos estudos recentes sobre MM. A teoria de que a presença de moléculas de adesão expressas na membrana celular tumoral poderia determinar a formação de nódulos de plasmócitos tumorais na M.O. e, conseqüentemente, definir o padrão de infiltração medular baseou, neste

estudo, a busca pela associação entre a expressão da CD56 e os diferentes padrões de infiltração tumoral por MM.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na expressão da molécula com relação ao padrão histológico de infiltração medular tumoral. Os resultados aqui verificados discordam do estudo de Rawstron e colaboradores (92), publicado em 1999, onde foi observada correlação inversa entre expressão de CD56 e padrão de infiltração medular. Rawstron comparou pacientes com infiltração tipo substituição (n=09) com pacientes com padrão intersticial (n=10), encontrando níveis de expressão de CD56 significativamente inferiores no grupo de pacientes com substituição medular por plasmócitos tumorais. Como a amostra do presente estudo comportou 97 pacientes, esta diferença entre as duas séries poderia ser atribuída à amostragem. Não se encontrou, na literatura, outros estudos comparando o padrão de infiltração medular por MM e a expressão da molécula CD56, mas os dados aqui obtidos permitem a afirmação de que não existe associação entre estes dois parâmetros. No entanto, observou-se que a imunohistologia permite avaliação mais confiável da infiltração tumoral medular do que a utilização isolada da histologia, reduzindo a possibilidade de subestimativa da carga tumoral, especialmente em amostras subótimas de medula óssea. O estudo imunohistoquímico destaca plasmócitos tumorais dispersos ou pequenos agrupamentos

plasmocitários, que poderiam não ser detectados à avaliação histológica isolada.

O estudo imunohistoquímico para cadeias leves de imunoglobulinas mostrou-se útil em dois aspectos do estudo. Sua identificação auxiliou de forma significativa a avaliação da infiltração medular tumoral, especialmente nos casos em que a carga plasmocitária medular era pequena, facilitando a visualização do volume tumoral e seu padrão de infiltração. Tal procedimento foi anteriormente descrito por Pileri et al (115), onde o estudo imunohistoquímico para *kappa* e *lambda* mostrou-se capaz de evitar a subestimativa da contagem de plasmócitos tumorais na medula óssea, que poderia resultar em erros diagnósticos em até 30% dos casos.

O estudo imunohistoquímico das cadeias leves demonstrou ainda a associação entre a expressão de *kappa* e *lambda* e a expressão de CD56. As neoplasias *kappa* positivas mostraram-se CD56 também positivas e, entre os casos *lambda* positivos, a expressão da molécula CD56 foi pequena. Os genes para a produção das cadeias leves localizam-se nos cromossomos 2 (*kappa*) e 22 (*lambda*) (116), enquanto os genes responsáveis pela expressão de CD56 encontram-se no cromossomo 11 (117), descartando a possibilidade de mutação genética como causa da associação. Apesar disso, este dado pode ser útil para a compreensão da fisiopatologia da doença. A forte associação entre expressão de CD56 e *kappa* poderia sugerir que a expressão da molécula

(ou sua ausência) seria imutável, uma vez que o isotipo de cadeia leve não varia durante o curso da doença. Rawstron e colaboradores (92), em 1999, verificaram um padrão constante de expressão da molécula através de sua análise em amostras seqüenciais de M.O. em 37 pacientes em tratamento, com intervalos de tempo de 6 a 25 meses entre as amostras (mediana 11 meses), o que reforça esta possibilidade. Entretanto, vários autores acreditam que há perda da expressão de CD56 com o avançar da doença (94-95; 98). É possível que os pacientes *kappa* positivos exerçam uma influência negativa sobre o mecanismo de perda da expressão de CD56 durante a evolução da doença, funcionando como um freio para sua progressão e evitando a migração de células tumorais para outros órgãos. Tal influência negativa seria capaz de bloquear a perda da molécula apenas por um determinado período de tempo, após o qual não seria mais suficiente para conter a expansão tumoral. Os dados obtidos não permitem fazer tal afirmação, uma vez que não foram feitas análises seqüenciais, mas sugerem que os processos envolvidos nesta associação *kappa*-CD56 devam ser mais profundamente estudados.

A condição de expressão de CD56 ao momento do diagnóstico, como se nos apresentou o grupo de 46 pacientes, parece estar associada à maior quantidade de Ig monoclonal sérica (tabela 4). Do mesmo modo, a não-expressão da molécula ao diagnóstico, seja ela a condição original do plasmócito tumoral no MM “de novo”, ou seja ela uma modificação ocorrida no curso evolutivo da doença, esteve associada à

menor síntese protéica monoclonal. Este fato poderia se somar à idéia conceitual de que a célula plasmocitária tumoral é tanto mais capaz de sintetizar uma proteína tão específica quanto a Ig, quanto mais diferenciada é esta célula, ou seja, maior expressão de CD56 nesta população. Assim também, o corolário seria de que uma célula plasmocitária tumoral menos diferenciada seria menos capaz de sintetizar Igs e menor expressão de CD56.

A idade ao diagnóstico mostrou-se capaz de influenciar o prognóstico dos pacientes com MM ($p < 0,05$), e já foi anteriormente descrita como importante fator prognóstico nesta doença. A dosagem sérica elevada de β_2 microglobulina mostrou uma tendência a sobrevida mais curta (embora não tenha atingido significância estatística), o que também é descrito pela literatura (32; 34). A ausência de significância pode estar associada ao número de casos estudados para esta variável ($n=44$).

A análise da relação entre o padrão histológico de infiltração medular plasmocitária e a probabilidade de sobrevida em 60 meses mostrou uma curva de sobrevida para esta variável com tendência a melhor prognóstico no grupo em que a carga tumoral foi menor (intersticial/misto). O mesmo ocorreu ao observar-se a curva de sobrevida para a expressão da CD56, havendo uma tendência a maior tempo de sobrevida para os pacientes em que a expressão da molécula foi mais importante. Na literatura, os dados a respeito da expressão de moléculas

de adesão como fator prognóstico são controversos. Omede et al (91), em 1993, sugeriram que a imunofenotipagem dos plasmócitos tumorais, no MM, poderia estar relacionada com a sobrevida, identificando um subgrupo de pacientes no qual a molécula CD56 não foi expressa ou apresentou expressão discreta à citometria em fluxo. Este subgrupo apresentou outros fatores de mau prognóstico com maior frequência, sugerindo uma evolução clínica menos favorável. Mathew et al (107), em 1995, estudaram a expressão da molécula CD56 à citometria em fluxo em 68 pacientes portadores de MM, não sendo verificado valor prognóstico ou diferenças no comportamento biológico relacionados à molécula. Em 1997, Rawstron et al relataram a influência da expressão de CD56 à citometria em fluxo sobre o comportamento clínico do MM (98). Neste estudo, o subgrupo CD56 positivo era favorecido. No entanto, em 1999, os mesmos autores não encontraram correlação entre expressão de CD56 e tempo de sobrevida. Apesar disso, a forte correlação entre baixa expressão da molécula e infiltração tumoral medular expressiva, sugerindo impacto da CD56 sobre o comportamento biológico da neoplasia, levou os autores a atribuírem o fato ao número limitado de pacientes envolvidos no estudo (92). Apesar das evidências de que a perda da molécula esteja associada a maior número de plasmócitos tumorais circulantes em sangue periférico e maior carga tumoral na M.O., nenhum dos estudos descritos conseguiu correlacionar a expressão de CD56 ao prognóstico dos pacientes, tendo atribuído este fato ao número

limitado de pacientes estudados. Recentemente, Sahara e colaboradores descreveram um estudo interessante, no qual foi avaliada a expressão de CD56 por plasmócitos tumorais em 70 pacientes com diagnóstico de MM através de citometria em fluxo, utilizando-se amostras frescas de M.O. (118). Os autores encontraram diferença significativa no tempo de sobrevida para os dois grupos, com benefício para os MMs CD56 positivos. No entanto, à análise multivariada, não puderam determinar valor prognóstico da expressão da molécula, provavelmente devido à forte correlação entre ausência de expressão de CD56 e presença de doença extramedular. O presente estudo permite definir a ausência de valor prognóstico independente para a expressão da molécula de adesão CD56 na população de pacientes com MM analisada.

Os dados sugerem que a expressão da molécula CD56 representa uma das características de um subgrupo distinto de MM, no qual há predomínio da expressão da cadeia leve *kappa*, os níveis de hemoglobina ao diagnóstico são mais baixos (inferiores a 10 g/dl em 63% dos casos, contra 48% no subgrupo com baixa expressão de CD56), e no qual há uma tendência a maior tempo de sobrevida. Acredita-se que a perda de CD56 está relacionada à leucemização plasmocitária e menor comprometimento ósseo, caracterizando um subgrupo com comportamento mais agressivo, com maior probabilidade de desenvolvimento de doença extramedular, e que poderia influenciar negativamente a sobrevida dos pacientes (91; 93-94). Os dados aqui

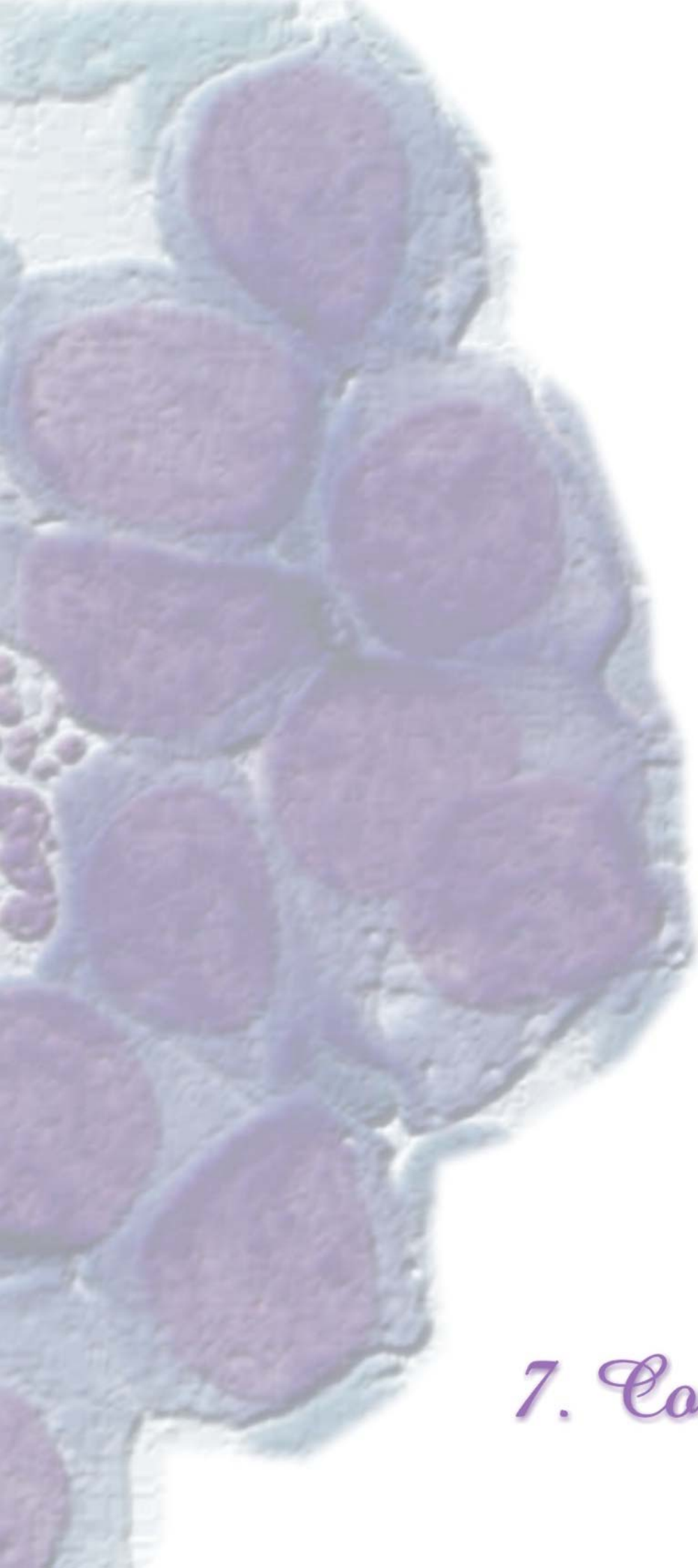
obtidos vêm corroborar estes resultados, caracterizando o subgrupo de pacientes complementar ao anteriormente descrito. Até o momento, não foi observada diferença significativa no prognóstico de pacientes de subgrupos distintos.

A avaliação crítica dos padrões de expressão genética dos diferentes subgrupos poderia auxiliar de forma significativa a compreensão da progressão tumoral e eventos relacionados. Hedvat e colaboradores estudaram o padrão de expressão de genes envolvidos no crescimento e expansão tumorais de plasmócitos de MM, leucemia plasmocitária e plasmocitomas extramedulares, observando diferenças significativas entre os grupos estudados (119). Os plasmócitos provenientes de plasmocitomas extramedulares apresentaram expressão significativamente reduzida de vários genes envolvidos na angiogênese e adesão celular. Seus achados reforçam a hipótese de que o comportamento biológico tumoral está intimamente associado à relação da célula tumoral com seu microambiente. Progressos recentes na avaliação do perfil genético envolvido no MM poderiam contribuir para a compreensão destes mecanismos. Uma análise de grandes séries de pacientes, realizada por Magrangeas e colaboradores, permitiu o esclarecimento do papel individual de algumas anormalidades cromossômicas, definindo dois tipos de MM (120). O primeiro grupo é caracterizado pela aquisição de múltiplos cromossomos específicos, baixa incidência de anormalidades no cromossomo 13 e baixa incidência de

translocações 14q32 recorrentes (121). Este grupo apresentaria sobrevida mais prolongada. O segundo tipo de MM é caracterizado pelo acúmulo de múltiplas quebras cromossômicas, pseudo ou hipodiploidia, alta incidência de perda do cromossomo 13 e alta incidência de translocações 14q32 recorrentes, especialmente t(11,14) e t(4,14). Tais diferenças genéticas poderiam estar de algum modo envolvidas com a expressão ou não da molécula CD56, uma vez que o cromossomo 11 contém os genes responsáveis por sua expressão. No entanto, este tipo de associação necessitaria ser mais profundamente estudada para que fosse definitivamente estabelecida.

As controvérsias em torno do valor prognóstico conferido a moléculas de adesão e seu nível de expressão pelas células neoplásicas talvez indiquem que o principal aspecto relacionado a estas moléculas não seja seu impacto no prognóstico dos pacientes, e sim seu papel biológico em fases específicas da evolução da doença. A utilização clínica da identificação da molécula CD56 poderia estar mais relacionada à escolha da terapêutica mais adequada em determinado momento que à definição pontual do prognóstico do paciente. Assim, num segundo momento, as abordagens terapêuticas mais adequadas, baseadas na avaliação conjunta da apresentação clínica, características histológicas, perfil de expressão molecular e perfil genético, poderiam resultar em ganho de sobrevida e qualidade de vida.

Enfim, a combinação única de informações anatômicas, antigênicas, funcionais e moleculares fornecidas pela imunohistologia é potencialmente uma das principais colaboradoras na investigação e abordagem clínica dos portadores de MM. A abordagem terapêutica individualizada, determinada pelas características biológicas específicas de cada paciente, tem sido a meta de pesquisadores em praticamente todas as áreas relacionadas à Hematologia e Oncologia Clínica (122), com resultados promissores em várias neoplasias. No caso específico dos portadores de MM, há fortes indícios de que existem estados diversos dentro da mesma doença, proporcionando a esperança de melhores resultados num futuro bastante próximo.



7. Conclusões

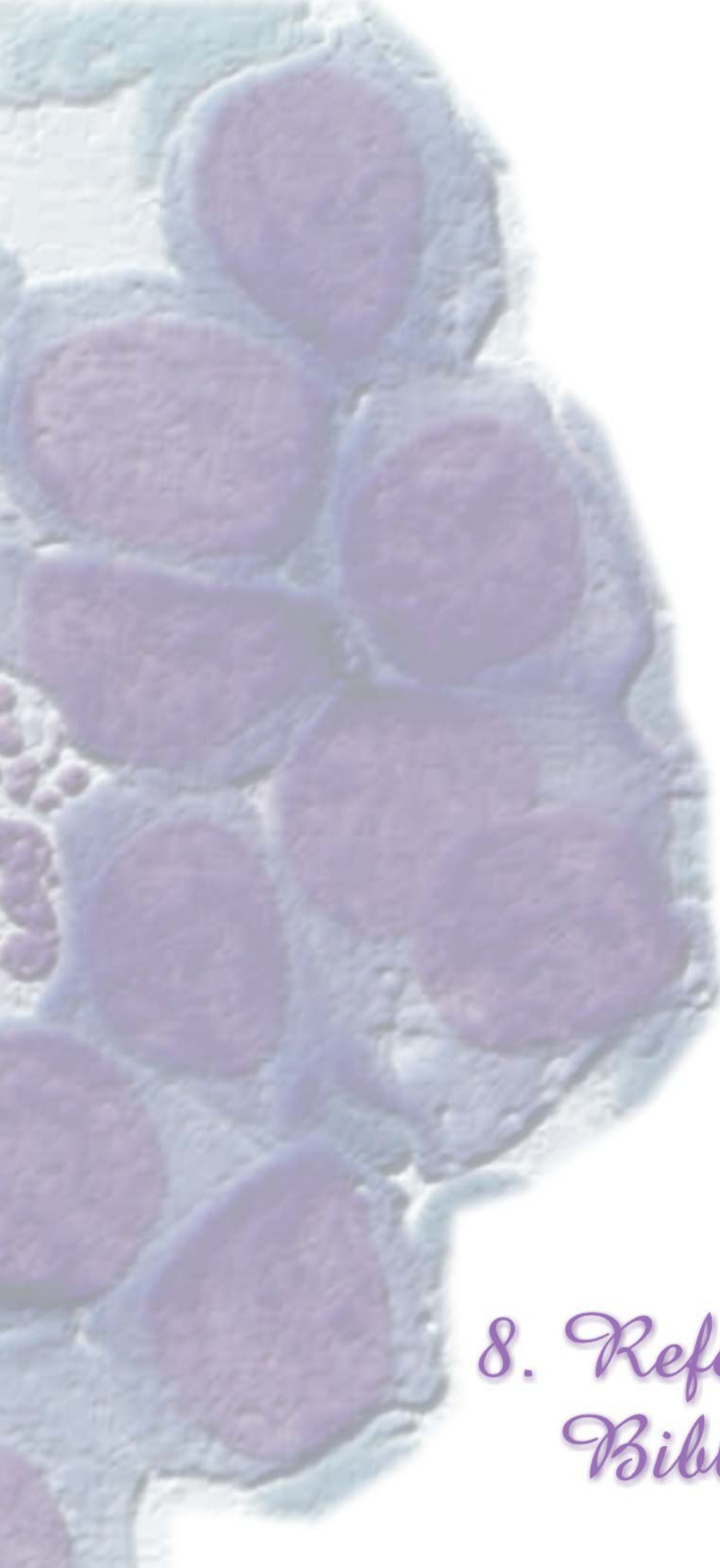
O presente estudo foi capaz de caracterizar, em termos clínicos, laboratoriais e moleculares, a população brasileira proveniente da região Centro-Oeste paulista, identificando-se características interessantes, como a grande incidência de anemia importante e extenso comprometimento ósseo já ao diagnóstico, configurando estadio inicial avançado. A difusão de informações a respeito do MM na comunidade médica, especialmente no nível básico de saúde, e na população, poderia contribuir para o diagnóstico mais precoce da doença.

O padrão de infiltração medular por plasmócitos tumorais foi predominantemente de padrões de carga tumoral mais expressiva, configurando a extensão da doença nesta população.

Há correlação estatisticamente significativa entre a expressão de CD56 e as variáveis sexo, expressão de cadeias leves de imunoglobulina tipo *kappa* e presença de proteína monoclonal sérica, assim como a negatividade para CD56 associa-se à expressão de *lambda*. Tais achados não demonstraram exercer influência sobre o prognóstico dos pacientes.

O principal fator prognóstico nesta população revelou-se associado à idade ao diagnóstico. A expressão de CD56 não se mostrou como variável de valor prognóstico nesta população de pacientes, embora esteja provavelmente envolvida no processo fisiopatológico da doença. A identificação de sua presença mostrou-se mais útil com finalidade

diagnóstica e para avaliação global do comportamento clínico da neoplasia, especialmente se interpretada em associação com características clínicas, laboratoriais, histopatológicas e imunohistoquímicas.



8. Referências Bibliográficas

1. Solly S. Remarks on the pathology of mollities ossium with cases. Medical and Chirurgical Transactions of London 1844; 27: 435-61.
 2. Kyle RA. History of multiple myeloma. In: Gahrton G, Durie BGM, editores. Multiple Myeloma. 1st ed. London: Arnold; 1996. P. 1-11.
 3. Kyle RA. Multiple myeloma: an odyssey of discovery. British Journal of Haematology 2000; 111: 1035-44.
 4. Kyle RA. Multiple myeloma and other plasma cell disorders. In: Hoffman R, Benz Jr. EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, editores. Hematology: basic principles and practice. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1995. P. 1354-74.
 5. Macyntire W. Case of mollities and fragilitas ossium, accompanied with urine strongly charged with animal matter. Medical and Chirurgical Transactions of London 1850; 33: 211-32.
 6. Dalrymple J. On the microscopical character of mollities ossium. Dublin Quarterly Journal of Medical Science 1846; 2: 85-95.
 7. Von Rutzinski J. Multiples myelom. Deutsche Zeitschrift für Chirurgie 1873; 3: 162-72.
-

8. Marschalkó T. Ueber die sogenannten plasmazellen, ein beitrag zur kenntniss der herkunft der entzündlichen infiltrationszellen. Archives of Dermatology and Syphilology 1895; 30: 241.
 9. Wright JH. A case of multiple myeloma. Transactions of the Association of American Physicians 1900; 15: 137-47.
 10. Weber FP, Hutchinson R, Macleod JJR. Multiple myeloma (myelomatosis), with Bence-Jones protein in the urine: myelopathic, albumosuria of Bradshaw, Kahler's disease. American Journal of Medical Science 1903; 126: 644-65.
 11. Arinkin MI. Die intravitale untersuchungsmethodik des knochenmarks. Folia Haematologie 1929; 38: 233-40.
 12. Bence-Jones H. Chemical Pathology. Lancet 1847; 2: 88-92.
 13. Bayne-Jones S, Wilson DW. Immunological reactions of Bence-Jones proteins. II. Differences between Bence-Jones proteins from various sources. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital 1922; 33: 119-25.
 14. Korngold L, Lipari R. Multiple-myeloma proteins. III. The antigenic relationship of Bence-Jones proteins to normal gammaglobulin and multiple-myeloma serum proteins. Cancer 1956; 9: 262-72.
-

15. Putnam FW, Hardy S. Proteins in multiple myeloma. III. Origin of Bence-Jones protein. *Journal of Biological Chemistry* 1955; 212: 361-69.
 16. Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Transactions of the Faraday Society* 1937; 33: 524.
 17. Blokhin N, Larionov L, Perevodchikova N, Chebotareva L, Merkulova N. Clinical experiences with sarcolysin in neoplastic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1958; 68: 1128-32.
 18. Myeloma Trialists' Collaborative Group. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6633 patients from 27 randomized trials. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16: 3832-42.
 19. Osserman ED, Dire LB, Sherman WH, et al. Identical twin marrow transplantation in multiple myeloma. *Acta Hematologica* 1982; 68: 215-23.
 20. Anderson KC. Multiple myeloma: how far have we come? *Mayo Clinic Proceedings* 2003; 78: 15-7.
 21. Grogan TM, Spier CM. B-cell immunoproliferative disorders, including multiple myeloma and amyloidosis. In: Knowles DA, editor. *Neoplastic Hematopathology*. Philadelphia: Lipinkott Williams & Wilkins; 2001. P. 1557-87.
-

22. Riedel DA, Pottern LM. The epidemiology of multiple myeloma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1992; 6 (2): 225-47.
 23. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proceedings* 2003; 78: 21-33.
 24. Österborg A, Mellstedt H. Clinical features and staging. In: Gahrton G, Durie BGM, editores. *Multiple myeloma*. 1st ed. London: Arnold; 1996. P. 98-107.
 25. Clark AD, Shetty A, Soutar R. Renal failure and multiple myeloma: pathogenesis and treatment of renal failure and management of underlying myeloma. *Blood Reviews* 1999; 13: 79-90.
 26. Kyle RA. Multiple myeloma : an update on diagnosis and management. *Acta Oncologica* 1990; 29 (1): 1-8.
 27. Kyle RA. Diagnostic criteria of multiple myeloma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1992; 6(2): 347-358.
 28. Winfield DA. Multiple myeloma. *British Journal of Hospital Medicine* 1992; 47 (1): 30-7.
-

29. Boccadoro M, Pileri A. Diagnosis, prognosis, and standard treatment of multiple myeloma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1997; 11 (1): 111-31.
 30. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology* 2003; 121: 749-57.
 31. Durie BGM, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975; 36: 842-54.
 32. Gassman W, Pralle H, Haferlach T, et al. Staging systems for multiple myeloma: a comparison. *British Journal of Haematology* 1985; 59: 703-711.
 33. Joshua D, Gibson J, Brown R. Myeloma: biology, prognosis and treatment. *Hematology Reviews* 1996; 9: 227-49.
 34. Haferlach T, Loffler H. Prognostic factors in multiple myeloma: practicability for clinical practice and future perspectives. *Leukemia* 1997; 11 Suppl 5: S5 - S9.
-

35. Sati HIA, Greaves M, Apperley JF, Russell RGG, Croucher PJ. Expression of interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α in plasma cells from patients with multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 1999; 104: 350-57.
36. Greipp PR, Lust JA, O'Fallon WM, Katzmann JA, Witzig TE, Kyle RA. Plasma cell labeling index and β_2 microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood* 1993; 81 (12): 3382-87.
37. Durie BGM. The importance of knowing the potential outcome: role for the new International Prognostic Index (IPI). *Myeloma Today* 2002; 4 (10): 1.
38. International Staging System for Multiple Myeloma (epub ahead of print). *Journal of Clinical Oncology* 2005; 4: S0732-183X.
39. Shaugnessy Jr J, Tian E, Sawyer J, McCoy J, et al. Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescence *in situ* hybridization-defined chromosome 13 deletion in multiple myeloma: early results of total therapy II. *British Journal of Haematology* 2003; 120: 44-52.
40. Kauffmann H, Krömer E, Nösslinger T, et al. Both chromosome 13 abnormalities by metaphase cytogenetics and deletion of 13q by interphase FISH only are prognostically relevant in multiple myeloma. *European Journal of Haematology* 2003; 71: 179-83.

41. Shaughnessy J, Jacobson J, Sawyer J, et al. Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities, especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy I: interpretation in the context of global gene expression. *Blood* 2003; 101 (10): 3849-56.
 42. Niéro-Melo L. Aspectos fisiopatológicos das gamopatias monoclonais - mieloma múltiplo: doença crítica e doença blástica [dissertação]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 1991.
 43. Bartl R, Frisch B. Clinical significance of bone marrow biopsy and plasma cell morphology in MM and MGUS. *Pathologie Biologie* 1999; 47 (2): 158-68.
 44. Murakami H. A staging system for multiple myeloma based on the morphology of myeloma cells. *European Journal of Haematology* 1999; 62 (1): 63-7.
 45. Greipp PR, Leong T, Bennet JM, Gaillard JP, Klein B, Stewart JA, Oken MM, Kay NE, Ness BV, Kyle RA. Plasmablastic morphology: an independent prognostic factor with clinical and laboratory correlates: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Myeloma Trial E 9486 report by the ECOG Myeloma Laboratory Group. *Blood* 1998; 91 (7): 2501-07.
-

46. Bartl R, Frisch B, Burkhardt R, et al. Bone marrow histology in myeloma: its importance in diagnosis, prognosis, classification and staging. *British Journal of Haematology* 1982; 51: 361-75.
 47. Fritz E, Ludwig H, Kandi M. Prognostic relevance of cellular morphology in multiple myeloma. *Blood* 1984; 63: 1072-9.
 48. Reyes F. Lymphocyte differentiation. In: Solal-Céligny P, Brousse N, Reyes F, Gisselbrecht C, Coiffier B, editores. *Non-Hodgkin's Lymphomas*. 1st ed. Paris: Editions Frison-Roche; 1993. P. 19-29.
 49. Rajkumar SV, Greipp P. Plasma cells and immunoglobulins. In: Mehta J, Singhal S, editores. *Myeloma*. 1st ed. London: Martin Dunitz; 2002. P. 03-23.
 50. Epstein J. Myeloma phenotype: clues to disease origin and manifestation. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1992; 6 (2): 249-56.
 51. Caligaris-Cappio F, Gregoret MG. Basic concepts - the plasma cell in multiple myeloma. In: Gahrton G, Durie BGM, editores. *Multiple myeloma*. 1st ed. London: Arnold; 1996. P. 22-35.
 52. Restifo NP, Wunderlich JR. Essentials of immunology. In: De Vita Jr FT, Hellman S, Rosenberg SA, editores. *Cancer – Principles and Practice*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. P. 43-73.
-

53. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998; 91 (1): 3-21.
 54. Rasmussen T, Jensen L, Johnsen HE. The clonal hierachy in multiple myeloma. *Acta Oncologica* 2000; 39 (7)) 765-770.
 55. Bakkus MHC, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K. Evidence that the clonogenic cell in multiple myeloma originates from a pre-switched but somatically mutated B cell. *British Journal of Haematology* 1994; 87: 68-74.
 56. Roodman GD. Role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Journal of Bone and Mineral Research* 2002; 17 (11): 1921-5.
 57. Dalton WS. The tumor microenvironment: focus on myeloma. *Cancer Treatment Reviews* 2003; 29 Suppl 1: 11-19.
 58. Kastan MB, Skapek SX. Molecular biology of cancer: the cell cycle. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editores. *Cancer - principles and practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. P. 91-109.
-

59. Stetler-Stevenson W, Kleiner Jr DE. Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editores. Cancer - principles and practice of oncology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. P. 123-136.
 60. San-Miguel JF, Gutierrez N, Garcia-Sanz R, Pandiella A. Thalidomide and new drugs for treatment of multiple myeloma. Educational Programme of the 8th Congress of the European Hematology Association; 2003; Lyon, França. p. 201-207.
 61. Kastrinakis NG, Gorgoulis VG, Foukas PG, Dimopoulos MA, Kittas C. Molecular aspects of multiple myeloma. *Annals of Oncology* 2000; 11: 1217-28.
 62. Nishimoto N, Shima Y, Yoshizaki K, Kishimoto T. Myeloma biology and therapy. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1997; 11 (1): 159-71.
 63. Teoh G, Anderson KC. Interaction of tumor and host cells with adhesion and extracellular matrix molecules in the development of multiple myeloma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1997; 11 (1): 27-42.
 64. Anderson KC, Hamblin TJ, Traynor A. Management of multiple myeloma today. *Seminars in Hematology* 1999; 36 (1): 3-8.
-

65. Klein B, Bataille R. Cytokine network in human multiple myeloma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1992; 6 (2): 273-84.
 66. Foerster J, Paraskevas F. Multiple myeloma. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, editores. *Wintrobe's: Clinical Hematology*. 10th ed. Malvern : Lea & Febiger; 1998. P. 2631-80.
 67. Lauta VM. A review of the cytokine network in multiple myeloma: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Cancer* 2003; 97 (10): 2440-52.
 68. Hussein MA, Juturi JV, Lieberman I. Multiple myeloma: present and future. *Current Opinion in Oncology* 2002; 14: 31-5.
 69. Kumar S, Witzig TE, Greipp PR, Rajkumar SV. Bone marrow angiogenesis and circulating plasma cells in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 2003; 122: 272-4.
 70. Raje N, Anderson KC. Cytokine abnormalities in plasma cell disorders. In: Mehta J, Singhal S, editores. *Myeloma*. 1st ed. London: Martin Dunitz; 2002. P. 53-64.
 71. Dahl IMS, Rasmussen T, Kauric G, Husebekk A. Differential expression of CD56 and CD44 in the evolution of extramedullary myeloma. *British Journal of Haematology* 2002; 116: 273-7.
-

72. Hoffman S, Sorkin BC, White PC, Brackenbury R, Mailhammer R, et al. Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *Journal of Biological Chemistry* 1982; 257: 7720-9.
 73. Cremer H, Lange R, Christoph A, et al. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 1994; 367 (6462): 455-9.
 74. Williams AF, Barclay NA. This immunoglobulin superfamily — domains for cell surface recognition. *Annual Reviews Immunology* 1988; 6: 381-405.
 75. Walsh FS, Doherty P. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulins superfamily: role in axon growth and guidance. *Annual Reviews Cell & Developmental Biology* 1997: 425-56.
 76. Zeromski J, Nyczak E, Dyszkiewicz W. Significance of cell adhesion molecules, CD56/NCAM in particular, in human tumor growth and spreading. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2001; 39: 36-7.
 77. Roth J, Zuber C, Wagner P, Taatjes DJ, Weisgerber C, Heitz PU, Goridis C, Bitter-Suermann D. Reexpression of poly (sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 1998; 85: 2999.
-

78. Patel K, Moore SE, Dickson G, Rossell RJ, Beverley PC, Kemshead JT, Walsh FS. Neural cell adhesion molecule (NCAM) is the antigen recognized by monoclonal antibodies of similar specificity in small cell lung carcinoma and neuroblastoma. *International Journal of Cancer* 1989; 44: 573.
 79. Cornfield D, Liu Z, Gorczyca W, Weisberger J. The potencial role of flow cytometry in the diagnosis of small cell carcinoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2003; 127 (4): 461-4.
 80. Tsang KS, Li CK, Tsoi WC, Leung Y, Shing MM, Chik KW, et al. Detection of micrometastasis of neuroblastoma to bone marrow and tumor dissemination to hematopoietic autografts using flow cytometry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* 2003; 97 (11): 2887-97.
 81. Lipinski M, Hirsch MR, De Agostini-Bazin H, Yamada O, Twisz T, Goridis C. Characterization of neural cell adhesion molecules (NCAM) expressed by Ewing and neuroblastoma cells lines. *International Journal of Cancer* 1987; 40: 81.
 82. Farinola MA, Weir EG, Ali SZ. CD56 expression of neuroendocrine neoplasms on immunophenotyping by flow cytometry: a novel diagnostic approach to fine-needle aspiration biopsy. *Cancer* 2003; 99 (4): 240-6.
-

83. Lee J-J, Chung I-J, Yang D-H, Cho S-H, Cho D, Ryang D-W, Kim H-J. Clinical significance of CD56 expression in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 2002; 43 (9): 1897-9.
 84. Khanlari B, Buser A, Lugli A, Tichelli A, Dirnhofer S. The expression pattern of CD56 (N-CAM) in human bone marrow biopsies infiltrated by acute leukemia. *Leukemia Lymphoma* 2003; 44 (12): 2055-9.
 85. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Immunology* 1986; 136: 4480.
 86. Van Camp B, Durie BGM, Spier C, De Waele M, Van Riet I, Vela E, Frutiger Y, Richter L, Grogan TM. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell - associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood* 1990; 76 (2): 377-82.
 87. Drach J, Gattringer C, Huber H. Expression of the neural cell adhesion molecule (CD56) by human myeloma cells. *Clinical & Experimental Immunology* 1991; 83: 418-22.
 88. Van Riet I, De Waele M, Remels L, Lacor P, Schots R, Van Camp B. Expression of cytoadhesion molecules (CD56, CD54, CD18 and CD29) by myeloma plasma cells. *British Journal of Haematology* 1991; 79: 421-7.
-

89. Barker HF, Hamilton MS, Ball J, Drew M, Franklin IM. Expression of adhesion molecules LFA-3 and N-CAM on normal and malignant human plasma cells. *British Journal of Haematology* 1992; 81: 331-5.
 90. Harada H, Kawano MM. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993; 81 (10): 2658-63.
 91. Omede P, Boccadoro M, Fusaro A, Gallone G, Pileri A. Multiple myeloma: "early" plasma cell phenotype identifies patients with aggressive biological and clinical characteristics. *British Journal of Haematology* 1993; 85: 504-13.
 92. Rawstron A, Barrans S, Blythe D, Davies F, English A, Pratt G, Child A, Morgan G, Jack A. Distribution of myeloma plasma cells in peripheral blood and bone marrow correlates with CD56 expression. *British Journal of Haematology* 1999; 104: 138-43.
 93. Garcia-Sanz R, Orfao A, Gonzales M, Tabernero MD, Bladé J, Moro MJ, Fernández-Calvo J, Sanz MA, Pérez-Simon JÁ, Rasillo A, San Miguel JF. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNAploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 1999; 93 (3): 1032-7.
 94. Pellat-Deceunynck C, Barillé S, Jegou G, Puthier D, Robbilar N, Pineau D, Rapp M-J, Harousseau J-L, Amiot M, Bataille R. The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia* 1998; 12: 1977-82.
-

95. Ely SA, Knowles DM. Expression of CD56/neural cell adhesion molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation. *American Journal of Pathology* 2002; 160 (4): 1293-9.
 96. Pérez-Andrés M, Almeida J, Martín-Ayuso M, Moro MJ, Martín-Núñez G, Galende J, Borrego D, Rodríguez MJ, Ortega F, Hernandez J, Moreno I, Dominguez M, Mateo G, San Migueles JF, Orfao A. Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia* 2005; 19:449-55.
 97. Kremer M, Ott G, Nathrath M, Specht K, Stecker K, Alexiou C, Quintanilla-Martinez L, Fend F. Primary extramedullary plasmacytoma and multiple myeloma: phenotypic differences revealed by immunohistochemical analysis. *Journal of Pathology* 2005; 205:92-10.
 98. Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, Johnson RJ, Jones RA, Richards SJ, Evans PA, Child A, Smith GM, Jack AS, Morgan GJ. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. *British Journal of Haematology* 1997; 97: 46-55.
-

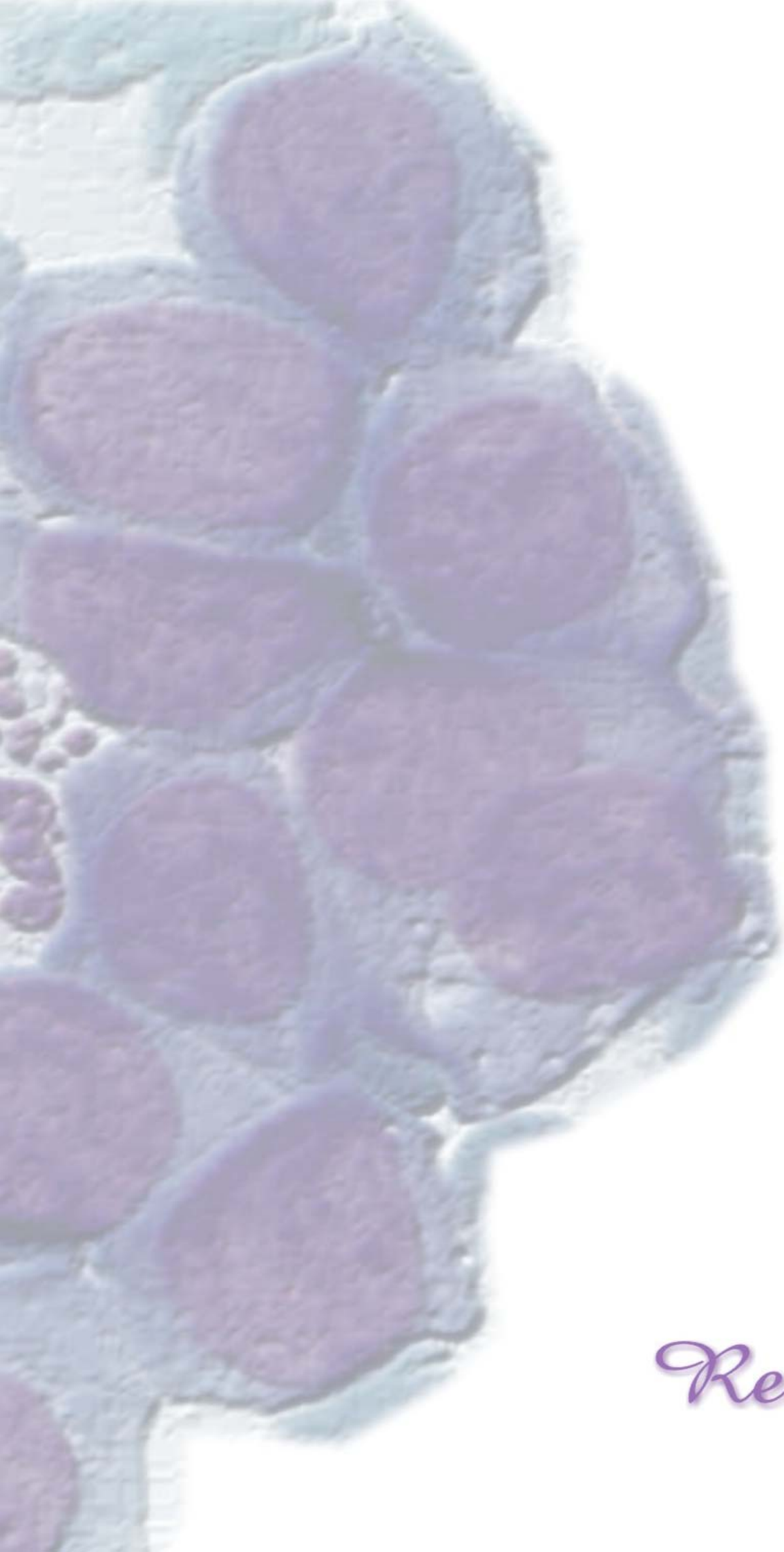
-
99. Nefedova Y, Landowski TH, Dalton WS. Bone marrow stromal-derived factors and direct cell contact contribute to *de novo* drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia* 2003; 17: 1175-82.
 100. Shain KH, Landowski TH, Dalton WS. The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: a possible mechanism for *de novo* drug resistance. *Current Opinion in Oncology* 2000; 557-63.
 101. Gown AM, Wever N, Battifora H. Microwave-based antigenic unmasking: a revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. *Applied Immunohistochemistry* 1999; 256-66.
 102. Dimopoulos MA, Moulopoulos A, Smith T, Delasalle KB, Alexanian R. Risk of disease progression in asymptomatic multiple myeloma. *The American Journal of Medicine* 1993; 94: 57-61.
 103. Pérez-Simón JA, Garcia-Sanz R, Tabernero MD, Almeida J, González M, Fernández-Calvo J, et al. Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: a FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 1998; 91 (9): 3366-71.
 104. Nunshi NC, Tricot G, Barlogie B. Plasma cell neoplasms. In: De Vita Jr FT, Hellman S, Rosenberg AS, editores. *Cancer – Principles and Practice*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. P. 2465-99.
-

105. Bladé J, Fernández-Llama P, Bosch F, Montolíu J, Lens XM, Montoto S, et al. Renal failure in multiple myeloma. *Archives of Internal Medicine* 1998; 158: 1889-93.
 106. Coradazzi AL, Resende LSR, Moraes Neto FA, Latorre MRDO, Niero-Melo L. Determinação da expressão da molécula de adesão CD56 em plasmócitos no mieloma múltiplo através de estudo imunohistoquímico. *Revista da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2003; 25 (3): 155-60.
 107. Mathew P, Ahmann GJ, Witzig TE, Roche PC, Kyle RA, Greipp PR. Clinicopathological correlates of CD56 expression in multiple myeloma: a unique entity? *British Journal of Haematology* 1995; 90: 459-61.
 108. Cabrelle A, Trentin L, Baesso I, Bortoli M, Arienti S, Dal Zilio B, et al. Adhesion molecules on human myeloma (MM) cells might clarify different clinical outcome. *Annals of Oncology* 2002; 99.
 109. Martín P, Santón A, Bellas C. Neural cell adhesion molecule expression in plasma cells in bone marrow biopsies and aspirates allows discrimination between multiple myeloma, monoclonal gammopathy of uncertain significance and polyclonal plasmacytosis. *Histopathology* 2004; 44: 375-80.
-

110. Wei A, Juneja S. Bone marrow immunohistology of plasma cell neoplasms. *Journal of Clinical Pathology* 2003; 56: 406-11.
 111. Mateo G, Orfão A, Montalbán MA, Bladé J, Lahuerta JJ, San Miguel JF. Immunophenotypic investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Série de Monografias da Escola Brasileira de Hematologia* 2004; 10: 59-61.
 112. Zandecki M, Facon T, Bernardi F, et al. CD19 and immunophenotype of bone marrow plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Journal of Clinical Pathology* 1995; 48 (6): 548-52.
 113. Rasmussen T, Theilgaard-Mönch K, Hudlebusch HR, Lodahl M, Johnsen HE, Dahl IMS. Occurrence of dysregulated oncogenes in primary plasma cells representing consecutive stages of myeloma pathogenesis: indications for different disease entities. *British Journal of Haematology* 2003; 123: 253-62.
 114. Sonoki T, Hata H, Kuribayashi N, Yoshida M, Harada N, Nagasaki A, et al. Expression of PRAD1/cyclin D1 in plasma cell malignancy: incidence and prognostic aspects. *British Journal of Haematology* 1999; 104: 614-17.
-

115. Pileri S, Poggi S, Baglioni P, Montanari M, Sabbatini E, Galieni P, et al. Histology and immunohistology of bone marrow biopsy in multiple myeloma. *European Journal of Haematology* 1989; 43: 52-9.
 116. Mandle R, Bing DH. Immunoglobins: structure, gunction, and uses. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, editores. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1995. P. 109-118.
 117. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 1987; 236: 799-806.
 118. Sahara N, et al. Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 2002; 117: 882-5.
 119. Hedvat CV, Comenzo RL, Teruya-Feldstein J, Olshen AB, Ely SA, Osman K, et al. Insights into extramedullary tumor cell growth revealed by expression profiling of human plasmacytomas and multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 2003; 122: 728-44.
-

120. Magrangeas F, Lodé L, Wulleme S, Minvielle S, Avet-Loiseau H. Genetic heterogeneity in multiple myeloma. *Leukemia* 2005; 19: 191-4.
 121. Wulleme S, Robillard N, Lodé L, Magrangeas F, Beris H, Harousseau J-L, Proffitt J, Minvielle S, Avet-Loiseau H. Ploidy, as detected by fluorescence in situ hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia* 2005; 19: 275-8.
 122. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* 2004; 351: 1860-73.
-

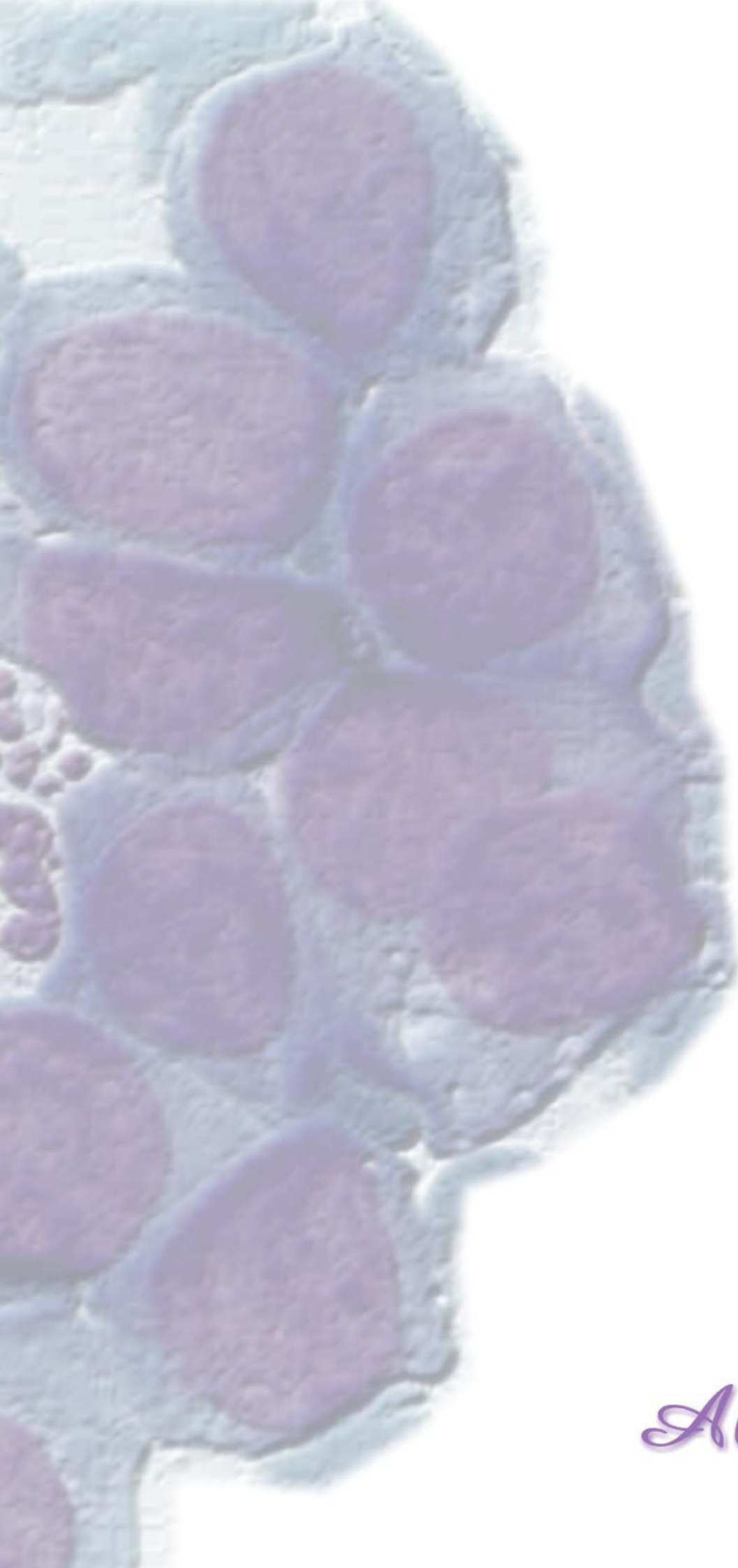


Resumo

O Mieloma Múltiplo (MM), a despeito dos avanços tecnológicos e terapêuticos dos últimos anos, mantém-se como uma neoplasia incurável e de prognóstico desfavorável na maioria dos casos. No entanto, estudos a respeito de sua fisiopatologia e dos eventos celulares e moleculares envolvidos têm trazido importantes contribuições para o desenvolvimento da terapêutica da doença. A expressão de moléculas de adesão, em especial CD56, por plasmócitos tumorais, tem sido freqüentemente associada ao prognóstico dos pacientes, embora seu papel na fisiopatologia da doença ainda seja controverso.

O presente estudo incluiu 97 pacientes com diagnóstico de MM, provenientes da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e do Hospital Amaral Carvalho – Jaú. Os materiais histológicos referentes ao diagnóstico foram classificados de acordo com a distribuição de plasmócitos tumorais na medula óssea. Foi realizado estudo imunohistoquímico para detectar a expressão das cadeias leves de imunoglobulina *kappa* e *lambda* e da molécula de adesão CD56. Os dados obtidos foram analisados levando-se em consideração fatores prognósticos previamente estabelecidos, como β_2 microglobulina e desidrogenase láctica, e tempo de sobrevida dos pacientes.

Foi observada expressão mais freqüente de CD56 entre pacientes do sexo masculino ($p=0,013$) e associação entre expressão de *kappa* e CD56 ($p=0,050$), assim como entre expressão de *lambda* e ausência de expressão de CD56 ($p=0,042$). Não foi observada associação entre expressão da molécula e outros fatores prognósticos, bem como tempo de sobrevida dos pacientes.

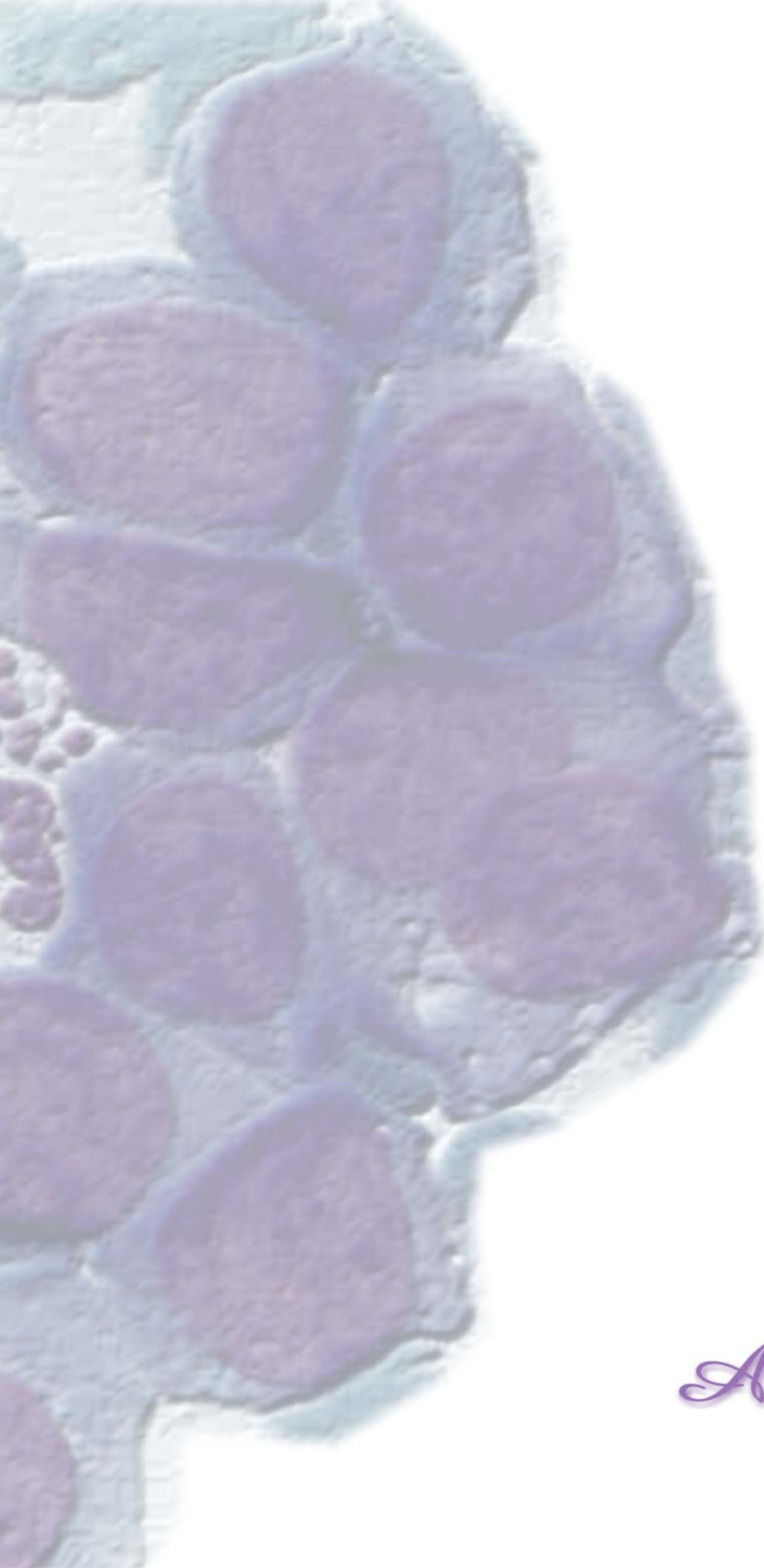


Abstract

Multiple Myeloma (MM) is still an incurable neoplasia with poor prognosis despite recent technological and therapeutic advances. Recent reports on MM physiopathology and its cellular and molecular events are making important contributions in therapeutic development. Neoplastic plasma cell adhesion molecule expression, especially CD56 has frequently been linked to patient prognosis, but its role in MM physiopathology is still controversial.

Histological samples from 97 Myeloma patients at Botucatu School of Medicine University Hospital and the Amaral Carvalho Hospital - Jaú were classified for plasma cell distribution in bone marrow. Immunohistochemistry was used for light chain (*kappa* and *lambda*) and CD56 adhesion molecule expression. Data were analysed considering previously established prognosis factors such as β_2 microglobulin, lactic dehydrogenase, and patient survival time.

CD56 expression was more frequent in males ($p=0.012$). There was an association between *kappa* and CD56 expression, and between *lambda* expression and lack of CD56 ($p=0.042$). There was no association between CD56 expression and other prognostic factors or survival time.



Anexas

Anexo 1 – Protocolos para coleta de dados a partir dos prontuários médicos de pacientes com MM e resultados de histologia e imunohistoquímica

Protocolo I

Nome: RG:

Sexo: Cor: Data nasc.:

Profissão: Estado civil:

Naturalidade: Código de mielograma:

Idade aos primeiros sintomas:

Especialidade de entrada no HC

Tempo decorrido até encaminhamento à Hematologia:

Primeira avaliação da Hematologia:

Sinais e sintomas iniciais:

Exame físico inicial:

Internações em outros serviços:

Outras patologias:

Hemograma inicial:

GB=

Ht= % Hb= g/dl PLQ= /mm³

VCM= HCM= CHCM=

Bioquímicos iniciais:

U= Cr= TGO= TGP= BD= BI=

FA= γ GT= Ca_c= Alb= Glob= AU=

Na= K= P= DHL= Gli=

Proteinúria:

Clearance de creatinina:

Eletroforese de proteínas séricas inicial:

Eletroforese de proteínas urinárias inicial:

Dosagem de β_2 microglobulina inicial:

Mielograma/biópsia de MO inicial:

Exames radiológicos ao diagnóstico:

Outros exames:

Cirurgias realizadas:

Tratamento inicial:

Suporte transfusional:

Intercorrências durante o tratamento:

Regularidade do seguimento:

Controle da doença:

- clínico:

- laboratorial:

- citológico:

Se óbito: data:

hipótese clínica para o óbito:

laudo de necrópsia:

Observações:

Protocolo II

1. Grau de infiltração da M.O. por MM:

- ☐ padrão intersticial
- ☐ padrão difuso
- ☐ padrão intersticial e difuso
- ☐ padrão de substituição

3. Expressão do CD56 pelos plasmócitos tumorais:

- ☐ ausente
- ☐ presente {
 - ☐ forte
 - ☐ moderada
 - ☐ fraca

4. Isotipo de imunoglobulina envolvida:

- ☐ kappa
- ☐ lambda
- ☐ nenhum isotipo

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE BOTUCATU

FACULDADE DE MEDICINA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

BOTUCATU, SP - Rubião Júnior - Cep 18.618-970 - PABX ☎ (014) 821-2121 - RAMAL 2258 - FAX (014) 821-4691 - TELEX 0142107

Botucatu, 07 de fevereiro de 2.000

Of.nº 034/2000-CEP
MVCR/asc

Prezada Senhora,

De ordem da Senhora Presidente deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Estudo de casos de Mieloma múltiplo diagnosticados pela disciplina de hematologia da FMB-Unesp no período de 1.980 a 1.999”**, de autoria de Ana Lucia Coradazzi, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião deste CEP aos 07/02/2000.

Sendo só para o momento, aproveito o ensejo para renovar os protestos de elevada estima e distinta consideração.

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Lígia Niero de Mello
Divisão de Hemocentro da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital Amaral Carvalho**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Informamos que do e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Amaral Carvalho analisou o protocolo de estudo intitulado “Estudo dos Casos de Mieloma Múltiplo Diagnosticados pela Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP no período de 1979 a 1999”, na data de 05 de setembro de 2001 e o considerou APROVADO, bem como o Consentimento Livre Esclarecido, de acordo com as Resoluções número 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde, podendo ser iniciado.

Jaú, 06 de setembro de 2001.

Carlos Hermann Schaal
Presidente do Comitê
de Ética em Pesquisa

Anexo 4 - Termo de consentimento livre e esclarecido

Estudo: Expressão da Molécula de Adesão CD56 Expressão da Molécula de Adesão CD56 por Plasmócitos Tumorais em Medula Óssea de Pacientes com Mieloma Múltiplo: Associação com Fatores Prognósticos e Impacto na Sobrevida Global

Nome das Instituições: Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp ☐
Hospital Amaral Carvalho – Jaú ☐

Nome do paciente: _____

Nº de identificação na Instituição: _____

Médica responsável pelo estudo: Dra. Ana Lucia Coradazzi

Fui informado de que está sendo desenvolvido um estudo na Faculdade de Medicina de Botucatu e no Hospital Amaral Carvalho de Jaú sobre as características moleculares das células tumorais de pacientes com o meu diagnóstico (Mieloma Múltiplo). Este estudo utilizará o material da primeira medula óssea coletada (no dia do diagnóstico) para avaliar a presença ou não de algumas moléculas que podem ser importantes para a compreensão da minha doença. Entendi que não será necessária a coleta de um novo material de medula óssea exclusivamente para o estudo (serão utilizadas apenas as medulas ósseas já disponíveis no Laboratório de Patologia).

Autorizo a utilização do meu material de medula óssea da época do meu diagnóstico para este estudo, assim como a utilização de dados obtidos do meu prontuário médico, desde que minha identidade seja mantida em sigilo.

Fui ainda informado de que esta autorização não é obrigatória e que, caso eu me recuse a assiná-la, não haverá nenhum prejuízo para meu tratamento ou acompanhamento médico nesta Instituição.

_____/_____/2004	_____	_____
data	assinatura do paciente	nome do paciente

_____/_____/2004	_____	_____
data	assinatura do investigador	nome do investigador