

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica
Hematologia

ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DE LINFÓCITOS E CÉLULAS
DENDRÍTICAS DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO QUE
RECEBERAM MANUTENÇÃO COM TALIDOMIDA E DEXAMETASONA
APÓS O TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA

ROBERTO JOSÉ PESSOA DE MAGALHÃES FILHO

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DE LINFÓCITOS E CÉLULAS
DENDRÍTICAS DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO
QUE RECEBERAM MANUTENÇÃO COM TALIDOMIDA E
DEXAMETASONA APÓS O TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE
MEDULA ÓSSEA

Roberto José Pessoa de Magalhães Filho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica (Hematologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Clínica Médica (Hematologia).

Orientadores: Prof. Dr. Ângelo Maiolino
Prof. Dr. Hélio dos Santos Dutra

Rio de Janeiro
Março/2009

Magalhães Filho, Roberto José Pessoa de

Análise imunofenotípica de linfócitos e células dendríticas de pacientes com mieloma múltiplo que receberam manutenção com talidomida e dexametasona após o transplante autólogo de medula óssea / Roberto José Pessoa de Magalhães Filho. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2009.

xiii, 90 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Ângelo Maiolino e Hélio dos Santos Dutra
Dissertação (Mestrado) – UFRJ, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica (Hematologia), 2009.

Referências Bibliográficas: f. 66-76

1. Mieloma Múltiplo. 2. Células Dendríticas. 3. Linfócitos. 4. monócitos. 5. talidomida. 6. Transplante autólogo de células tronco hematopoéticas. 7. Hematologia – Tese. I. Maiolino, Ângelo. II. Dutra, Hélio dos Santos. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Clínica Médica - Hematologia. IV. Título.

ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DE LINFÓCITOS E CÉLULAS
DENDRÍTICAS DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO QUE
RECEBERAM MANUTENÇÃO COM TALIDOMIDA E DEXAMETASONA
APÓS O TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA

Roberto José Pessoa de Magalhães Filho

Orientadores: Prof. Dr. Ângelo Maiolino
Prof. Dr. Hélio dos Santos Dutra

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica (Hematologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Clínica Médica (Hematologia).

Aprovada por:

Presidente, Prof^a. Dr^a.

Prof^a. Dr^a.

Prof^a. Dr^a.

Rio de Janeiro
Março/2009

A minha mulher e a meus três queridos filhos com ternura, pelo convívio com amor, carinho e companheirismo e em compartilhar o grande desafio da longa jornada da vida...

Aos meus pais e irmãos minha eterna gratidão pelo apoio, compreensão e amizade responsáveis por minha maravilhosa infância e criação.

Dedico este trabalho ao meu querido avô Hildebrando Monteiro Marinho (in memoriam), médico pioneiro na hematologia brasileira, personalidade imprescindível, sempre representou exemplo de integridade, profissionalismo, dedicação e cultura.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Hélio dos Santos Dutra pela oportunidade de ingresso na prática de investigação laboratorial e atenção e paciência inesgotáveis durante minha passagem pelo laboratório.

Ao orientador Prof. Dr. Ângelo Maiolino por propiciar minha formação no campo do transplante de medula óssea e pela oportunidade de trabalhar na prática de investigação clínica em pacientes com mieloma múltiplo.

Ao Farmacêutico Gabriel A. C. Verânio Silva pela ajuda inestimável, com sua grande dedicação e esforço pessoal tornou possível a realização deste trabalho conjunto.

A Dr^a. Márcia Garnica pela revisão da tese e enriquecimento desta com sugestões e aplicação de métodos estatísticos avançados.

A biomédica Carolina, e as biólogas Ana Cristina e Simone pela ajuda na marcação das amostras que foram utilizadas na citometria de fluxo.

A todos os médicos da equipe de hematologia e transplante de medula óssea do HUCFF e especialmente para Dr^a. Maria Claudia Moreira, Dr^a. Kátia Urago Turon e Dr. Daniel Mercante que me apoiaram e cuidaram de forma dedicada de nossos pacientes durante minha ausência nos últimos meses de conclusão deste trabalho.

A enfermeira Marise Teixeira e as técnicas de enfermagem Helena e Maria do Carmo, responsáveis pelo ambulatório e pronto atendimento clínica - dia pela enorme ajuda no dia -dia e na coleta das amostras de sangue do estudo.

Este foi um estudo colaborativo entre dois serviços em que houve uma grande participação multidisciplinar sem a qual este não poderia ser realizado.

Gostaria de prestar meus profundos agradecimentos e estima aos pacientes do ambulatório de mieloma múltiplo da Universidade Federal do Rio de Janeiro que colaboraram em participar deste estudo. Muitos destes tornaram-se amigos alguns não mais presentes no momento da conclusão deste trabalho.

RESUMO

ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DE LINFÓCITOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO QUE RECEBERAM MANUTENÇÃO COM TALIDOMIDA E DEXAMETASONA APÓS O TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA

Roberto José Pessoa de Magalhães Filho

Orientadores: Prof. Dr. Ângelo Maiolino
Prof. Dr. Hélio dos Santos Dutra

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica (Hematologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Clínica Médica (Hematologia).

Este estudo analisou o fenótipo de linfócitos e células dendríticas em pacientes com mieloma múltiplo submetidos a tratamento de manutenção após o TACH. A população em estudo apresentou uma diminuição da mediana dos valores de linfócitos CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, da relação CD4⁺/CD8⁺ e aumento de monócitos em comparação a indivíduos sadios, independente do esquema terapêutico de manutenção (dexametasona com ou sem talidomida). Comparando com o grupo pré-manutenção foi demonstrado um aumento de monócitos e da relação CD4⁺/CD8⁺. Estratificando por tipo de terapia de manutenção, no subgrupo da dexametasona (DEX) houve uma diminuição dos linfócitos CD3⁺CD4⁺, da relação CD4⁺/CD8⁺, enquanto no subgrupo da talidomida e dexametasona (TAL-DEX) houve diminuição de células CD3⁺ e CD19⁺ em comparação com indivíduos sadios. Nos dois subgrupos foi observado aumento de monócitos. Estes subgrupos foram investigados antes e após manutenção de forma pareada sendo demonstrado aumento da relação CD4⁺/CD8⁺ no subgrupo DEX e aumento de monócitos no TAL-DEX. Na geração de células dendríticas (DCs) in vitro a partir de monócitos, o rendimento das culturas obtidas foi semelhante entre o grupo de pacientes e o grupo sadio, e também entre os subgrupos de tratamento. A única variável que apresentou correlação com a produção de DCs foi o número de monócitos. A pesquisa das moléculas coestimulatórias de superfície CD1-a, CD80, CD86 e HLA-DR não apresentou diferença entre a população estudada, os subgrupos de manutenção e o grupo sadio. Em síntese, portadores de MM que foram submetidos a manutenção com agentes imunomoduladores após o TACH apresentam alterações nas subpopulações de linfócitos comuns ao período pós-transplante e células dendríticas normais.

Palavras-chave: Mieloma Múltiplo, Células Dendríticas, Linfócitos, monócitos, talidomida, Transplante autólogo de células tronco hematopoéticas

Rio de Janeiro
Março/2009

ABSTRACT

PHENOTYPE ANALYSIS OF LYMPHOCYTES AND DENDRITIC CELLS OF MULTIPLE MYELOMA PATIENTS IN MAINTENANCE WITH THALIDOMIDE AND DEXAMETHASONE AFTER AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION

Roberto José Pessoa de Magalhães Filho

Orientadores: Prof. Dr. Ângelo Maiolino
Prof. Dr. Hélio dos Santos Dutra

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica (Hematologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Clínica Médica (Hematologia).

This study analyzed the phenotype of lymphocytes and dendritic cells (DC) populations in multiple myeloma patients before and after maintenance therapy following autologous stem cell transplant. Patients had higher median counts of monocytes, and reduced CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ ratio of T lymphocytes comparing with health controls. Stratifying by maintenance regimen, patients receiving dexamethasone (DEX) presented lower median values of the CD3⁺CD4⁺ cells and reduced CD4⁺/CD8⁺ ratio and higher monocyte counts. Thalidomide-Dexamethasone (TAL-DEX) subgroup showed the same features as the DEX one but in addition revealed lower median values of CD3⁺ and CD19⁺ lymphocyte subsets. Comparing pre and post maintenance within the treatment subgroups, patients in DEX had augmented CD4⁺/CD8⁺ ratio and patients in TAL-DEX was observed an elevated monocyte count. The generation of dendritic cells (DC) by monocytes cultures had the same performance in all patients, treatment subgroups and health controls. The only variable related to DC generation was the number of monocytes. There were no differences in the coestimulatory molecules (CD1a, CD80, CD86 and HLA-DR) between all patients, treatment subgroups and controls. Transplanted multiple myeloma patients that received maintenance therapy with immunomodulatory agents had the expected changes in lymphocytes subsets in the post-transplant phase and normal dendritic cells generated *in vitro*.

Key-words: Multiple Myeloma, Dendritic cells, Lymphocytes, Monocytes, Thalidomide, Autologous Stem cell Transplantation

Rio de Janeiro

Março/2009

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES, DE QUADROS E DE TABELAS	XI
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo principal	3
2.2 Objetivos Secundários	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Evolução do tratamento do mieloma múltiplo.....	4
3.2 Estratégias de controle do mieloma múltiplo após o transplante	6
3.3 Imunoterapia no tratamento das neoplasias	10
3.4 Imunoterapia e aplicação de vacinas no tratamento do mieloma múltiplo	12
3.5 Obtenção de células dendríticas para imunoterapia	15
3.6 Alterações no sistema imune de pacientes com mieloma múltiplo	17
3.7 Células dendríticas de pacientes com MM submetidos a tratamento.....	20
4 PACIENTES E MÉTODOS	23
4.1 Desenho do estudo definição de casos e controles	23
4.1.1 <i>População do Estudo</i>	23
4.1.2 <i>Crítérios de inclusão e exclusão</i>	24
4.2 Estudo Clínico	25
4.3 Coleta de dados clínicos e definições utilizadas no estudo	26
4.4 Aspectos Éticos da Pesquisa	29
4.5 Coleta de amostras e processamento da análise laboratorial	29
4.5.1 <i>Imunofenotipagem de linfócitos</i>	29
4.5.2 <i>Obtenção de células dendríticas através de cultura de monócitos com citocinas</i>	31
4.5.3 <i>Avaliação do fenótipo de células dendríticas</i>	32
4.5.4 <i>Avaliação funcional das células dendríticas</i>	33
4.5.5 <i>Obtenção de linfócitos alogênicos e autólogos</i>	34
4.6 Análise estatística	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Características clínicas e laboratoriais dos pacientes no estudo	36
5.2 Grupos de tratamento.....	38
5.3 Avaliação de linfócitos e monócitos após o TACH e a manutenção	40

5.4	Impacto do tratamento de manutenção nos linfócitos e monócitos	43
5.5	Avaliação de linfócitos e monócitos no sangue de pacientes que receberam os regimes de manutenção Dexametasona ou Talidomida e Dexametasona	47
5.6	Expansão de células dendríticas em pacientes com mieloma múltiplo	51
5.7	Fatores potencialmente envolvidos na geração de células dendríticas	53
5.7.1	<i>Status da doença após o tratamento</i>	53
5.7.2	<i>Tempo de manutenção</i>	54
5.7.3	<i>Beta-2 Microglobulina</i>	55
5.8	Variáveis correlacionadas ao rendimento de células dendríticas	55
5.9	Padrão de moléculas coestimulatórias de superfície nas células dendríticas de portadores de mieloma múltiplo submetidos a manutenção.	56
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	ANEXOS	77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\Delta 13$	Deleção do cromossoma 13
$\beta 2$ micro	Beta2-microglobulina
B1	Conjunto de pacientes com Beta2-microglobulina menor ou igual a 3,5mg/dl
B2	Conjunto de pacientes com Beta2-microglobulina maior que 3,5mg/dl
COM	Contagens por minuto
Componente M	Componente Monoclonal
D0	Dia da infusão da medula óssea
DCEP	Dexametasona, Ciclofosfamida, Etoposide e Cisplatina
DCs	Células dendríticas
DE	Doença estável
DEX	Dexametasona
DP	Doença progressiva
FISH	Fluorescent in situ hybridization
GC	Grupo controle
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
IBMTR	International Bone Marrow Transplantation Registry
ID	Idiotipo
IF-	Imunofixação negativa
IF	Índice de fluorescência
IF+	Imunofixação positiva
IFM	Intergrupo Francês de Mieloma Múltiplo
IFN- α	Interferon - alfa
IL-10	Interleucina-10
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina -6
IP	Índice de proliferação
ISS	International Score System
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanine

L	Linfócitos
MFI	Intensidade mediana de fluorescência
MM	Mieloma múltiplo
MP	Melfalano e Prednisona
NK	Natural Killer
NR	Não resposta
Pós-M	Pós-manutenção
Pré-M	Pré-manutenção
Ptn M	Proteína Monoclonal
QAD	Quimioterapia em altas doses
QC	Quimioterapia convencional
R MO-DC	relação monócitos- dendríticas
RC	Resposta completa
RC1	Conjunto de pacientes com resposta completa e parcial muito boa
RD	Recaída de doença
Rmin	Resposta mínima
RP	Resposta parcial
RP1	Conjunto de pacientes com resposta parcial , mínima e doença estável
RPMB	Resposta parcial muito boa
S.E.	Sem estímulo
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida livre de eventos
SLP	Sobrevida livre de progressão
TACH	Transplante autólogo de células tronco hematopoéticas
TAL	Talidomida
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
TM	Tempo de manutenção
TM1	Tempo de manutenção menor ou igual a 4 meses
TM2	Tempo de manutenção maior que 4 meses
TMO	transplante de medula óssea
TNF-I	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Taxa de resposta
VAD	Vincristina, Adriamicina e Dexametasona
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, DE QUADROS E DE TABELAS

Figura 1	Fluxograma dos pacientes e fases de tratamento do ensaio clínico. Após o Transplante autólogo de progenitores hematopoéticos os pacientes foram randomizados para o tratamento de manutenção. Neste momento foram incluídos no estudo experimental para avaliação imunofenotípica de subpopulações de linfócitos e de células dendríticas DEX-Dexametasona; TAL-DEX-Talidomida e Dexametasona; ®-Randomização	24
Figura 2	Perfil de linfócitos do sangue de pacientes portadores de mieloma múltiplo submetidos ao transplante autólogo de medula óssea pré-manutenção (PRE-M) e pós-manutenção (POS-M) comparados com Grupo controle (GC)	42
Figura 3	Perfil de linfócitos e monócitos do sangue de pacientes portadores de mieloma múltiplo submetidos ao transplante autólogo de medula óssea pré-manutenção (PRE-M) e pós-manutenção (POS-M) comparados com Grupo controle (GC).....	43
Figura 4	Perfil de monócitos e da relação $CD4^+/CD8^+$ de amostras pareadas de pacientes antes e após receberem manutenção e estratificados por grupo de manutenção.	46
Figura 5	Análise de linfócitos T $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, de relação $CD4^+/CD8^+$, de linfócitos B e de monócitos. Comparação entre o Grupo controle e os subgrupos que receberam Dexametasona e Talidomida+Dexametasona.....	49
Figura 6	Distribuição da população de linfócitos B $CD19^+$ nos diversos grupos analisados no estudo.	50
Figura 7	Distribuição de monócitos nos diversos grupos analisados no estudo.	50
Figura 8	Análise das células dendríticas por citometria de fluxo ao final do sétimo dia de cultura.	51
Figura 9	Análise por histograma das moléculas de superfície de células dendríticas.A análise com anticorpo fluorescente para pesquisa do HLA-DR e isotipo controle.B análise com anticorpo fluorescente para pesquisa do CD80 e isotipo controle.C análise com anticorpo fluorescente para pesquisa do CD86 e isotipo controle e D análise com anticorpo fluorescente para pesquisa do CD1a e isotipo controle.	52

Figura 10	A e B Moléculas coestimulatórias de superfície das células dendríticas geradas <i>in vitro</i> . Estão apresentados os resultados da mediana do índice de fluorescência (IF) dos marcadores de superfície CD1a e CD80. Foram comparados os subgrupos que receberam Dexametasona e Talidomida+Dexametasona com o grupo controle. Índice de Fluorescência (IF): razão entre MFI (intensidade mediana de fluorescência) do marcador e MFI do isotipo controle.57	57
Figura 11	Moléculas de superfície das células dendríticas geradas <i>in vitro</i> . Em 11A está representado o marcador CD86 e em 11B a molécula MHC classe II, HLA-DR. Os resultados da mediana do índice de fluorescência (IF) foram comparados entre os subgrupos que receberam Dexametasona e Talidomida+Dexametasona e grupo controle.....57	57
Tabela 1	Resumo de estudos randomizados analisando a talidomida como tratamento de manutenção após o TACH9	9
Tabela 2	Resumo dos estudos com vacinação idiotípica com células dendríticas em pacientes com mieloma múltiplo 14	14
Tabela 3	Painel de anticorpos fluorescentes usado para marcação de linfócitos e monócitos 30	30
Tabela 4	Painel de anticorpos fluorescentes usados para marcação de células dendríticas33	33
Tabela 5	Características clínicas dos pacientes portadores de mieloma múltiplo estudados37	37
Tabela 6	Status de doença e características da terapia de manutenção de acordo com o grupo de manutenção.....39	39
Tabela 7	Perfil de linfócitos e monócitos de pacientes portadores de Mieloma após o TACH41	41
Tabela 8	Influência do tratamento de manutenção no perfil de linfócitos e monócitos após o TACH em pacientes com MM45	45
Tabela 9	Análise de linfócitos e monócitos de pacientes com mieloma múltiplo que receberam os regimes de manutenção com Dexametasona ou Talidomida e Dexametasona.....48	48
Tabela 10	Tratamento de manutenção e rendimento de células dendríticas.....53	53

Tabela 11	Fatores potencialmente envolvidos na obtenção de células dendríticas <i>in vitro</i>	54
Tabela 12	Moléculas de superfície de células dendríticas nos diferentes grupos de tratamento	56

1 INTRODUÇÃO

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia clonal de células plasmáticas da medula óssea que caracteriza-se pela presença de: anemia, lesões líticas disseminadas, hipercalcemia, insuficiência renal e falha na imunidade humoral acarretando infecções de repetição.¹

Grandes avanços ocorreram no tratamento desta enfermidade nas últimas décadas.² Entre eles destacam-se o uso em primeira linha do transplante autólogo de células tronco hematopoéticas (TACH) combinado a quimioterapia convencional (QC), corticoesteróides e talidomida.³ Através de uma estratégia de tratamento seqüencial foi possível melhorar e prolongar a vida destes pacientes.⁴

Contudo, apesar do expressivo desenvolvimento terapêutico nesta área, a falha no controle e a conseqüente progressão da doença junto a presença de infecções, são os principais fatores relacionados a óbitos por esta moléstia hematológica na atualidade.²

Desta forma, são necessárias novas propostas terapêuticas assim como um melhor entendimento do sistema imune de pacientes com mieloma.

Imunoterapia com células dendríticas conjugadas a antígenos tumorais ou fusionadas a plasmócitos tem sido testadas em estudos fase I,^{5, 6} com objetivo de controlar a doença estimulando respostas efetoras de linfócitos do próprio paciente contra o MM. As vacinações tiveram um aceitável perfil de toxicidade, ficou comprovada a capacidade de ativação do sistema imune entretanto as respostas clínicas a esta terapêutica foram pouco expressivas. Entre alguns dos fatores especulados na falha de obtenção de resultados clínicos nestes estudos acredita-se

que: alterações quantitativas, imunofenotípicas e funcionais nas células dendríticas, geradas *in vitro* possam estar envolvidas.^{7, 8}

O mesmo se aplica aos linfócitos T, B e NK que também são influenciados pela doença e pelos tratamentos usados no combate ao MM.

Diversos estudos já evidenciaram que o sistema imune passa por intensas modificações após o TACH. Como exemplo disso, durante o primeiro ano após esse procedimento é esperado: uma redução de células CD3⁺, CD4⁺, da relação CD4⁺/CD8⁺, CD19⁺ e aumento de linfócitos CD8⁺.⁹ Em contraste, granulócitos, monócitos e células NK em geral atingem valores normais rapidamente em cerca de 1 mês.¹⁰

O uso da talidomida, no período de cem dias até aproximadamente 1 ano, como manutenção após o TACH, melhora as taxas de resposta (TR), sobrevida livre de eventos (SLE) e sobrevida Global (SG).¹¹ Todavia sua influência nas populações de linfócitos, monócitos e células dendríticas de portadores de mieloma submetidos ao TACH, não está bem definida. Um estudo que investigou a expansão *in vitro* de células dendríticas em portadores de mieloma transplantados, não encontrou diferenças quantitativas e no fenótipo destas células quando comparado a indivíduos saudáveis. Entretanto a mesma análise em um subgrupo que havia recebido talidomida observou-se diminuição de moléculas coestimulatórias e MHC constituintes da superfície de células dendríticas.¹²

Portanto, diante de uma escassez de informações sobre o sistema imune de portadores de MM nestas circunstâncias e a perspectiva de um projeto que testará a aplicação de uma vacina para o controle desta doença nos pacientes de nossa instituição, realizamos este estudo que investigou o fenótipo de linfócitos e células dendríticas de uma população de transplantados que receberam dois diferentes regimes de manutenção (dexametasona com ou sem a talidomida).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Analisar o imunofenótipo de linfócitos e células dendríticas em pacientes portadores de mieloma múltiplo em tratamento de manutenção (dexametasona com ou sem talidomida) após o TACH.

2.2 Objetivos Secundários

- 1 Comparar as populações de monócitos, linfócitos B, T e NK e células dendríticas deste grupo de pacientes com indivíduos saudáveis.
- 2 Comparar as populações de monócitos, linfócitos B, T e NK antes e após o tratamento de manutenção.
- 3 Comparar as populações de monócitos, linfócitos B, T e NK e células dendríticas entre os dois subgrupos de manutenção e o grupo controle.
- 4 Comparar a expressão dos marcadores de superfície das células dendríticas entre o grupo que recebeu manutenção e o grupo controle.
- 5 Comparar a expressão dos marcadores de superfície das células dendríticas, entre dois esquemas de manutenção e o grupo controle.

3 REVISÃO DA LITERATURA

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia clonal de células plasmáticas da medula óssea que corresponde a 1% de todos os tipos de câncer e a 10% das neoplasias hematológicas.¹

A incidência do MM nos Estados Unidos é de 5.5 casos por 100.000 habitantes ao ano.¹³

A doença caracteriza-se pela presença de: anemia, lesões líticas disseminadas, hipercalcemia, comprometimento renal e imunossupressão humoral e celular, acarretando infecções de repetição.¹

3.1 Evolução do tratamento do mieloma múltiplo

Em 1969 Alexanian e cols. descreveram o regime de quimioterapia oral melfalano e prednisona (MP), sendo este o primeiro tratamento antineoplásico capaz de modificar a história natural do MM.¹⁴ Apesar do avanço obtido com este protocolo, seus resultados foram modestos uma vez que a taxa de resposta completa foi inferior a 5% e a SG foi de 3 anos.

Diante deste cenário Barlogie e cols. (1984), propuseram uma nova associação de quimioterápicos para pacientes que apresentavam-se refratários aos agentes alquilantes. Este esquema constituído pela associação de Vincristina, Doxorubicina e Dexametasona (VAD) foi capaz de resgatar 14 entre 20 pacientes com MM com doença avançada.¹⁵

Com este resultado, diversas publicações exploraram este protocolo em

pacientes recém diagnosticados sem tratamento prévio atingindo taxas de resposta que variaram entre 50-84%.¹⁶⁻¹⁸

Seguindo as evidências dos estudos relatados Cavo e cols. (2002), testaram a alternância dos protocolos MP e VAD. Porém quando foram feitas análises comparativas com o tratamento padrão, MP, não houve diferença na TR e SG.¹⁹ Outros estudos similares, com variações das drogas nos protocolos de quimioterapia combinada, também foram publicados com resultados divergentes.²⁰ Para tentar responder a esta relevante questão, o grupo colaborativo Myeloma Trialists realizou uma meta-análise englobando 27 estudos randomizados com um total de 6.633 pacientes. Na conclusão deste estudo que comparou o VAD e similares versus MP, foi demonstrada vantagem na TR no grupo da quimioterapia combinada (60% vs 53%) $p=0.00001$. Entretanto quando analisada SG não houve diferença entre os grupos terapêuticos.²¹

Há duas décadas desenvolveu-se o tratamento de quimioterapia em altas doses (QAD) com transplante autólogo de células progenitoras hematopoéticas (TACH).

Como marco inicial, as experiências de McElwain e Powles (1983), testando o escalonamento do melfalano em portadores de MM refratário descortinaram um novo campo que foi explorado por outros pesquisadores.^{22, 23}

Barlogie e cols. (1986), posteriormente utilizando QAD e em seguida a infusão de medula óssea do próprio paciente, conseguiu reduzir a toxicidade relacionada a este procedimento e tornar viável a aplicação desta terapia em seres humanos.²⁴

O mesmo autor seguindo os conceitos introduzidos por Freireich no tratamento de hemopatias malignas e com o aprendizado adquirido no tratamento

das leucemias agudas popularizou o tratamento do mieloma múltiplo em 3 fases: indução; intensificação e manutenção.²⁵

A partir de dois estudos randomizados comparativos realizados pelo intergrupo francês de mieloma (IFM-90) e pelo grupo inglês (MRC7) o transplante atingiu resultados superiores à quimioterapia convencional (QC), deste modo, foi incorporado na prática médica como tratamento de primeira linha para pacientes jovens^{2,26}. **Ademais, outros estudos foram publicados posteriormente confirmando o benefício deste tratamento²⁷⁻³⁰ em contraste 2 estudos não demonstraram vantagem terapêutica para o TACH.^{28, 29}**

O impacto desta mudança foi indicado pelo registro internacional de transplante de medula óssea (IBMTR), que reportou o mieloma múltiplo como a doença na qual foi realizado maior número de transplantes na América do Norte, o que superou os linfomas e as leucemias agudas no ano de 2005.³¹

Contudo, apesar de o estudo IFM 90 ter alcançado significativa melhora expressada por melhor TR, SLE e SG para os pacientes tratados com transplante, a SLE em sete anos foi de apenas 16%, no braço do TMO.² Além do mais, quando analisadas as curvas de sobrevida não foi observado um platô, sendo a maioria dos óbitos registrados por recidiva e doença progressiva.

Estes dados sugeriam a urgente necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para melhorar os resultados do transplante.

3.2 Estratégias de controle do mieloma múltiplo após o transplante

O tratamento de manutenção ou consolidação foi explorado por vários pesquisadores com o objetivo de melhorar os resultados do transplante.

A abordagem clássica inicial utilizada por vários grupos foi a manutenção com interferon-alfa (IFN- α). Diversos estudos comparativos foram publicados alguns com resultados favoráveis³² enquanto outros não demonstraram benefício.^{33, 34}

Como exemplo desta controvérsia, Powles e cols. (1995) estudaram 85 pacientes com o objetivo de testar a superioridade do IFN- α contra um grupo controle após o transplante. O grupo de tratamento recebeu IFN- α (3×10^6 UI três vezes por semana) até a recidiva ou progressão. Após mediana de 52 meses, a sobrevida livre de progressão (SLP) no grupo tratado com IFN- α foi de 46 meses, contra 27 meses no grupo-controle ($p = 0,0025$). No entanto, a vantagem de sobrevida desapareceu em uma análise posterior, com seguimento mais longo.^{35, 36}

Posteriormente, foi publicada uma meta-análise avaliando 3948 pacientes de um total de 30 ensaios clínicos randomizados que usaram IFN- α no MM. Foi encontrado um discreto benefício na sobrevida global de 7 meses ($p=0.01$) no grupo que recebeu manutenção.³⁷ Em seguida esses, dados foram reforçados por uma análise sistemática que demonstrou um aumento da mediana de sobrevida de 4 meses no grupo do IFN- α .³⁸

Os glicocorticóides em altas doses são medicamentos efetivos no tratamento do mieloma múltiplo, podendo atingir 43% de TR quando utilizados em primeira linha e 27% em pacientes refratários.³⁹ Além disso, já foi descrito que a dexametasona é o agente mais eficaz do protocolo VAD correspondendo por até 80% da resposta obtida com essa combinação.⁴⁰ Entretanto, quando aplicado como agente isolado no tratamento de manutenção, apesar de aumentar a duração da resposta, seu efeito na SG permanece controverso.⁴¹

Em 1999, o grupo da Universidade de Arkansas comprovou a importância da talidomida como droga de resgate após o transplante. Em uma população de

pacientes portadores de mieloma com recidiva após várias linhas de tratamento incluindo o TACH, observou-se uma TR de 32%.⁴²

O ressurgimento da talidomida na prática clínica e sua aplicação no tratamento do MM foi uma das grandes inovações no campo da oncohematologia na última década. Entre os fatores relacionados a incorporação da talidomida estão: sua apresentação oral, e sua atividade sinérgica com outros fármacos sendo uma boa droga para uso em associação.

Seu papel no tratamento do MM já foi consolidado em distintas situações clínicas, entre elas destacam-se: a associação com a dexametasona no preparo para o TACH como tratamento de indução, a combinação com o protocolo MP para tratamentos de pacientes idosos e não-candidatos ao TACH e no tratamento de manutenção após o transplante.³

Recentemente, o estudo IFM 9902 comparou três diferentes estratégias de cuidados após o TACH: grupo 1 - ausência de manutenção, grupo 2 - uso do pamidronato e grupo 3 - uso do pamidronato associado a talidomida. A população estudada foi composta por pacientes de baixo risco, o que na definição dos autores compreendia aqueles que tinham até 1 fator de risco ao diagnóstico (Beta-2 microglobulina (β 2-micro) > 3mg/l ou deleção do cromossoma 13 (Δ 13).

O grupo 3 quando comparado com os grupos 1 e 2 atingiu maior TR (67% versus 55% ou 57%), e em 3 anos maior SLP (52% versus 36% ou 37%) e em 4 anos maior SG (87% versus 74% ou 77%)⁴. Outros 4 estudos também confirmam o benefício da talidomida após o TACH (Tabela 1).^{11, 27, 43, 44}

Após testes *in vitro* que confirmaram a atividade sinérgica da talidomida combinada a dexametasona, vários grupos vêm aplicando esta combinação em diferentes etapas do tratamento do MM.

Tabela 1 Resumo de estudos randomizados analisando a talidomida como tratamento de manutenção após o TACH

Estudo	N	TACH	dose	tempo	TR	SLP	SG
Total Therapy 2 ²⁷	668	duplo	Até 400mg	Início até a recaída	62% vs 43%	5 anos 56% vs 44%	5 anos 65% vs 65%
IFM 99-02 ⁴	597	duplo	200mg	15 meses	67% vs 55% ou 57%	3 anos 52% vs 36% ou 37%	4 anos 87% vs 74% ou 77%
Estudo da Tunísia ⁴³	140	único	100mg	6 meses	67% vs 51%	3 anos 85% vs 57%	3 anos 85% vs 65%
Estudo australiano ¹¹	243	único	200mg	12 meses	24% vs 15%	2 anos 66% vs 40%	2 anos 91% vs 80%
Estudo Brasileiro ⁴⁴	93	único	200mg	12 meses	-	42% vs 25%	NS

N - numero de pacientes , TACH – transplante autólogo de células tronco hematopoéticas , dose - dose máxima de talidomida usada , TR- taxa de resposta , SLP- sobrevida livre de progressão SG – sobrevida global.

Adaptada de referência 74. Estão assinalados em negrito os resultados que atingiram significância estatística.

Dimopoulos e cols. (2003), demonstraram que esta combinação pode atingir TR de 45% em pacientes refratários, e que também 30% dos pacientes que não obtiveram resposta com a talidomida, quando usam as duas drogas respondem ao tratamento.⁴⁵

O papel destas duas drogas combinadas na manutenção após o TACH não está estabelecido.

Em um estudo multicêntrico retrospectivo realizado com o objetivo de analisar as práticas de transplante no MM em 9 instituições brasileiras, a talidomida isoladamente ou em associação com dexametasona, foi o esquema mais utilizado como terapia de manutenção ou resgate após o transplante.⁴⁶

Atualmente o grupo brasileiro de mieloma terminou o recrutamento de pacientes para um ensaio randomizado que compara talidomida e dexametasona versus dexametasona como regime de manutenção. Em uma análise preliminar o grupo da TAL-DEX demonstrou superioridade na SLP.⁴⁴

Outras alternativas têm sido estudadas em diversos centros com objetivo de controlar a doença após o transplante. Entre elas destacam-se: a combinação de novas drogas (bortezomibe e imunomoduladores análogos a talidomida) com quimioterapia e o transplante alogênico não-mieloablativo.

A geração de vacinas com células dendríticas conjugadas a antígenos tumorais com o objetivo de imunoterapia após o TACH é uma nova abordagem que está em fase inicial de desenvolvimento.⁴⁷

3.3 Imunoterapia no tratamento das neoplasias

Desde a década de 50 surgiram as primeiras evidências de que o sistema

imune atua no combate das neoplasias. O pesquisador, Burnett (1971), observou que após a tentativa de transplante de tumores no modelo murino, ocorria repetidamente rejeição⁴⁸. Esses achados sugeriram a participação do sistema imune no reconhecimento e destruição de tumores. Tais conceitos, mais tarde, ficaram conhecidos como teoria da vigilância imunológica.⁴⁸

Décadas após, outros indícios como: a detecção de infiltrados de linfócitos em tumores sólidos⁴⁹ e o conhecimento da existência de maior risco de câncer em pacientes com imunodeficiências, deram suporte a esta hipótese.^{50, 51}

Atualmente, o papel dos linfócitos (B, T, NK, NKT) como células efetoras assim como os seus produtos os interferons (Tipo I e Tipo II) e a perforina como participantes nos mecanismos de vigilância do sistema imune já estão mais definidos⁵²

Um exemplo prático de imunoterapia está no sucesso alcançado com a aplicação do transplante alogênico no tratamento das neoplasias hematológicas.⁵³ Neste procedimento os linfócitos T tem um papel essencial na produção da resposta imune necessária para a eliminação de células tumorais e este fenômeno é conhecido como efeito do enxerto contra o tumor.⁵⁴

Kolb e cols. (1995), comprovaram o impacto deste efeito. Ao transferirem linfócitos de um doador alogênico conseguiram curar pacientes em recaída de leucemia mielóide crônica após o transplante de medula óssea.⁵⁵ No entanto, seria desejável alcançar uma maior eficiência desta terapia através da promoção de uma resposta imune específica, sem os riscos da doença enxerto contra hospedeiro.

O uso de células dendríticas para a apresentação de antígenos específicos das células tumorais, tem se revelado como o método mais adequado para a indução de uma resposta imune específica antitumoral. A transfusão de células

dendríticas autólogas, previamente tratadas com antígenos encontrados nas células tumorais, promove uma resposta específica dependente de linfócitos T. Estudos em modelos animais revelaram a potencial eficácia deste tratamento.⁵⁶⁻⁵⁸ Esta modalidade terapêutica já foi aplicada em pacientes com melanoma⁵⁹, linfoma⁶⁰, câncer de próstata⁶¹, mieloma múltiplo⁶² entre outros.

3.4 Imunoterapia e aplicação de vacinas no tratamento do mieloma múltiplo

O mieloma múltiplo é uma neoplasia que reúne condições ideais para o desenvolvimento da terapia por ativação de células dendríticas. Isto ocorre, pois o plasmócito, a célula maligna, tem a capacidade de sintetizar, expressar em sua superfície e posteriormente secretar anticorpos ou fragmentos destes em mais de 90% dos casos. Estes anticorpos constituem-se em antígenos ideais, pois só são secretados, exclusivamente, pelas células malignas.

Bergenbrant e cols. (1991), demonstraram a presença de linfócitos B secretores de imunoglobulinas anti-idiotípicas em pacientes com mieloma múltiplo, com especificidade para o produto secretado pelas células malignas.⁶³ Também, já foram identificados linfócitos T com atividade anti-idiotípica, o mesmo ocorrendo com células natural killer (NK).⁶⁴ Ainda assim, a interação entre células tumorais, células apresentadoras de antígenos e linfócitos é incapaz de gerar, *in vivo*, a resposta imune necessária para o controle da doença após a quimioterapia.

As primeiras tentativas de imunização contra o mieloma conjugavam idiotipos a um carreador imunogênico denominado KLH (Keyhole Limpet Hemocyanine) e utilizavam o fator de crescimento de granulócitos e macrófagos ou

a interleucina-2 como adjuvantes para estimular o sistema imune.⁶⁵ Entretanto, com resultados pouco expressivos parecia que a manipulação *in vitro* das células deveria constituir uma etapa fundamental do processo.

Em estudo realizado na Universidade de Stanford, doze pacientes com mieloma múltiplo foram tratados com infusões de células dendríticas, três e seis meses após o transplante autólogo de medula óssea. A tolerância às infusões foi muito boa.⁶⁶ A resposta clínica foi boa no grupo de pacientes em que a ativação imune foi demonstrada, gerando a expectativa de que a imunoterapia faça parte dos esquemas de tratamento do mieloma múltiplo.

Posteriormente foram publicados, pelo menos, mais 8 estratégias de vacinação utilizando células dendríticas conjugadas a idiotipos tumorais no mieloma múltiplo. Estes estudos divergem em diversos aspectos como: carga tumoral no momento da vacinação, quanto ao tratamento que foram expostos previamente (TACH versus QC), na composição das vacinas e no protocolo de aplicação, tornando difícil sua comparação (tabela-2).⁶

Até o momento a maior parte dos estudos consegue comprovar *in vitro* através da geração de respostas de células T específicas para os idiotípos a ação da vacinação. Porém esse benefício não se converteu em respostas clínicas consistentes. Na tentativa de melhorar os resultados da vacinação no MM: a busca por antígenos mais específicos e eficientes, a melhor definição do protocolo de geração de células dendríticas para confecção das vacinas e o aprimoramento dos protocolos de vacinação são etapas a serem investigadas referentes a este tratamento.

Tabela 2 Resumo dos estudos com vacinação idiotípica com células dendríticas em pacientes com mieloma múltiplo

vacina	Status da doença	Resposta imune * **	Efeito anti-tumoral	Ref
DC-pulsadas com Id → Klh	1ª remissão TACH	2/12 nd	2/12 redução ptn M	30
DC-pulsadas com Id → Klh + GM-Csf	1ª remissão TACH	2/10 1/10	3/10 redução ptn M	96
DC-pulsadas com ID	1ª remissão TACH	Presente nos respondedores	3/17 RC e 2/17 RP	94
DC-pulsadas com ID	1ª remissão TACH	4/5 2/5	1/5 redução ptn M	86
DC-pulsadas com Id - Klh ou ID→Klh	1ª remissão TACH	4/26 nd	2/21 RC 8/21 redução ptn M	90
DC-pulsadas com Id - Klh	MM-IgG	5/6 2/6	1/6 redução ptn M	92
DC-pulsadas com Id → Id+GM-Csf	Doença avançada	nd 4/10	1/10 redução da infiltração plasmocitária na MO	89
DC-pulsadas com Id	Doença avançada	nd	6/42 redução ptn M	95
DC-pulsadas com Id -KLH	Doença avançada	Resposta +	Redução ptn M	93
DC-pulsadas com Id –KLH +GM-Csf	Doença avançada	2/2 2/2	0/2	88

DC- células dendríticas; ID - Idiotipos , KLH- Keyhole Limpet Hemocyanin; GM-CSF - Fator de crescimento de granulócitos e macrófagos; RC- resposta completa; ptn M - proteína monoclonal; MO- medula óssea.

* Proliferação de linfócitos T idiotipo específica ** Liberação de citocinas de células T idiotipo específicas. Dados adaptados da ref:31.

Também de forma relevante a atenção a população estudada constitui uma etapa fundamental. Neste contexto existem questões a serem melhor elucidadas como: a seleção de pacientes elegíveis para a vacinação e a definição do momento adequado para a vacinação, tendo em vista uma população que apresenta diferente carga tumoral e tratada previamente com agentes modificadores do sistema imune.

Recentemente uma nova abordagem na geração de vacinas antitumorais com células dendríticas estão em fase I e II de investigação.⁶⁷ Raje e cols. (2004), desenvolveram um novo protocolo de vacinação que explora a fusão de plasmócitos com células dendríticas, formando hibridomas. Em uma análise preliminar, foi demonstrada uma resposta imune autóloga contra o mieloma.⁵

3.5 Obtenção de células dendríticas para imunoterapia

O desenvolvimento de formas eficientes de obtenção de células dendríticas usando precursores hematopoéticos foi etapa fundamental para a viabilização da vacinação com células dendríticas.

Inaba e cols. (1992), descobriram que com a adição de fator de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) ao sangue de camundongos era possível gerar células dendríticas. Posteriormente desenvolveram o primeiro método de obtenção de células dendríticas maduras usando medula óssea de camundongos.⁶⁸

Em seguida, foram feitos experimentos em humanos que encontraram obstáculos na tentativa de geração de células dendríticas ao reproduzir o modelo de cultura com GM-CSF isoladamente.

Primeiro Caux e cols. (1992) e após Sienna e cols. (1995) conseguiram obter células dendríticas de humanos usando culturas de células CD34⁺ tratadas com GM-

CSF e TNF- α . Como resultado destes experimentos encontraram dois diferentes precursores de células dendríticas, um assemelhava-se a uma célula de Langerhans com CD1a⁺ e CD14⁻ enquanto o outro tinha características de uma célula dendrítica intersticial CD1a⁻ e CD14⁺.^{69, 70}

Porém um passo importante aconteceu quando, Salusto e Lanzavecchia, (1994) introduziram um novo método que consistia em separar e cultivar células CD14⁺ (monócitos) com a adição de GM-CSF e IL-4.⁷¹

Este estudo serviu de base para outros que usando metodologia semelhante adicionaram o TNF- α nos últimos dias de cultura a fim de obter maturação terminal das células dendríticas.

Com este protocolo foi possível gerar células dendríticas em 6 dias com o seguinte fenótipo: CD14^{low}, CD83⁺, CD86⁺, MHC-II.

Atualmente após estas adaptações e com algumas variações, tornou-se o método mais difundido para obtenção de células dendríticas para imunoterapia.⁷²

Em uma análise de 10 estudos clínicos que aplicaram vacinação com células dendríticas, no total de 108 pacientes com melanoma, a utilização de TNF- α no protocolo de maturação foi a única variável correlacionada a uma resposta favorável ao tratamento $p < 0.001$.⁷³ Esses dados clínicos reforçam a impressão de que o estímulo de maturação de células dendríticas geradas *in vitro* tem impacto nos resultados da imunoterapia.

Apesar da evolução dos protocolos de obtenção de células dendríticas, ainda não está definido qual o melhor estímulo para maturação destas células e nem até quanto esta célula deve ser estimulada para obter um fenótipo maduro. Existem evidências de que a vacinação com células dendríticas imaturas pode gerar tolerância ao invés de estimular o sistema imune.⁷⁴

No Brasil, Neves e cols. (2005), da Universidade de São Paulo em preparo para um protocolo de vacinação para pacientes com câncer renal metastático, utilizaram como método de geração de células dendríticas: cultura de células mononucleares com GM-CSF e IL-4 por 5 dias e em seguida as mesmas citocinas mais o TNF- α por 2 dias adicionais. O rendimento de células dendríticas através deste protocolo de cultura foi adequado, pois quando comparado com um grupo controle de pessoas saudias foi de 17.25% contra 18%.⁷⁵

3.6 Alterações no sistema imune de pacientes com mieloma múltiplo

Pacientes portadores de mieloma múltiplo apresentam grave comprometimento do sistema imune, sendo a principal alteração relacionada a esta doença, a falha da imunidade humoral.⁷⁶

Raitakari (2003) em uma revisão de estudos publicados sobre a função e distribuição de linfócitos T em pacientes com MM, destacou que o número de células CD4⁺ no sangue periférico está diminuído e a relação CD4⁺/CD8⁺ invertida.⁷⁷ Em contrapartida pesquisadores da Universidade de Salamanca ao analisar a medula óssea por citometria de fluxo de pacientes com gamopatias monoclonais, notaram um aumento de infiltração por células T com fenótipo citotóxico / Th1.⁷⁸

Outro fator a ser destacado é o emprego de diferentes agentes terapêuticos (corticoesteróides, VAD, ciclofosfamida e TACH) que modificam o sistema imune e acarretam um estado de imunodeficiência mais abrangente e duradouro.

Os corticoesteróides são drogas conhecidas por suas propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras relacionadas com: a redução da expressão de genes de diversas citocinas (IL-1, IL-6, TNF α , IL-10); a redução de monócitos e

macrófagos e a diminuição da secreção de citocinas pelos linfócitos T, inibindo a proliferação destas células.⁷⁹ O TACH é responsável por profundas modificações no sistema imune de pacientes com mieloma.¹⁰

Como exemplo, disso, diversos trabalhos já demonstraram que enquanto granulócitos, monócitos e plaquetas apresentam recuperação quantitativa em cerca de um mês, a reconstituição imunológica pode durar mais de 1 ano após o TACH.⁹

Ademais, quando analisadas as populações de linfócitos do sangue, é notável um comportamento distinto quanto a recuperação após o transplante.

As células NK ($CD3^-$, $CD16^+$, $CD56^+$) são os linfócitos que se recuperam prontamente no primeiro mês, seguido dos linfócitos B ($CD19^+$) entre 6 até 12 meses e linfócitos T ($CD4^+$) de 1 até 5 anos.⁹

Vários pesquisadores, revendo este tema, apontam para alterações importantes no repertório de células T manifestando-se principalmente com redução das contagens das células $CD4^+$, inversão da relação $CD4^+/CD8^+$ e aumento de células $CD8^+$ no primeiro ano após o TACH.^{9, 80}

A recuperação das células T ocorre através de uma via tímica e outra independente do timo. Aparentemente as células T $CD8^+$ necessitam menos do timo e provem de expansões do sangue periférico e por esta razão recuperam-se rapidamente após o TACH.⁸⁰

Os linfócitos T podem ser estudados através de isoformas do CD45 ($CD45RA$ e $CD45RO$). As células T $CD45RO^+$ em geral respondem a antígenos e são conhecidas como células de memória enquanto as $CD45RA$ são denominadas células naive.⁹

Após três meses do transplante, os linfócitos $CD45RA$ estão muito diminuídos no sangue e retornam ao normal somente com o decorrer de 1 ano.

Porém, quando analisadas separadamente em subpopulações, as CD4⁺CD45RA⁺ têm um padrão de recuperação que dura cerca de 2 anos e ao contrário as células CD8⁺45RA⁺ reestabelecem-se no primeiro mês.⁸¹

Diferente dos corticoesteróides e TACH existem evidências de que a talidomida exerce uma atividade estimulatória do sistema imune⁸².

A talidomida e seus análogos são drogas que atuam por meio de diversos mecanismos de ação no mieloma múltiplo e têm como alvo as interações entre os plasmócitos e as células do estroma da medula óssea.

Entre eles destacam-se: ação anti-angiogênica; imunomoduladora; reduzem a produção de TNF- α e modificam as moléculas de adesão no microambiente medular.

As evidências de atividade no sistema imune acumulam-se em diferentes publicações, das quais: estímulo na ativação e expansão de células T CD8⁺;⁸³ aumento da produção de IL-2 por células mononucleares;⁸⁴ indução de produção de citocinas através do linfócito T helper tipo-2;⁸⁵ aumento da atividade NK *in vitro*⁸⁶ e por fim, estímulo de mecanismos efetores celulares e humorais em camundongos.⁸⁷

88

O pesquisador Schutt e cols. (2006) ao estudar subpopulações de linfócitos do sangue de pacientes com MM comparou as alterações encontradas em diferentes subgrupos de tratamento.¹⁰

Foram formados os seguintes grupos: I – QC, II - QC e Talidomida, III – QAD, IV - não tratados e V - grupo controle.

Quando comparados pacientes com MM não tratados e o grupo controle foi demonstrada diminuição significativa da mediana dos linfócitos CD19⁺, CD4⁺/CD45RO, NK, CD3⁺/HLA-DR⁺ neste grupo entretanto não houve diferença nas

células T, granulócitos e monócitos.

Ao comparar as células do sistema imune entre os que receberam QC e o grupo não tratado, identificou: diminuição dos valores de $CD4^+$; $CD4^+/CD45RO^-$; $CD4^+/CD45RO^+$; $CD19^+$; aumento $CD3^+/HLA-DR$ e monócitos e não houve diferença nas células $CD8^+$, NK e granulócitos.

Ao aplicar o mesmo modelo entre o grupo que recebeu QAD e o controle e o não tratado, notou diferença de 2 anos na recuperação das células $CD4^+/45RO^-$ enquanto as células $CD4^+/45RO^+$ tiveram padrão de regeneração semelhante. Após o TACH as células $CD8^+$, $CD3^+/HLA-DR$ e monócitos atingiram valores normais após 2 meses, as NK após 3 meses e as células B entre 6 meses e 1 ano.

E sucessivamente, comparou os grupos com e sem talidomida adicionada a QC, na tentativa de identificar possíveis diferenças nas células constituintes do sistema imune. Não encontrou diferença nas células pesquisadas ($CD4^+$, $CD4^+/45RO^+$, $CD4^+/45RO^-$, $CD19^+$, NK e granulócitos) o único parâmetro que apresentou diferença foi um aumento do número de monócitos no grupo da talidomida.¹⁰

3.7 Células dendríticas de pacientes com MM submetidos a tratamento

Devido ao potencial de aplicação de células dendríticas em imunoterapia para controle do MM, diversos trabalhos procuraram analisar o número, o fenótipo e a funcionalidade das células dendríticas obtidas *in vitro* através de células mononucleares do sangue desses pacientes.

Alguns estudos demonstram que pacientes com MM têm número reduzido de células dendríticas quando comparados com indivíduos normais, enquanto outros

não mostram essas diferenças. Da mesma forma, resultados divergentes são encontrados com relação a expressão dos marcadores de maturação de células dendríticas e a capacidade de estimulação de linfócitos alogênicos quando os mesmos grupos são comparados.^{89, 90}

Entre os fatores apontados pelos grupos que tiveram resultados negativos em pacientes com MM, está a interferência no processo de geração dessas células por citocinas (IL-6, IL-10, TGF- β e VEGF) secretadas pela célula tumoral.^{7, 8, 91}

Em um estudo testando *in vitro* a adição de dexametasona na cultura de monócitos com GM-CSF + IL-4, foram obtidas células dendríticas imaturas com baixa expressão de CD1a, CD40⁺, CD86⁺ e alta expressão de CD14⁺. E não obstante, quando adicionado TNF- α ao sistema, a maturação terminal não ocorreu, sendo comprovado pela persistência de baixa modulação das moléculas coestimulatórias CD83⁺ e CD86⁺.⁹²

Em outro que testou o efeito da talidomida *in vitro*, ficou estabelecido que a adição desta droga em um meio de cultura de monócitos com GM-CSF e IL-4, não inibe a diferenciação destas em células dendríticas. E ademais, a talidomida foi capaz de modular a capacidade aloestimulatória com aumento da secreção de IL-12p70 e aumento da resposta de linfócitos TH1 de maneira dose dependente.⁹³

Recentemente, foram publicados resultados de um estudo conduzido na Dinamarca que arrolou 19 pacientes com MM no diagnóstico e 8 pacientes após o TACH.⁹¹

O objetivo do estudo foi analisar os seguintes parâmetros das células dendríticas: número, marcadores de superfície e capacidade de estimulação de linfócitos T sendo que, as células dendríticas foram extraídas diretamente do sangue por um método de purificação, não sendo expostas a citocinas.

O estudo demonstrou redução do número de células dendríticas e dos marcadores de maturação assim como, uma baixa estimulação linfocitária e de produção de citocinas (Interferon-gama) nos pacientes com MM quando comparados com indivíduos normais.

Quando pesquisadas as diferenças entre os pacientes com MM no diagnóstico e após o TACH, ambos tiveram um número reduzido de células dendríticas embora, as células do grupo do transplante tenham apresentado maior expressão de HLA-DR e moléculas HLA de classe I.

Nas conclusões finais os autores sugerem que a vacinação deve ser realizada no período de manutenção após o transplante⁹¹.

Schutt e cols. (2005) estudaram em 25 pacientes com MM submetidos a tratamento com Qc, TACH e talidomida a expansão de células dendríticas *in vitro*. Utilizando um protocolo de obtenção com GM – CSF e IL-4 por 7 dias seguidos por TNF- α , IL-1beta, GM – CSF e IL-4 por mais 7 dias para maturação terminal, obtiveram um rendimento de células dendríticas satisfatório (92%) com fenótipo típico. Entretanto quando foram analisadas as células geradas em cultura de pacientes haviam recebido talidomida, observou-se significativa redução na expressão de HLA-DR, CD40, CD83 e CD1a.¹² **Como conclusões deste trabalho o uso da talidomida foi associado a geração de células dendríticas imaturas.**

4 PACIENTES E MÉTODOS

Entre março de 2006 a novembro de 2008 após aprovação pelo comitê de ética institucional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) foi iniciado este estudo em colaboração entre o Instituto de Ciências Biomédicas e o Serviço de Hematologia/Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF).

O HUCFF é um hospital público federal de ensino, terciário, que possui, desde 1994, um programa de transplante de medula óssea vinculado ao Serviço de Hematologia e um laboratório com ampla capacidade instalada para prática de investigação laboratorial e assistência ao transplante, vinculado ao Departamento de Histologia e Embriologia.

4.1 Desenho do estudo definição de casos e controles

4.1.1 População do Estudo

Este estudo experimental arrolou pacientes de uma coorte prospectiva de portadores de mieloma múltiplo que participava, de um ensaio clínico, que testou duas diferentes estratégias de manutenção após o TACH.

Foram incluídos neste estudo, 19 pacientes com mieloma múltiplo e 14 indivíduos sadios como grupo controle (GC). Figura 1 fluxograma

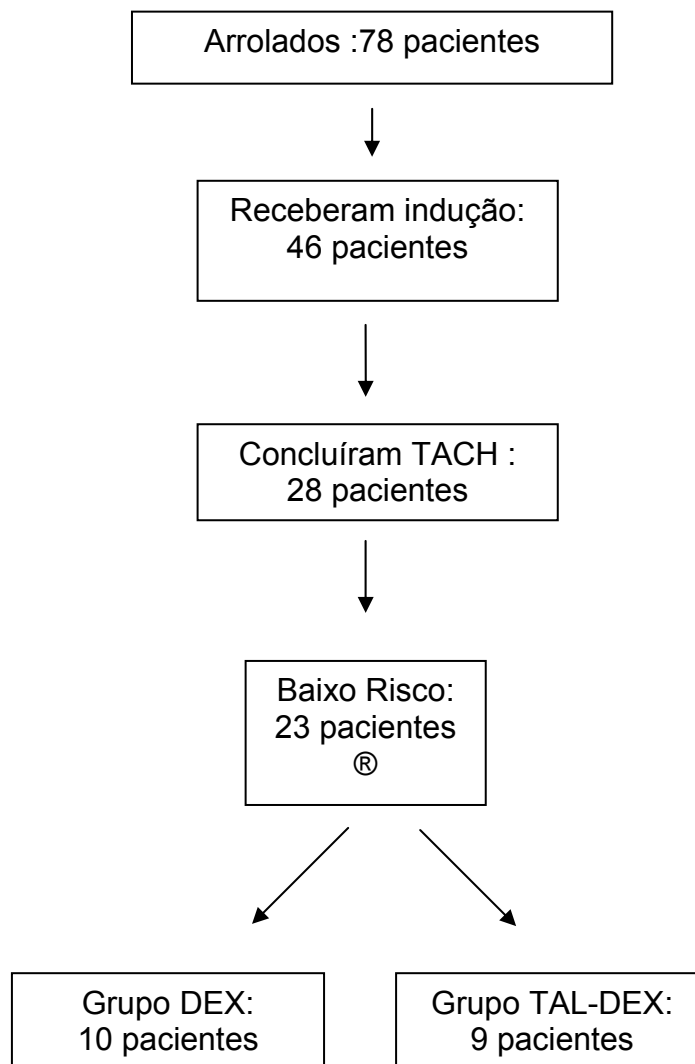


Figura 1 Fluxograma dos pacientes e fases de tratamento do ensaio clínico. Após o Transplante autólogo de progenitores hematopoéticos os pacientes foram randomizados para o tratamento de manutenção. Neste momento foram incluídos no estudo experimental para avaliação imunofenotípica de subpopulações de linfócitos e de células dendríticas DEX-Dexametasona; TAL-DEX-Talidomida e Dexametasona; ®-Randomização

4.1.2 Crítérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão para pacientes foram: ter o diagnóstico de mieloma múltiplo sintomático; estar incluso no ensaio clínico no grupo de baixo risco; ter

recebido o tratamento previsto para o grupo de baixo risco; ter recebido manutenção com dexametasona ou talidomida e dexametasona sem violações e por tempo contínuo de ao menos 2 meses e ter recebido a dexametasona 3 semanas antes da coleta de sangue para as análises.

Foram definidos como critérios de exclusão: Ter recebido o tratamento para o grupo de alto risco; Ter *performance status* baixo (PS); ter perspectiva de sobrevida inferior a 3 meses julgada pelo investigador; ter infecção grave no momento da coleta de amostras sanguíneas e ter descontinuado ou modificado o regime de medicamentos previstos na manutenção.

Foi definido como grupo controle um conjunto de indivíduos sadios, doadores voluntários de sangue cadastrados no banco de sangue da UFRJ. Os critérios adotados para inclusão foram os mesmos que os usados de rotina na seleção de doadores de sangue.

4.2 Estudo Clínico

Entre setembro de 2004 e outubro de 2008 após aprovação pelo comitê de ética institucional da UFRJ desenvolveu-se um estudo randomizado e multicêntrico para pacientes portadores de mieloma múltiplo no serviço de Hematologia do Hospital Clementino Fraga Filho. Este estudo teve um recrutamento total de 78 pacientes no Rio de Janeiro.

O estudo tinha como objetivo: validar estratégias terapêuticas distintas em intensidade de acordo com o risco dos pacientes. Foram estratificados dois grupos de risco de acordo com a presença dos marcadores prognósticos: β 2-micro (com ponto de corte em 2,5 mg/dl) e Δ 13 pela técnica de hibridização *in situ* (Fluorescent

In Situ Hibridization, FISH).

O grupo de alto risco consistia na presença simultânea dos dois fatores enquanto o de baixo risco na presença isolada de um destes ou ausência de ambos.

A programação terapêutica do estudo foi comum a todos os pacientes e compreendia: tratamento de indução com o protocolo VAD ambulatorial (vincristina 0,4mg D1-D4, adriamicina 9 mg/m² D1-D4 e dexametasona 40 mg D1-D4 a cada 21 dias, total de 3 ciclos, seguido de mobilização de progenitores hematopoéticos com ciclofosfamida 4 g/m² associado a G-csf 10mcg/kg/dia e realização de transplante autólogo de progenitores hematopoéticos (TACH) usando como regime de condicionamento o protocolo melfalano na dose de 200mg/m².

No grupo de baixo risco após cem dias do TACH foi realizada randomização para dois regimes de manutenção distintos: dexametasona (DEX) 40mg por 4 dias mensal ou talidomida (TAL-DEX) 200mg/dia em combinação com a dexametasona 40 mg por 4 dias consecutivos ao mês, ambos os esquemas com duração de 1 ano.

4.3 Coleta de dados clínicos e definições utilizadas no estudo

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos através de banco de dados organizado prospectivamente pelo próprio investigador na divisão ambulatorial da unidade de transplante de medula óssea do HUCFF.

Avaliação laboratorial de rotina dos pacientes no diagnóstico foi feita com os exames: hemograma completo; bioquímica (glicose, uréia, creatinina, ácido úrico, cálcio, albumina, β 2-micro); Proteína M (eletroforese de proteínas no soro e na urina, imunofixação de proteínas no soro e urina), avaliação do aspirado de medula óssea, estudo molecular da medula óssea, para Δ 13, por FISH e rotina radiológica

do esqueleto completo.

I - Para definição de mieloma múltiplo sintomático foram seguidos os critérios do, International Myeloma Working Group,⁹⁴ que consiste na presença dos três achados em conjunto: **I** - Infiltração com mais de 10% de plasmócitos na medula óssea, **II** - Presença de componente M no soro ou na urina e **III** - evidências de doença sintomática.

Neste consenso foi estabelecido, como doença sintomática, todo acometimento de órgãos pelo MM que acarreta: hipercalcemia com cálcio maior ou igual a 11,5 mg/dl; insuficiência renal com creatinina maior que 1,73 mg/dl (mmol/l), anemia com hemoglobina menor que 10g/dl e dano ósseo com lesões líticas, osteopenia difusa ou fraturas patológicas.

II - Para avaliação do prognóstico foram usados: o estágio Durie-Salmon,⁹⁵ o ISS,⁹⁶ e o elaborado pelo grupo francês (Anexo II).⁹⁷

III - Para avaliação da resposta foram utilizados os critérios do Registro Internacional de Transplante de Medula Óssea,⁹⁸ modificado com a inclusão da categoria Resposta parcial muito boa, de acordo com as modificações do “International Uniform Response Criteria for Multiple Myeloma”⁹⁹ e em revisões recentes sobre o tema¹⁰⁰ (Anexo II). O componente M no diagnóstico serviu como padrão para comparação com o apresentado pelos pacientes após o TACH e após a manutenção.

Quanto aos grupos de pacientes analisados no estudo definiu-se como grupo Pré-M todos os pacientes submetidos ao TACH que já estavam randomizados para determinado tratamento, em um momento antes de iniciar a manutenção e grupo Pós-M, aos pacientes que estavam após manutenção.

Foi definido tempo de manutenção (TM) o intervalo de tempo entre o início deste tratamento e o momento em que o paciente teve amostra de sangue colhida. De acordo com os critérios de inclusão este tempo tinha que ter duração mínima de 2 meses de manutenção. Esta definição foi fundamentada no fato de que este é o tempo mínimo necessário para observação de resposta terapêutica com a talidomida⁴².

Com relação à infusão da medula óssea (D0) ficou estabelecido como tempo pré-manutenção como o tempo entre o D0 até o momento em que o paciente colheu amostra de sangue e iniciou a manutenção e tempo pós-manutenção como o tempo entre o D0 até o momento que foram colhidas amostras de sangue dos pacientes que estavam em manutenção.

Para correlacionar os parâmetros de rendimento das células dendríticas foram criadas variáveis de interesse clínico.

Para avaliação do status da doença após o tratamento: denominou-se Grupo RC1 ao conjunto de pacientes que tiveram Resposta completa (RC) e Resposta parcial muito boa (RPMB) e Grupo RP1 ao conjunto de pacientes que tiveram resposta parcial (RP), resposta mínima (RMIN) e Doença estável (DE).

Para tempo de manutenção foram constituídos 2 grupos: foi dado o nome de Grupo TM1 ao conjunto de pacientes com tempo de manutenção menor ou igual a 4 meses e Grupo TM2 aos que tiveram tempo de manutenção maior que 4 meses.

Para investigar a β 2-micro, os pacientes foram divididos nos grupos, B1, para aqueles que tinham β 2-micro menor ou igual a 3,5 mg/dl e, B2, para os que tinham β 2-micro maior que 3,5 mg/dl.

4.4 Aspectos Éticos da Pesquisa

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUCFF. Esclarecimentos sobre o estudo e posterior obtenção de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram realizados no primeiro momento da identificação do paciente elegível para o grupo de pacientes em manutenção e para o grupo de indivíduos saudáveis. O TCLE encontra-se no Anexo I.

4.5 Coleta de amostras e processamento da análise laboratorial

Todas as amostras de sangue de pacientes foram obtidas através de punção venosa periférica no Serviço de Hematologia e logo em seguida após curto período de permanência em seringa plástica com o anticoagulante liquemine (10u/ml), foram transportadas para o laboratório para processamento. O quantitativo de sangue foi de 20ml no grupo Pré-M e 40ml no grupo Pós-M e GC.

4.5.1 Imunofenotipagem de linfócitos

A análise de linfócitos foi feita no grupo Pré-M, no grupo Pós-M e no GC.

Utilizou-se 4 ml de sangue para realização do hemograma completo e imunofenotipagem dos linfócitos. O volume restante do hemograma completo foi diluído (4 partes) com hidróxido de etilamônio a 6% em soro fisiológico (1 parte) – Plasmin (HalexIstar). Após 15-30 min de repouso à temperatura ambiente o volume de plasma enriquecido com leucócitos foi obtido para imunomarcagem dos linfócitos.

Os leucócitos foram lavados duas vezes por centrifugação à 1200 rpm, à temperatura ambiente, em solução salina tamponada com fosfato (Phosphate

Buffered Saline – PBS) contendo 0,1% de azida sódica. Os leucócitos foram ressuspendidos com solução salina tamponada (BSS- Buffered Saline Solution) contendo 0,1% de azida sódica e 0,1% de albumina bovina.

Cada tubo contendo 50 ul da suspensão celular em BSS, foi incubado em banho de gelo por 10 minutos com 10 ul de soro de camundongo (diluído 1/5), para bloqueio de sítios de ligação inespecíficos ou receptores da região de fixação de complemento das imunoglobulinas.

Para imunomarcção dos linfócitos utilizamos as seguintes combinações de anticorpos: CD45, CD3, CD16, CD56, CD3/CD4/CD8, CD3/CD19/CD45, Mouse IgG1, Mouse IgG2a. Os marcadores, fluorocromos, isotipos, clones e fornecedores estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 Painel de anticorpos fluorescentes usado para marcação de linfócitos e monócitos

Tubo	Anticorpo- Fluorocromo	Isotipo	Clone	Fabricante
1	CD45 - FITC	IgG1	2D1	B-D
2	CD3/19/45 FITC/PE/PerCP	IgG1/IgG1/IgG1	SK7/SJ25C1/SD1	B-D
3	CD3 - FITC	IgG2a	HIT3a	B-D PharMingen
	CD16 - PE	IgG1	3G8	B-D PharMingen
	CD56 - Cy	IgG1	B159	B-D PharMingen
4	CD4/CD8/CD3 FITC/PE/PerCP	IgG1/IgG1/IgG1	SK3/SK1/SK7	B-D
5	Mouse IgG1 - PE	IgG1	X40	B-D
6	Mouse IgG 2a FITC	IgG2a	X39	B-D

Os anticorpos monoclonais previamente titulados foram adicionados à suspensão celular. Após 30 minutos de incubação em banho de gelo, foram adicionados 500 µl de solução lítica (Becton e Dickinson-BD). Os tubos foram mantidos por 6 minutos à temperatura ambiente e centrifugados à 1200 rpm por 5 min. O pellet foi lavado uma vez com PBS 0,1% de azida sódica (2 mL). Após centrifugação à 1200 rpm por 5 min o pellet foi ressuscitado com solução de paraformaldeído 1% para fixação. Os tubos foram mantidos à 4°C até aquisição no citômetro de fluxo (FacsCalibur- BD).

A aquisição e análise foi feita pelo programa BD CellQuest Pro versão 6.0. Os valores percentuais foram transformados em valores absolutos conforme o leucograma de cada amostra.

4.5.2 Obtenção de células dendríticas através de cultura de monócitos com citocinas

Foram estabelecidas culturas de monócitos para obtenção de células dendríticas nos grupos Pós-M (n=17) e GC (n=12). Para esta etapa foram utilizados 35 mL de sangue.

As células mononucleares foram isoladas por gradiente de densidade utilizando-se Ficoll Hypaque (Pharmacia). Após a separação, aproximadamente 5-7 x10⁶ células mononucleares foram transferidas para placas de Petri de 35 mm (Corning Co.) e mantidas por 2 horas a 37°C. Os monócitos, as células aderentes à placa, foram mantidos em cultura com citocinas enquanto os linfócitos, as células não-aderentes, foram separados e criopreservados para posterior utilização no teste de proliferação linfocitária.

Para obtenção de células dendríticas, as células aderentes foram cultivadas em meio RPMI 1640 e suplementadas com: 10% de soro fetal bovino (Cultilab[®]), penicilina 100 U/mL, streptomicina 100 ug/mL e glutamina (Molaridade). Em seguida foram adicionados ao meio: GM-CSF (R&D) 50ng/ml e IL-4 50ng/ml (R&D) por 5 dias para diferenciação de monócitos em células dendríticas. Para maturação terminal foi acrescentado TNF- α 50 ng/ml (R&D) e repetida a dose de GM-CSF 50ng/ml (R&D[®]) e IL-4 50ng/ml por mais 2 dias.

Para análise do rendimento das células dendríticas ao término da cultura foram utilizados os parâmetros: número de células obtidas ao término da cultura / volume de sangue utilizado para separação dos leucócitos mononucleares e número de monócitos obtidos para iniciar a separação das células mononucleares/ número de células dendríticas obtidas ao término da cultura.

4.5.3 Avaliação do fenótipo de células dendríticas

Ao término da cultura (7 dias) $1-2 \times 10^5$ células foram separadas para o protocolo de imunofenotipagem, conforme protocolo descrito previamente para linfócitos (item: 4.5.1). Foram utilizados os marcadores: HLA-DR, CD45, CD1a, CD14, CD80, CD86, Mouse IgG2a, Mouse IgG1 (Tabela 4). Os resultados foram obtidos em percentagens de células positivas e mediana de intensidade de fluorescência (MFI) para cada marcador. Os resultados de MFI foram convertidos para Índice de Fluorescência (IF) pela razão entre MFI do marcador e MFI do isotipo controle.

Tabela 4 Painel de anticorpos fluorescentes usados para marcação de células dendríticas

Tubo	Anticorpo-Fluorocromo	Isotipo	Clone	Fabricante
1	HLA-DR-FITC	IgG2a	L243(G46-6)	B-D- Pharmingen
2	CD45-FITC	IgG1	2D1	B-D
3	CD1a-PE	IgG1	HI-149	Caltag
4	CD14-FITC	IgG2a	TÜK4	Caltag
5	CD80-FITC	IgG1	MEM-233	Caltag
6	CD86- FITC	IgG1	BU63	Caltag
7	Mouse IgG 2a FITC	IgG2a	X39	B-D
8	MouseIgG1 -FITC	IgG1	X40	B-D
9	Mouse IgG1-PE	IgG1	X40	B-D

4.5.4 Avaliação funcional das células dendríticas

Foi realizada avaliação funcional das células dendríticas através da indução de resposta proliferativa de linfócitos. O ensaio de proliferação celular utilizado foi o teste de incorporação da timidina tritiada $-[3H]$ radioativa.

As células dendríticas derivadas da cultura de monócitos foram distribuídas num volume de 100 μ l/poço em placas de 96 poços e irradiadas (3000CGy) no serviço de Medicina Nuclear do HUCFF. O co-cultivo com linfócitos, nas proporções DC:L: 1:10, 1:20, 1:100, foi mantido por 5 dias. Nas últimas 18 horas foi adicionado 0,5 μ Ci de timidina tritiada (Sigma)/poço. As células foram transferidas para papel de fibra de vidro e estes para frascos contendo líquido de cintilação. A leitura foi feita em cintilador (Beckman). A radioatividade incorporada pelas células foi medida em CPM (contagem por minuto) e os resultados foram expressos pelo índice de proliferação (IP).

Para cálculo do IP foi aplicada a fórmula:

$$IP = \text{CPM das DC} + L / \text{CPM dos L (s.e.)}$$

DC= células dendríticas

L= linfócitos

s.e.= sem estímulo

4.5.5 Obtenção de linfócitos alogênicos e autólogos

Os linfócitos alogênicos foram obtidos de concentrado de leucócitos do sangue de dois doadores saudáveis (Buffy-coat de bolsas de sangue) do Serviço de Hemoterapia - HUCFF. Inicialmente o buffy-coat foi diluído em solução salina tamponada na proporção de 1:1 (volume final de 40 mL). Após centrifugação à 1000 rpm por 20 min. à temperatura ambiente, foi descartado o volume sobrenadante correspondente à 25 mL. Este procedimento foi realizado duas vezes para exclusão de plaquetas. A fração de leucócitos pobre em plaquetas foi ressuspensa para 40 mL com solução salina tamponada e adicionada sobre 10 mL de Ficoll para obtenção das células mononucleares. Após lavagem para exclusão do Ficoll, a suspensão foi transferida para uma coluna de lã de nylon preparada para adesão de monócitos e granulócitos remanescentes da separação no Ficoll. Após adesão por 45 min. os linfócitos foram eluídos com meio de cultura e lavados duas vezes com meio de cultura contendo 10% de soro fetal. A taxa de linfócitos CD3⁺ nesta suspensão foi maior que 85%. Estes linfócitos foram criopreservados e descongelados no momento de preparação da co-cultura com células dendríticas.

4.6 Análise estatística

As variáveis contínuas foram expressas em mediana com limites mínimo e máximo e as variáveis categóricas foram expressas em frequência utilizando percentagem. Para comparação entre as medianas foi aplicado o teste Mann-Whitney. Para as variáveis relacionadas ao rendimento de células dendríticas e as variáveis de interesse clínico contínuas foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman (r) e análise de regressão linear (contínuas e categorizada).

Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Para os cálculos estatísticos foram usados os programas GraphPrism 4 e SPSS 11.0 (for Windows, SPSS Inc. Chicago, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas e laboratoriais dos pacientes no estudo

Foram incluídos 19 portadores de mieloma múltiplo de uma coorte inicial de 78 pacientes.

A mediana de idade dos pacientes foi de 58 anos e variou de 29 a 64 anos, com predomínio de pacientes do sexo masculino (68%) e de brancos ou miscigenados (79%), conforme mostra a Tabela 5.

O tipo de mieloma mais comum foi o IgG em 57%, seguido do mieloma IgA 27% e cadeias leves em 16% dos pacientes.

A mediana dos parâmetros laboratoriais avaliados ao diagnóstico da doença foram: hemoglobina de 9 g/dl (8 a 14,7 g/dl); cálcio sérico de 10 mg/dl (6,4 a 14,1 mg/dl); creatinina de 1mg/dl (0,7 a 7,5 mg/dl) e percentual de infiltração de plasmócitos na medula óssea de 20% (4 a 100%).

De acordo com o sistema de estadiamento Durie-Salmon: 47% dos pacientes se enquadraram no estágio II e 53% no estágio III. No ISS: 37% estavam em estágio I; 47% em estágio II e 16% em estágio III.

Ao aplicar o índice prognóstico francês apenas 1 paciente desta amostra foi classificado como alto risco. Os demais pacientes foram classificados como de baixo risco e tiveram a seguinte distribuição dos fatores prognósticos: β 2-micro menor que 2,5 e ausência de Δ 13 em 42%, β 2-micro menor que 2,5 e presença de Δ 13 em 16% e β 2-micro acima de 2,5 e ausência de Δ 13 em 37%.

Tabela 5 Características clínicas dos pacientes portadores de mieloma múltiplo estudados

Características	Frequência N= 19
Idade, mediana em anos, (min - max)	58 (29 – 64)
Sexo, n	
Masculino:Feminino	13:6
Etnia, n (%)	
Brancos e miscigenados	15 (79)
Negros	4 (21)
Tipo MM, n (%)	
IgG	11 (57)
IgA	5 (27)
Cadeia leve	3 (16)
Estadiamento Salmon-Durie*, n (%)	
II	9 (47)
III	10 (53)
ISS, n (%)	
I	7 (37)
II	9 (47)
III	3 (16)
Hemoglobina (g/dl), mediana (min - max)	9 (5,8 - 15)
Cálcio (mg/dl), mediana (min - max)	10 (6,4 - 14)
Creatinina (mg/dl), mediana (min - max)	1 (0,7 - 7,5)
Infiltração da medula óssea por plásmocitos (%), mediana (min - max)	20 (4 - 100)
Albumina (g/dl), mediana (min - max)	4 (2,5 - 4,8)
β2-micro (mg/dl), mediana (min - max)	2 (1,4 - 17,3)
Δ13 (FISH), n (%)	4 (21%)

*nenhum paciente apresentou estágio I; n: número; min: mínimo; max: máximo; ISS:International Score system; MM: mieloma múltiplo; β2-micro: β2-microglobulina; Δ13: Deleção cromossoma 13; FISH: Fluorescent in Situ Hybridization

Outros marcadores prognósticos estudados foram: albumina (mediana de 4 g/dl e variação de 2,5 a 4,8 g/dl); β 2-micro (mediana de 2 mg/dl e variação de 1,4 a 17,3 mg/dl) e a pesquisa da Δ 13, que foi positiva em 21% dos pacientes estudados.

5.2 Grupos de tratamento

Partindo de uma amostra de 19 pacientes, somente 17 concluíram as etapas previstas do tratamento e conseqüentemente, tiveram seus dados analisados. O motivo da exclusão de um dos pacientes foi a retirada do consentimento, não recebendo manutenção (Braço DEX da randomização) e o outro por apresentar precocemente progressão da doença, sepse grave e óbito (Braço TAL-DEX).

Sendo assim, a população estudada foi constituída por 17 pacientes, dos quais 9 receberam DEX e 8 TAL-DEX. A comparação destes dois grupos está exposta na Tabela 6.

A avaliação pré-manutenção foi feita com um número inferior de pacientes (n=13), devido a decisão do comitê de investigadores desta pesquisa ter incluído esta análise posteriormente ao início do estudo.

O tempo pré-manutenção global teve uma duração mediana de 129 dias e variou de 90 a 272 dias. Nos dois subgrupos de manutenção o tempo mediano foi semelhante.

O TM, expresso em tempo mediano, foi de 137 dias, variou de 58 a 623 dias sendo mais longo no subgrupo que recebeu TAL-DEX (184 versus 137 dias).

O tempo pós-manutenção, teve mediana de 312 dias e variou de 201 a 754 dias. No grupo DEX, este tempo foi de 265 dias e variou de 201 a 514 dias e no grupo TAL-DEX, 330 dias e variou de 210 a 714 dias.

Tabela 6 Status de doença e características da terapia de manutenção de acordo com o grupo de manutenção

	Manutenção N=17	Talidomida + Dexametasona N=8	Dexametasona N=9
Status da doença Pré-Manutenção, n (%)			
RC + RPMB	7 (41)	3 (38)	4 (44)
RP + RMIN	9 (53)	5 (62)	4 (44)
DE	1 (6)	-	1 (12)
Status da doença Pós-Manutenção			
RC + RPMB	13 (76)	7 (87)	6 (67)
RP + RMIN	4 (24)	1 (13)	3 (33)
DE	-	-	-
Dias após o TACH, mediana (min – max)			
Pré-manutenção	129 (90-272)	130 (117-215)	129 (90-272)
Pós-manutenção	312 (201-754)	330 (210-714)	265 (201-514)
Tempo de manutenção, mediana (min-max)	137 (58-623)	184 (58-623)	134 (84-346)

N: número de pacientes; RC: resposta completa; RPMB: resposta parcial muito boa; RP: resposta parcial; RMIN: resposta mínima; NR: não resposta; TACH: Transplante autólogo de células tronco hematopoéticas; min: mínimo; max: máximo

Na avaliação de resposta terapêutica depois do TACH, 41% dos pacientes tiveram RC e RPMB, 53% RP e RMIN e apenas 6% DE. Entretanto quando reavaliados após a instituição da manutenção: 76% RC e RPMB, 24% RP e RMIN.

Na avaliação pós manutenção, o subgrupo DEX obteve taxas de 67% RC e RPMB, 33% RP e RMIN e o subgrupo TAL-DEX taxas de 87% RC e RPMB e 13% RP e RMIN. (Tabela 6)

5.3 Avaliação de linfócitos e monócitos após o TACH e a manutenção

A comparação entre as medianas dos valores globais de leucócitos do sangue de indivíduos saudáveis e de pacientes transplantados demonstrou uma diminuição ($p < 0.005$) em todos os grupos de tratamento. Ao empregar a avaliação utilizando a citometria de fluxo, a contagem de linfócitos foi semelhante em indivíduos saudáveis e pacientes com mieloma submetidos ao TACH.

O grupo Pré-M apresentou diminuição das medianas de linfócitos T $CD3^+$ e de $CD3^+CD4^+$, da relação $CD4^+/CD8^+$ e aumento dos linfócitos T $CD3^+CD8^+$ em comparação com o GC. Não houve diferenças nos linfócitos B ($CD45^+CD19^+$), NK ($CD3^-CD56^+CD16^+$) e monócitos.

Da mesma forma quando comparados o grupo Pós-M e o GC houve: diminuição da mediana dos valores de linfócitos T $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, da relação $CD4^+/CD8^+$ e aumento dos monócitos, no grupo de pacientes tratados. Não houve diferença entre linfócitos T $CD3^+CD8^+$, B e NK nos dois grupos.

A comparação dos mesmos parâmetros entre os grupos Pré-M e Pós-M encontrou aumento da mediana da relação de linfócitos $CD4^+/CD8^+$ e de monócitos após a manutenção. Não houve diferenças entre linfócitos T $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$,

CD3⁺CD8⁺, linfócitos B e NK (Tabela 7 e Figuras 2 e 3).

Tabela 7 Perfil de linfócitos e monócitos de pacientes portadores de Mieloma após o TACH

Leucócitos do sangue (mm ³), medianas (min - max)	Grupo Controle N=14	Transplantados	
		Pré-manutenção N=13	Pós manutenção N=17
CD3+	1420 (464-1950)	1195* (439-1771)	887* (196-1974)
CD3+CD4+	859 (294-1392)	168* (77-307)	239* (37-571)
CD3+CD8+	475 (151-708)	821* (289-1394)	621 (146-1283)
R CD4+/ CD8+	1,80 (1,40 – 4,23)	0,25* (0,11-0,45)	0,41*; (0,23-0,96)
CD45+CD19+	238 (37-797)	215 (11-849)	149 (5-481)
NK # (CD3-CD56+CD16+)	217 (93-673)	108 (4-1197)	165 (39-669)
Monócitos	385 (230-500)	380 (260-1166)	600*; (200-850)

p < 0.05, quando comparado com o Grupo controle; * p < 0.05, quando comparados os grupos pré e pós-manutenção. #: Na análise de células NK: GC n=13; grupo pré-manutenção n=11; grupo pós-manutenção n=16. Min: mínimo; max: máximo; Nk: natural killer

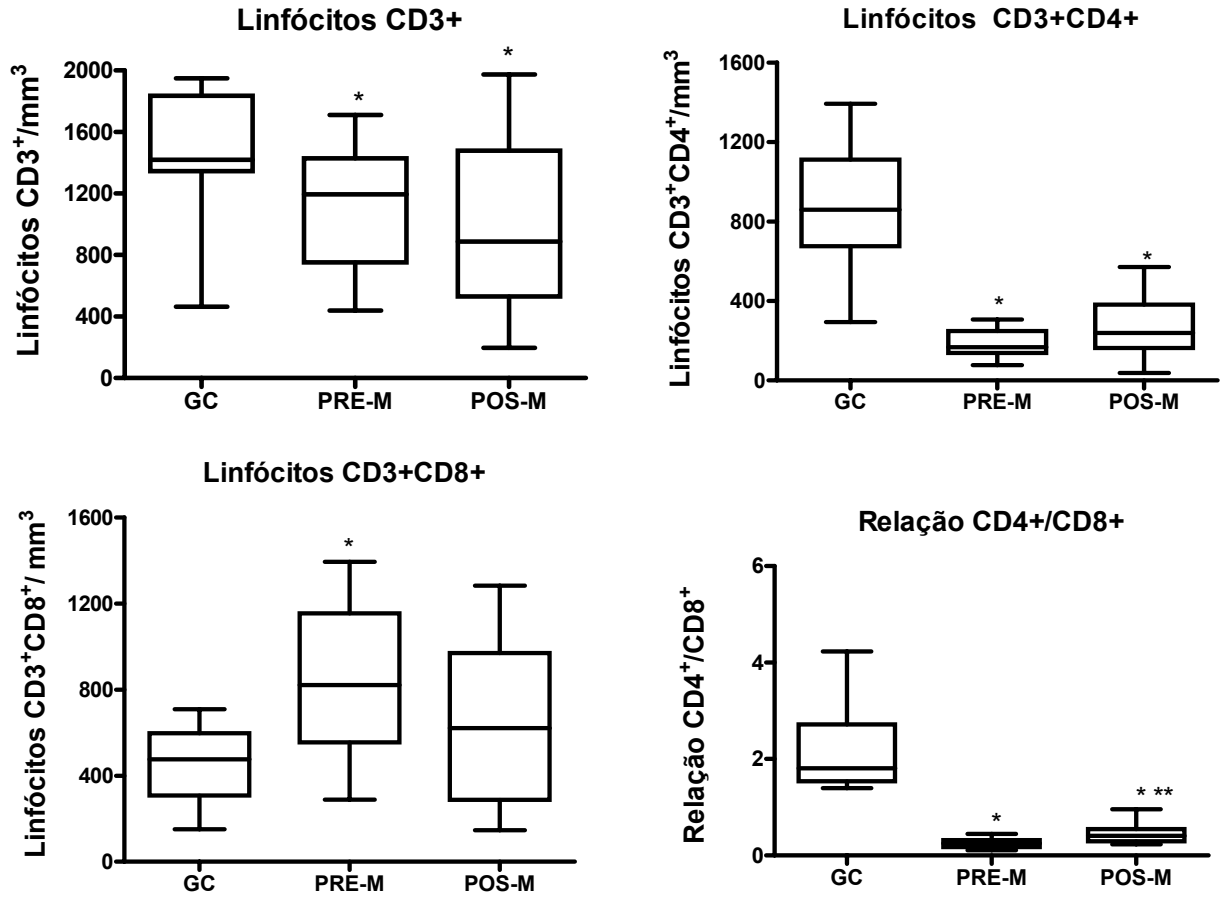


Figura 2 Perfil de linfócitos do sangue de pacientes portadores de mieloma múltiplo submetidos ao transplante autólogo de medula óssea pré-manutenção (PRE-M) e pós-manutenção (POS-M) comparados com Grupo controle (GC)

* $p < 0.05$, quando comparado com o grupo controle

** $p < 0.05$, quando comparados os grupos pré e pós-manutenção

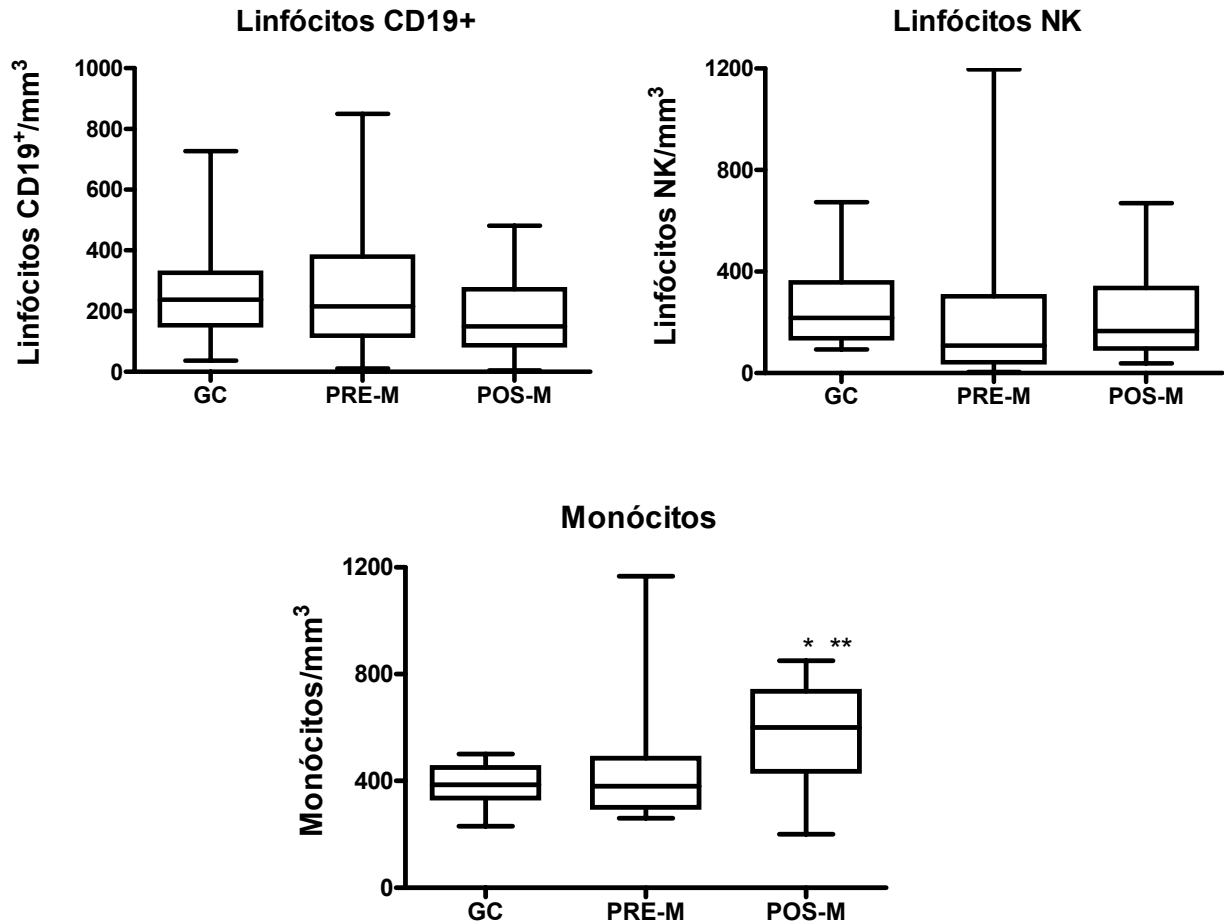


Figura 3 Perfil de linfócitos e monócitos do sangue de pacientes portadores de mieloma múltiplo submetidos ao transplante autólogo de medula óssea pré-manutenção (PRE-M) e pós-manutenção (POS-M) comparados com Grupo controle (GC)

* $p < 0.05$, quando comparado com o grupo controle

** $p < 0.05$ quando comparados os grupos pré e pós-manutenção

5.4 Impacto do tratamento de manutenção nos linfócitos e monócitos

Pareando os dados pré e pós manutenção dos 11 pacientes com amostras disponíveis, observou-se novamente aumento das medianas da relação de linfócitos T $CD4^+/CD8^+$ e de monócitos na avaliação após a manutenção. Não houve diferenças relevantes entre linfócitos T $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, linfócitos B e NK.

Estratificando a análise por subgrupos de manutenção, foi encontrado no grupo que recebeu DEX ($n = 7$), um aumento na mediana da relação de linfócitos

CD4⁺/CD8⁺. Não houve diferença nos linfócitos T CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, B, NK e monócitos.

No grupo que recebeu TAL+DEX (n=4), houve um aumento da mediana de monócitos (p= 0,057) sem outras diferenças nas demais células pesquisadas (Tabela 8 e Figura 4).

Tabela 8 Influência do tratamento de manutenção no perfil de linfócitos e monócitos após o TACH em pacientes com MM

	Manutenção N=11		Dexametasona N=7		Talidomida + Dexametasona N=4	
	PRE-M	POS-M	PRE-M	POS-M	PRE-M	POS-M
Leucócitos (mm ³)						
CD3 ⁺	1195 (439-1711)	891 (196-1974)	1287 (526-1711)	887 (196-1974)	994 (439-1316)	1153 (288-1479)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	214 (77-307)	252 (37-571)	214 (77-295)	252 (36-571)	218 (113-307)	274 (115-458)
CD3 ⁺ CD8 ⁺	821 (289 -1280)	621 (146-1283)	861 (400-1280)	583 (158-1282)	741 (288-1002)	788 (146-1013)
R CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0,27 (0,13-0,45)	0,41* (0,23-0,82)	0,17 (0,13-0,45)	0,41 ³ (0,23 – 0,82)	0,31 (0,25-0,39)	0,42 (0,27-0,79)
CD19 ⁺	215 (11-849)	105 (5 -481)	344 (11-849)	224 (4-481)	125 (43-277)	71 (38-90)
NK (CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺)	98 (4 -1197)	165 (39-669)	87 (4-1196)	136 (38-402)	108 (25-436)	168 (162-669)
Monócitos	410 (280-1166)	600 ¹ (320-850)	480 (280-1166)	500 (320-720)	320 (280-410)	790 ² (408-850)

*- Diferenças significativas estatisticamente $p < 0.05$, quando comparado com o grupo pré-manutenção

¹- $p = 0,087$, a comparação entre as medianas de monócitos entre o grupo pré-manutenção e pós-manutenção.

²- $p = 0,057$, a comparação entre as medianas de monócitos entre o grupo pré-manutenção e o subgrupo que recebeu Talidomida e Dexametasona

³- $p = 0,053$, a comparação entre as medianas dos valores da relação CD4⁺/CD8⁺ entre o grupo pré-manutenção e o subgrupo que recebeu dexametasona.

OBS: Nas células NK manutenção n=8; Dexa n=5; Tal +Dex n=3.

N: número; NK: Natural Killer.

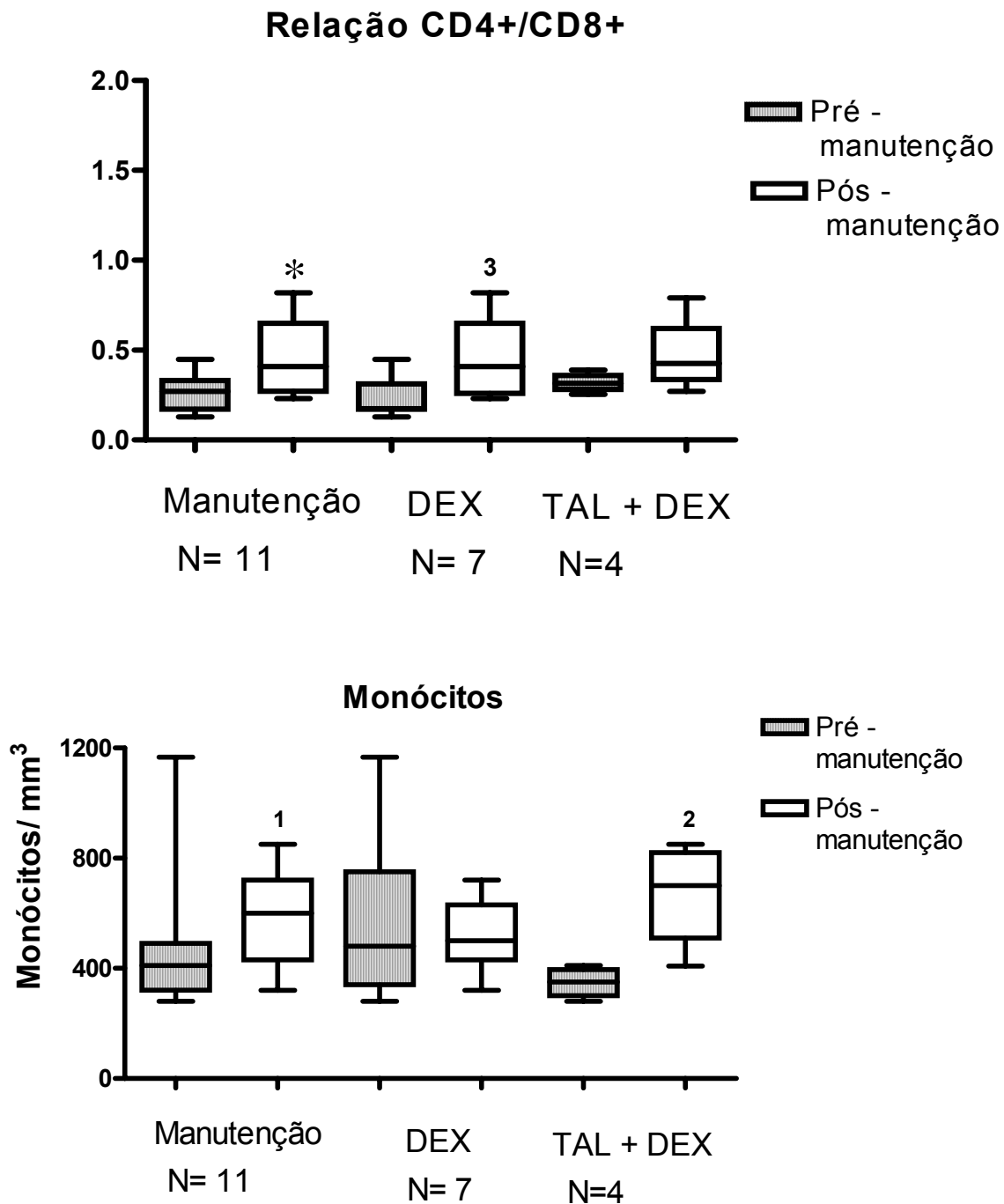


Figura 4 Perfil de monócitos e da relação CD4⁺/CD8⁺ de amostras pareadas de pacientes antes e após receberem manutenção e estratificados por grupo de manutenção.

*- $p < 0,05$, quando comparado com o grupo Pré-manutenção

1- $p = 0,087$, a comparação entre as medianas de monócitos entre o grupo pré-manutenção e pós-manutenção.

2- $p = 0,057$, a comparação entre as medianas de monócitos entre o grupo pré-manutenção e o subgrupo que recebeu Talidomida e Dexametasona

3- $p = 0,053$, a comparação entre as medianas dos valores da relação CD4⁺/CD8⁺ entre o grupo pré-manutenção e o subgrupo que recebeu Dexametasona.

5.5 Avaliação de linfócitos e monócitos no sangue de pacientes que receberam os regimes de manutenção Dexametasona ou Talidomida e Dexametasona

Ao buscar possíveis diferenças não evidenciadas anteriormente, foi estabelecida comparação da mediana dos valores de linfócitos e monócitos entre o GC e os subgrupos DEX e TAL-DEX.

Desta forma ao confrontar o GC (n=14) com o subgrupo DEX (n=9), observou-se diminuição de linfócitos T $CD3^+CD4^+$, da relação de linfócitos $CD4^+/CD8^+$ e um aumento de monócitos ($p= 0,054$), no grupo que passou por intervenção terapêutica.

Em seguida foi feito o mesmo com o GC versus o subgrupo TAL-DEX (n= 8), e os resultados observados foram: diminuição de linfócitos T $CD3^+$ ($p=0,070$), $CD3^+CD4^+$, da relação $CD4^+/CD8^+$, $CD45^+19^+$ ($p=0,060$) e aumento de monócitos. Não houve diferença nas células $CD3^+CD8^+$ e NK nos pacientes com mieloma.

Por último a comparação entre os subgrupos DEX versus TAL-DEX (n=8), não revelou diferenças nos parâmetros do sistema imune investigados (Tabela 9, Figuras 5, 6 e 7).

Tabela 9 Análise de linfócitos e monócitos de pacientes com mieloma múltiplo que receberam os regimes de manutenção com Dexametasona ou Talidomida e Dexametasona

Leucócitos (mm³) mediana (min - Max)	Grupo Controle N=14	Pós-Manutenção DEX N=9	Pós-Manutenção TAL-DEX N=8
CD3⁺	1419 (464-1949)	887 (195-1973)	911 ¹ (288-1612)
CD3⁺CD4⁺	859 (294 – 1391)	252 * (37-571)	209 * (115-458)
CD3⁺CD8⁺	476 (151-708)	583 (158-1282)	625 (146-1205)
R CD4⁺/CD8⁺	1,8 (1,4-4,2)	0,41 * (0,23-0,96)	0,38 * (0,27-0,79)
CD19⁺	238 (37-727)	224 (5-481)	109 ² (38-270)
NK (CD3⁻CD56⁺CD16⁺)	217 (93-674)	120 (39-403)	202 (95-669)
Monócitos	385 (230-500)	500 ³ (200-760)	605 * (408-850)

* - Diferenças significativas estatisticamente $p < 0.05$, quando comparado com GC.

¹ - $p = 0.07$ quando comparado mediana de células CD3⁺ entre subgrupo que recebeu Talidomida e Dexametasona e o GC.

² - $p = 0.06$ quando comparado mediana de células CD45⁺CD19⁺ entre subgrupo que recebeu Talidomida e Dexametasona e o GC.

³ - $p = 0.054$ quando comparado mediana de monócitos entre o grupo que recebeu dexametasona e GC

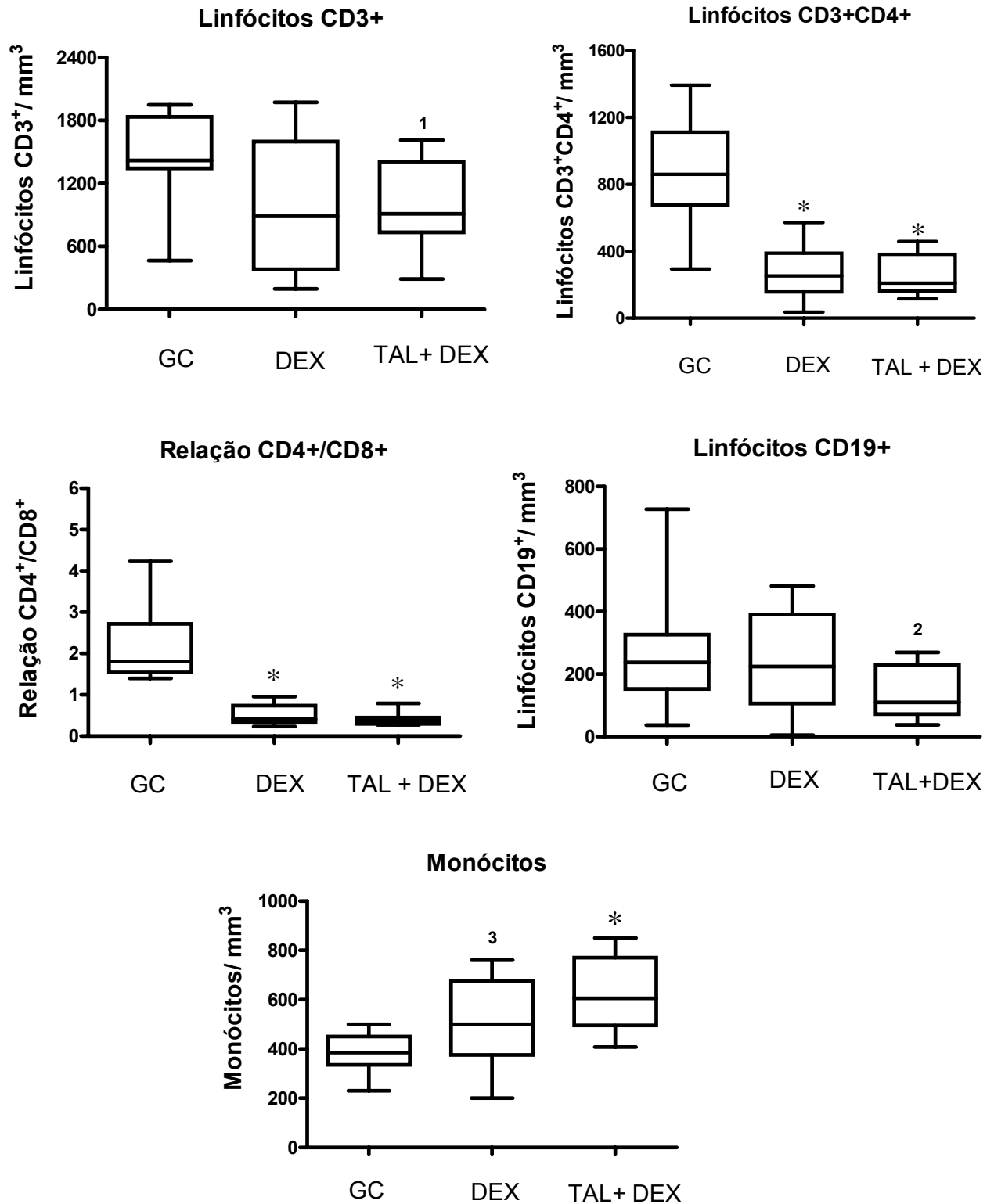


Figura 5 Análise de linfócitos T CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, de relação CD4⁺/CD8⁺, de linfócitos B e de monócitos. Comparação entre o Grupo controle e os subgrupos que receberam Dexametasona e Talidomida+Dexametasona

* - p= 0,05, comparado com o grupo controle.

¹ - p= 0,07 quando comparado mediana de células CD3⁺ entre subgrupo que recebeu Talidomida e Dexametasona e o GC.

² - p= 0,06 quando comparado mediana de células CD45⁺CD19⁺ entre subgrupo que recebeu Talidomida e Dexametasona e o GC.

³ - p= 0,054 quando comparado mediana de monócitos entre o grupo que recebeu dexametasona e GC

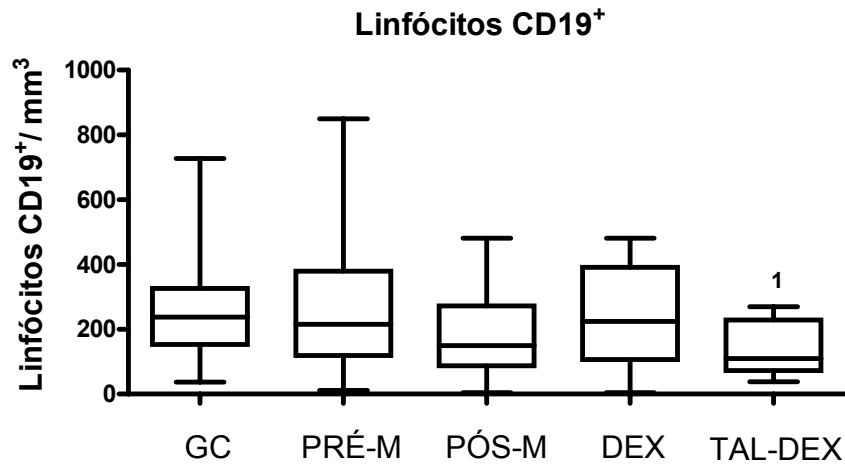


Figura 6 Distribuição da população de linfócitos B CD19⁺ nos diversos grupos analisados no estudo.

GC: grupo controle, PRÉ-M: grupo pré-manutenção; PÓS-M: pós-manutenção; DEX: subgrupo Dexametasona; TAL-DEX: subgrupo que recebeu talidomida e dexametasona.

¹ – p= 0.060 quando comparado mediana de células CD19⁺ entre subgrupo que recebeu Talidomida e Dexametasona e o GC.

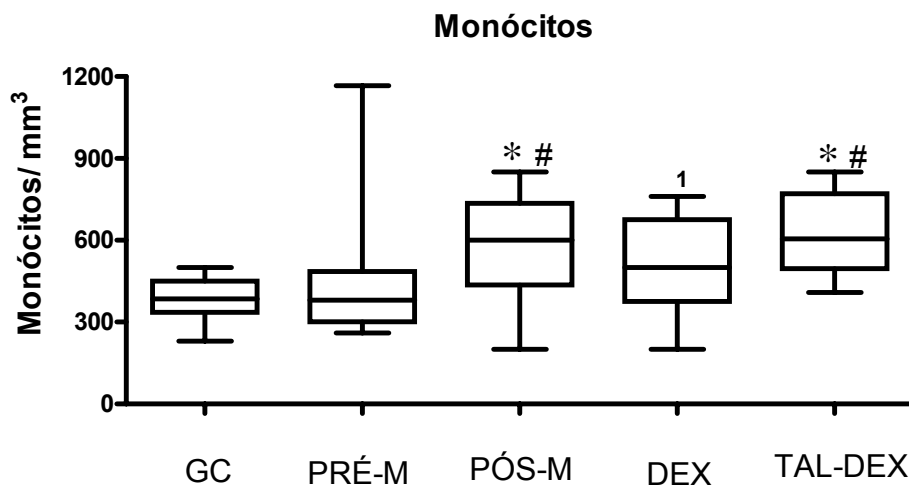


Figura 7 Distribuição de monócitos nos diversos grupos analisados no estudo.

GC: grupo controle, PRÉ-M: grupo pré-manutenção; PÓS-M: pós-manutenção; DEX: subgrupo Dexametasona; TAL-DEX: subgrupo que recebeu talidomida e dexametasona

* - Representa diferença significativa estatisticamente $p \leq 0.05$, comparado com o grupo controle.

- Representa diferença significativa estatisticamente $p \leq 0.05$, comparado com o grupo pré-manutenção.

¹ – p= 0.054 quando comparado mediana de monócitos entre subgrupo que recebeu Dexametasona e o GC.

5.6 Expansão de células dendríticas em pacientes com mieloma múltiplo

Através do protocolo de cultivo de monócitos com GM-CSF, IL-4 e TNF- α por 7 dias, foram geradas DCs com características imunofenotípicas e morfológicas típicas. (Figura 8 e 9)

A comparação entre o GC (n=12) e o grupo Pós-M (n=17) não mostrou diferença quanto a produção total de DCs. Entretanto houve aumento do número de monócitos e aumento da relação MO-DC no grupo de manutenção (P=0.054).

Posteriormente foi feita estratificação por subgrupo de manutenção, e comparados o grupo DEX (n= 9) e o TAL-DEX (n=8) com o GC. Não houve diferenças quanto ao número global de DCs obtidas e tampouco da relação MO-DC. Os grupos DEX e TAL+DEX também foram comparados entre si e o resultado final não revelou nenhuma alteração no rendimento de DCs (Tabela 10).

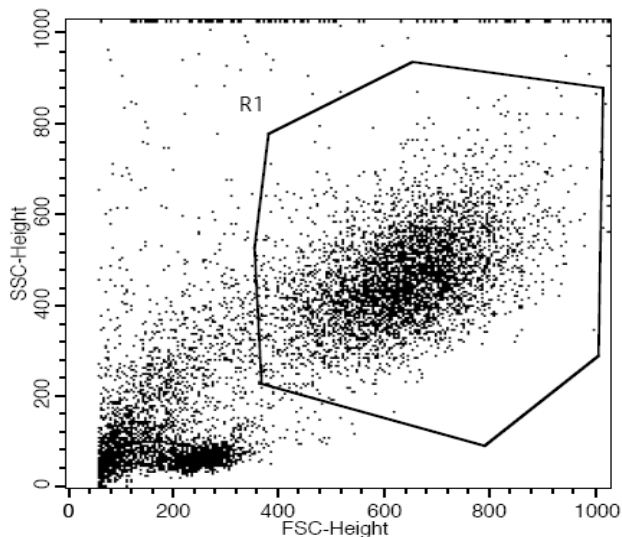


Figura 8 Análise das células dendríticas por citometria de fluxo ao final do sétimo dia de cultura.

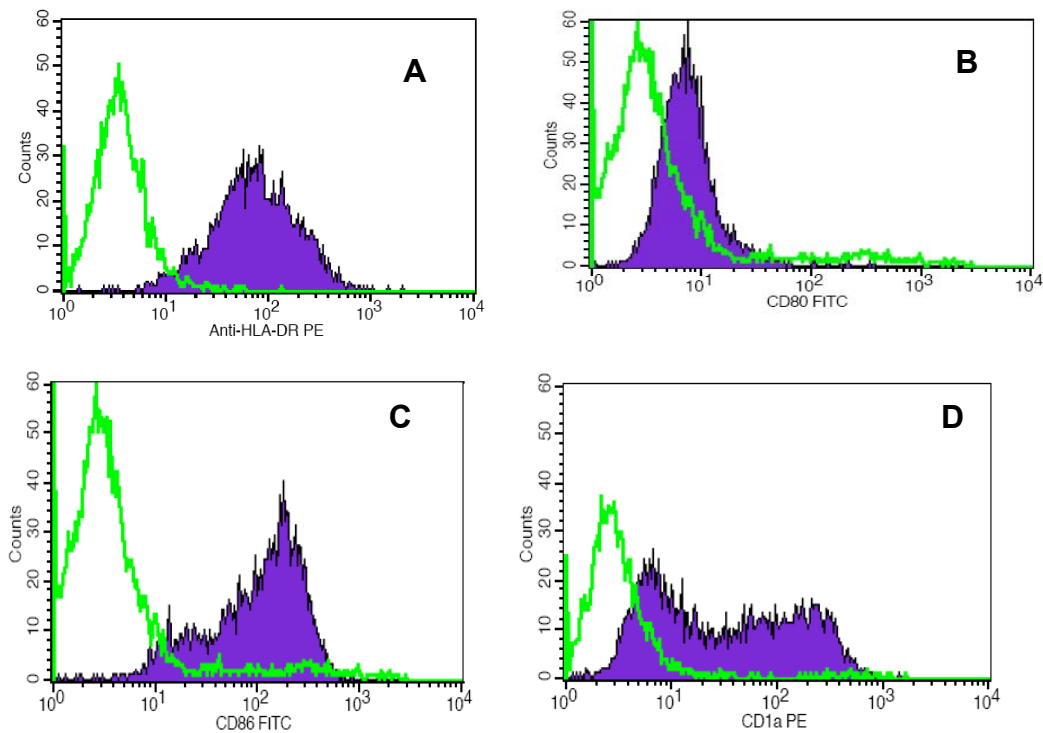


Figura 9 Análise por histograma das moléculas de superfície de células dendríticas. A análise com anticorpo fluorescente para pesquisa do HLA-DR e isotipo controle. B análise com anticorpo fluorescente para pesquisa do CD80 e isotipo controle. C análise com anticorpo fluorescente para pesquisa do CD86 e isotipo controle e D análise com anticorpo fluorescente para pesquisa do CD1a e isotipo controle.

Tabela 10 Tratamento de manutenção e rendimento de células dendríticas

	N	Monócitos mm³	Dendríticas Totais mm³	Relação MO-DC
GC	12	385 (230-500)	43 (24-88)	9 (4-19)
DEX	9	500 ¹ (200-760)	42 (3-120)	17 (5-65)
TAL+ DEX	8	605* (408-850)	64 (12-167)	13 (4-36)
Pós-M	17	600* (200-850)	43 (3-167)	16 ² (4-65)

*- Diferenças significativas estatisticamente $p < 0.05$, quando comparado com GC.

¹ - $p = 0.054$ quando comparado mediana de monócitos entre subgrupo que recebeu Dexametasona e o GC.

² - $p = 0.054$ quando comparado relação monócitos- dendríticas entre o grupo que recebeu manutenção e o GC.

GC: grupo controle; DEX: subgrupo que recebeu dexametasona; TAL+DEX: subgrupo que recebeu talidomida e dexametasona; Pós-M: grupo pós-manutenção. Relação MO-DC: relação monócitos-dendríticas.

5.7 Fatores potencialmente envolvidos na geração de células dendríticas

5.7.1 Status da doença após o tratamento

O grupo RC1 (n=13) ao ser comparado com o GC, apresentou maior número de monócitos e da relação MO-DC, enquanto o número total de dendríticas não variou entre os dois grupos.

O grupo RP1 (n=4) ao ser comparado com o GC apresentou aumento do número mediano de monócitos, enquanto o número total de dendríticas e a relação MO-DC não variou entre os dois grupos.

Na comparação entre os dois subgrupos de tratamento, não foram constatadas diferenças (Tabela 11).

Tabela 11 Fatores potencialmente envolvidos na obtenção de células dendríticas *in vitro*

	N	Monócitos mm ³	Dendríticas Totais mm ³	Relação Monócitos/DC
Grupo Controle	12	385 (230-500)	43 (24-88)	9 (4-19)
Status da Doença				
RC/RPMB (RC1)	13	600 * (200-850)	42 (3-166)	17 * (4-65)
RP/RMIN (RP1)	4	555* (490-760)	55 (36-102)	9 (6-21)
Tempo de Tratamento				
≤ 4 meses (TP1)	7	610* (430-850)	78 ² (20-120)	9 (5-30)
> 4 meses (TP2)	10	525 ¹ (200-790)	32 ** (3-166)	20 *, ³ (4-65)
Beta 2 microglobulina				
≤ 3,5 (B1)	10	605* (200-790)	46 (3-166)	16 (4-65)
> 3,5 (B2)	7	500* (408-850)	43 (12-120)	11 (5-36)

* - Diferenças significativas estatisticamente $p < 0.05$, quando comparado com GC

** - Diferenças significativas estatisticamente $p < 0.05$, quando comparados grupos entre si.

¹ $p = 0.055$ quando comparados monócitos do grupo que teve tempo de manutenção maior que 4 meses com o GC

² $p = 0.083$ quando comparadas dendríticas totais do grupo que teve tempo de manutenção menor que 4 meses com o GC.

³ $P = 0.070$, quando comparada relação monócito-dendríticas entre os grupos com tempo de manutenção maior que 4 meses e menor que 4 meses.

5.7.2 Tempo de manutenção

De acordo com o tempo de manutenção, observou-se que o grupo TM1 (n=7) apresentou aumento da mediana dos monócitos e das células dendríticas totais ($p=0.083$) enquanto a relação MO-DC não apresentou diferença quando

comparado ao GC.

O grupo TM2 (n= 10), apresentou aumento da relação MO-DC e do número de monócitos ($p=0.055$) e não apresentou diferença no número total de DCs em comparação ao GC.

Na comparação entre TM1 e TM2 houve uma diminuição do número total de dendríticas obtidas e aumento da relação MO-DC ($p=0.070$) para o grupo que recebeu manutenção por mais 4 meses (Tabela 11).

5.7.3 Beta-2 Microglobulina

Seguindo a mesma linha de investigação anterior. Os grupos B1 e B2 ao serem comparados ao GC, apresentaram isoladamente aumento de monócitos e não houve diferenças no número total de DCs e na relação MO-DC. A comparação dos grupos B1 e B2 entre si, não teve diferença relevante em nenhum dos parâmetros de rendimento da cultura de DCs (Tabela 11).

5.8 **Variáveis correlacionadas ao rendimento de células dendríticas**

A análise de correlação entre as variáveis número de monócitos, número de células dendríticas, relação monócito/dendrítica, idade, β 2-micro, TM, TM1, TM2, tempo pré e pós-manutenção evidenciou apenas correlação entre o número de monócitos e o número de DCs total ($r = 0,581$; $p = 0,014$).

A única variável identificada como associada ao número de células dendríticas totais obtidas nas culturas, foi o número de monócitos ($p= 0.074$) por análise de regressão linear. Não houve associação entre DCs total e o subgrupo de tratamento (DEX x TAL-DEX, $p= 0,330$), beta2-micro ($p=0,354$), tempo de

manutenção ($p=0,158$) e status de doença ($p=0,763$).

5.9 Padrão de moléculas coestimulatórias de superfície nas células dendríticas de portadores de mieloma múltiplo submetidos a manutenção.

Foi feita comparação entre a mediana dos valores de IF dos marcadores: CD1a, CD80, CD86, HLA-DR entre o grupo Pós-M e o GC.

Não foram encontradas diferenças significativas em relação às moléculas coestimulatórias de superfície nos dois grupos. Também não houve diferença após comparação estratificada por subgrupos DEX e TAL-DEX com o GC. E da mesma forma quando afrontados os dois subgrupos, não houve diferença em nenhuma das moléculas de superfície pesquisadas. (Tabela 12 e Figuras 10 A e B e 11 A e B).

Tabela 12 Moléculas de superfície de células dendríticas nos diferentes grupos de tratamento

	N	CD1a	CD80	CD86	HLA-DR
Grupo Controle	11				
DC (d+7)		22 (9-51)	7 (4-18)	17 (6-46)	53 (6-125)
Mieloma Pós-Manutenção	17				
DC (d+7)		18 (4-187)	7 (3-20)	21 (5-32)	23 (6-291)
TAL-DEX	8				
DC (d+7)		19 (12-140)	9 (3-20)	24 (7-32)	23 (6-34)
DEX	9				
DC (d+7)		18 (4-187)	6 (3-17)	18 (5-30)	20 (6-43)

D+7: Último dia do cultivo de células mononucleares com citocinas; N= número de indivíduos investigados; DC: célula dendrítica; TAL-DEX: talidomida e dexametasona; DEX: Dexametasona

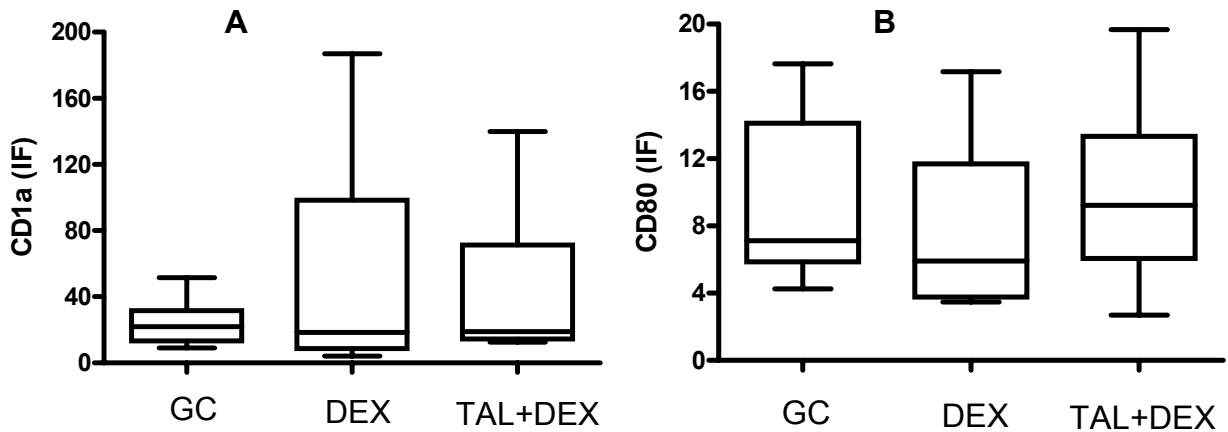


Figura 10 A e B Moléculas coestimulatórias de superfície das células dendríticas geradas *in vitro*. Estão apresentados os resultados da mediana do índice de fluorescência (IF) dos marcadores de superfície CD1a e CD80. Foram comparados os subgrupos que receberam Dexametasona e Talidomida+Dexametasona com o grupo controle. Índice de Fluorescência (IF): razão entre MFI (intensidade mediana de fluorescência) do marcador e MFI do isotipo controle.

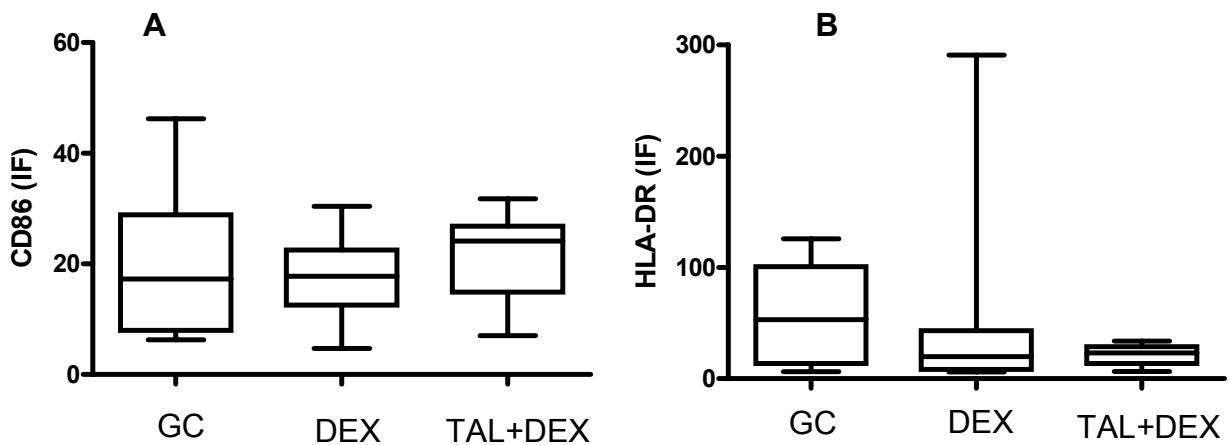


Figura 11 Moléculas de superfície das células dendríticas geradas *in vitro*. Em 11A está representado o marcador CD86 e em 11B a molécula MHC classe II, HLA-DR. Os resultados da mediana do índice de fluorescência (IF) foram comparados entre os subgrupos que receberam Dexametasona e Talidomida+Dexametasona e grupo controle.

6 DISCUSSÃO

Foram analisados pacientes transplantados que participavam de um ensaio clínico dos quais: 13 estavam em fase pré-manutenção e 17 pós-manutenção. E após randomização 9 foram tratados com DEX e 8 TAL-DEX. Para as comparações formou-se um Grupo Controle com 14 indivíduos sadios.

Encontrou-se uma diminuição dos linfócitos T $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, da relação $CD4^+/CD8^+$ e aumento de linfócitos T $CD8^+$, no grupo Pré-M em relação ao grupo controle. Este grupo após a manutenção apresentou as mesmas diferenças com exceção dos linfócitos T $CD3^+CD8^+$ que apresentaram normalização dos valores e dos monócitos que apresentaram um aumento após a fase de manutenção.

Não foram encontradas diferenças nas células NK e linfócitos B em nenhum dos dois grupos.

Como as análises de linfócitos e monócitos foram feitas em dois momentos distintos em cerca de 4 meses no grupo Pré-M e 11 meses no grupo Pós-M após o TACH, foi possível apreciar o comportamento dessas células e correlacionar com as informações disponíveis sobre a reconstituição imunológica após o TACH.

A supressão de linfócitos T $CD3^+CD4^+$, esteve presente no grupo Pré-M e persistiu no grupo Pós-M com discreto aumento das contagens. Esse achado está de acordo com o de outros pesquisadores que já demonstraram ocorrer uma profunda redução destas células nos primeiros meses após o TACH e uma recuperação lenta que pode durar mais que 2 anos.^{9, 80}

A explicação deste fato está na dependência do timo no processo de ontogenia destas células e uma incapacidade tímica de restabelecer as contagens

normais em parte por seu processo natural de involução nos adultos e também por toxicidade gerada pela QC e pelo regime de condicionamento do transplante.⁹

Os linfócitos T $CD3^+CD8^+$ apresentaram aumento no grupo Pré-M e normalizaram seus valores quando foram reavaliados após a manutenção.

A expansão clonal de células T $CD3^+CD8^+$, está descrita em outros estudos e sua duração varia de 1 a 2 anos após o transplante.⁸⁰ A explicação definitiva para este fenômeno não está completamente elucidada embora existam evidências que a depleção linfocitária após o TACH eleva os níveis séricos de citocinas como a interleucina 15 e 7 e estas por sua vez expandem clones de células $CD8^+$ de memória central ($CD45RA^-CCR7^+$), de memória efetora ($CD45RA^-CCR7^-$) e células efetoras ($CD45RA^+CCR7^-$) poupando as células T $CD8^+$ naive.¹⁰¹

Em nosso estudo o retorno aos valores normais ocorreu poucos meses mais precoce que o descrito, talvez podendo representar uma influência da talidomida e da dexametasona suprimindo a produção destas citocinas e consequentemente reduzindo mais precocemente a expansão desta subpopulação de células.

A relação $CD4^+/CD8^+$ manteve-se diminuída antes e após o tratamento de manutenção em comparação com o grupo controle. Porém, notou-se uma discreta elevação quantitativa após decorrer do tratamento. Resultado este que está de acordo com o de outros investigadores que demonstraram um comportamento semelhante ao das células $CD3^+CD4^+$ após o TACH.⁹

Não houve diferenças quantitativas das células NK em nenhum dos períodos investigados e subgrupos que participaram desta análise.

Nossos resultados encontram suporte na informação que este linfócito apresenta uma recuperação mais precoce que os outros, em geral de 14 dias a 1 mês após o TACH.

Para justificar esse fato, além dessas células não precisarem do timo para reconstituírem-se, acredita-se que sua rápida recuperação representa um mecanismo de defesa que é poupado pelo organismo. Sabe-se que a função primordial desta subpopulação de linfócitos é na imunidade inata contra vírus e agentes intracelulares. E esse é um mecanismo provisório e inespecífico enquanto o organismo monta um sistema de defesa mais eficiente com uma resposta imune, restrita ao MHC e mediada pela cooperação de células dendríticas, linfócitos T e B.¹⁰²

Os linfócitos B não apresentaram modificações em suas contagens tanto no grupo Pré-M quanto no Pós-M. Este dado contrasta com os resultados apresentados em outros trabalhos, cujas contagens destas células têm um padrão de recuperação em 6 meses seguida de elevação e platô em um prazo de 9 meses a 2 anos, estabilizando-se com valores maiores do que em indivíduos sadios⁸⁰.

Além disso, no subgrupo TAL-DEX foi evidenciada uma diminuição de células CD45⁺CD19⁺ ($p=0,060$) o que difere de um estudo semelhante, que não encontrou influência da talidomida nas células B de pacientes com MM.¹⁰

Os valores dos monócitos apresentaram-se normais após o TACH e aumentados após a manutenção. Esse resultado surpreendeu os investigadores uma vez que, estima-se uma normalização dos seus valores precoce. Em geral ocorre aumento no primeiro mês do TACH como resultado de uma recuperação vigorosa da medula óssea em resposta a supressão pelo agente quimioterápico e pelo estímulo gerado pelo uso de fatores crescimento no órgão hematopoético. E após dois meses, a expectativa é estabilização desses valores.⁸⁰

Buscando entender melhor esta alteração, incomum nessa fase após o TACH, foi feita análise por tipo de manutenção utilizada. Em ambos subgrupos foi

revelado o aumento de monócitos porém quando feita uma pesquisa pareada usando como controle os próprios pacientes em fase pré-manutenção, somente o subgrupo TAL-DEX teve aumento de monócitos. Estes dados aproximam-se dos encontrados em um estudo alemão, que descreveu um aumento de monócitos em pacientes tratados com talidomida associada a QC.¹⁰

O subgrupo DEX embora com uma associação mais fraca, também revelou um aumento de monócitos ($p= 0,054$) quando comparado com grupo controle. Esta informação não apresenta relato na literatura. Está descrito que entre os efeitos da dexametasona no hemograma ocorre neutrofilia, linfopenia e monocitopenia 48 horas após o seu uso e que a recuperação de monócitos ocorre logo em seguida atingindo valores acima do normal.¹⁰³ Em outro trabalho que investigou o potencial dessa droga na mobilização de células tronco hematopoéticas, demonstrou-se uma fraca porém presente capacidade de recrutar progenitores de granulócitos e monócitos.¹⁰⁴

Partindo dessas informações e procurando evitar os efeitos a curto prazo nas populações de linfócitos e monócitos acarretados pela dexametasona, o presente estudo estabeleceu nos critérios de inclusão que as amostras de sangue fossem colhidas somente após 3 semanas do uso deste fármaco.

Ressalta-se que pelo nosso conhecimento, a descrição dessa alteração nos monócitos com o uso de TAL-DEX após o TACH, está sendo feita pela primeira vez no presente estudo.

Como limitações do estudo não foi possível investigar correlações entre a monocitose com variáveis de interesse clínico para saber se essa nova informação tem algum outro significado de interesse científico. Está em andamento uma avaliação mais detalhada do perfil dos monócitos deste estudo, comparando os

resultados obtidos no hemograma (aqui apresentados), com os obtidos na região de monócitos definida por citometria e nas células marcadas com o anticorpo CD14⁺.

As células dendríticas foram geradas em 17 culturas de monócitos no grupo Pós-M e em 12 indivíduos saudáveis.

A obtenção de células dendríticas foi semelhante no grupo de pacientes em manutenção que estavam em uma mediana de 11 meses após o TACH e o Grupo de indivíduos saudáveis. Este resultado teve similaridade com o publicado por Schutt e cols. (2005) que também não encontrou obstáculos na geração de dendríticas em pacientes com MM transplantados. Esse estudo mostrou ainda que pacientes que receberam talidomida tiveram maior número de DCs do que os que não receberam este tratamento⁴⁹.

No presente estudo a análise por subgrupo apesar do grupo TAL-DEX apresentar uma maior mediana de células dendríticas totais não houve diferença estatística quando comparado ao GC e ao subgrupo DEX.

Foi encontrado no grupo Pós-M maior relação MO-DC e aumento de monócitos comparado ao controle.

A interpretação mais plausível para este achado baseou-se no fato que o aumento de monócitos que ocorreu sobretudo com o uso de drogas imunomoduladoras durante a manutenção, foi capaz de elevar a produção de DCs e equilibrar o resultado final entre os dois grupos.

Dando suporte a esta afirmativa, a única variável correlacionada com o potencial de geração de células dendríticas, foi o número de monócitos.

A investigação de possíveis correlações entre o rendimento global de células dendríticas ao término das culturas com algumas variáveis de interesse clínico foi prejudicada pelo pequeno número de pacientes analisados. Não sendo possível

gerar conclusões definitivas.

Ainda assim com a finalidade de orientar pesquisas futuras, o grupo que recebeu manutenção até 4 meses demonstrou melhor rendimento que o que recebeu tratamento por mais tempo e que o grupo controle.

Estabelecer correlação entre o status da doença e os níveis de beta2 micro seria desejável, pois já foi demonstrado que essa proteína quando adicionada ao meio de cultura é capaz de impedir a produção de células dendríticas derivadas de monócitos.¹⁰⁵

O estudo demonstrou a capacidade de geração de células dendríticas maduras com características morfológicas, fenotípicas e funcionais similares entre o grupo de pacientes após a manutenção e o grupo controle.

No final das culturas houve modulação do marcador CD14 com conseqüente diminuição deste na superfície das células o que caracteriza a conversão do monócito para uma célula dendrítica madura (dados não apresentados).

A pesquisa dos marcadores de superfície de células dendríticas por citometria de fluxo nos pacientes Pós-M não apresentou diferenças com o grupo controle. E esta avaliação feita com os subgrupos DEX e TAL-DEX também não teve diferenças. Este resultado difere com o publicado por Schutt e cols. que demonstrou que pacientes com talidomida tem diminuição da expressão de CD1a, HLA-DR quando comparados ao GC. Pode ter importância nessas diferenças encontradas, o fato do outro estudo ter analisado pacientes que receberam talidomida junto a QC e não QAD e também ter usado protocolo de geração de DCS diferente do utilizado nesta investigação.

Apesar do curto período de 2 anos para este estudo experimental, foram realizadas 29 culturas celulares viáveis, foram empregadas técnicas convencionais

de citometria de fluxo em pelo menos 3 diferentes momentos em cada paciente. Foi possível responder aos objetivos formulados. Entretanto devido ao número pequeno de pacientes que atingiram o momento da manutenção no período analisado, não foi possível obter informações complementares com as variáveis clínicas de interesse.

Com relação as análises laboratoriais, não foi possível investigar a modulação das moléculas em um momento intermediário da culturas, antes do segundo acréscimo de citocinas no quinto dia de cultivo, o que poderia trazer informações adicionais sobre a biologia das DCs geradas *in vitro*. Outras informações de interesse biológico como a análise do perfil de citocinas secretado por estas células após serem afrontadas com linfócitos não foram investigados.

Este foi um estudo preliminar para a confecção de uma vacina com células dendríticas autólogas conjugadas a plasmócitos (Hibridomas), que está em desenvolvimento entre os dois serviços no HUCFF.

Através dele foi demonstrado que é possível obter células dendríticas autólogas no período de 1 ano após o TACH para aplicação em um futuro estudo fase I de imunoterapia.

Um achado interessante foi que, o uso da manutenção nesta fase parece favorecer o aumento de monócitos e equilibrar a obtenção de células dendríticas, que poderia estar prejudicada por outros fatores. E portanto com essa informação, o uso de talidomida e dexametasona por curto período (até 6 meses), parece não ser um impedimento para que os pacientes venham a participar de um protocolo de vacinação.

Apesar de um cenário em que o sistema imune esta em recuperação do TACH, a doença de base encontra-se controlada na maioria dos pacientes, isto faria esse um momento propício para a imunoterapia.

7 CONCLUSÃO

- 1) Em pacientes com mieloma múltiplo submetidos à manutenção após o TACH, foi observada diminuição de linfócitos $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, da relação $CD4^+/CD8^+$ e aumento de monócitos quando comparado a indivíduos sadios, em ambos esquemas terapêuticos (DEX ou TAL-DEX). No subgrupo TAL-DEX também foi observada diminuição de linfócitos B $CD19^+$. As células dendríticas apresentaram imunofenótipo normal.
- 2) Após a manutenção os pacientes apresentaram um aumento de monócitos e da relação $CD4^+/CD8^+$ em relação à fase pré-manutenção;
- 3) Não houve diferença nas populações de linfócitos e monócitos e células dendríticas entre os subgrupos de manutenção. No entanto, o número de monócitos necessários para gerar células dendríticas foi aproximadamente 2 vezes maior no grupo pós manutenção (9 versus 16 monócitos por célula dendrítica);
- 4) Não foi observada diferença nos marcadores de superfície de células dendríticas entre a população estudada, os subgrupos e o grupo controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Medeiros CR. Distúrbios dos plasmócitos e doenças correlatas. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R, editors. Hematologia Fundamentos e Prática. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 677-88.
2. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, *et al.* A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. N Engl J Med 1996 Jul 11;335(2):91-7.
3. Palumbo A, Facon T, Sonneveld P, Blade J, Offidani M, Gay F, *et al.* Thalidomide for treatment of multiple myeloma: 10 years later. Blood 2008 Apr 15;111(8):3968-77.
4. Attal M, Harousseau JL, Leyvraz S, Doyen C, Hulin C, Benboubker L, *et al.* Maintenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma. Blood 2006 Nov 15;108(10):3289-94.
5. Raje N, Hideshima T, Davies FE, Chauhan D, Treon SP, Young G, *et al.* Tumour cell/dendritic cell fusions as a vaccination strategy for multiple myeloma. Br J Haematol 2004 May;125(3):343-52.
6. Ruffini PA, Neelapu SS, Kwak LW, Biragyn A. Idiotypic vaccination for B-cell malignancies as a model for therapeutic cancer vaccines: from prototype protein to second generation vaccines. Haematologica 2002 Sep;87(9):989-1001.
7. Brown RD, Pope B, Murray A, Esdale W, Sze DM, Gibson J, *et al.* Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. Blood 2001 Nov 15;98(10):2992-8.
8. Harrison SJ, Cook G. Immunotherapy in multiple myeloma--possibility or probability? Br J Haematol 2005 Aug;130(3):344-62.
9. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M. Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. Blood 1998 Sep 1;92(5):1471-90.

10. Schutt P, Brandhorst D, Stellberg W, Poser M, Ebeling P, Muller S, *et al.* Immune parameters in multiple myeloma patients: influence of treatment and correlation with opportunistic infections. *Leuk Lymphoma* 2006 Aug;47(8):1570-82.
11. Harousseau JL. Maintenance treatment in multiple myeloma. *Ann Oncol* 2008 Jun;19 Suppl 4:iv54-5.
12. Schutt P, Buttkereit U, Brandhorst D, Lindemann M, Schmiedl S, Grosse-Wilde H, *et al.* In vitro dendritic cell generation and lymphocyte subsets in myeloma patients: influence of thalidomide and high-dose chemotherapy treatment. *Cancer Immunol Immunother* 2005 May;54(5):506-12.
13. National Cancer Institute. Disponível no endereço eletrônico. Disponível em: <http://seercancer.gov/csr/1975_2005/results_merged/sect_18_myeloma> Acesso em: 25 nov 2008. Journal [serial on the Internet]. Date.
14. Alexanian R, Haut A, Khan AU, Lane M, McKelvey EM, Migliore PJ, *et al.* Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA* 1969 Jun 2;208(9):1680-5.
15. Barlogie B, Smith L, Alexanian R. Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *N Engl J Med* 1984 May 24;310(21):1353-6.
16. Alexanian R, Barlogie B, Tucker S. VAD-based regimens as primary treatment for multiple myeloma. *Am J Hematol* 1990 Feb;33(2):86-9.
17. Anderson H, Scarffe JH, Ranson M, Young R, Wieringa GS, Morgenstern GR, *et al.* VAD chemotherapy as remission induction for multiple myeloma. *Br J Cancer* 1995 Feb;71(2):326-30.
18. Segeren CM, Sonneveld P, van der Holt B, Baars JW, Biesma DH, Cornellissen JJ, *et al.* Vincristine, doxorubicin and dexamethasone (VAD) administered as rapid intravenous infusion for first-line treatment in untreated multiple myeloma. *Br J Haematol* 1999 Apr;105(1):127-30.
19. Cavo M, Benni M, Ronconi S, Fiacchini M, Gozzetti A, Zamagni E, *et al.* Melphalan-prednisone versus alternating combination VAD/MP or VND/MP as primary therapy for multiple myeloma: final analysis of a randomized clinical study. *Haematologica* 2002 Sep;87(9):934-42.
20. Blade J, San Miguel JF, Alcalá A, Maldonado J, Sanz MA, Garcia-Conde J, *et al.* Alternating combination VCMP/VBAP chemotherapy versus

melphalan/prednisone in the treatment of multiple myeloma: a randomized multicentric study of 487 patients. *J Clin Oncol* 1993 Jun;11(6):1165-71.

21. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. Myeloma Trialists' Collaborative Group. *J Clin Oncol* 1998 Dec;16(12):3832-42.

22. McElwain TJ, Powles RL. High-dose intravenous melphalan for plasma-cell leukaemia and myeloma. *Lancet* 1983 Oct 8;2(8354):822-4.

23. Selby PJ, McElwain TJ, Nandi AC, Perren TJ, Powles RL, Tillyer CR, *et al.* Multiple myeloma treated with high dose intravenous melphalan. *Br J Haematol* 1987 May;66(1):55-62.

24. Barlogie B, Hall R, Zander A, Dicke K, Alexanian R. High-dose melphalan with autologous bone marrow transplantation for multiple myeloma. *Blood* 1986 May;67(5):1298-301.

25. Barlogie B. Advances in therapy of multiple myeloma: lessons from acute leukemia. *Clin Cancer Res* 1997 Dec;3(12 Pt 2):2605-13.

26. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, *et al.* High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003 May 8;348(19):1875-83.

27. Barlogie B, Tricot G, Anaissie E, Shaughnessy J, Rasmussen E, van Rhee F, *et al.* Thalidomide and hematopoietic-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2006 Mar 9;354(10):1021-30.

28. Blade J, Rosinol L, Sureda A, Ribera JM, Diaz-Mediavilla J, Garcia-Larana J, *et al.* High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. *Blood* 2005 Dec 1;106(12):3755-9.

29. Femand JP, Ravaud P, Chevret S, Divine M, Leblond V, Belanger C, *et al.* High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma: up-front or rescue treatment? Results of a multicenter sequential randomized clinical trial. *Blood* 1998 Nov 1;92(9):3131-6.

30. Palumbo A, Bringhen S, Petrucci MT, Musto P, Rossini F, Nunzi M, *et al.* Intermediate-dose melphalan improves survival of myeloma patients aged 50 to 70: results of a randomized controlled trial. *Blood* 2004 Nov 15;104(10):3052-7.

31. CIBMTR. Center for international blood and marrow transplant research. Disponível em: <<http://www.cibmtr.org/> em https://campusmcw.edu/AngelUploads/Content/CS_IBMTR2/_assoc/ECCBED0AF0A4492BB667FB6227DC7C06/summary05_Pt1_files/v3_documenthtm> Acesso em: 04 de nov 2008. Journal [serial on the Internet]. Date.
32. Ludwig H, Cohen AM, Polliack A, Huber H, Nachbaur D, Senn HJ, *et al.* Interferon-alpha for induction and maintenance in multiple myeloma: results of two multicenter randomized trials and summary of other studies. *Ann Oncol* 1995 May;6(5):467-76.
33. Barlogie B, Anderson K, *et al.* Comparable survival in multiple myeloma with high dose therapy MEL 140mg/m²plus TBI 12 GY autotransplants versus standard dose VBMCP and no benefit from interferon maintenance results from intergroup trial S9321. *Blood* 2003;102:42 a(abstract).
34. Drayson MT, Chapman CE, Dunn JA, Olujohungbe AB, Maclennan IC. MRC trial of alpha2b-interferon maintenance therapy in first plateau phase of multiple myeloma. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Haematol* 1998 Apr;101(1):195-202.
35. Cunningham D, Powles R, Malpas J, Raje N, Milan S, Viner C, *et al.* A randomized trial of maintenance interferon following high-dose chemotherapy in multiple myeloma: long-term follow-up results. *Br J Haematol* 1998 Jul;102(2):495-502.
36. Powles R, Raje N, Cunningham D, Malpas J, Milan S, Horton C, *et al.* Maintenance therapy for remission in myeloma with Intron A following high-dose melphalan and either an autologous bone marrow transplantation or peripheral stem cell rescue. *Stem Cells* 1995 Aug;13 Suppl 2:114-7.
37. Fritz E, Ludwig H. Interferon-alpha treatment in multiple myeloma: meta-analysis of 30 randomised trials among 3948 patients. *Ann Oncol* 2000 Nov;11(11):1427-36.
38. Interferon as therapy for multiple myeloma: an individual patient data overview of 24 randomized trials and 4012 patients. *Br J Haematol* 2001 Jun;113(4):1020-34.
39. Alexanian R, Barlogie B, Dixon D. High-dose glucocorticoid treatment of resistant myeloma. *Ann Intern Med* 1986 Jul;105(1):8-11.
40. Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K, Barlogie B. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood* 1992 Aug 15;80(4):887-90.

41. Berenson JR, Crowley JJ, Grogan TM, Zangmeister J, Briggs AD, Mills GM, *et al.* Maintenance therapy with alternate-day prednisone improves survival in multiple myeloma patients. *Blood* 2002 May 1;99(9):3163-8.
42. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, *et al.* Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999 Nov 18;341(21):1565-71.
43. Abdelkefi A, Ladeb S, Torjman L, Othman TB, Lakhal A, Romdhane NB, *et al.* Single autologous stem-cell transplantation followed by maintenance therapy with thalidomide is superior to double autologous transplantation in multiple myeloma: results of a multicenter randomized clinical trial. *Blood* 2008 Feb 15;111(4):1805-10.
44. Maiolino A, Hungria VTM, Oliveira-Duarte G, Oliveira LC, Mercante DR, Miranda ECM, *et al.* Thalidomide + Dexamethasone as maintenance after single stem cell transplantation improves progression free survival (PFS) in advanced multiple myeloma. A prospective Brazilian Randomized Trial. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2008 Nov;112:3703.
45. Dimopoulos MA, Anagnostopoulos A, Weber D. Treatment of plasma cell dyscrasias with thalidomide and its derivatives. *J Clin Oncol* 2003 Dec 1;21(23):4444-54.
46. Maiolino A, Nucci M, Hamerschlak N, Silla L, Rotolo M, Hungria V, *et al.* Brazilian group for study of high dose therapy and multiple myeloma. Autologous Haematopoietic stem cell transplantation for the treatment of multiple myeloma: a multicenter retrospective study. *EBMT; Prague meeting 2005:Abstract number:877.*
47. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2004 Oct 28;351(18):1860-73.
48. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007 May;121(1):1-14.
49. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Dec 20;102(51):18538-43.
50. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 2007 Jul 7;370(9581):59-67.

51. Kinlen L. Infections and immune factors in cancer: the role of epidemiology. *Oncogene* 2004 Aug 23;23(38):6341-8.
52. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002 Nov;3(11):991-8.
53. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001 May 17;411(6835):385-9.
54. Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med* 2007 Oct 11;357(15):1472-5.
55. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, *et al.* Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995 Sep 1;86(5):2041-50.
56. Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD, Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 1996 Jan 1;183(1):283-7.
57. Knight SC, Hunt R, Dore C, Medawar PB. Influence of dendritic cells on tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 Jul;82(13):4495-7.
58. Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, *et al.* Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med* 1996 Jan 1;183(1):87-97.
59. Nestle FO, Gilliet M, Alijagic S, Wiesner W, Grabbe S, Dummer R, *et al.* Vaccination of melanoma patients with peptide-pulsed dendritic cells. *Melanoma Res* 1997;7:S14 (Abstract).
60. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, *et al.* Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996 Jan;2(1):52-8.
61. Murphy G, Tjoa B, Ragde H, Kenny G, Boynton A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 1996 Dec;29(6):371-80.

62. Wen YJ, Ling M, Bailey-Wood R, Lim SH. Idiotype protein-pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 1998 Apr;4(4):957-62.
63. Bergenbrant S, Osterborg A, Holm G, Mellstedt H, Lefvert AK. Anti-idiotypic antibodies in patients with monoclonal gammopathies: relation to the tumour load. *Br J Haematol* 1991 May;78(1):66-70.
64. Pico JL, Castagna L, Bourhis JH. Recent progress in the biology of multiple myeloma and future directions in the treatment. *Hematol Cell Ther* 1998 Apr;40(2):45-61.
65. Massaia M, Borrione P, Battaglio S, Mariani S, Beggiato E, Napoli P, *et al.* Idiotype vaccination in human myeloma: generation of tumor-specific immune responses after high-dose chemotherapy. *Blood* 1999 Jul 15;94(2):673-83.
66. Reichardt VL, Okada CY, Liso A, Benike CJ, Stockerl-Goldstein KE, Engleman EG, *et al.* Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma--a feasibility study. *Blood* 1999 Apr 1;93(7):2411-9.
67. Koido S, Hara E, Homma S, Fujise K, Gong J, Tajiri H. Dendritic/tumor fusion cell-based vaccination against cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007 Sep-Oct;55(5):281-7.
68. Inaba K, Steinman RM, Pack MW, Aya H, Inaba M, Sudo T, *et al.* Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med* 1992 May 1;175(5):1157-67.
69. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992 Nov 19;360(6401):258-61.
70. Siena S, Di Nicola M, Bregni M, Mortarini R, Anichini A, Lombardi L, *et al.* Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp Hematol* 1995 Dec;23(14):1463-71.
71. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994 Apr 1;179(4):1109-18.

72. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002 Mar;2(3):151-61.
73. McIlroy D, Gregoire M. Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. *Cancer Immunol Immunother* 2003 Oct;52(10):583-91.
74. Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 2001 Jul;22(7):394-400.
75. Neves AR, Ensina LF, Anselmo LB, Leite KR, Buzaid AC, Camara-Lopes LH, *et al.* Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. *Cancer Immunol Immunother* 2005 Jan;54(1):61-6.
76. Pratt G, Goodyear O, Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007 Sep;138(5):563-79.
77. Raitakari M, Brown RD, Gibson J, Joshua DE. T cells in myeloma. *Hematol Oncol* 2003 Mar;21(1):33-42.
78. Perez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso M, Moro MJ, Martin-Nunez G, Galende J, *et al.* Characterization of bone marrow T cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and plasma cell leukemia demonstrates increased infiltration by cytotoxic/Th1 T cells demonstrating a skewed TCR-Vbeta repertoire. *Cancer* 2006 Mar 15;106(6):1296-305.
79. Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol* 1996 Nov;60(5):563-72.
80. Geddes M, Storek J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007 Jun;20(2):329-48.
81. Mackall CL, Granger L, Sheard MA, Cepeda R, Gress RE. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* 1993 Oct 15;82(8):2585-94.
82. LeBlanc R, Hideshima T, Catley LP, Shringarpure R, Burger R, Mitsiades N, *et al.* Immunomodulatory drug costimulates T cells via the B7-CD28 pathway. *Blood* 2004 Mar 1;103(5):1787-90.

83. Haslett PA, Hanekom WA, Muller G, Kaplan G. Thalidomide and a thalidomide analogue drug costimulate virus-specific CD8⁺ T cells in vitro. *J Infect Dis* 2003 Mar 15;187(6):946-55.
84. Shannon EJ, Sandoval F. Thalidomide increases the synthesis of IL-2 in cultures of human mononuclear cells stimulated with Concanavalin-A, Staphylococcal enterotoxin A, and purified protein derivative. *Immunopharmacology* 1995 Nov;31(1):109-16.
85. McHugh SM, Rifkin IR, Deighton J, Wilson AB, Lachmann PJ, Lockwood CM, *et al.* The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen- and antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Clin Exp Immunol* 1995 Feb;99(2):160-7.
86. Davies FE, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai YT, *et al.* Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 2001 Jul 1;98(1):210-6.
87. Dredge K, Marriott JB, Dalglish AG. Immunological effects of thalidomide and its chemical and functional analogs. *Crit Rev Immunol* 2002;22(5-6):425-37.
88. Karrow NA, McCay JA, Brown RD, Musgrove DL, Pettit DA, Munson AE, *et al.* Thalidomide stimulates splenic IgM antibody response and cytotoxic T lymphocyte activity and alters leukocyte subpopulation numbers in female B6C3F1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000 Jun 15;165(3):237-44.
89. Pfeiffer S, Gooding RP, Apperley JF, Goldschmidt H, Samson D. Dendritic cells generated from the blood of patients with multiple myeloma are phenotypically and functionally identical to those similarly produced from healthy donors. *Br J Haematol* 1997 Sep;98(4):973-82.
90. Raje N, Gong J, Chauhan D, Teoh G, Avigan D, Wu Z, *et al.* Bone marrow and peripheral blood dendritic cells from patients with multiple myeloma are phenotypically and functionally normal despite the detection of Kaposi's sarcoma herpesvirus gene sequences. *Blood* 1999 Mar 1;93(5):1487-95.
91. Brimnes MK, Svane IM, Johnsen HE. Impaired functionality and phenotypic profile of dendritic cells from patients with multiple myeloma. *Clin Exp Immunol* 2006 Apr;144(1):76-84.
92. Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, *et al.* Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 1999 Jun 1;162(11):6473-81.

93. Mohty M, Stoppa AM, Blaise D, Isnardon D, Gastaut JA, Olive D, *et al.* Differential regulation of dendritic cell function by the immunomodulatory drug thalidomide. *J Leukoc Biol* 2002 Nov;72(5):939-45.
94. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003 Jun;121(5):749-57.
95. Durie BG, 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 Sep;36(3):842-54.
96. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, *et al.* International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005 May 20;23(15):3412-20.
97. Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, Moreau P, Genevieve F, Zandecki M, *et al.* Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 2001 Mar 15;97(6):1566-71.
98. Blade J, Samson D, Reece D, Apperley J, Bjorkstrand B, Gahrton G, *et al.* Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. *Br J Haematol* 1998 Sep;102(5):1115-23.
99. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Blade J, Barlogie B, Anderson K, *et al.* International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006 Sep;20(9):1467-73.
100. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009 Jan;23(1):3-9.
101. Williams KM, Hakim FT, Gress RE. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin Immunol* 2007 Oct;19(5):318-30.
102. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008 Aug 1;112(3):461-9.
103. Fauci AS. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. II. Differential effects of in vivo hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on in vitro expression of lymphocyte function. *Clin Exp Immunol* 1976 Apr;24(1):54-62.

104. Berardi A, Geraci L, Quaglietta AM, Di Bartolomeo G, Dragani A. Pharmacological mobilization of haemopoietic progenitor cells in human peripheral blood. *Haematologica* 1990 Jan-Feb;75 Suppl 1:15-7.
105. Xie J, Wang Y, Freeman ME, 3rd, Barlogie B, Yi Q. Beta 2-microglobulin as a negative regulator of the immune system: high concentrations of the protein inhibit in vitro generation of functional dendritic cells. *Blood* 2003 May 15;101(10):4005-12.

ANEXOS

Anexo I TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Caracterização de Células Dendríticas em Pacientes Portadores de Mieloma Múltiplo Submetidos a Estratégias Terapêuticas Baseadas no Risco.

Introdução:

O Mieloma Múltiplo é uma doença caracterizada por lesões ósseas, comprometimento dos rins e da medula óssea e infecções. Como conseqüências, a qualidade de vida do paciente é intensamente comprometida, padecendo de dores intensas por fraturas ósseas, necessitando de transfusões de sangue para controle da anemia.

Finalidade:

Este estudo nos permitirá comparar a produção e atividade de células apresentadoras de antígenos tumorais. Os resultados deste projeto nos permitirão compreender o comportamento destas células. Além disso, poderão contribuir para estabelecer um protocolo de imunoterapia que possa atingir a expectativa de uma terapêutica mais eficaz contra esta neoplasia.

Procedimento:

O paciente será submetido a uma coleta de 40 mL de sangue. As células vermelhas serão descartadas e as células brancas serão utilizadas nos experimentos. A utilização deste material será de uso exclusivo neste projeto de pesquisa e nenhum material será preservado.

Risco:

A coleta será realizada através de materiais descartáveis, o que não apresentará risco ao paciente.

Alternativa:

O paciente pode se recusar a participar do estudo sem prejuízo ao seu tratamento médico.

Consentimento:

Em virtude de considerar claras e satisfatórias as informações acima expostas eu, _____ voluntariamente, aceito participar do estudo sobre tratamento de mieloma múltiplo. Com garantia de sigilo que assegure minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos, quando da sua divulgação ou publicações científicas, e, garantia de acesso ao responsável pelo estudo, professor Hélio dos Santos Dutra, através do telefone: (21) 2562-2249.

Responsável: Professor Hélio dos Santos Dutra.

Assinatura: _____

Testemunha: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Pesquisador: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Anexo 2

Estágio Salmon Durie

Estágio I- Todos os seguintes achados

Hemoglobina > 10 g/dl

Cálcio sérico < 12 mg/dl

Estrutura óssea normal ou (escala 0)

plasmocitoma solitário no estudo radiológico

Ig G < 5 g/dl ou Ig A < 3 g/dl ou cadeia leve urinária < 4 g/24h em eletroforese

Estágio II- Achados entre os estágios I e III**Estágio III - Um ou mais dos achados abaixo**

Hemoglobina < 8,5 g/dl

Cálcio sérico > 12 mg/dl

Doença lítica óssea avançada (escala 3)

Ig G > 7 g/dl ou Ig A > 5 g/dl ou cadeia leve urinária > 12 g/24h em eletroforese

A - Função renal normal (creatinina < 2 mg/dl)**B** - Função renal anormal (creatinina > 2 mg/dl)

A escala de lesão óssea é: **0** sem lesão; **1** osteoporose; **2** lesões líticas; **3** destruição óssea extensa com fraturas.

Tabela Sistema Prognóstico Internacional

Sistema de Prognóstico Internacional (ISS)	
Estágio 1	β2-micro < 3.5 mg/dl Albumina > 3.5 g/dl
Estágio 2	β2-micro < 3.5 mg/dl Albumina < 3.5 mg/dl ou β2-micro 3.5-5.5 mg/dl
Estágio 3	β2-micro > 5.5

ISS – International score system , β2-micro- Beta2 –microglobulina
Ref no:105

Tabela -Sistema de prognóstico do Intergupo Francês de Mieloma (IFM)

Sistema prognóstico do grupo IFM	Número de Fatores	Associação de Fatores
<i>Baixo Risco</i>	0-1	$\beta 2$-micro < 2,5mg/dl + $\Delta 13$ - $\beta 2$-micro < 2,5 mg/dl + $\Delta 13$+ $\beta 2$-micro > 2,5 mg/dl + $\Delta 13$ -
<i>Alto Risco</i>	2	$\beta 2$-micro > 2,5mg/dl + $\Delta 13$ +

IFM-Intergupo Francês de Mieloma ; $\beta 2$ -micro-Beta2-microglobulina. Ref no-106

Tabela Critérios de resposta do Registro Internacional de Transplante de Medula óssea

Critérios de Resposta	Definição
Remissão completa (RC)	<p>Para a remissão completa o paciente deverá apresentar <u>todos</u> os itens abaixo: O não preenchimento de algum desses critérios, assim como a não realização da imunofixação (mesmo com eletroforese normal), classifica o paciente como tendo obtido resposta parcial muito boa ou resposta parcial.</p> <p>Ausência da proteína M original no soro e/ou urina, por eletroforese de proteínas e imunofixação, mantida por um mínimo de 6 semanas. A presença de bandas oligoclonais compatíveis com reconstituição imunológica não exclui a remissão completa</p> <p>Menos de 5% de plasmócitos em aspirado de medula óssea, ou, no caso de mieloma não secretor, em biópsia de medula óssea. Se a ausência da proteína M se mantiver por 6 semanas, o exame de medula é dispensável, exceto nos casos de mieloma não secretor.</p> <p>O não aumento no número de lesões líticas encontradas no diagnóstico. A evolução para fratura em lesão pré-existente não exclui a remissão completa</p> <p>Desaparecimento de plasmocitomas existentes</p>
Resposta Parcial Muito Boa (RPMB)	<p>Para resposta parcial muito boa o paciente deverá apresentar todos os itens abaixo: O não preenchimento de algum desses critérios classifica o paciente como tendo obtido resposta parcial.</p>
#	<p>Proteína M detectada no soro e na urina somente por imunofixação e não detectada por eletroforese ou redução da proteína M maior que 90% no soro e menor que 100 mg na urina em 24 horas.</p>
Resposta Parcial (RP)	<p><i>Para a remissão parcial o paciente deverá apresentar <u>todos</u> os itens abaixo:</i> <i>O não preenchimento de algum desses critérios classifica o paciente como tendo obtido resposta mínima.</i></p> <p>Mais que 50% na redução dos níveis da proteína M, mantido por um mínimo de 6 semanas.</p>
Resposta Parcial	<p>Redução na excreção de cadeia leve, em urina de 24 horas, de 90% ou para menos que 200 mg/24h, mantido por um mínimo de 6 semanas.</p>

Critérios de Resposta	Definição
(continuação)	<p>Para os pacientes com mieloma não secretor, a redução de pelo menos 50% dos plasmócitos em aspirado ou biópsia (se realizada) de medula óssea, mantido pelo um mínimo de 6 semanas.</p> <p>Redução de pelo menos 50% do tamanho dos plasmocitomas existentes, por avaliação clínica ou radiológica</p> <p>Estabilização no número de lesões líticas encontradas no diagnóstico. A evolução para fratura em lesão pré-existente não exclui a remissão parcial</p> <p>Para a resposta mínima o paciente deverá apresentar todos os itens abaixo:</p> <p>Redução de 25 a 49% dos níveis de proteína M, sustentados por um mínimo de 6 semanas</p> <p>Redução de 50 a 89% da excreção urinária de cadeia leve, em urina de 24 horas, mesmo se acima de 200 mg/24h, mantido por pelo menos 6 semanas.</p> <p>Para os pacientes com mieloma não secretor, a redução entre 25 a 49% dos plasmócitos no aspirado ou biópsia (se realizada) de medula óssea, mantido pelo um mínimo de 6 semanas.</p>
Resposta Mínima (Rmin)	<p>Redução de 25 a 49% no tamanho dos plasmocitomas avaliado clinicamente ou por radiologia</p> <p>Estabilização no número de lesões líticas encontradas no diagnóstico. A evolução para fratura em lesão pré-existente não exclui a remissão completa</p>
Não Resposta (NR)	<p>Considera-se não resposta quando o paciente não apresenta os critérios para doença mínima ou doença progressiva.</p>
Doença Estável	<p>Considera-se doença estável quando os níveis dos parâmetros avaliados flutuam em até 25%, mantidos assim por pelo menos 3 meses.</p> <p>Para os pacientes que não estejam em remissão completa, se caracteriza por um ou mais dos achados abaixo:.</p> <p>Aumento maior que 25% no nível sérico da proteína M, que também pode ser o aumento absoluto de, pelo menos, 5 g/dl no nível sérico, confirmados em no mínimo uma repetição do exame.</p>
Doença Progressiva (DP)	<p>Aumento maior que 25% na excreção da cadeia leve em urina de 24 horas, que também pode ser o aumento absoluto de, pelo</p>

Critérios de Resposta	Definição
Recaída de doença (RD)	<p>menos, 200 mg/24 da excreção, confirmados em no mínimo uma repetição do exame.</p> <p>Aumento maior que 25% de plasmócitos na medula óssea, em relação à avaliação da remissão, em aspirado ou biópsia, podendo ser considerado também o aumento absoluto de 10% nos plasmócitos.</p> <p>Aumento comprovado no tamanho das lesões líticas e plasmocitomas existentes</p> <p>Aparecimento de novas lesões líticas e/ou plasmocitomas</p> <p>Desenvolvimento de hipercalcemia (cálcio sérico > 11,5 mg/dl ou > 2,8 mmol/L), sem outra causa atribuída. A caracterização de recaída de doença requer um ou mais dos achados abaixo, nos pacientes em remissão completa:</p> <p>Reaparecimento da proteína M na urina ou sangue, por exame de imunofixação ou eletroforese de proteínas, confirmado em pelo menos uma repetição e excluindo a reconstituição oligoclonal.</p> <p>Presença de mais de 5% de plasmócitos na medula óssea por aspirado ou biópsia</p> <p>Aparecimento de novas, ou crescimento definitivo do tamanho, de lesões ósseas líticas ou plasmocitomas.</p> <p>Desenvolvimento de hipercalcemia (cálcio sérico > 11,5 mg/dl ou > 2,8 mmol/L), sem outra causa atribuída</p>

Proteína M- proteína monoclonal. #A categoria Resposta parcial Muito boa – foi inserida pois já faz parte de uma nova proposta de classificação.
Ref: 108,109, 110.

Anexo 3

Apresentações em congressos

1. Silva, GCA; Magalhães RJP, Maiolino A, Dutra HS. .Multiple Myeloma:Diferenciation of dendritic cells using monocytes. Presented in the oral session of the Hemo 2007.-Congress of the Brazilian Society of Hematology and Hemotherapy.

2- Magalhães R.J.P.1; Veranio-Silva, G. A.C.1; Leão, S.C.L.1; Pimenta, G.1; Dines, I.2 ; Pulcheri, W.A.,1; Rossi, M.I.D.3; Maiolino, A.1, Borojevic, R.3; Dutra, H.S.3 Serviço de Hematologia-HUCFF1, Lab. Multidisciplinar de Pesquisa-HUCFF2, Dep. Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas.3 UFRJ – Rio de Janeiro

Analysys of the mononuclear cells of the blood in patients with multiple myeloma after high dose therapy. Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia- Hemo 2006, 2006, Recife-PE. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2006. v. 28. p. 240-240.

3-Veranio-Silva GA; R, Magalhães; Leão SCL; G, Pimenta; Rumjanek VM; WA, Pulcheri; MID, Rossi; Maiolino, A; R, Borojevic; HS, Dutra. Functionality and Phenotypic Profile of Monocyte-Derived Dendritic Cells from Patients with Multiple Myeloma. In: XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology, 2006, Búzios-RJ. Anais do XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology, 2006.

Anexo 4 Tabelas com banco de dados do estudo

Tabela- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo

NO	Idade (anos)	Sexo	Raça	Tipo mm	Estádio SS	Estádio ISS	Grupo risco	Beta-2 Microglobulina (mg/l)	Cromossoma 13 (Fish)	Albumina (g/dl)
1	62	f	b	IgGk-l	II-A	1	Br	2	N	3.5
2	48	m	b	IgG	II-A	2	Br	2.1	N	3.2
3	57	f	b	IgG-k	II-A	1	Br	1.45	P	3.8
4	65	f	b	IgG-k	III-A	3	Br	16.4	N	3.8
5	58	m	b	kappa	III-B	2	Br	1.4	P	3.2
6	62	m	b	IgG-k	III-A	3	Br	6.8	N	3.3
7	58	m	b	IgG-l	II-A	2	Br	4.9	N	3.7
8	64	m	b	IgA-k	II-A	1	Br	2.3	N	4.8
9	59	m	n	IgA-l	II-A	1	Br	1.8	N	4
10	37	f	b	Kappa	III-A	1	Br	2.1	P	3.9
11	61	m	b	IgG-k	II-A	2	Br	2.1	N	3.3
12	56	m	pd	IgA-l	III-A	2	Br	3.8	N	3.5
13	29	m	b	IgA-l	III-A	1	Br	1.7		4.6
14	44	f	pd	Lambda	III-B	2	Ar	5.4	P	3.8
15	64	m	b	IgG-l	II-A	1	Br	3.3	N	4.2
16	47	m	b	IgA-k	III-B	2	Br	2.0	N	2.5
17	61	f	b	IgG-l	II-B	3	Br	17.3	N	3.6
18	59	m	pd	IgG-k	III-A	2	Br	3.7	N	3.9
19	58	m	b	IgG-l	III-A	2	Br	2.3	N	2.8

No- número do paciente no protocolo conforme entrada no estudo; sexo: f-feminino, m-masculino; Raça: b-branco, n-negro, pd-pardo; Estádio SS – Salmon Durie; Estádio ISI-International Staging System; Grupo de risco:BR – baixo risco, AR- alto risco; Pesquisa da deleção do cromossoma 13 por hibridização in situ.

Tabela – Pacientes distribuídos pelo tipo de regime de manutenção , tempo de manutenção e padrão de resposta

no	Regime de manutenção	Coleta PREM	Coleta POSM	Data PREM (dias)*	Data POS (dias)**	Tempo de Manutenção (dias)	Ptn M diagnostico (g/dl)	Ptn M PREM (g/dl)	Ptn M POSM (g/dl)	Status PREM	Status POSM
1	tal+dex	não	sim	131	754	623	3.48	2.24	1.13	RM	RPMB
2	tal+dex	não	sim	181	376	194	6.2	1.77	0	RP	RC
3	dex	não	sim	174	312	137	2.75	1.45	0.84	RM	RPMB
4	tal+dex	não	sim	129	333	203	4.2	2	1.17	RP	RPMB
5	dex	não	sim	129	318	189	5.6	1.25	0.6	RM	RP
6	tal+dex	sim	sim	159	333	174	5.46	2.76	1.69	RP	RP
7	dex	sim	sim	272	375	103	4.69	1.3	0	RPMB	RC
8	dex	sim	sim	168	514	346	1.81	0	0	RC	RC
9	tal+dex	sim	sim	117	327	210	1.1	0	0.5	RC	RPMB
10	dex	sim	sim	131	265	134	ns	0	0	RP	RC
11	tal+dex	sim	sim	215	273	58	2.53	0	0	RC	RC
12	dex	sim	sim	117	224	107	3.52	0	0	RC	RC
13	nao	sim	não	114	-	-	3.59	0	-	RC	-
14	tal+dex	sim	sim	117	210	93	1.4	0.5	0.5	RPMB	RPMB
15	dex	sim	sim	117	201	84	1.32	0		RC	
16	tal+dex	sim	não	114			5.84	1.39	6.46	RP	DP
17	dex	sim	sim	116	214	98	3.77	2.95	2.33	SR	RM
18	dex	sim	sim	90	229	139	4.43	3	3.55	RM	RM
19	tal+dex	sim		121			4.69	2.71	2.17	RM	RP

PREM- Pré manutenção ; POSM- Pós manutenção ; Ptn- M – Proteína monoclonal ; tal-talidomida ; dex –dexametasona. Critérios de resposta de Bladé: SR- sem resposta; RM-resposta mínima ; RP- resposta parcial ; RPMB- resposta parcial muito boa ; RC-resposta completa ; DP-Doença progressiva. Ns- não secretor.

* - Tempo do transplante até de coleta de amostra e início da manutenção.

** - Tempo do transplante até coleta de amostra após pelo menos 2 meses de manutenção.

Tabela .Dados obtidos por citometria de fluxo e hemograma dos grupos de tratamento com dexametasona ou talidomida e dexametasona

Nome	Grupo	Leucometria / mm3	Linf CF /mm3	CD3	CD3/4	CD3/8	R CD4 /CD8	CD19/45	MN	CD3-/ CD56+	IF CD1a	IF CD86	IF CD80	IF HLA- DR DC
				Linfoc /mm3	Linfoc /mm3	Linfoc /mm3		Linfoc /mm3	Hemog / mm3	/CD16 high /mm3				
EBM	DEX	2900,00	814,61	441,84	219,94	227,93	0,96	273,79	200,00	54,67	4,098315	17,75562	3,780899	17,26
LC	DEX	7300,00	1853,47	1478,70	440,76	982,34	0,45	106,57	760,00	95,80	66,87296	11,89111	4,751361	47,25
RFP	DEX	4200,00	1532,16	887,43	239,17	583,45	0,41	317,46	320,00	97,75	129,8471	24,34395	13,74522	39,36
CRP	DEX	5700,00	3401,76	1719,93	334,39	1282,80	0,26	464,68	600,00	402,77	19,99762	20,72619	7,395238	19,86
GTS	DEX	4300,00	1573,80	638,49	283,28	344,35	0,82	149,51	720,00	381,17	10,94855	30,43177	3,742729	25,30
CAT	DEX	7400,00	2789,06	1973,82	571,20	884,69	0,65	481,39	430,00	289,21	6,052805	4,709571	3,475248	6,47
JJM	DEX	4200,00	527,94	321,36	93,39	229,76	0,41	4,75	490,00	136,22	18,41093	13,13302	17,17577	6,05
PATF	DEX	3500,00	398,65	195,66	36,91	158,18	0,23	105,32	500,00	38,68	15,85855	13,82237	9,631579	10,10
JBS	DEX	5700,00	1288,20	890,66	252,49	640,11	0,39	224,40	630,00	119,66	186,9331	20,57962	5,907643	290,82
EC	Talid + Dex	3300,00	1482,36	849,54	158,46	587,76	0,27	128,37	550,00	281,01	12,73978	25,69517	2,687732	17,03
JJML	Talid + Dex	6700,00	3360,05	1612,82	379,35	1205,25	0,31	254,69	600,00	615,61	76,39691	22,70876	7,512887	30,29
MAS	Talid + Dex	4900,00	1341,62	615,00	190,24	423,82	0,45	269,80	440,00	94,64	16,15858	31,78317	19,6699	23,74
SLOC	Talid + Dex	5830,00	2322,67	1479,54	458,03	1013,15	0,45	83,85	408,00	168,23	139,9772	20,72638	12,0684	22,76
JSA	Talid + Dex	4300,00	1587,99	1339,95	383,66	956,29	0,40	90,67	790,00		65,95874	28	14,56974	33,83
LAS	Talid + Dex	5500,00	1590,60	857,97	228,41	629,40	0,36	202,32	750,00	201,88	12,5601	25,54808	9,579327	9,90
SCCC	Talid + Dex	4700,00	2225,92	965,38	166,28	621,03	0,27	59,88	850,00	669,37	21,06582	7,017722	4,6	6,52
CF	Talid + Dex	4700,00	669,75	288,53	115,46	146,07	0,79	37,77	610,00	162,07	16,75798	9,034574	8,859043	27,42

Tabela .Dados obtidos por citometria de fluxo e hemograma do grupo de indivíduos sadios

nome	grupo	Leucometria / mm3	Linf CF /mm3	CD3 Linfoc /mm3	CD3/4 Linfoc /mm3	CD3/8 Linfoc /mm3	R CD4 /CD8	CD19/4 5 Linfoc /mm3	MN Hemog /mm3	CD3-/CD56+ /CD16 high /mm3	IF CD1a	IF CD86	IF CD80	IF HLA-DR DC
D.A.	S	8100,00	1738,26	1340,20	831,24	435,09	1,91	132,46	450,00	93,21	nd	nd	nd	nd
G.B.	S	7300,00	2871,09	1387,60	744,76	530,86	1,40	484,07	430,00	665,82	nd	nd	nd	nd
GAB	S	6000,00	2002,20	1411,15	874,76	481,53	1,82	309,94	360,00	164,73		nd	nd	nd
HSD	S	5500,00	962,50	464,50	294,04	150,63	1,95	172,87	340,00	113,66	11,35906	6,286614	14,82677	53,16
COC	S	5200,00	3018,08	1767,39	989,02	664,28	1,49	727,36	290,00	673,66	21,86732	10,46437	17,64373	104,75
RJPM	S	5000,00	2107,50	1389,90	842,79	469,76	1,79	278,40	370,00	248,43	31,5	18,43684	6,710526	67,97
AF	S	6100,00	2384,49	1904,49	1118,33	708,19	1,58	123,99	450,00	281,32	22,44992	10,29064	7,124795	13,86
RM	S	5800,00	2041,60	1448,11	604,52	429,96	1,41	212,94	390,00	217,30	51,58531	28,88389	6,196682	100,61
RR	S	6300,00	2906,82	1946,41	1103,14	698,80	1,58	239,23	330,00	336,07	44,58438	46,2125	7,8	125,53
S.C.	S	6700,00	2220,38	1433,48	987,63	346,60	2,85	248,02	500,00		14,5816	17,29674	4,252226	13,57
A.D.	S	6500,00	2057,25	1428,14	1136,01	268,27	4,23	233,09	400,00	158,47	15,59044	7,975052	5,856549	36,00
MCM	S	5300,00	1101,87	830,59	577,71	218,50	2,64	36,91	230,00	110,27	13,19298	29,96272	5,276316	60,99
R.E.	S	13100,00	2944,88	1949,81	1391,75	499,45	2,79	342,20	480,00	378,61	23,16927	21,53452	14,11136	8,08
MCB	S	9200,00	1933,84	1347,11	838,32	497,77	1,68	236,51	380,00	182,25	9,107527	7,77957	10,80645	6,34

Tabela .Dados obtidos por citometria de fluxo e hemograma dos pacientes pré-manutenção

nome	grupo	Leucometria / mm3	Linf CF /mm3	CD3 Linfoc/mm3	CD3/4 Linfoc/mm3	CD3/8 Linfoc/mm3	R CD4/CD8	CD19/45 Linfoc/mm3	MN Hemog / mm3	CD3- /CD56+/CD16 high/mm3
GTS	Pre-man	6900,00	3694,26	1486,94	214,27	1231,30	0,17	215,01	460,00	nd
SLOC	Pre-man	3400,00	1408,62	1316,50	306,94	1001,67	0,31	42,82	380,00	25,04
JSA	Pre-man	3100,00	1810,71	1149,08	268,35	820,98	0,33	277,40	320,00	127,21
RFP	Pre-man	7497,00	2103,66	1371,59	295,14	1076,02	0,27	464,49	1166,20	nd
LAS	Pre-man	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CRP	Pre-man	8700,00	5246,10	1711,28	219,29	1280,05	0,17	849,34	750,00	1196,91
JBS	Pre-man	5200,00	1497,60	1194,64	150,21	861,42	0,17	183,76	480,00	4,04
RCC	Pre-man	3200,00	1110,40	863,11	150,35	681,90	0,22	115,48	260,00	42,97
MLFJ	Pre-man	5500,00	2520,10	1590,44	154,99	1393,87	0,11	381,54	330,00	302,79
SCCC	Pre-man	2500,00	1603,50	838,79	167,73	661,12	0,25	121,55	280,00	436,89
CAT	Pre-man	4200,00	2152,92	1287,88	228,42	508,73	0,45	376,98	340,00	270,68
JJM	Pre-man	3100,00	870,48	525,77	125,09	399,90	0,31	10,88	280,00	87,01
PATF	Pre-man	3700,00	1167,35	664,34	76,93	598,15	0,13	344,37	490,00	76,78
CF	Pre-man	4100,00	895,03	438,83	113,76	288,74	0,39	128,53	410,00	108,26

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)