

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Pollyanna Domeny Duarte

**Mieloma Múltiplo: Estudo do Microambiente e Correlação
com Fatores Prognósticos**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

**Botucatu
2020**

Pollyanna Domeny Duarte

Mieloma Múltiplo: Estudo do Microambiente e
Correlação com Fatores Prognósticos

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Duarte, Pollyanna Domeny.

Mieloma múltiplo : estudo do microambiente e correlação
com fatores prognósticos / Pollyanna Domeny Duarte. -
Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Maria Aparecida Custodio Domingues
Capes: 40105008

1. Mieloma múltiplo - Prognóstico. 2. Microambiente
tumoral. 3. Imunoglobulinas.

Palavras-chave: Cadeias leves livres; Gamopatia
monoclonal; Imunoglobulina; Microambiente; Mieloma
múltiplo.

Aos que abdicaram do seu tempo
comigo para que essa tese fosse concluída
e torceram para que eu tivesse
sucesso – minha gratidão!
Aos que serão beneficiados por
este conhecimento, meu respeito.

Agradecimentos

À minha orientadora, querida Professora Maria, pela parceria e compreensão, além dos ensinamentos profissionais, muito obrigada!

Aos professores de cada fase da minha vida acadêmica – com e sem Título – desde as primeiras regras da escrita, aos da graduação e pós-graduação, muito obrigada!

Aos meus pais, Domingos e Eny, que continuam a me ensinar a cada dia como ser e dar o melhor de mim, minha eterna gratidão!

Aos meus irmãos, de alma e de sangue, Gislene – presente da minha passagem por Botucatu, Sellyanna e Adriano, companheiros desde a infância, por todos os momentos partilhados e tão significativos em minha vida, minha especial admiração.

Ao meu marido, Ívison, companheiro e incentivador na vida pessoal e profissional e às nossas bênçãos, Alice, Saul, Clara e Miguel, todo meu amor.

Aos familiares e amigos que me deram suporte e me encorajaram quando pareceu tão difícil chegar até aqui, muito obrigada.

Aos docentes, residentes e internos que assistiram os pacientes deste trabalho; aos Hematologistas, pelo cuidado direto, registro das informações e coleta de amostras; aos Residentes e Docentes de Hematologia e Patologia, responsáveis pela análise inicial das amostras; aos técnicos do Departamento de Patologia da UNESP; ao Carlos, técnico de laboratório de Patologia do Instituto A. C. Camargo e ao Antonio de Castro Bruni (PhD, CONRE 6363/A) pelo auxílio na análise estatística – todos que viabilizaram este estudo, meu sincero reconhecimento.

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
Introdução	1
Objetivos.....	12
Casuística e Métodos	13
Seleção dos casos	13
Análise morfológica	13
Elaboração do Microarranjo Tecidual (“Tissue Microarray”-TMA).....	13
Estudo Imuno-histoquímico	15
Obtenção de dados clínicos.....	16
Metodologia Estatística	17
Resultados.....	19
Achados Clínico-Laboratoriais.....	19
Achados de Análise Citológica, Histológica e de TMA.....	29
Discussão	44
Conclusões	51
Bibliografia	53
APÊNDICE	60
ANEXOS	61

Lista de abreviaturas e siglas

- Beta2M:** beta 2 microglobulina
- BMP:** proteína morfogênica óssea
- CCL3:** interleucina relacionada com angiogênese
- CD:** cluster de diferenciação
- CG:** centros germinativos
- CGA:** campo de grande aumento
- CXCR4:** receptor de SDF no microambiente medular
- DHL:** desidrogenase láctica
- DS:** Sistema de estadiamento de Durie & Salmon
- EPS:** eletroforese de proteínas séricas
- EPU:** eletroforese proteínas urinárias
- EUA:** Estados Unidos da América
- FGFs:** indutores de diferenciação de células mesenquimais em condrócitos
- FISH:** hibridização “in situ” por fluorescência
- IL:** interleucina
- IGF:** fator de crescimento derivado de insulina
- ISS:** Sistema de estadiamento internacional
- MI:** Mieloma indolente
- MM:** Mieloma múltiplo
- MO:** medula óssea
- OMS:** Organização Mundial da Saúde
- PD:** proteínas de morte celular programada
- PET-CT:** tomografia contrastada com emissão de pósitrons
- QT:** quimioterapia
- RT:** radioterapia
- SDF:** fator de quimioatração de células hematopoéticas
- SM:** *smoldering myeloma*
- SOE:** sem outra especificação
- TaMO:** transplante autólogo de medula óssea
- TMA:** microarranjo tecidual
- VHS:** velocidade de hemossedimentação
- Wnts:** indutores de diferenciação de células mesenquimais em condrócitos

Lista de Figuras

<i>Figura 1 – Exemplo de bloco de parafina “receptor” (bloco de TMA).</i>	14
<i>Figura 2 - Mapa de TMA, utilizado para a orientação da inclusão dos casos nos blocos de TMA e, posteriormente, a identificação dos casos para a interpretação dos resultados obtidos.</i>	15
<i>Figura 3 – Imagem da tela do programa Filemaker Pro 12, utilizado para arquivamento dos dados coletados.</i>	17
<i>Figura 4 – Curvas de sobrevida em função do Estadio ISS</i>	20
<i>Figura 5 – Curvas de sobrevida segundo grupo secretor</i>	22
<i>Figura 6 – Tempo de Plateau e percentual de sobreviventes a MM</i>	25
<i>Figura 7 – Incidência acumulada de mortes e taxa de sobreviventes</i>	26
<i>Figura 8 – Curvas de sobrevida segundo as Faixas etárias</i>	26
<i>Figura 9 – Curvas de sobrevida segundo a resposta terapeutica</i>	27
<i>Figura 10 – Tempo de Recidiva segundo o Sexo</i>	28
<i>Figura 11 – Tempo de Recidiva segundo a Faixa etária</i>	28
<i>Figura 12 – Distribuição da Infiltração segundo a Faixa etária</i>	29
<i>Figura 13 – Curvas de sobrevida em função do tratamento Talidomida</i>	33
<i>Figura 14 – Curvas de sobrevida segundo o marcador Ciclina-D1</i>	35
<i>Figura 15 – Curvas de sobrevida segundo o marcador CD45</i>	36
<i>Figura 16 – Curvas de sobrevida segundo o marcador Kappa</i>	37
<i>Figura 17 – Curvas de sobrevida segundo o marcador Lambda</i>	37
<i>Figura 18 – Distribuição dos tipos de QT segundo a Faixa etária</i>	39
<i>Figura 19 - Distribuição da TMO segundo a Faixa etária</i>	40
<i>Figura 20 – Contribuição das variáveis e suas relações</i>	42
<i>Figura 21 - Resultados com modelo de Cox</i>	43

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Estadiamento Durie & Salmon	4
Tabela 2 – Estadiamento ISS.....	4
Tabela 3 – Classificação de resposta terapêutica (IMWG); CR = resposta completa; FLC = cadeia leve livre (razão anormal reflete a presença de um clone anormal é uma razão de $k/\lambda > 4:1$ ou $<1:2$); PR = resposta parcial; SD = doença estável; sCR = resposta completa estrita; VGPR = resposta parcial muito boa.	5
Tabela 4 – Especificações dos antígenos primários, fonte e região de positividade na célula avaliada. DAKO (Carpinteria, CA, EUA); Neomarkers/Lab Vision (Fremont, CA, EUA); Novocastra (Newcastle, Reino Unido).	16
Tabela 5 – Distribuição dos pacientes por Faixa Etária.....	19
Tabela 6 – Distribuição do Estadio DS	20
Tabela 7 – Distribuição do Estadio ISS.....	20
Tabela 8 – Estatísticas de Sobrevida segundo o Estadio ISS.....	21
Tabela 9 – Anemia em função da Faixa etária	21
Tabela 10 – Estatísticas descritivas para os marcadores quantitativos	21
Tabela 11 – Estatísticas descritivas para os marcadores qualitativos.....	21
Tabela 12 – Tempo de sobrevida e condição de ser secretor	22
Tabela 13 – Distribuições da presença de lesões de órgãos-alvo da MM	23
Tabela 14 – Hipercalcemia em função da Faixa etária.....	23
Tabela 15 – Dor óssea segundo a Faixa etária	23
Tabela 16 – Fraqueza segundo a Faixa etária	23
Tabela 17 – Lesão Lítica segundo a Faixa etária	23
Tabela 18 – Fratura patológica segundo a Faixa etária	23
Tabela 19 – Estadio DS em função da Faixa etária.....	24
Tabela 20 – Tempos de sobrevida em função da resposta terapêutica.....	27
Tabela 21 – Tempo de Recidiva em função do Sexo	27
Tabela 22 – Tempo de Recidiva segundo a Faixa etária	29
Tabela 23 – Infiltração segundo Faixa etária.....	29
Tabela 24 – Distribuição da Classificação de Bartl&Frish	30
Tabela 25 – Resultados do perfil imunofenotípico dos plasmócitos neoplásicos	31
Tabela 26 – p53 versus Faixas etárias	31
Tabela 27 – Resultados do perfil imunofenotípico das células do estroma/microambiente	31
Tabela 28 – Marcador CD3 versus Resposta terapêutica	32
Tabela 29 - Associação entre CD34 e Ki-67.....	32
Tabela 30 - Marcador CD34 versus Resposta terapêutica	33
Tabela 31 – Estatísticas de Sobrevida segundo o tratamento com Talidomida	34
Tabela 32 – Marcador Ciclina D1 versus Resposta terapêutica	34
Tabela 33 – Marcador CD45 versus Resposta terapêutica	34
Tabela 34 – Marcador Kappa versus Resposta terapêutica	34
Tabela 35 - Marcador Lambda versus Resposta terapêutica	34
Tabela 36 – Estatísticas de sobrevida para o Marcador Ciclina D1	35
Tabela 37 – Estatísticas de sobrevida para o Marcador CD45	36
Tabela 38 – Estatísticas de sobrevida para o Marcador Kappa	37
Tabela 39– Estatísticas de sobrevida para o Marcador Lambda	37
Tabela 40 – Distribuição dos tipos de tratamentos	38
Tabela 41 – Tipo de tratamento por QT segundo a Faixa etária	38
Tabela 42 - Tratamento de TMO segundo Faixa etária	40
Tabela 43 – Modelo Linear Generalizado ajustado para o Tempo Total de Sobrevida	42

Resumo

Mieloma Múltiplo é uma neoplasia maligna de células plasmocitárias, cujas repercussões clínicas de interação da célula tumoral com seu microambiente e com o hospedeiro podem causar danos irreversíveis e progressivos ao doente. Estratégias terapêuticas têm tentado reunir antídotos às várias linhas de atuação da célula tumoral. Objetivou-se avaliar características clínicas e possíveis interações com o microambiente da medula óssea. Foram colhidos dados clínicos, reavaliado material histológico e confeccionado bloco de TMA com grupos de pacientes ao diagnóstico, na primeira recaída e após transplante autólogo de medula óssea. A análise estatística compreendeu descrição dos dados de distribuições de frequência para as variáveis qualitativas e calculadas as médias, desvios padrão, valores mínimo e máximo e mediana para as variáveis quantitativas. O teste de Qui-quadrado de Pearson foi empregado para variáveis qualitativas. Gráficos do tipo mosaico apresentaram os cruzamentos das variáveis discretas e técnica FAMD para verificação da contribuição das variáveis qualitativas e quantitativas simultaneamente. As curvas de sobrevida foram obtidas usando a metodologia de Kaplan & Meier e a estatística de Breslow foi empregada para testar a diferença entre as curvas observadas. Os intervalos de confiança para as curvas e testes foram feitos com nível de significância de 5%. As análises e figuras foram elaboradas com o software R (R Core Team, 2017). Concluímos que pacientes com condições clínicas para terapêuticas iniciais mais agressivas podem ter impacto em suas curvas de sobrevida; que pacientes em uso de talidomida tem risco de morte reduzido; que estágio ISS avançado reduz em até três vezes a sobrevida e que há associação negativas entre resposta terapêutica e positividade das células tumorais para ciclina-D1, CD45 e cadeia leve de imunoglobulina kappa.

Palavras-chaves: Mieloma múltiplo, gamopatia monoclonal, imunoglobulina, cadeias leves, microambiente.

Abstract

Multiple Myeloma is a malignant neoplasm of plasma cells whose clinical repercussions of tumor cell interaction with its microenvironment and host may cause irreversible and progressive damage to the patient. Therapeutic strategies have attempted to gather antidotes to the various lines of action of the tumor cell. This study aimed to evaluate clinical characteristics and possible interactions with the bone marrow microenvironment. Clinical data were collected, histological material was reevaluated and an AMT block was made with patient groups at diagnosis, in the first relapse and after autologous bone marrow transplantation. Statistical analysis included description of frequency distribution data for qualitative variables and calculated means, standard deviations, minimum and maximum values and median for quantitative variables. Pearson's chi-square test was used for qualitative variables. Mosaic graphs showed the intersections of discrete variables and FAMD technique to verify the contribution of qualitative and quantitative variables simultaneously. Survival curves were obtained using the Kaplan & Meier methodology and the Breslow statistic was employed to test the difference between the observed curves. Confidence intervals for curves and tests were made at a significance level of 5%. The analyzes and figures were elaborated with the R software (R Core Team, 2017). We conclude that patients with clinical conditions for more aggressive initial therapies may impact their survival curves; whereas thalidomide patients have a reduced risk of death; which advanced ISS stage reduces survival by up to three-fold and that there is a negative association between therapeutic response and tumor cell positivity for cyclin-D1, CD45 and kappa immunoglobulin light chain.

Keywords: Multiple myeloma, monoclonal gammopathy, immunoglobulin, light chains, microenvironment.

INTRODUÇÃO

O mieloma múltiplo (MM) é neoplasia maligna, de origem linfoide B, pós centro germinativo, com diferenciação e proliferação clonal de plasmócitos, que produzem imunoglobulinas monoclonais^{1, 2}. Faz parte de um espectro de neoplasias de plasmócitos, cujo fenômeno inicial comum é a hipermutação somática associada à diferenciação dos linfócitos B durante a resposta imune. Neste espectro, a Organização Mundial da Saúde (OMS)¹ reconhece as categorias: Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS), *Smoldering* Mieloma (SM) e Mieloma Indolente (MI), que representam um contínuo evolutivo, a depender do número de plasmócitos clonais na medula óssea (MO). SM e MI receberam a designação de MM Assintomático, pela ausência de sintomas e pela impossibilidade de serem diagnosticados prospectivamente. No extremo oposto deste espectro e, no seu processo evolutivo, se insere o MM, cujos critérios diagnósticos são infiltração de MO por 10% ou mais de plasmócitos clonais ou plasmocitoma em biópsia óssea associado a evidência de um ou mais eventos definidores de MM: CRAB (hipercalcemia, falência renal, anemia ou lesões líticas); plasmocitose monoclonal em MO maior que 30%; elevação não reacional de cadeias leves livres séricas ou mais de uma lesão focal em exame de imagem¹. Responde por cerca de 1,8% de todos os cânceres e está entre 10-15% das malignidades hematológicas^{1, 3, 4}. A Sociedade Americana de Câncer estima 30,33 novos casos/ano de MM nos Estados Unidos, bem como 12.650 mortes¹. Acomete, sobretudo, indivíduos idosos, com uma idade mediana ao diagnóstico de 66 anos, sendo 37% dos pacientes diagnosticados com mais de 75 anos de idade, 26%, entre 65 e 74 anos, e 37%, abaixo dos 65 anos. Na América Latina e no Brasil há poucos dados epidemiológicos registrados sobre MM. Hungria e colaboradores⁵ relataram que, no Brasil, a idade mediana ao diagnóstico é de 65 anos, com discreta prevalência no sexo masculino (53%). Em 1112 pacientes de instituições brasileiras, a maioria dos pacientes foi diagnosticada com doença avançada. A sobrevida média, em 5 e 10 anos é de 31% e 10%, respectivamente^{1, 6}.

Assim como outras neoplasias malignas, a origem do MM é multifatorial. Sabe-se que familiares de primeiro grau de pacientes com MGUS têm duas a três vezes maior risco para MM. Entretanto, considerando a baixa incidência do

MM, a contribuição da hereditariedade é relativamente discreta⁷. Quanto aos riscos geneticamente determinados, pacientes com del(17p), t(14;16) e t(14;20) têm alto risco para desenvolver MM, já os pacientes com t(4;14) e trissomia (1q) têm risco intermediário, os demais são considerados risco padrão¹. Há relatos sugerindo polimorfismo gênico contribuindo para etiologia; assim também exposição a irradiação, pesticidas, benzeno, medicamentos (reposição estrogênica⁸, uso crônico de acetaminofeno); que a obesidade está associada ao aumento de 1,4 a 2,5 vezes na incidência da doença e que o uso da aspirina pode ser fator protetor, contrário a origem do MM⁷.

A anemia e fadiga são achados sistêmicos estreitamente relacionados ao MM - há estreita correlação entre número de elementos eritroides em MO e redução do tecido adiposo, bem como contagem de hemácias em sangue periférico⁹, contribuindo com o raciocínio do papel do microambiente também nas manifestações clínicas. Além das lesões ósseas e da anemia, os rins são importantes órgãos-alvo de complicações pelo MM, com o quadro de nefropatia que representa importante fator de baixa sobrevida. A disfunção renal frequentemente é uma das primeiras manifestações e ocorre por interação de múltiplos mecanismos. Pode-se observar injúria tecidual direta – dano glomerular relacionado à amiloidose, deposição de imunoglobulina monoclonal de cadeias leves ou pesadas e crioglobulinemia monoclonal; disfunção tubular, por nefropatia secundária à deposição de cadeias leves em túbulo proximal e disfunção intersticial, por infiltração direta de plasmócitos neoplásicos^{10, 11}. Normalmente, cadeias leves são filtradas e reabsorvidas nos túbulos, que se tornam sobrecarregados pelo aumento significativo de cadeias leves. O dano tubular resulta de efeito tóxico direto e acúmulo de enzimas lisossomais. As proteínas Tamm–Horsfall (THMP) são secretadas usualmente na porção grossa ascendente da alça de Henle – cadeias leves precipitam dentro dos túbulos com THMP, levando à obstrução por cadeias densas. Precocemente, a proteinúria secundária ao MM é predominantemente de cadeia leve, com baixíssima perda de albumina. Entretanto, uma vez que o dano glomerular ocorra, proteinúria não seletiva, inclusive com albumina, é encontrada. Pseudo-hiponatremia está associada à proteinúria e deixa os rins mais suscetíveis à injúria intersticial por desidratação. Uso de contraste intravenoso, drogas antiinflamatórias não esteroidais e bisfosfonatos, além de hiperuricemia, somam-se à doença primária e pioram a disfunção renal. O diagnóstico

definitivo é feito por biópsia renal. Esta é especialmente importante em pacientes com nefropatia atípica e albuminúria significativa, sugerindo doença de depósito de proteína amiloide ou de cadeias leves de imunoglobulina e sedimentos urinários – o que traduz necrose tubular aguda ou história de nefrite intersticial alérgica. Em acordo com os achados clínicos, em pacientes com altos níveis séricos de cadeias leves de imunoglobulina (imunofixação) – maiores que 1500 mg/L – e baixa excreção urinária, pode ser feito diagnóstico presuntivo sem necessidade de biópsia renal¹⁰.

Após confirmação diagnóstica, é indicado estadiar o paciente, a fim de avaliação prognóstica e definição da melhor estratégia terapêutica. Em 1975, foi proposto o estadiamento de Durie-Salmon (*Durie-Salmon stage* – DSS), que subdivide os pacientes em três grupos, de acordo com achados laboratoriais e de imagem¹². As características clínicas presentes de 71 pacientes com MM foram correlacionadas com a massa tumoral (células de MM $\times 10^{12}/m^2$ de área de superfície corporal), prevista com precisão a partir de extensão das lesões ósseas, nível de hemoglobina, nível de cálcio sérico e níveis de componentes M no soro e na urina. Segundo Durie & Salmon¹², análises de resposta à quimioterapia e sobrevida indicaram correlação significativa com a carga celular medida no MM. Os resultados foram sintetizados para produzir um sistema de estadiamento clínico, com três níveis (Tabela 1).

Reavaliações e inclusão de novos marcadores a esse estadiamento, confirmaram ser ele eficaz, mesmo reunindo critérios menos custosos tecnicamente¹³. Com a inclusão de métodos novos ao DSS, como ressonância magnética e PET-CT, é possível um estadiamento mais preciso da doença. Esse novo estadiamento é denominado Durie & Salmon PLUS, que quantifica o número de lesões em cada estágio e demonstra seu valor prognóstico, que se assemelha com o estadiamento internacional (ISS, Tabela 2). A observação de um padrão focal na ressonância magnética parece estar associada à pior sobrevida¹⁴.

Estádio	Critérios
I	Baixa massa tumoral ($<0,6 \text{ células} \times 10^{12}/\text{m}^2$) Todos os seguintes: Hb $>10/\text{gdl}$; cálcio normal; IgG $< 5\text{g/dl}$; IgA $< 3\text{g/dl}$; proteína urinária monoclonal $< 4\text{g/24h}$; ausência ou lesão lítica única
II	Intermediário (entre estádios II e III)
III	Alta massa tumoral ($1,2 \text{ células} \times 10^{12}/\text{m}^2$) Qualquer um dos seguintes: Hb $< 8,5/\text{gdl}$; cálcio $> 12\text{g/dl}$; IgG $> 7\text{g/dl}$; IgA $> 5\text{g/dl}$; proteína urinária monoclonal $> 12\text{g/24h}$; múltiplas lesões osteolíticas, fraturas
PLUS	A – se creatinina $< 2\text{mg/dl}$ e ausência de doença extramedular B – se creatinina $> 2\text{mg/dl}$ e doença extramedular

Tabela 1 – Estadiamento Durie & Salmon

Após quase três décadas, o DSS foi a classificação mais utilizada. Todavia, em 2005 foi publicado o *International Staging System* (ISS)¹⁵, que também subdivide os pacientes em três estádios; entretanto, baseia-se em marcadores laboratoriais de atividade de doença: beta-2-microglobulina e albumina (Tabela 2).

Estádio	Critérios
I	Beta2microglobulina $< 3,5 \text{ mg/dl}$ e Albumina sérica $> 3,5\text{g/dl}$
II	Beta2microglobulina $< 3,5 \text{ mg/dl}$, mas Albumina sérica $< 3,5\text{g/dl}$ Beta2microglobulina $> 3,5 \text{ mg/dl}$, mas Albumina sérica $> 3,5\text{g/dl}$
III	Beta2microglobulina $> 5,5 \text{ mg/dl}$

Tabela 2 – Estadiamento ISS

O ISS permite melhor correlação clínica e estratificação de subgrupos com diferentes evoluções. Ele é validado para diversos grupos populacionais, incluindo a população brasileira, além de ser mais fidedigno quando comparada ao DSS¹⁶⁻¹⁸.

As propostas de estadiamento clínico buscam associação a maior ou menor razão de progressão e refratariedade clínica. Quanto à resposta terapêutica, os pacientes são classificados em resposta completa, resposta parcial muito boa, resposta parcial e doença estável, além de refratariedade –

ausência de resposta/remissão^{19, 20}, conforme O Grupo de Trabalho Internacional de Mieloma²¹ (Tabela 3). A remissão é geralmente considerada como sendo pelo menos uma resposta parcial (melhoria $\geq 50\%$) que se prolonga por pelo menos 6 meses. O alvo tem sido alcançar respostas cada vez mais profundas, bem como duração de resposta.

Categoria de Resposta	Critérios Clínicos
Resposta Completa Estrita (sCR)	Relação de cadeias leves livres (FLC) normal e ausência de células clonais na medula óssea (imunoistoquímica ou imunofluorescência)
Resposta Completa (RC)	Imunofixação negativa no soro e urina e desaparecimento de quaisquer plasmacitomas de tecidos moles e $\leq 5\%$ de plasmócitos na medula óssea (imunoistoquímica ou imunofluorescência)
Resposta Parcial Maior (muito boa) (VGPR)	Proteína M do soro e urina detectável pela imunofixação, mas não na eletroforese ou redução de 90% ou maior na proteína M no soro e nível de proteína M na urina <100 mg por 24h
Resposta Parcial (PR)	Redução $\geq 50\%$ da proteína M sérica e redução na proteína M urinária de 24 horas em $\geq 90\%$ ou a < 200 mg/24h • Se a proteína M do soro e urina forem imensuráveis, uma diminuição $\geq 50\%$ na diferença entre os níveis envolvidos e não envolvidos de FLC é necessária, em lugar dos critérios da proteína M; • Se a proteína M do soro e urina forem imensuráveis e a cadeia leve livre no soro também for imensurável, é necessária uma redução $\geq 50\%$ nos plasmócitos, em vez da proteína M, desde que a percentagem de base de plasmócitos na medula óssea seja $\geq 30\%$ Além dos critérios enumerados acima, se estiver presente no período basal, também é necessária uma redução $\geq 50\%$ no tamanho dos plasmocitomas de tecido mole.
Doença estável (SD)	Não atende aos critérios anteriores ou doença progressiva (não recomendado para o uso como um indicador da resposta, a estabilidade da doença é melhor descrita ao fornecer estimativas do tempo para a progressão)

Tabela 3 – Classificação de resposta terapêutica (IMWG); CR = resposta completa; FLC = cadeia leve livre (razão anormal reflete a presença de um clone anormal é uma razão de $k/\lambda > 4:1$ ou $<1:2$); PR = resposta parcial; SD = doença estável; sCR = resposta completa estrita; VGPR = resposta parcial muito boa.

Mieloma múltiplo é, ainda, doença incurável²², devido a uma complexa arquitetura genética e constante proteção que recebe do seu nicho tumoral, representado pelo microambiente da MO^{4, 23}. Além dos conhecidos determinantes da conversa cruzada entre MO e plasmócitos malignos; descoberta de fatores celulares e moleculares têm propiciado reconhecimento de complexo cenário de microambiente⁴.

A MO dos ossos longos e chatos é o sítio definitivo da hematopoiese. A

formação óssea ocorre por dois processos distintos, de acordo com a sua localização, denominados ossificações endocondral e intramembranosa. A gênese óssea envolve vários fatores locais, como BMPs, Wnts, FGFs, proteínas Hedgehog, IGFs e retinoides; além de fatores sistêmicos, como hormônio de crescimento, hormônio tireoidiano, estrógenos, andrógenos, vitamina D e glicocorticoides. A formação óssea atrai a vascularização que serve de porta de entrada para a imigração hematopoiética, a qual se inicia no estágio E15 da embriogênese humana²⁴. As células totipotentes hematopoéticas (CTHs) são multipotentes, com capacidade de autorregeneração de progenitores que geram todas as células sanguíneas maduras e sua função é eficientemente controlada para manter a homeostasia hematopoética, regulando células especializadas e fatores que constituem o nicho hematopoético – ou microambiente²⁵. Como em outros sítios hematopoiéticos, a ocupação da medula óssea pelos precursores imigrantes, também conta com o sistema de endereçamento oferecido pela interação de SDF-1 (fator derivado de estroma)/CXCR4 (receptor de fator quimioatrativo de célula hematopoética)²⁴, cuja expressão no estroma medular parece ser importante para a contenção dos progenitores, já que, numa situação de mobilização celular, este ligante sofre diminuição significativa. Neste contexto espacial, associa-se significativo papel dos macrófagos, derivados de células totipotentes fetais e embrionárias e de monócitos derivados da medula óssea, que participam do processo de opsonização e facilitação da fagocitose através da interação com opsoninas tipo CRP, amiloide P, C1q, C3b, IgM, ficolina e proteínas surfactantes. Em algumas situações, esta opsonização pode ser prejudicial, com danos associados às vias moleculares (DAMPs)²⁴. O sucesso da atividade hematopoiética da medula óssea é creditado às funções das células estromais ou mesenquimais. De fato, o estroma parece ser responsável não só por alojar as células tronco, mas também por regular suas atividades fisiológicas. A modulação da diferenciação celular hematopoiética na medula óssea é consequência de interações contínuas entre o estroma e as células precursoras. Células de MM são remanescentes de células tronco hematopoéticas que guardam estrita relação de dependência com o microambiente da medula óssea; contudo, expressam fenótipo de maturidade e secretam anticorpos²⁶. A interleucina (IL) 6 é um dos maiores contribuintes para a formação do microambiente pela célula tumoral no MM, mas não dentro

do nicho de células unipotentes²⁶. O nicho da medula óssea para células de MM inclui a atividade de citocinas inflamatórias através de osteoclastogênese, o que permite a manutenção de células de MM dentro da medula óssea. Por outro lado, osteoclastogênese constitui um sinal que direciona a via de células unipotentes hematopoéticas para seu nicho na medula óssea²⁶. Assim, MM representa um microambiente de tumor hematopoético que não guarda correspondência com o nicho da sua célula progenitora^{26, 27}.

Os padrões mais comuns de infiltração, à histologia, são o padrão nodular ou difuso com erosão óssea, fibrose e neoformação vascular, mas virtualmente qualquer padrão pode ser observado. Inclusive, há casos com envolvimento tão focal e discreto que o diagnóstico pode ser dificultado, justificando a escolha de biopsiar sítios de osteólise. O padrão morfológico das células pode variar entre plasmócitos bem diferenciados de aspecto normal, células binucleadas, células em anel de sinete ou com citoplasma claro, acúmulos de imunoglobulinas na forma de inclusões nucleares ou cristais citoplasmáticos, células de aspecto monocitoide, pequenas células hipercromáticas, células fusiformes ou histiocitoides (pseudo-Gaucher), plasmablastos ou células polimórficas. A morfologia do MM pode simular desde plasmocitoses reacionais a carcinomas, linfomas e mesmo sarcomas. A presença de células plasmablásticas ou anaplásicas está associada com prognóstico desfavorável e o termo mieloma anaplásico pode ser usado quando a morfologia imunoblástica/polimórfica for predominante. Já se sabe que existe heterogeneidade intraclonal dentre os clones de MM predominantes, a qual está estreitamente relacionada ao comportamento biológico, progressão de doença e desenvolvimento de resistência terapêutica²⁸.

O plasmócito, acometido com achados de malignidade no MM, infiltra a MO determinando reabsorção de tecido ósseo²⁹, mas, contrariamente ao esperado, não há diminuição do volume de MO e, ainda, há aumento das células estromais no espaço endosteal e acúmulo de osteoblastos, relacionados com osteogênese⁹. Já se identificam múltiplas vias de interação entre estes plasmócitos tumorais e o microambiente da MO³⁰, muitas delas levando à resistência terapêutica, através de desarranjo das vias de manejo de estresse, autofagia, reprogramação de transcrição e RNAs não codificantes^{4, 31}. Foi observado que a interação entre as células do MM e seu microambiente

retroalimenta um mecanismo de *feedback* positivo, reforçando um “ciclo vicioso” que resulta em aumento da reabsorção óssea e crescimento da população de células tumorais³². Essa interação é responsável por um específico “homing” na MO, proliferação e sobrevivência de plasmócitos tumorais, além de resistência à quimioterapia³³. Um modelo computacional³², de interação entre osso e células do MM, mostra como os mecanismos de sinalização intercelular direcionam para progressão de doença, especialmente por vias de adesão que relacionam IL-6 e células estromais da MO e células do MM.

Uma série de moléculas que poderiam estar envolvidas na ligação entre microambiente e osteoclastogênese têm sido estudadas, especialmente CD38 – molécula de adesão e ectoenzima altamente expressa por células de MM e também de osteoclastos e seus precursores e CD138 (sindecano 1 (*SDC*, CD138, *SYND1*, syndecan ou *SDC1*) – 2p241, que codifica uma proteína transmembrana (tipo I) heparan-sulfato proteoglicana, membro da família proteoglicana dos sindecanos; medeia a ligação celular, sinalização celular e organização do citoesqueleto. Funciona como proteína integral da membrana celular e participa da proliferação, migração e integração com a matriz celular via receptor para proteínas de matriz extracelular. Essa proteína pode agir como um regulador multifuncional do comportamento celular no seu microambiente, medeia adesão do plasmócito ao colágeno tipo I e inibe invasão de células tumorais em gel de colágeno³⁴. A forma dispersa da molécula CD138 inibe o crescimento e induz apoptose de células do mieloma, podendo modular a doença óssea através de inibição de osteoclastos e ativação de osteogênese³⁴.

O microambiente da MO, em relação ao processo de adesão celular é bem ordenado, a fim de reter precursores circulantes e induzir produção de interleucinas envolvidas no crescimento e diferenciação final³⁵. Além disso, citocinas tipo IL-1 beta e M-CSF ativam células estromais da MO para produzir outras citocinas, como IL-6, que estimula a proliferação de plasmócitos. A maioria das citocinas produzidas localmente (IL-1 beta, TNF-beta, M-CSF, IL-3 e IL-6) também age na ativação e proliferação de osteoclastos³⁵. Já a formação de osteoclastos induzida por MM acontece devido a um desequilíbrio entre receptor ativador NFkappaB ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), em favor de RANKL no microambiente da MO e consequente produção de CCL3

por células do MM³⁶.

A osteoclastogênese afeta diretamente o microambiente imune, inclusive sendo potencial alvo para aumentar atividade anti-MM e doença óssea^{29, 35}. Osteoclastos, células endoteliais e células estromais da MO orquestram um microambiente adequado para o desenvolvimento do MM e também auxiliam na resistência à terapêutica, formando um verdadeiro nicho de MM³⁷. Osteoclastos protegem as células de citotoxicidade mediada por linfócitos T^{29, 38} através da expressão de moléculas tipo ligante de morte programada (PD-L) 1, galectina (Gal) 9, CD200 e indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), bem como via anexina II (AXII)^{35, 39, 40}. A ativação da via NFkappaB mostra ter importância significativa na patogênese do MM. O receptor de necrose tumoral associado ao fator 6 (TRAF6) é um mediador chave de ativação dessa via. A aderência de células do mieloma às células estromais resulta em recíproco aumento de expressão de TRAF6 e diminuição de moléculas de adesão ICAM1 e VCAM1 com expressão induzida por NFkappaB³⁶. Já o PD-1 (proteína de morte celular programada), é expresso na superfície de células T e B e seu ligante nos plasmócitos do MM, apontando para ação direta plasmocitária no microambiente com imunomodulação negativa para apoptose⁴¹. Há um processo de indução de melhoramento da osteoclastogênese e estímulo da angiogênese, além de supressão da diferenciação osteoblástica, levando à destruição óssea^{37, 42}.

Estudos^{22, 27} mostraram que macrófagos existentes no microambiente das células do MM funcionam como protetores das células neoplásicas, especialmente do efeito de quimioterápicos, através de atenuação de ativação e clivagem de sinais apoptóticos dependentes de caspases, bem como modulação de microRNAs (miR-21, miR-15a/16) relacionadas com direcionamento de adesão e secreção de citocinas, especialmente. Também promovem progressão tumoral através de angiogênese e estimulação do crescimento⁴³. Uso de terapia monoclonal pode aumentar citotoxicidade direcionada às células tumorais, como demonstrado com anti-CD38 que aumenta a citotoxicidade de células-NK contra células que expressam CD38, exceto as com baixa ou expressão ausente, através de degranulação das células-NK^{44, 45}.

Os adipócitos da medula óssea também exercem funções cruciais neste microambiente favorável ao MM. Por serem células predominantes, exercerem

função endócrina, serem metabolicamente ativos e secretarem adipocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, os adipócitos influenciam o comportamento de células recém-nascidas na MO e podem desregular a homeostase óssea⁴⁶. Por isso, têm sido alvo de estudo, tanto na relação de favorecimento de progressão neoplásica no MM quanto nos processos de metastatização óssea de tumores sólidos.

Quanto à importância da angiogênese para o comportamento tumoral do MM, há interações diretas de estimulação pela célula tumoral e pelas células do estroma da MO, o que favorece progressão de fases assintomáticas (MGUS, SM e MI) ao MM^{47, 48}.

Todos esses conceitos sobre interação das células neoplásicas com o microambiente têm sido utilizados na identificação de terapêuticas para os pacientes com MM. Os inibidores de proteassoma agem diretamente ativando o receptor de fator nuclear kappa B ligante⁴⁹, bem como restringindo a angiogênese e através da liberação de vesículas extracelulares associadas à apoptose⁵⁰. Os inibidores de atividade de osteoclastos (pamidronato ou zoledronato) dificultam crescimento de células do MM, através de restrição de sua ligação com células estromais, quando restritos ao microambiente da MO⁵¹, mas não nos casos de doença extramedular, apontando para a dependência destas células tumorais da atividade de osteoclastos e seus produtos e a importância da relação mieloma-osteoclastos-mieloma para sustentar o processo de doença⁵². A IL-6, produzida por células do estroma da MO, pode proteger células do mieloma de apoptose induzida por glicocorticoides⁵³. Concentrações de lenalidomida e pomalidomida que agem diminuindo a regulação de RANKL – estreitamente relacionada com expressão de CD49d em células osteoprogenitoras humanas, na presença de células do MM, também inibem produção de CCL3 por estas células⁵⁴. Contudo, a despeito das novas terapêuticas, fortemente baseadas nos conceitos de interação da célula neoplásica com o seu microambiente, pacientes refratários continuam com prognóstico bastante reservado⁵⁵.

Mieloma múltiplo é uma doença ímpar, na qual imunidade antitumoral é seletivamente prejudicada pelo próprio tumor. Assim, MM leva a progressiva desregulação imune, com defeito na imunidade associada à célula T, função de células *natural killer* e células dendríticas com capacidade de apresentação de antígeno, evidenciando que o microambiente tumoral promove tolerância à

doença e progressão. Tem-se trabalhado em terapêuticas que envolvem quimerismo de antígenos com receptores de células T, reovírus oncolíticos, inibidores de *checkpoints* imunológicos, anticorpos biespecíficos e vacinas tumorais, sozinhos ou em combinação com as terapias em vigor⁵⁵⁻⁵⁹, bem como detecção, em sangue periférico, de marcadores baseados na assinatura genética do tumor (microRNAs e piRNAs)^{60, 61}.

Interações entre células estromais da medula óssea e células do MM são cruciais para o desenvolvimento da doença. Exossomos, nanovesículas extracelulares secretadas por variados tipos celulares são capazes de modular o microambiente da medula óssea por regulação de angiogênese, mediação de citocina, influência na resposta imune, inflamação e metástase⁶¹⁻⁶⁴. Estes exossomos induzem diretamente a sobrevivência de precursores através da ativação das vias STAT3 e STAT1. Também aumentam proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL e Mcl-1⁶³, potencializam o óxido nítrico derivado de células de MM e sua atividade supressora de células T, o que favorece imunossupressão e viabiliza progressão de MM^{63, 65}.

Baseados nos conceitos de interação da célula tumoral e manipulação do meio pelas mesmas, tentou-se identificar pontos de interrelação entre o microambiente da MO e fatores inerentes da célula tumoral e suas repercussões no hospedeiro.

Objetivos

Gerais:

- Avaliar as características do microambiente da medula óssea que possam se correlacionar com aspectos clínico-evolutivos, morfológicos e imunofenotípicos em pacientes com diagnóstico de MM.

Específicos:

- Caracterização epidemiológica da nossa amostragem: idade, sexo, apresentação clínica (sintomas constitucionais, marcadores laboratoriais/bioquímicos, tempo de *plateau*, progressão de doença após tratamento, lesões de órgãos-alvo e comorbidades associadas, estadiamento clínico, terapêutica indicada, evolução clínica, taxa de sobrevida e taxa de óbito);
- Correlação com tipos citológicos;
- Análise do perfil imunofenotípico dos plasmócitos neoplásicos, densidade vascular do microambiente;
- Estudo de marcadores de células tronco e correlação dos achados acima descritos com possíveis diferenças evolutivas entre pacientes com MM secretores e não secretores;
- Confeccionar e validar técnica de plataforma de microarranjo de tecidos de medula óssea com citoinclusão de coágulo de aspirado.

Casuística e Métodos

Seleção dos casos

Os tecidos correspondentes aos casos diagnosticados como MM foram obtidos dos arquivos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP, entre os anos de 1979 e 2014. Houve dispensa da aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes indisponíveis, conforme aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (CAAE 41172815.7.0000.5411, parecer consubstanciado em 3/3/15). As amostras correspondem à citoinclusão de coágulo de aspirado de medula óssea, ao diagnóstico e em recaídas pós primeiro *plateau* e pós transplante autólogo de medula óssea (TaMO). O material coletado por aspiração de medula óssea foi fixado em formalina e incluído em parafina. Foram incluídos 189 casos com blocos de parafina disponíveis para os estudos histológicos e imuno-histoquímicos e 67 casos com apenas dados de revisão de prontuário, somando 256 pacientes, dentre estes, nove não secretores de cadeias leves de imunoglobulina, kappa ou lambda.

Casos controle foram representados por sete coágulos de medula óssea não diagnosticados como gamopatia monoclonal, aleatórios, com tempo de armazenamento semelhante ao dos blocos-teste, provenientes de coleta para estadiamento de neoplasias hematológicas ou investigação de hemopatias reacionais, sem diagnóstico de malignidade. Amostras de amígdala e placenta foram usadas para controle externo imuno-histoquímico.

Análise morfológica

Os casos incluídos foram reavaliados para confirmação diagnóstica de MM de acordo com os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO)¹. Além disso, foi aplicado em cada caso, a subtipagem morfológica descrita por Bartl e Frisch⁶⁶.

Elaboração do Microarranjo Tecidual (“Tissue Microarray” - TMA)

O TMA é um método de preparação de novo bloco de parafina e consiste em retirar parte de tecido que foi preparado e emblocado em parafina convencional (bloco doador) e colocá-lo em um novo bloco (bloco receptor).

Esse processo nos permite colocar amostras de vários doadores em uma única lâmina. Utiliza agulhas de tamanhos variados que podem ser de 0,5mm, 1,0mm, 1,5mm e 2,0mm de diâmetro, de forma que se possa corar os preparos uniformemente, tanto com métodos imuno-histoquímicos, quanto de proteínas. Permite a análise de um grande número de amostras, utilizando-se uma única lâmina, o que facilita a pesquisa e a comparação de casos, além da redução de custos e tempo para análise.

A confecção deste bloco de parafina foi realizada utilizando-se o sistema Beecher Instruments (MTA-1), de acordo com as especificações do manual do fabricante e amplamente utilizado e descrito na literatura.

Os blocos de parafina doadores corresponderam à inclusão do coágulo de medula óssea, originado do conteúdo final do aspirado de medula óssea do osso esterno e/ou crista ilíaca anterior ou posterior, direita ou esquerda. Blocos e lâminas tiveram área de interesse demarcada. A confecção do TMA foi realizada em colaboração com o serviço de Patologia do Hospital Antônio Cândido de Camargo (HACCamargo). Foi confeccionado um bloco de TMA contendo cilindros de 1,0 mm de cada bloco doador. Todo material foi selecionado do arquivo da blocoteca do Departamento de Patologia – UNESP/HC (Figura 1) e a lista mestra construída em Excell (Figura 2).



Figura 1 – Exemplo de bloco de parafina “receptor” (bloco de TMA).

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	mm
0	PLACENTA	2917/87	2894/11	3215/89	2533/07	2195/07	3588/14	651/14	649/14	6410/13	4541/13	1011/94	973/95	1199/95	4848/89	4015/89	0
1.2	3271/93	2731/87	9255/10	5878/01 1	4982/91	2889/87	9346/09	10882/08	3302/93	4557/00	43/90	5839/00 1	5839/00 2	4166/00 1	782/98	1026/98 1	1.2
2.4	6130/02	321/98	624/98	5952/97	9417/07	2630/95	6795/97	5126/97	2908/97	4980/95	4966/92	5848/93	4168/93	9701/07 2	4160/03	7370/02	2.4
3.6	8780/02	2850/03	3469/03	4431/03	4432/03	4695/03	11088/07	1160/13	47/13	1248/07	1170/07	405/07	482/95	948/95	437/95	3447/02	3.6
4.8	3845/02 1	7827/01	749/02	1832/02	1597/85	6029/91	324/91	263/91 A	485/90	978/89	12/93	6517/01 2	7685/01 1	7685/01 2	5854/01	5878/01 2	4.8
6.0	7686/01	5318/01 2	5050/01	7035/99	7034/99 1	6833/99	6116/99	2710/04	8853/04	8312/04	456/04	198/97	6623/05	6750/05	37/06	66/06	6.0
7.2	10248/05	4866/01	7939/95P	1274/01	1952/01 1	28/99	3773/05	3970/11 2	7228/09	10497/10	9508/09	1324/10	2261/10	1399/10	1293/13	6108/10	7.2
8.4	6310/94	4121/91	1095/11	257/06	3336/06	3913/06	8198/09	11623/13	8848/13	6599/07	10078/07	11576/12	8388/09	11460/12	4011/06	4926/06	8.4
9.6	8143/06	9097/06	737/83	1256/05	2052/05	10252/04	2334/82	944/86	1428/83	3337/86	2940/86	1970/86	2244/80	3050/10	2023/80	2251/87	9.6
10.8	4294/12	1383/87	2164/12	12000/11	10051/11	9652/11	9385/11	4757/07	1919/11	3970/11 1	9242/08	3524/09	4717/08	7676/08	7994/08 1	7814/12	10.8
12.0	3526/08	1268/08	7813/12	9426/12	6435/11	6357/11	9431/10	6276/11	1868/11	277/08	8425/12	8589/12	2170/84	4204/10	6277/10	6669/10	12.0
13.2	886/90	9430/10	2034/09	3581/00	2554/86												13.2
14.4	PLACENTA	905/13	506/14	11648/12	153/12	5273/94	6739/12	7215/12	3624/12	152/12	515/86	1414/87	243/87	8352/05	10562/14	7671/04	14.4
15.6	10952/07	5980/07	4710/07	1099/93	4711/07	7210/95	3120/92	2022/93	2397/07	967/07	8887/02	6929/02	5757/02	7002/96	7786/02	4211/90	15.6
16.8	89/02	1546/09	1395/09	2080/02	6261/08	2086/09	2150/10	2612/00	1035/09	6555/08	5770/09	4369/03	5115/08	2931/06	2835/09	1841/10	16.8
18.0	781/10	8154/13	7851/10	10917/10	7787/09	2139/13	10136/05	8447/06	8157/05	7030/06	9093/07	641/08	2652/11	1423/12	6118/04	5078/11	18.0
19.2	5583/01	798/09	6728/13	3966/11	3036/03	4252/14	4406/98	1193/11	1639/11	288/96	5047/96	2398/94	885/93				19.2
20.4	PLACENTA	8246/05	910/11	639/08	199/10	10942/06	280/07	3669/07									20.4
21.6	3939/93	6268/94	3811/93	3065/93	3812/93	3787/93	2165/82	3165/93	3351/93	3225/93	573/13	2076/02					21.6
22.8																	22.8

Figura 2 - Mapa de TMA, utilizado para a orientação da inclusão dos casos nos blocos de TMA e, posteriormente, a identificação dos casos para a interpretação dos resultados obtidos.

Estudo Imuno-histoquímico

As lâminas feitas a partir do TMA foram coradas, no Departamento de Patologia da UNESP/HC e no Laboratório Patologika (Aracaju/SE), para os marcadores imuno-histoquímicos com anticorpos primários para CD20, CD3, MUM1, CD45, CD138, kappa, lambda, CD34, KI-67, Ciclina-D1, EMA e P53, conforme padronização do Serviço e especificações de antígenos primários (Tabela 4). Os cortes tiveram espessura de 3,0 µm, montados em lâminas de vidro previamente preparadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma Chemical Corporation, P-7886, Saint Louis, MO, EUA) e posteriormente desparafinizados em xilol por 5 minutos (4 banhos), hidratados em álcool etílico absoluto (5 banhos) e lavados com solução salina tamponada (PBS) por 5 minutos, seguindo-se pelo bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 3% por 10 minutos. A recuperação antigênica foi realizada através do sistema PTLINK da Dako, conforme recomendação do fabricante, em pH ácido ou básico, de acordo com a padronização de cada anticorpo. A seguir, as lâminas foram retiradas do equipamento e incubadas em solução de lavagem (Envision Flex Wash Buffer – solução salina tamponada com Tris contendo Tween 20, pH 7.6) por 5 minutos e aplicada a solução de bloqueio de peroxidase por 5 minutos (Envision Flex peroxidase block) – tampão fosfato contendo peróxido de hidrogênio, NaN₃ e detergente. Posteriormente, as lâminas foram incubadas

com os anticorpos primários por pelo menos 12 horas, durante o período noturno, à temperatura de 4°C. Após lavagem em PBS, aplicado o polímero por 20 minutos (Envision Flex/HRP) – dextran – acoplado com moléculas de peroxidase e anticorpo secundário direcionado contra imunoglobulinas de coelho e camundongo. Para identificação da reação, utilizou-se a solução de trabalho (Envision Flex Substrate Working Solution – DAB) mais solução tamponada contendo peróxido de hidrogênio) por 10 minutos, seguida de lavagem por 5 minutos. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Meyer e as lâminas montadas com resina e rotuladas.

Antígeno	Clone	Diluição	Fabricante	Interpretação
CD45	X16/99	1:100	DAKO	Membrana
CD20	L26	1:200	Novocastra	Membrana
CD34	QBEND-10	1:50	DAKO	Membrana
CD3	565	1:800	Novocastra	Membrana
Ciclina D1	P2D11F11	1:200	Leica	Nuclear
CD138	MI15	1:100	DAKO	Membrana
Ki-67	MIB-1	1:500	DAKO	Nuclear
Kappa	A8B5	1:200	DAKO	Membrana/Citoplasma
Lambda	N10/2	1:400	Neomarkers	Membrana/Citoplasma
MUM1/IRF4	MUM1P	1:1200	DAKO	Nuclear
EMA	GP14	1:40	DAKO	Membrana
P53	DO7	1:800	DAKO	Nuclear

Tabela 4 – Especificações dos antígenos primários, fonte e região de positividade na célula avaliada. DAKO (Carpinteria, CA, EUA); Neomarkers/Lab Vision (Fremont, CA, EUA); Novocastra (Newcastle, Reino Unido).

Obtenção de dados clínicos

As informações clínicas (idade, sexo, sintomas constitucionais, marcadores laboratoriais/bioquímicos, tempo de *plateau* e evolução para progressão de doença após tratamento, lesões de órgãos-alvo e comorbidades associadas, estadiamento clínico – conforme estadios ISS e DS, terapêutica inicial, evolução clínica e data de óbito/último contato) foram obtidas a partir de revisão dos prontuários físicos e eletrônicos e arquivos de mielogramas e laudos anátomo-patológicos dentro do HCFMB-UNESP e catalogadas numa base de dados, usando o programa FileMaker (Figura 3).

UNESP-FMB-Departamento de Patologia
PROJETO: Mieloma múltiplo

RG UNESP **Codigo Mielograma**

anos **DN:**

B diagnóstico **B 1a recaída** **B pos TMO**

BLOCO **CAIXA** **TMA**

Data do diagnóstico

Resumo clínico

Perda Ponderal **Fraqueza**

ESTADIAMENTO

Dor óssea **Fratura Patologica** **Anemia (Hb10)** **Plaquetopenia (100000mm3)** **Infiltração mielograma**

DHL **Lesão Lítica** **Beta2M** **Albumina** **Sódio** **Creatinina** **ISS**

VHS aumentado **Hipercalcemia** **EPS pico monoclonal** **EPU pico monoclonal** **Acido urico**

QT **Talidomida** **RT** **TaMO** **PLATEAU** **ÓBITO**

RECIDIVA **APÓS TEMPO** **RESPOSTA TERAP.**

SOBREVIDA (anos)

DIAGNÓSTICO **BartlFrisch**

Cariótipo **Último contato**

CD138 **kappa** **lambda** **Ig cadeia pesada** **PAX5** **Ig%** **Não secretor**

CD20 **CD3** **CD105** **CD34** **EMA**

Ciclina D1 **MUM1** **CD56** **p53** **KI-67 (%)**

OBSERVAÇÕES

OBSERVAÇÕES

Figura 3 – Imagem da tela do programa Filemaker Pro 12, utilizado para arquivamento dos dados coletados.

Metodologia Estatística

Foi elaborada a análise descritiva dos dados apresentando distribuições de frequência para as variáveis qualitativas e calculadas as médias, desvios padrão, valores mínimo e máximo e mediana para as variáveis quantitativas.

Testes de associação entre variáveis qualitativas foram feitos empregando a estatística Qui-quadrado de Pearson. Figuras foram elaboradas apresentando visualmente as distribuições observadas e o resultado do nível descritivo do teste de associação – p.

Gráficos do tipo mosaico⁶⁷ foram elaborados para apresentar os cruzamentos das variáveis discretas, visando expor o resultado do teste de associação.

A técnica multivariada de Análise Fatorial para Dados Misto – [Factor Analysis for Mixed Data – FAMD]⁶⁸, foi utilizada para verificação da contribuição das variáveis qualitativas e quantitativas simultaneamente possibilitando assim uma visão holística de todas as variáveis pesquisadas, ela fundamentou a escolha das variáveis para o ajuste do Modelo Linear Generalizado.

A técnica multivariada de Modelos Lineares Generalizados^{69, 70} (regressão logística multivariada) foi empregada para testar os efeitos do sexo, da radioterapia, do tipo de quimioterapia, da Faixa etária e da anemia sobre o status de vida dos pacientes.

As curvas de sobrevida foram obtidas usando a metodologia de Kaplan & Meier^{71, 72}. A estatística de Breslow⁷³, baseada no Log-rank, foi empregada para testar a diferença entre as curvas observadas.

Os fatores independentes associados ao paciente foram analisados ajustando modelos de riscos proporcionais de Cox^{73, 74}. Razões de Risco foram apresentadas como riscos relativos juntamente com seus Intervalos de Confiança com coeficiente de 95%. Os intervalos de confiança para as curvas e testes foram feitos com nível de significância de 5%⁷³.

As análises e figuras foram elaboradas com o software R (R Core Team, 2017).

Resultados

Achados Clínico-Laboratoriais

O Hospital das Clínicas da FMB é um hospital geral com serviço oncológico de pequeno porte, o que explica em parte o tamanho reduzido dos grupos de casos. Contudo, havia ampla documentação de dados clínicos e laboratoriais dos pacientes. A idade mediana foi de 62,5 anos, com mínima de 26 anos e máxima de 94 anos e discreta prevalência no sexo masculino (54,8%, 144 pacientes), com menor representatividade dos pacientes com mais de 80 anos – 5,8% dos pacientes diagnosticados com mais de 80 anos de idade, 56,9%, entre 61 e 80 anos, e 37,3%, abaixo dos 60 anos. A maioria dos pacientes foi diagnosticada com doença avançada (maiores estadios clínicos, com lesões de órgãos-alvo) e foram observadas diferenças significativas entre as curvas de sobrevida em função do estadio ISS - o tempo médio de vida para o Estadio ISS= 1 foi de 185 meses, para o estadio ISS = 2, 94 meses e para o estadio ISS = 3, 67 meses, Há forte indicativo de influência da faixa etária nas curvas de sobrevida ($p=0,088$), mas não foi possível concluir pelo baixo número de pacientes com menos de 40 anos de idade. O tempo médio de sobrevida para pacientes entre 41 e 60 anos foi de 57 meses, para o grupo acima de 60 anos foi de 43 meses. A distribuição segundo as faixas etárias está apresentada na Tabela 5.

Idade	n	%
Até 40	13	5.0
41 a 60	84	32.3
61 a 80	148	56.9
> 80	15	5.8
Total	260	100.0
Missing	3	

Tabela 5 – Distribuição dos pacientes por Faixa Etária

Na Tabela 6 apresentamos a distribuição do estadio DS dos casos:

Estadio DS	n	%
1A	27	10.4%
1B	6	2.3%
2A	126	48.6%
2B	59	22.8%
3A	18	6.9%
3B	23	8.9%
Total	259	100.0%
Missing	4	

Tabela 6 – Distribuição do Estadio DS

Na Tabela 7 apresentamos a distribuição do Estadio ISS dos casos:

Estadio ISS	n	%
1	57	21.8%
2	114	43.7%
3	90	34.5%
Total	261	100.0%
Missing	2	

Tabela 7 – Distribuição do Estadio ISS

Na Figura 4 e Tabela 8 mostramos informações sobre a curva de sobrevivência segundo o estadio ISS:

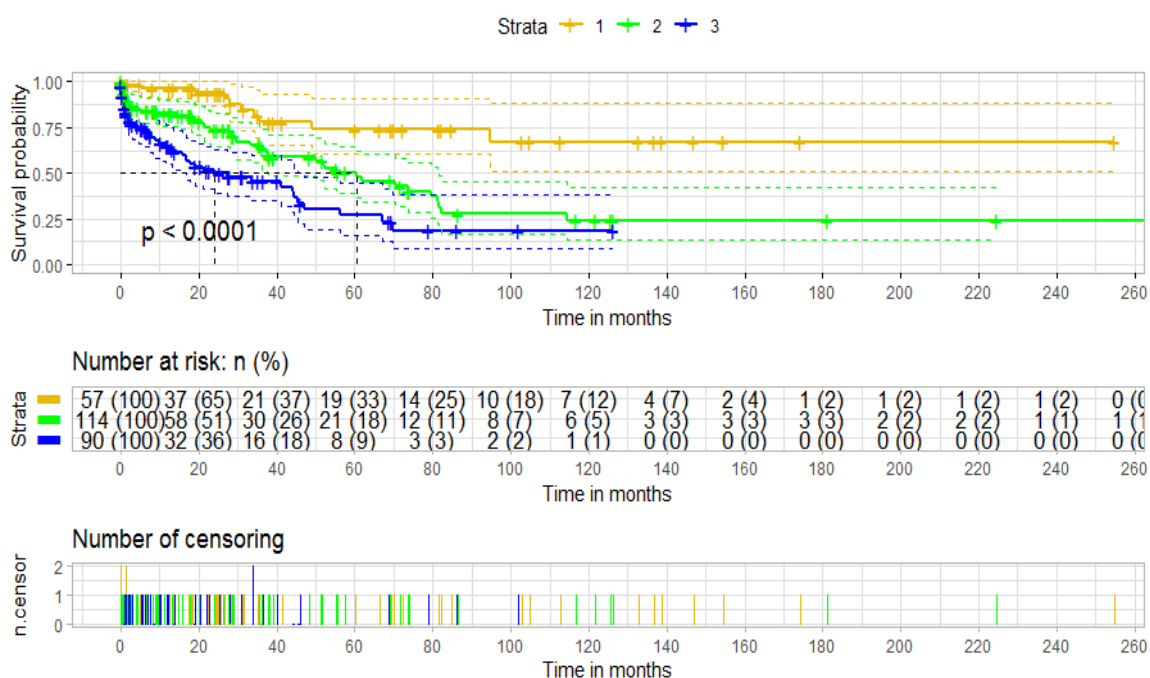


Figura 4 – Curvas de sobrevivência em função do Estadio ISS

Estadio ISS	n	Óbitos	Média (m)	Desvio	Mediana
1	57	10	185.2	19.2	NA
2	114	48	94.3	13.8	37.9
3	90	48	67.2	15	15.8

Tabela 8 – Estatísticas de Sobrevida segundo o Estadio ISS

A Tabela 9 mostra a prevalência de anemia em função da faixa etária:

Anemia	Até 40	41 a 60	> 60	Total
Não	7	42	70	119
Sim	6	42	94	142
Total	13	84	164	261

Tabela 9 – Anemia em função da Faixa etária

Quanto aos marcadores laboratoriais e bioquímicos, a Tabela 10 mostra estatísticas descritivas para marcadores quantitativos com medianas elevadas, corroborando a característica de diagnóstico já em fase avançada de doença; bem como qualitativos (Tabela 11) confirmando predomínio de indivíduos secretores de cadeias leves de imunoglobulinas séricas e/ou urinárias e elevação de velocidade de hemossedimentação (VHS), denunciando o importante estado inflamatório sistêmico.

Variável	n	Mediana	Média (m)	Min	Max
Ácido Úrico	225	6.2	6.68	1.4	21.9
Albumina	234	3.3	3.25	1.2	5.3
Beta2M	155	4.5	7.19	0.5	54.1
Creatina	245	1.5	2.34	0.4	16.6
DHL	170	410	554.4	70	6081
Sódio	215	140	139.1	120	155

Tabela 10 – Estatísticas descritivas para os marcadores quantitativos

Variável	n	Sim	Não
EPS	234	211	23
positivo		90%	10%
EPU	201	86	115
positivo		43%	57%
VHS	102	85	17
aumentado		83%	17%

Tabela 11 – Estatísticas descritivas para os marcadores qualitativos

Não foi identificada diferença entre tipos citológicos; análise do perfil imunofenotípico dos plasmócitos neoplásicos, densidade vascular do microambiente e fatores prognósticos clínicos entre pacientes com MM secretores e não secretores. A Figura 5 mostra as curvas de sobrevida de

pacientes segundo o grupo secretor e a Tabela 12 mostra os dados quantitativos:

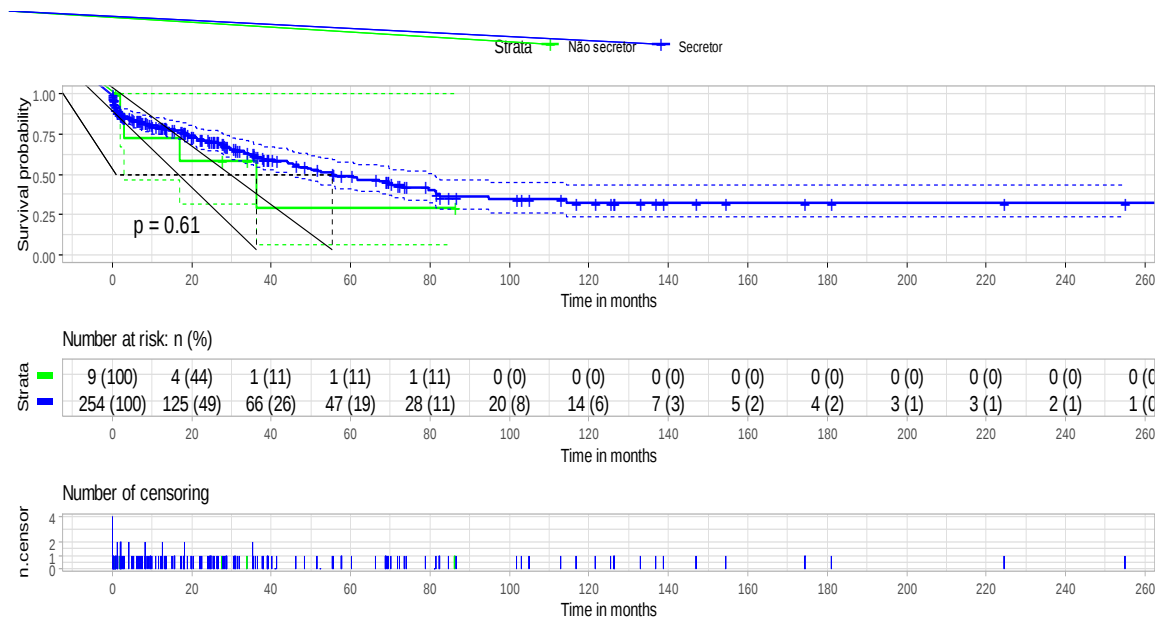


Figura 5 – Curvas de sobrevida segundo grupo secretor

Secretor	n	Óbitos	Média (m)	Desvio	Mediana
Não	9	4	65.6	34.62	NA
Sim	254	102	81.8	6.35	81.1

Tabela 12 – Tempo de sobrevida e condição de ser secretor

Não foi evidenciada diferença significativa entre os grupos segundo a condição de secreção de cadeias leves de imunoglobulina; contudo, devemos observar que o número de casos de MM não secretores foi de apenas 9 pacientes.

Sobre as lesões de órgãos alvo (Tabela 13) foi observado mais hipercalcemia (Tabela 14) em indivíduos mais velhos; contudo, sem associação significativa. Dor óssea (Tabela 15), fraqueza (Tabela 16) e lesão lítica (Tabela 17) foram as mais frequentes, independente da faixa etária. Conforme os métodos radiológicos disponíveis, menos de metade dos pacientes apresentou fratura patológica (Tabela 18) ao diagnóstico, a despeito da prevalência de hipercalcemia e lesões líticas. Em nossa amostra a disfunção renal grave foi menos prevalente que as descrições da literatura, com consequentes menor injúria tecidual direta; poucos pacientes com amiloidose que leva a dano glomerular; menos exposição a contraste; baixa prevalência de hiperuricemia e ausência de significado biológico estatístico quanto à distribuição de depósitos

de imunoglobulina monoclonal de cadeias leves ou pesadas em pacientes secretores e não secretores.

Lesões	Sim	%	Não	%	Total
Anemia	142	54.4%	119	45.6%	261
Hipercalcemia	119	48.2%	128	51.8%	247
Dor óssea	179	74.0%	63	26.0%	242
Fraqueza	147	63.4%	85	36.6%	232
Fratura patológica	98	40.5%	144	59.5%	242
Lesão lítica	147	61.3%	93	38.8%	240
Perda ponderal	126	53.4%	110	46.6%	236
Plaquetopenia	35	13.5%	225	86.5%	260

Tabela 13 – Distribuições da presença de lesões de órgãos-alvo da MM

Hipercalcemia	Até 40	41 a 60	> 60	Total
Não	9	39	80	128
Sim	2	41	76	119
Total	11	80	156	247

Tabela 14 – Hipercalcemia em função da Faixa etária

Dor óssea	Até 40	41 a 60	> 60	Total
Não	4	23	36	63
Sim	8	54	117	179
Total	12	77	153	242

Tabela 15 – Dor óssea segundo a Faixa etária

Fraqueza	Até 40	41 a 60	> 60	Total
Não	5	30	50	85
Sim	4	42	101	147
Total	9	72	151	232

Tabela 16 – Fraqueza segundo a Faixa etária

Lesão Lítica	Até 40	41 a 60	> 60	Total
Não	6	27	60	93
Sim	5	49	93	147
Total	11	76	153	240

Tabela 17 – Lesão Lítica segundo a Faixa etária

Fratura patológica	Até 40	41 a 60	> 60	Total
Não	6	47	91	144
Sim	5	29	64	98
Total	11	76	155	242

Tabela 18 – Fratura patológica segundo a Faixa etária

A Tabela 19 traz a correlação das variáveis acima através da distribuição segundo estadio clínico de Durie & Salmon¹² em função da faixa etária, corroborando a evidência de diagnóstico em fases mais adiantadas da doença.

Estadio DS	Até 40	41 a 60	> 60	Total
1A	4	11	12	27
1B	1	1	4	6
2A	7	42	77	126
2B	0	18	41	59
3A	0	5	13	18
3B	1	7	15	23
Total	13	84	162	259

Tabela 19 – Estadio DS em função da Faixa etária

Como MM não tem cura, uma informação importante é o período de vida do paciente, após o diagnóstico, sem a necessidade de intervenção terapêutica – o tempo de *plateau*. Do total de pacientes (263), um subgrupo de 63 pacientes permaneceram em *plateau*, desde o diagnóstico, sem necessidade de nenhum tratamento; contudo, não foi possível identificar características clínicas, laboratoriais ou achados de medula óssea (células tumorais e microambiente) com significância estatística em relação aos pacientes com progressão precoce. Como o paciente pode ter mais de um *plateau*, utilizamos, neste estudo, somente o primeiro deles.

Na Figura 6 apresentamos a distribuição do tempo de *plateau* e o percentual de sobreviventes. A faixa que envolve a curva é a região de confiança feita com 95% de coeficiente de confiança⁷³. O tempo mediano de primeiro *plateau* foi de 36 meses, o limite inferior do intervalo de confiança foi igual a 20 meses e o limite superior ficou em aberto, não sendo possível estimar por perda completa de seguimento de pacientes em primeiro *plateau* (óbito por MM ou censura por morte por outras causas ou falta de informação registrada/perda de contato ou início de tratamento).

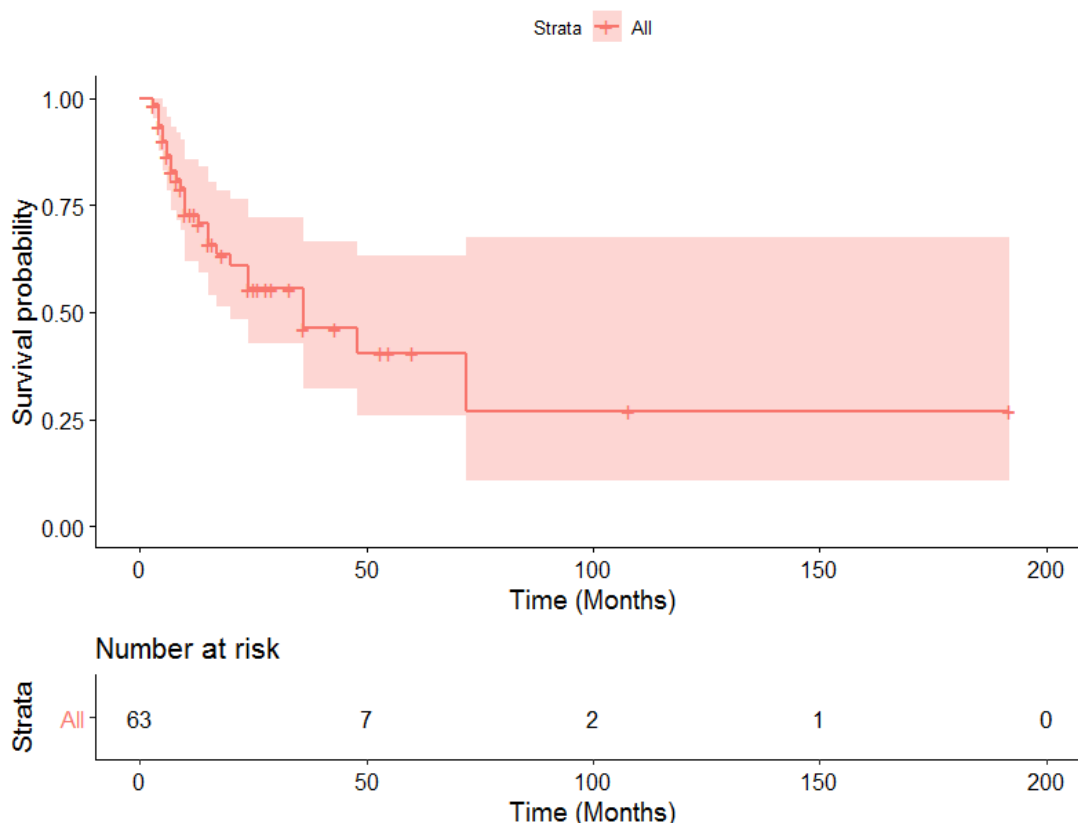


Figura 6 – Tempo de *plateau* e percentual de sobreviventes a MM

Em relação à progressão da doença após tratamento, 83 puderam ser avaliados. Destes, 20,5% mantiveram-se em remissão/*plateau* durante o tempo em que foram acompanhados, 39,8% recidivaram menos de um ano do término do primeiro tratamento e 39,8% tiveram recidiva tardia, com tempo de *plateau* prolongado, mas não foi possível identificar variáveis clínicas ou de avaliação da medula óssea, com significância estatística, definidoras do comportamento biológico tumoral destes pacientes.

A seguir apresentamos as curvas de incidência acumulada de óbitos – curva de sobrevivência dos pacientes diagnosticados com MM (curvas de mortes devido ao câncer e aquelas relativas às mortes totais incluindo aquelas por outras causas, Figura 7) e de sobrevivência em relação à faixa etária (Figura 8) e resposta terapêutica (Figura 9). Os dados utilizados na elaboração dessas curvas estão no Anexo 2.

Como o número de pacientes com idade inferior a 40 anos foi de apenas 13, houve dificuldade em evidenciar a diferença entre as curvas de sobrevida; contudo, $p=0,088$, muito próximo de nível de confiança 5%, adotado nos testes.

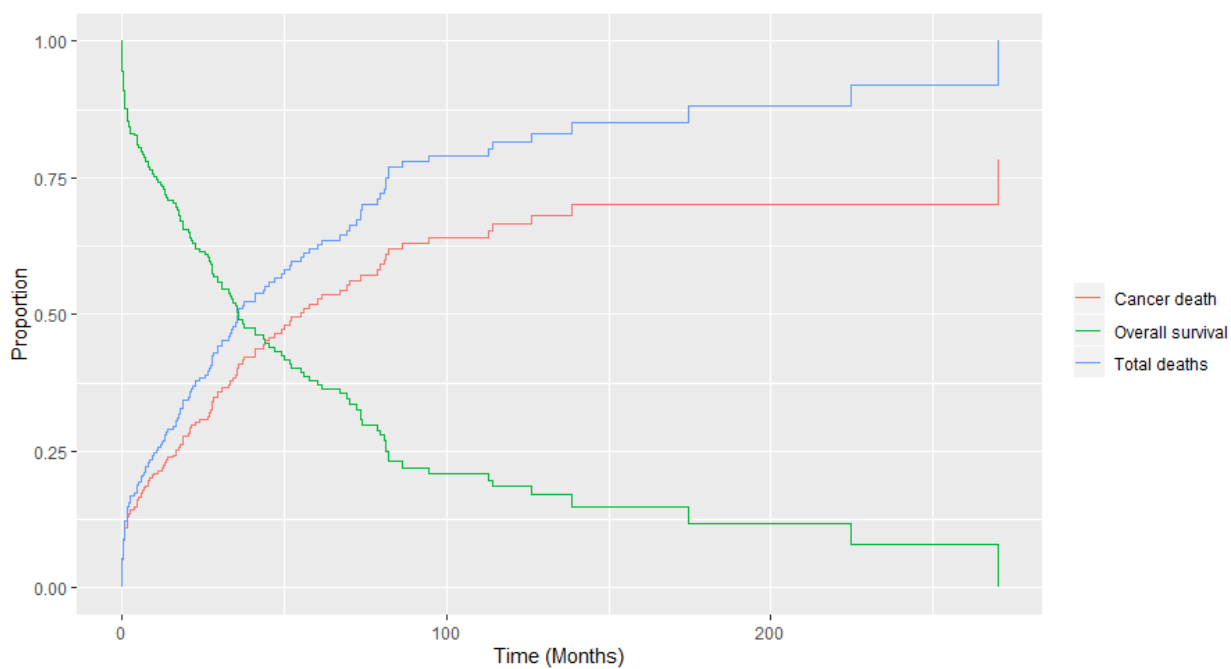


Figura 7 – Incidência acumulada de mortes e taxa de sobreviventes

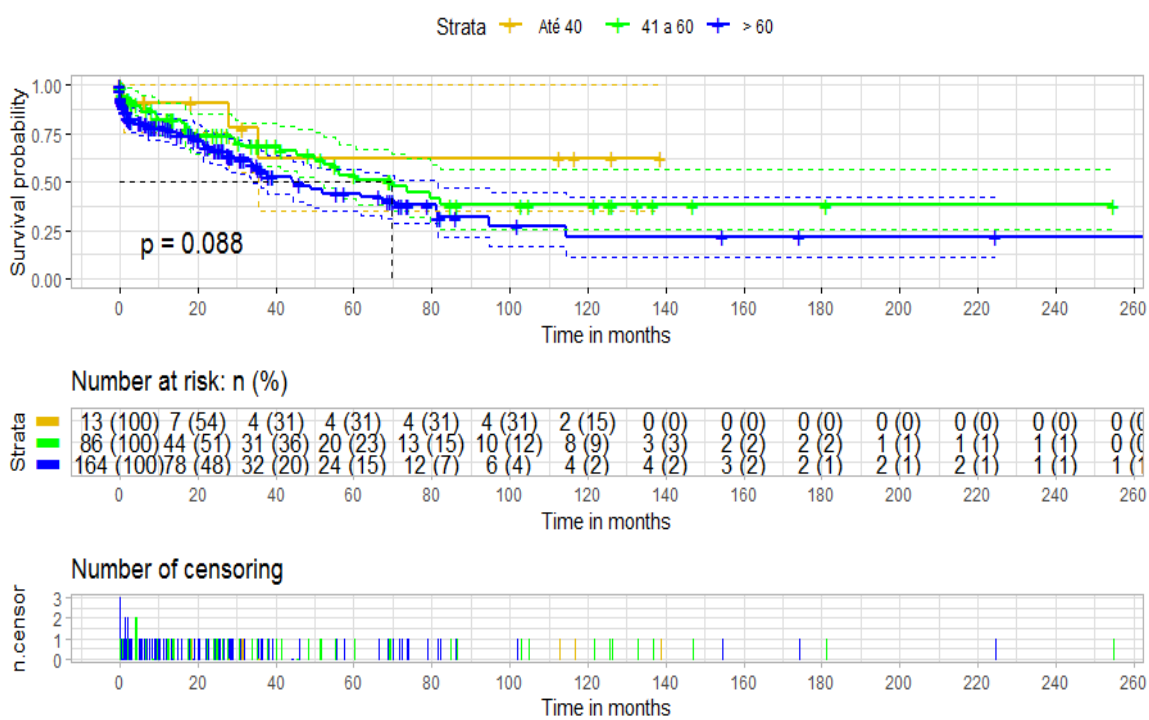


Figura 8 – Curvas de sobrevida segundo as Faixas etárias

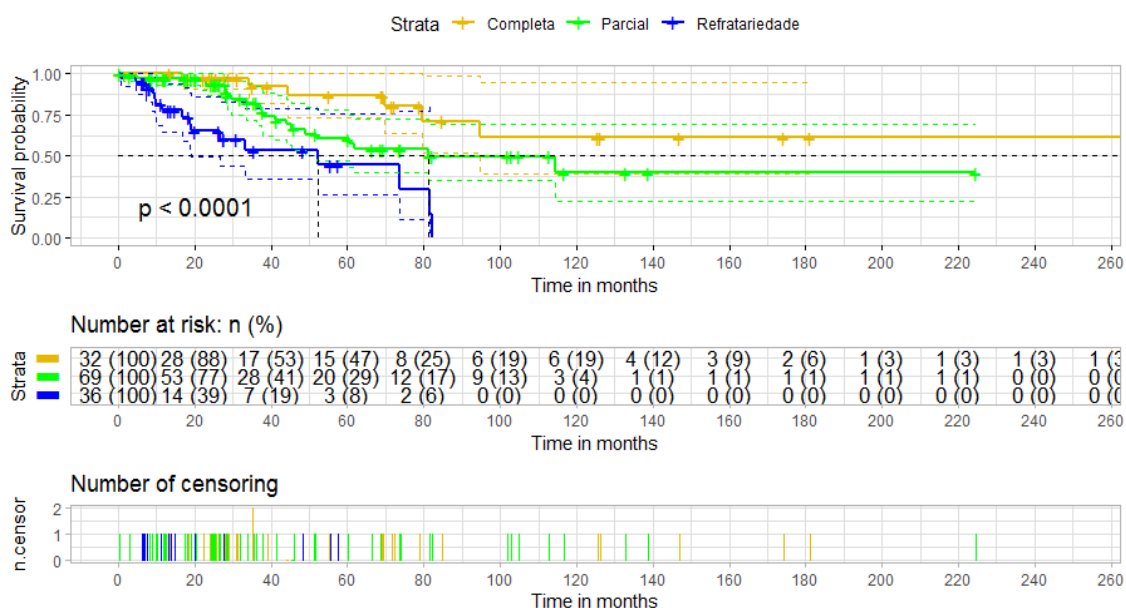


Figura 9 – Curvas de sobrevida segundo a resposta terapeutica

Foi detectada diferença significativa entre as curvas de sobrevida em função do tipo de resposta terapeutica, $p < 0.0001$. Na Tabela 20 apresentamos as estatísticas relativas aos tempos de sobrevida segundo a resposta terapeutica.

Resposta Terapeutica	n	Óbitos	Média	Desvio	Mediana
Completa	32	7	162.9	20.96	269.9
Parcial	69	21	121.3	16.63	81.1
Refratariedade	36	16	47.4	6.49	52.4

Tabela 20 – Tempos de sobrevida em função da resposta terapêutica (TTS)

Como era de se esperar, as curvas de sobrevida são distintas em função da resposta terapeutica ao tratamento, se a resposta foi completa, o tempo total de sobrevida (TTS) médio foi de 163 meses, para resposta parcial o TTS foi de 121 meses, já para o grupo refratário, foi de apenas 47 meses.

A Tabela 21 e Figura 10 mostram informações relacionadas ao tempo de recidiva segundo o sexo:

Sexo	n	Óbitos	Média	Desvio	Mediana
Feminino	25	11	56.7	12.5	36
Masculino	38	15	63.7	11.5	24

Tabela 21 – Tempo de Recidiva em função do Sexo

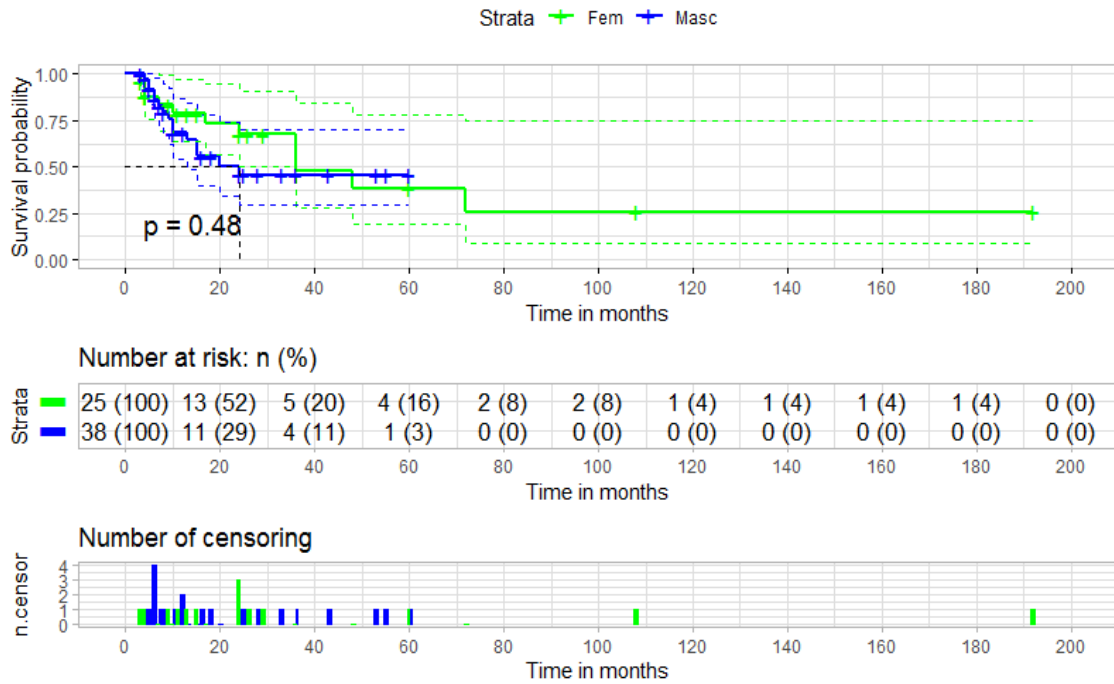


Figura 10 – Tempo de Recidiva segundo o Sexo

Não foram significativas as diferenças entre as curvas de tempo de recidiva por Sexo.

A Figura 11 e Tabela 22 mostram informações relacionadas ao tempo de recidiva segundo a faixa etária:

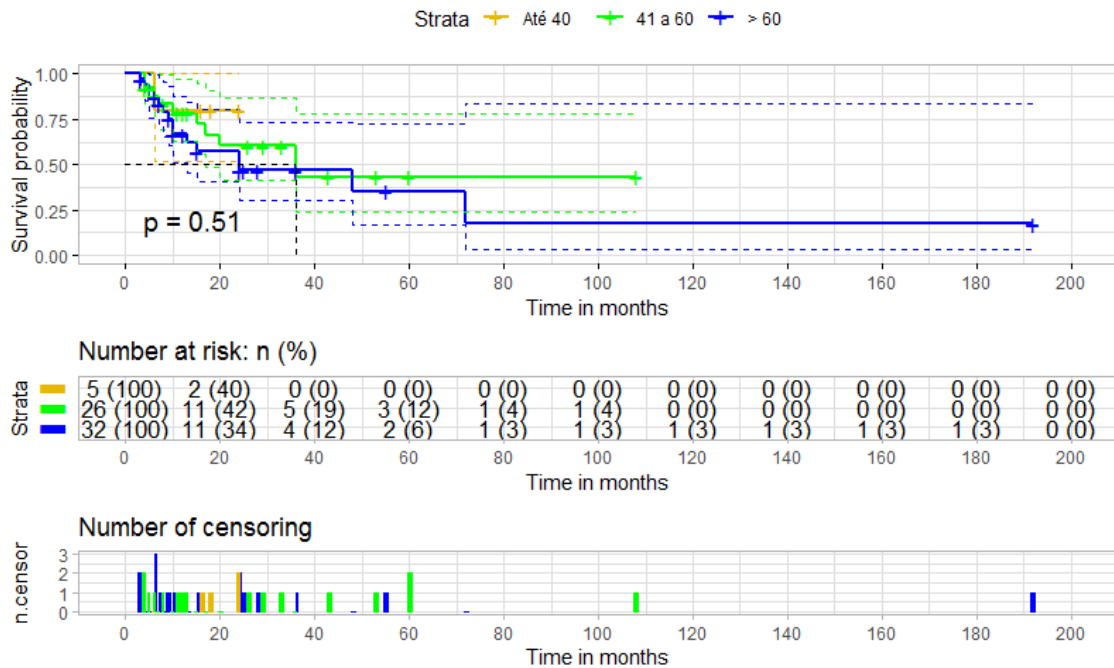


Figura 11 – Tempo de Recidiva segundo a Faixa etária

Faixa Etária	n	Óbitos	Média	Desvio	Mediana
Até 40	5	1	87.6	18.25	NA
41 a 60	26	10	57.2	11.29	17
> 60	32	15	43.4	9.42	13

Tabela 22 – Tempo de Recidiva segundo a Faixa etária

Não foram significativas as diferenças entre as curvas de tempo de recidiva por Faixa etária.

Achados de Análise Citológica, Histológica e de TMA

Quanto à infiltração ao mielograma, a mediana foi igual a 46% tendo sido observado o mínimo de 0 e o máximo de 100% e a distribuição segundo faixa etária está demonstrada na Tabela 23 e figura 12. Como podemos observar, a associação não foi significativa ($p=0,10934$).

Infiltração	Até 40	41 a 60	> 60	Total
<30%	7	19	38	64
>=30%	4	39	79	122
Total	11	58	117	186

Tabela 23 – Infiltração segundo Faixa etária

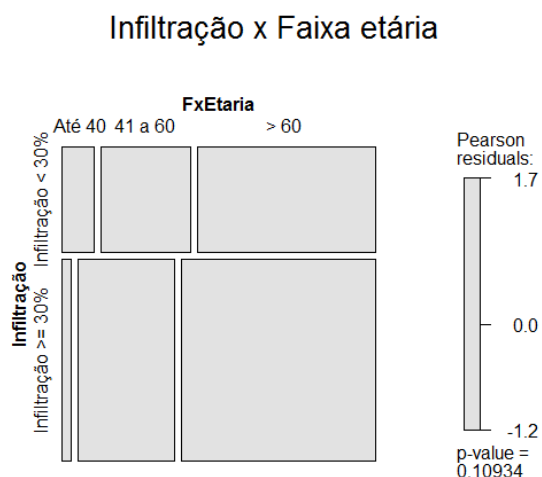


Figura 12 – Distribuição da Infiltração segundo a Faixa etária

O padrão morfológico das células pode variar entre plasmócitos bem diferenciados de aspecto normal (padrão Marschalko), pequenas e com infiltrado linfóide exuberante associado (padrão linfoplasmacítico), células variáveis e pleomórficas, por vezes binucleadas (padrão pleomórfico), células em anel de sinete ou com citoplasma claro, acúmulos de imunoglobulinas na forma de inclusões nucleares ou cristais citoplasmáticos de aspecto

monocitoide (padrão assíncrono), plasmablastos (padrão plasmablástico) ou células de padrões múltiplos, não caracterizáveis dentre as descrições prévias. Sobre a classificação de Bartl & Frish, foi mais frequente o padrão pleomórfico (29,4%), seguida de perto pelos tipos plasmablástico (25,4%) e Marschalko (22,3%).

A distribuição dos achados segundo a classificação de Bartl & Frish está apresentada na Tabela 24.

Bartl&Frish	Frequência	%
Assíncrono	25	12.7%
Linfoplasmacítico	5	2.5%
Marschalko	44	22.3%
Misto	15	7.6%
Plasmablástico	50	25.4%
Pleomórfico	58	29.4%
Total	197	100.0%
Missing	66	

Tabela 24 – Distribuição da Classificação de Bartl&Frish

Os padrões mais comuns de infiltração histológica, semelhante à literatura, foram o nodular ou difuso com erosão óssea, fibrose variável e neoformação vascular, mas sem predomínio ou tendência biológica estatisticamente significativa para marcadores específicos das células tumorais ou do estroma medular. Como já comentado, existe heterogeneidade intraclonal dentre os clones de MM predominantes, a qual está estreitamente relacionada ao comportamento biológico, progressão de doença e desenvolvimento de resistência terapêutica, que também foram observados na análise evolutiva dos casos mais agressivos da amostra; contudo, com o nosso número de casos não foi possível evidenciar significância estatística.

A Tabela 25 mostra o perfil imunofenotípico dos plasmócitos neoplásicos, nos casos analisados.

Quanto aos marcadores imuno-histoquímicos em relação à faixa etária, para o marcador p53 (Tabela 26), apesar de não ter havido associação significativa, $p=0,062806$, há uma tendência estatística. Com um maior número de casos essa hipótese poderá ser confirmada.

A Tabela 27 descreve parâmetros do microambiente avaliados por estudo imuno-histoquímico no TMA, quanto à prevalência de infiltrado

intersticial por linfócitos T (CD3+) e grau de neovascularização (CD34+), nos casos analisados.

Variável	Nível	Freq.	%
Ciclina D1	Negativo	59	36.9%
	Positivo	101	63.1%
	N/A	103	
EMA	Negativo	59	36.9%
	Positivo	101	63.1%
	N/A	103	
CD45	Negativo	28	19.9%
	Positivo	113	80.1%
	N/A	122	
KAPPA	Negativo	62	38.8%
	Positivo	98	61.3%
	N/A	103	
LAMBDA	Negativo	103	64.8%
	Positivo	56	35.2%
	N/A	104	
MUM1	0	10	6.8%
	1	85	57.8%
	2	47	32.0%
	3	5	3.4%
	N/A	116	
p53	Negativo	104	68.9%
	Positivo	47	31.1%
	N/A	112	

Tabela 25 – Resultados do perfil imunofenotípico dos plasmócitos neoplásicos

p53	Até 40	41 a 60	> 60	Total
Não	8	38	58	104
Sim	1	8	38	47
Total	9	46	96	151

Tabela 26 – p53 versus Faixas etárias

Variável	Nível	Freq.	%
CD3	0	47	33.6%
	1	71	50.7%
	2+3	22	15.7%
	N/A	123	
CD34	0	54	45.0%
	+	56	46.7%
	++	10	8.3%
	N/A	143	

Tabela 27 – Resultados do perfil imunofenotípico das células do estroma/microambiente

Baseados nos achados de que osteoclastos protegem as células de citotoxicidade mediada por linfócitos T e que PD-1, expresso na superfície de

células T e B, e seu ligante nos plasmócitos do MM, no nosso trabalho, não identificamos relação estatística significativa entre fatores prognósticos clínicos/refratariedade terapêutica e infiltrado linfocitário (Tabela 28).

Marcador CD3	Resposta Terapêutica			Total
	Completa	Parcial	Refratariedade	
0	8	14	8	30
1	8	22	12	42
2+3	4	3	3	10
Total	20	39	23	82
X-squared = 2.451, df = 4, p-value = 0.6534				

Tabela 28 – Marcador CD3 versus Resposta terapêutica

A intensidade de neovascularização, medida através da positividade de CD34 – marcador vascular/angiogênese é resultante de relação da célula tumoral com o microambiente. Tentamos correlacionar neovascularização com índice mitótico (Ki67, Tabela 29); contudo, provavelmente pela escassez de pacientes analisados, o teste de associação ($\chi^2=4,415$, $p=0,10998$) não permitiu concluir relação entre essas duas variáveis, nesta amostra. Assim também, não conseguimos mostrar associação significativa com refratariedade terapêutica (Tabela 30). Apesar disso, pacientes tratados com talidomida, cujo alvo de ação é impedir progressão tumoral pela imunomodulação da angiogênese, tiveram menor risco de morte e maior curva de sobrevida. A Figura 13 e Tabela 31 mostram as curvas e estatísticas de sobrevida em função do tratamento com talidomida.

CD34	Ki-67		Total
	<10%	>=10%	
0	1	2	3
+	6	1	7
++	0	1	1
Total	7	4	11

Tabela 29 - Associação entre CD34 e Ki-67

Quanto aos marcadores imuno-histoquímicos estudados nos plasmócitos em relação à resposta terapêutica, vale ressaltar associação significativa entre positividade para ciclina-D1 e refratariedade ($p=0,005962$, Tabela 32), tendência a associação entre CD45 positivo e refratariedade ($p=0,05092$, Tabela 33 –), associação entre marcador de cadeia leve de imunoglobulina kappa com resposta terapêutica completa ($p=0,0249$, Tabela 34) bem como marcador de cadeia leve de imunoglobulina lambda com resposta terapêutica parcial ($p=0,02027$, Tabela 35).

Marcador CD34	Resposta Terapêutica			Total
	Completa	Parcial	Refratariedade	
0	5	17	8	30
+	10	13	9	32
++	1	2	3	6
Total	16	32	20	68

X-squared = 3.601, df = 4, p-value = 0.4627

Tabela 30 - Marcador CD34 versus Resposta terapêutica

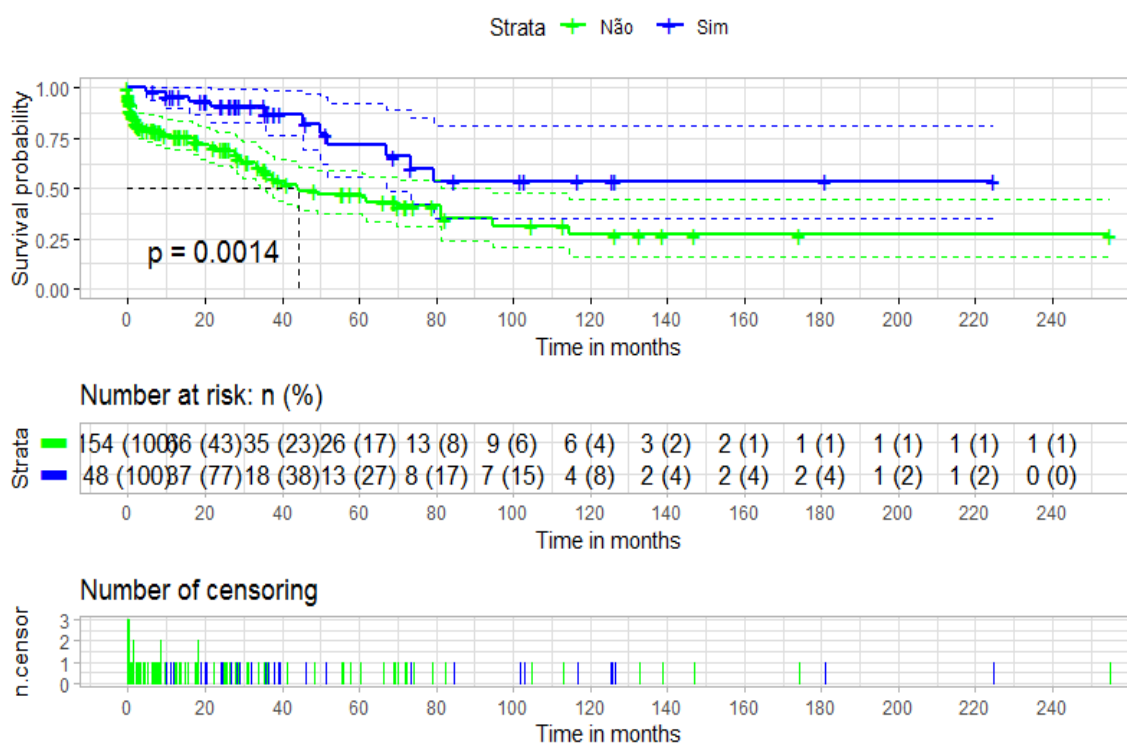


Figura 13 – Curvas de sobrevivência em função do tratamento Talidomida

Talidomida	n	Óbitos	Média	Desvio	Mediana
Não	154	62	91.7	12.5	44.2
Sim	48	11	151.7	21.1	NA

Tabela 31 – Estatísticas de Sobrevida segundo o tratamento com Talidomida

Marcador	Resposta Terapeutica			
Ciclina D1	Completa	Parcial	Refratariedade	Total
Negativo	14	17	4	35
Positivo	9	27	21	57
Total	23	44	25	92
X-squared = 10.245, df = 2, p-value = 0.005962				

Tabela 32 – Marcador Ciclina D1 versus Resposta terapeutica

Marcador CD45	Resposta Terapeutica			
	Completa	Parcial	Refratariedade	Total
Negativo	5	5	9	19
Positivo	14	35	14	63
Total	19	40	23	82
X-squared = 5.9549, df = 2, p-value = 0.05092				

Tabela 33 – Marcador CD45 versus Resposta terapeutica

Marcador Kappa	Resposta Terapeutica			
	Completa	Parcial	Refratariedade	Total
Negativo	3	22	9	34
Positivo	16	20	15	51
Total	19	42	24	85
X-squared = 7.3854, df = 2, p-value = 0.0249				

Tabela 34 – Marcador Kappa versus Resposta terapeutica

Marcador Lambda	Resposta Terapeutica			
	Completa	Parcial	Refratariedade	Total
Negativo	17	22	14	53
Positivo	2	20	9	31
Total	19	42	23	84
X-squared = 7.7972, df = 2, p-value = 0.02027				

Tabela 35 - Marcador Lambda versus Resposta terapeutica

Não foi possível evidenciar a associação entre o marcador CD45 positivo (antígeno comum de leucócitos, presente nas células tumorais) e refratariedade terapeutica; entretanto, é possível que, se houver um maior número de casos, possamos fazê-la, já que $p=0,05092$, muito próximo de 5%. A seguir, serão apresentados os resultados de marcadores da célula tumoral cuja positividade mostrou associação estatística significativa com a resposta terapeutica e impacto na sobrevida - ciclina D1 (Tabela 36,

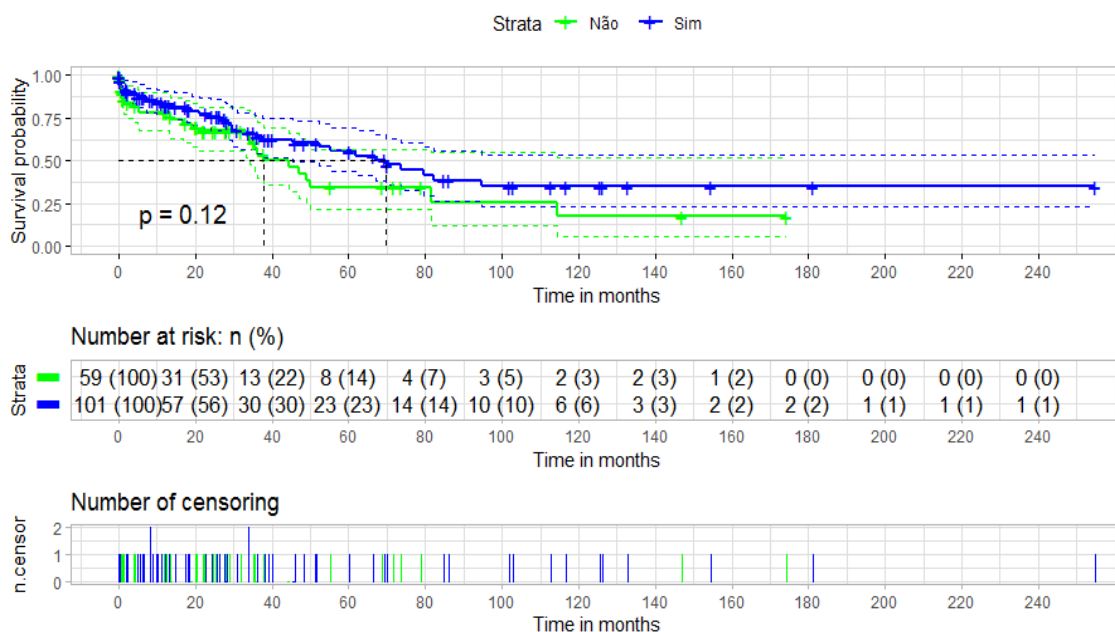


Figura 14), CD45 (Tabela 37, Figura 15) e cadeias leves de imunoglobulina – kappa (Tabela 38, Figura 16) e lambda (Tabela 39, Figura 17):

Ciclina D1	n	Óbitos	Média	Desvio	Mediana
Não	59	28	69.7	15.1	37.9
Sim	101	39	100.6	12.3	69.6

Tabela 36 – Estatísticas de sobrevida para o Marcador Ciclina D1

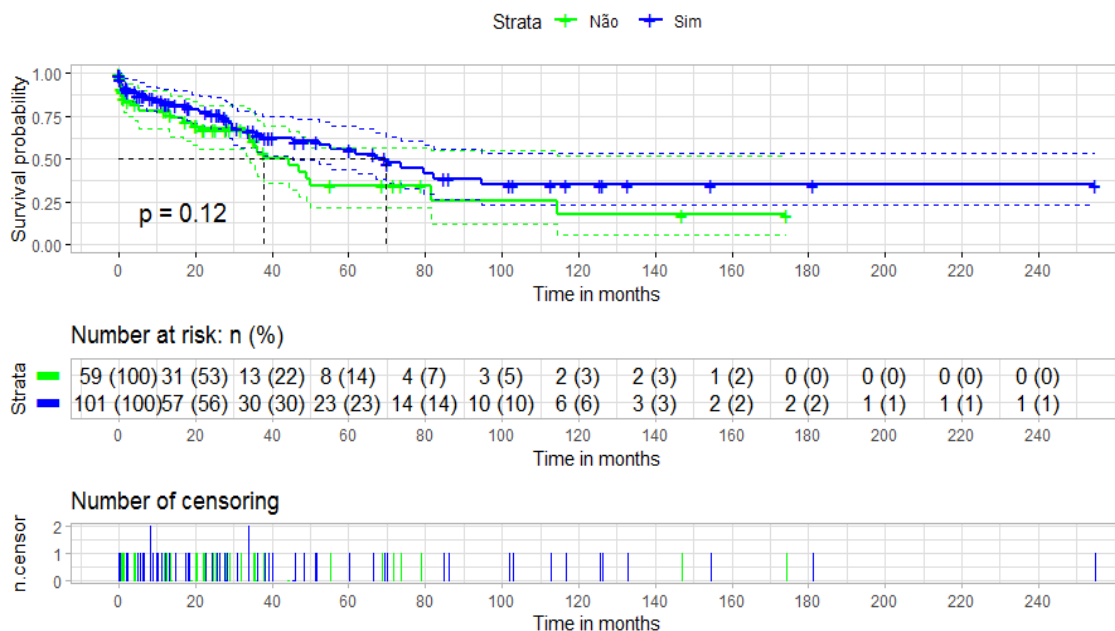


Figura 14 – Curvas de sobrevida segundo o marcador Ciclina-D1

CD45	n	Óbitos	Média	Desvio	Mediana
Não	28	11	96.6	23.5	52.4
Sim	113	51	85.3	11	49.1

Tabela 37 – Estatísticas de sobrevida para o Marcador CD45

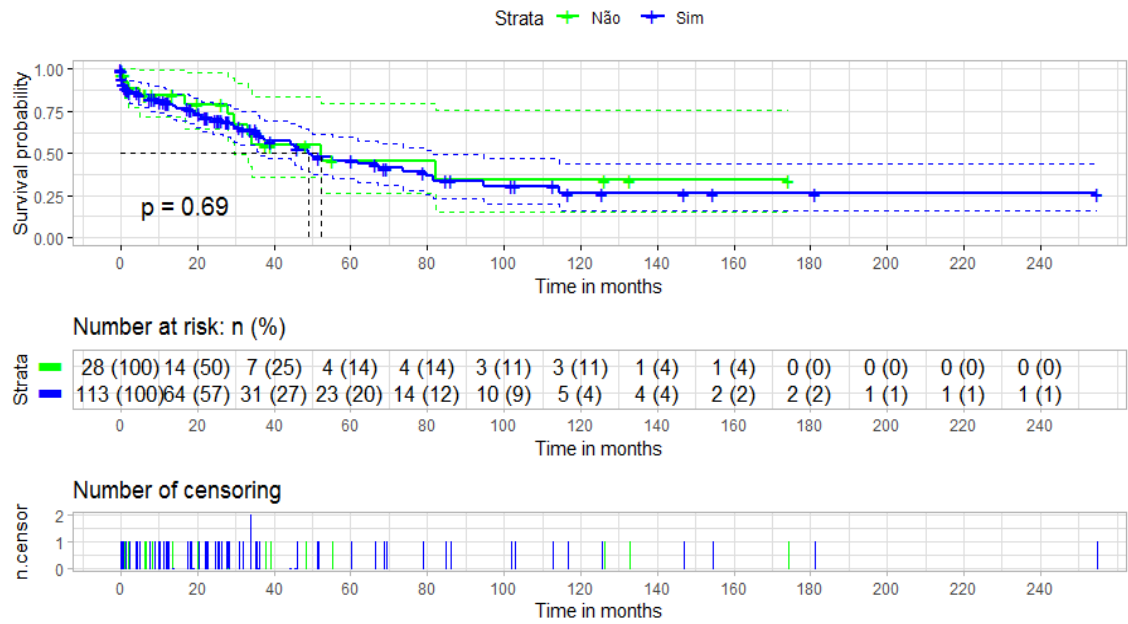


Figura 15 – Curvas de sobrevivência segundo o marcador CD45

Kappa	n	Óbitos	Média	Desvio	Mediana
Não	62	23	106	17.2	73.5
Sim	98	40	88.2	12.8	56.1

Tabela 38 – Estatísticas de sobrevida para o Marcador Kappa

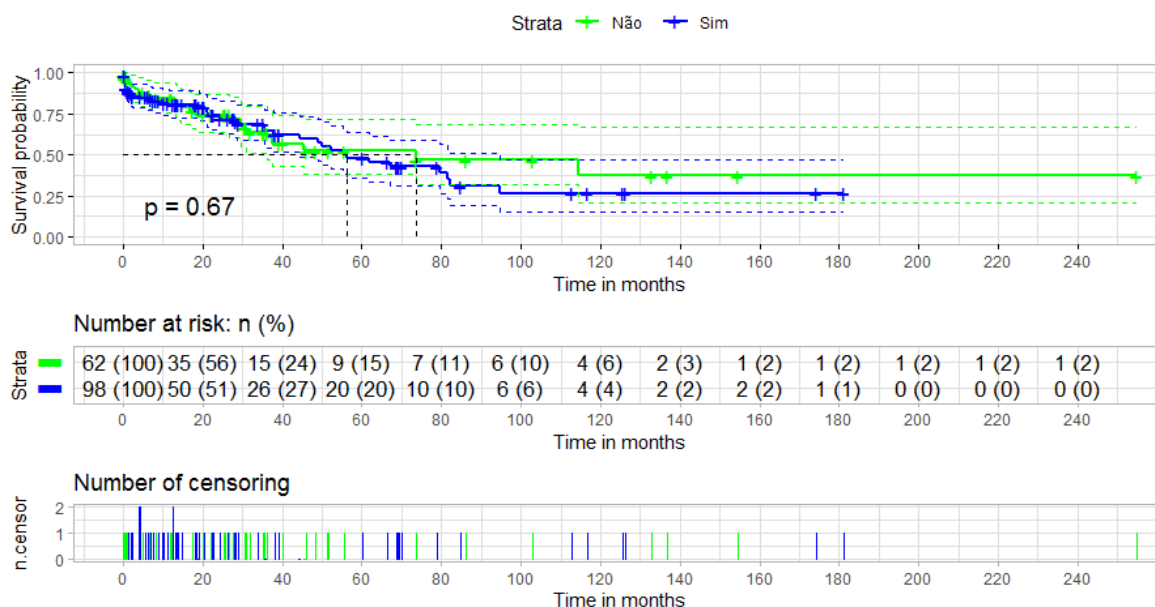


Figura 16 – Curvas de sobrevida segundo o marcador Kappa

Lambda	n	Óbitos	Média	Desvio	Mediana
Não	103	44	84.3	12.2	52.4
Sim	56	19	114.7	18.1	114.4

Tabela 39 – Estatísticas de sobrevida para o Marcador Lambda

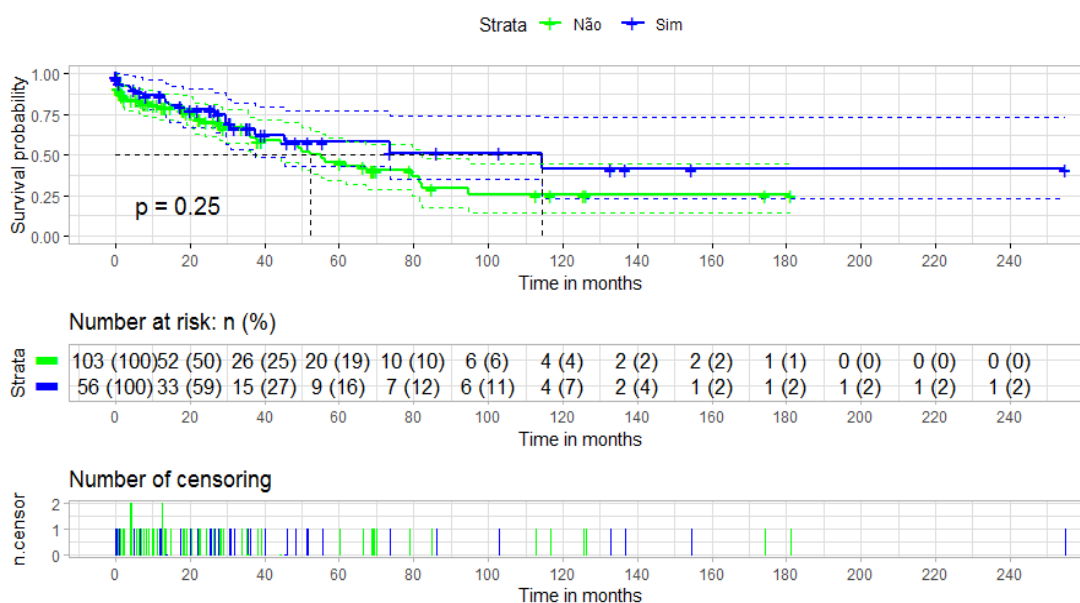


Figura 17 – Curvas de sobrevida segundo o marcador Lambda

A Tabela 40 mostra a distribuição de pacientes por tipo de tratamento. Houve esperada relação estatística entre tipos de tratamento mais agressivo, incluindo TaMO em menor faixa etária (Tabela 41), com impacto significativo no aumento da sobrevida (Tabela 41, Figura 18).

Tratamento	Tipo/Resp.	Freq.	%
QT	AC	115	54.2%
	CC	20	9.4%
	CYBORDEX	2	0.9%
	DEXA	10	4.7%
	M2	10	4.7%
	NÃO	34	16.0%
	VAD	21	9.9%
	TOTAL	212	100.0%
	Missing	51	19.4%
RT	Não	160	79.2%
	Sim	42	20.8%
	Total	202	100.0%
	Missing	61	23.2%
Talidomida	Não	154	76.2%
	Sim	48	23.8%
	Total	202	100.0%
	Missing	61	23.2%
TaMO	Não	189	93.6%
	Sim	11	5.4%
	Total	200	99.0%
	Missing	63	23.2%

Tabela 40 – Distribuição dos tipos de tratamentos

QT	Até 40	41 a 60	> 60	Total
AC	4	28	83	115
CC	2	6	12	20
CYBORDEX	0	1	1	2
DEXA	0	5	5	10
M2	1	4	5	10
NÃO	2	11	21	34
VAD	1	16	4	21
TOTAL	10	71	131	212

Tabela 41 – Tipo de tratamento por QT (quimioterapia) segundo a Faixa etária
 (AC: alqueran + corticoide; CC: ciclofosfamida + corticoide; Cybordex: ciclofosfamida + bortezomibe + dexametasona; Dexa: dexametasona; M2 protocolo baseado em mostarda; VAD: vincristina + adriamicina + dexametasona)

QT x Faixa etária

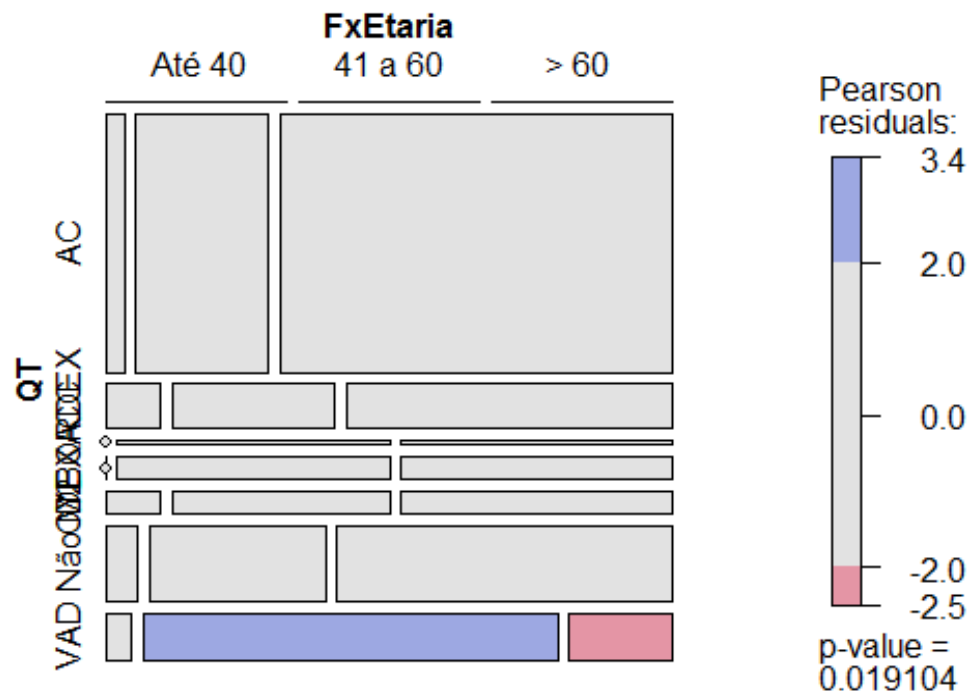


Figura 18 – Distribuição dos tipos de QT segundo a Faixa etária

Foi observada associação significativa entre o tipo de quimioterapia utilizado e a faixa etária dos pacientes, o tipo VAD ficou fortemente associado à faixa etária de 41 a 60 anos, onde preferencialmente foi empregado e ao baixo emprego na faixa após os 60 anos de idade. Todos os demais tipos de quimioterapia foram empregados na faixa etária acima de 60 anos.

Foi significativa a associação entre transplante autólogo de medula óssea (TaMO) e faixa etária dos pacientes, $p=0,046301$ (Tabela 42, Figura 19). O tratamento incluindo transplante autólogo de medula óssea foi aplicado preferencialmente na faixa etária de 41 a 60 anos, conforme protocolos de tratamento vigentes. Vale observar que tivemos apenas 11 casos de tratamento com TaMO.

TMO x Faixa etária



Variables - FAM2

Dim2 (5.3%)

Dim1 (7.6%)

contrib

6
5
4
3
2
1

QT
Talidomida
Ki67
MUM1
TMO
Lesão.Lítica
CD138
VHS.aumentado
p53
Dor.Ossea
kappa.DHL.NL.300
lambda
ACIDO.URICO
Status
event
time
Infiltração
DIAGNÓSTICO
Estadio_DS
RESPOSTA.TERAPEUTICA
HiperCAlCEmia
CD3
CD34
EMA
Albumina
Anemia..Hb10.
Estadio_ISS
Beta2M
EPO.alterada
Creatine.Group
Fraqueza
FxEtariaPerda.Ponderal
EPS.alterada
SEX
Sódio.Group
Sérum.Patológico
Fígado.Patológico
CD34

Figura 20 que as contribuições dos Estádios DS e ISS apontam para a mesma direção da Resposta Terapeutica. Recidiva já apareceu próxima ao tratamento com quimioterapia e ao diagnóstico.

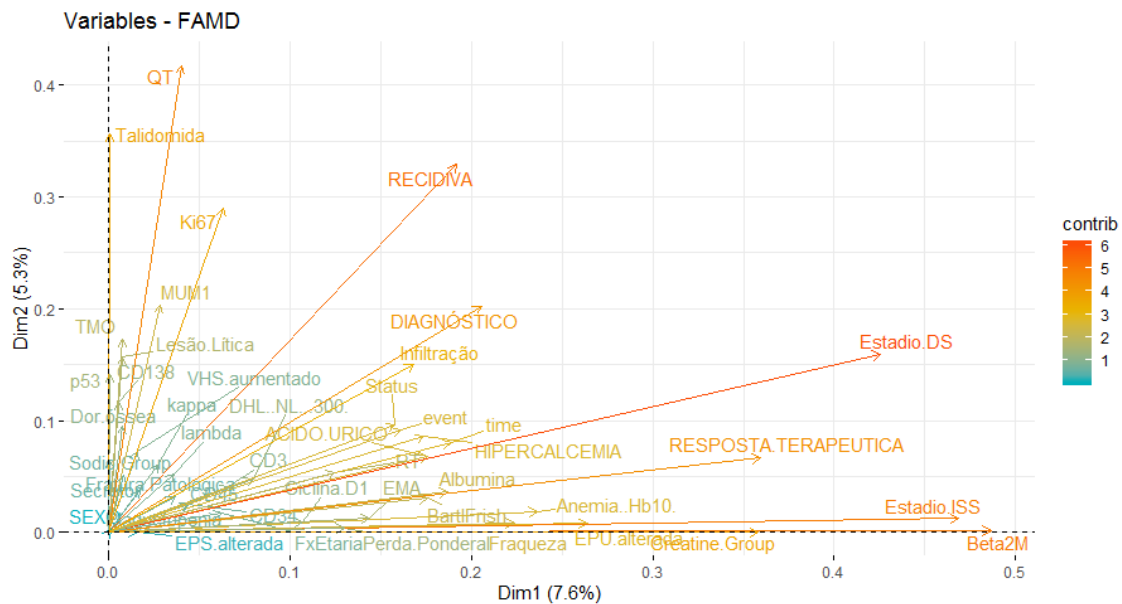


Figura 20 – Contribuição das variáveis e suas relações

Pela técnica multivariada de Modelos Lineares Generalizados (GLM)^{70,75, 76} que considera como variável resposta o *status* de vida do paciente e como variáveis explicativas aquelas que desejamos avaliar a significância delas sobre o *status* de vida, consideramos em nosso modelo: sexo, Radioterapia (RT), tipo de Quimioterapia (QT), Talidomida, Faixas etárias, estadio ISS e anemia (conforme resultados de FAMD)⁶⁸. Na Tabela 43 apresentamos o resultado do ajuste:

Factors Levels	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-0.64052	0.88321	-0.725	0.4683
SEXO=Masc	-0.03566	0.34666	-0.103	0.9181
RT=Sim	-0.67865	0.52461	-1.294	0.1958
QT=CC	-1.13645	0.62662	-1.814	0.0697
QT=CYBORDEX	0.39954	1.50143	0.266	0.7902
QT=DEXA	0.63701	0.76022	0.838	0.4021
QT=M2	-1.41484	0.85779	-1.649	0.0991
QT=Não	-0.30556	0.44152	-0.692	0.4889
QT=VAD	-1.36014	0.85815	-1.585	0.113
Talidomida=Sim	-0.94343	0.469	-2.012	0.0443
FxEtaria= 41 a 60	-0.25279	0.82778	-0.305	0.7601
FxEtaria= > 60	-0.37657	0.79852	-0.472	0.6372
Estadio.ISS=2	1.01513	0.49827	2.037	0.0416
Estadio.ISS=3	1.29074	0.54481	2.369	0.0178
Anemia=Sim	0.18754	0.36713	0.511	0.6095

Tabela 43 – Modelo Linear Generalizado ajustado para o Tempo Total de Sobrevida

O índice R² de McFadden (pseudo r²) foi igual a 0,65248 e tem a mesma interpretação do coeficiente de explicação usual. Além das variáveis da

Tabela 43 foram pesquisadas as seguintes variáveis: DHL ($p=0,3685$), creatinina ($p=0,8854$), hipercalcemia ($p=0,9952$), diagnóstico ($p=0,9950$), as quais foram removidas do modelo por não apresentarem contribuição significativa.

Também aplicamos o modelo estatístico de Cox⁷⁴ em que a variável resposta é o tempo total de sobrevida – TTS e as variáveis explicativas foram os marcadores imunofenotípicos. Na Figura 21 apresentamos os resultados do ajuste.

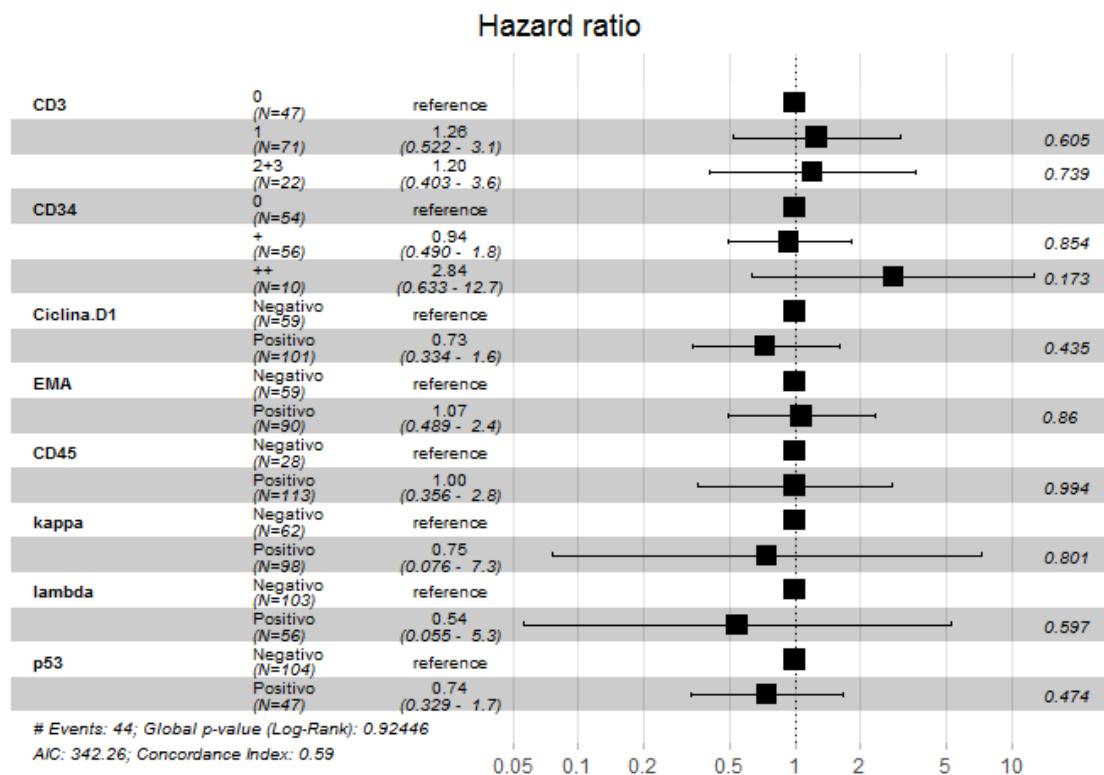


Figura 21 Resultados com modelo de Cox

Nenhum dos marcadores explicou significativamente o tempo total de sobrevida dos pacientes.

Discussão

Apesar de não se tratar de amostra com grande série de casos, foi possível obter muitas e completas informações na maioria dos pacientes quanto a dados clínicos e laboratoriais, o que nos permitiu conclusões interessantes para a patologia Mieloma múltiplo, as quais podem se estender para a população brasileira. A idade mediana é semelhante ao descrito nas grandes coortes, mas nossos pacientes parecem ter menos acesso ao diagnóstico precocemente. Tal característica implica em maior prevalência de complicações graves (maiores estádios clínicos, com lesões de órgãos-alvo) e faixa etária mais avançada, com menor possibilidade de recursos invasivos, o que mostra correlacionar-se com menor sobrevida para a nossa amostragem. Provavelmente, se pudermos ampliar para avaliação de mais pacientes com menos de 40 anos de idade, poderemos mostrar a influência da faixa etária, ao diagnóstico, nas curvas de sobrevida.

Quanto aos estádios clínico e ISS, ao diagnóstico, especialmente pela análise estatística da técnica multivariada de modelos lineares generalizados (GLM) que visa explicar razões para impacto na sobrevida, apontamos para a ideia lógica que nossos pacientes parecem ter menos chances de sobrevida em comparação a população mundial, o que nos remete ao impacto da falta de acesso a recursos e à indiferença social quanto a área da Saúde. Pacientes com diagnóstico de MM precisam ser identificados mais precocemente e a melhor estratégia parece ser fazer com que a entidade seja melhor reconhecida. Ao observar a curva de sobrevida em relação ao estágio ISS (figura 22), vemos como a sobrevida é impactada pela possibilidade terapêutica precoce, quando indicada, bem como pelo melhor *status performance* do paciente ao diagnóstico.

Nesse aspecto identificamos algumas características clínicas que devem ser bem avaliadas ao diagnóstico. A anemia e fadiga são achados sistêmicos estreitamente relacionados ao MM, refletindo o impacto da redução do tecido adiposo, que acontece fisiologicamente com o envelhecimento, e a diminuição da contagem de hemácias em sangue periférico associada à doença. Considerando o papel do microambiente nas manifestações clínicas, apontamos com nosso estudo para a importância de considerar interação multifatorial das repercussões clínicas, não apenas pela ação da célula

tumoral, com produção de interleucinas inflamatórias e imunomodulação negativa da hematopoese, mas também o reflexo das alterações fisiopatológicas da interação do plasmócito clonal com as demais células do microambiente. Quanto mais velho o paciente, maior chance de apresentar-se com restrição de atividade normal de medula óssea. Cria-se ciclo vicioso em que doença e inabilidade de resposta do paciente contribuem para falência do sistema. Tais achados são semelhantes ao descrito na literatura nacional e mundial, mostrando ser MM uma doença que ultrapassa as questões sociais e genéticas específicas de determinadas populações.

Apesar de não termos identificado novos marcadores quantitativos ou qualitativos com impacto clínico isolado, pudemos confirmar a semelhança das características da nossa amostra com o contexto internacional e o também predomínio de indivíduos secretores de cadeias leves de imunoglobulinas séricas e/ou urinárias e elevação de velocidade de hemossedimentação (VHS), que denuncia o estado inflamatório sistêmico como determinante na evolução clínica.

Buscamos variações citológicas, histológicas e imunofenóticas que pudessem agrupar pacientes; entretanto, não foi identificada significância estatística para as variáveis estudadas. Apesar disso, podemos dizer que a densidade vascular do microambiente e fatores prognósticos clínicos entre pacientes com MM secretores e não secretores são semelhantes, contrariando o raciocínio lógico de que secretar imunoglobulina seja uma característica estreitamente relacionada com maior atividade patogênica da célula tumoral. Considerando as curvas de sobrevida de pacientes segundo o grupo secretor e não secretor de cadeias leves de imunoglobulina, podemos confirmar essa conclusão. Se pudermos reunir mais pacientes não secretores, talvez consigamos explicar a ação dessas imunoglobulinas no ambiente da medula óssea, além do impacto nas lesões de órgão-alvo.

Além das lesões ósseas e da anemia, os rins são importantes órgãos-alvo de complicações pelo MM. A nefropatia tem explicação multifatorial. Em nossa amostra a disfunção renal grave foi menos prevalente que as descrições da literatura, contudo, sem significado biológico estatístico. Sabendo-se serem as lesões renais irreversíveis e motivo de diminuição de sobrevida, o olhar atento e cuidadoso para proteção renal é imprescindível para manejar pacientes cujo alvo é qualidade de sobrevida.

Mesmo tendo sido observado mais hipercalcemia em indivíduos mais velhos, conforme os métodos radiológicos disponíveis, menos de metade dos pacientes apresentou fratura patológica ao diagnóstico e, apesar de quantitativamente haver mais prevalência de dor óssea em idades mais avançadas, não foi possível identificar correlação estatística.

Um conceito importante que podemos valorizar em MM, doença incurável em pacientes com mais restrição de estado de performance, é o período de vida do paciente, após o diagnóstico, sem a necessidade de intervenção terapêutica – o tempo de *plateau*. Parte dos nossos pacientes permaneceu em *plateau*, desde o diagnóstico, sem necessidade de nenhum tratamento, com doença estável e sem sinais de comprometimento sistêmico. O paciente pode ter múltiplas fases de *plateau*, período sem tratamento, sem sinais de comprometimento de órgãos-alvo, com doença latente. Não foi possível identificar características clínicas, laboratoriais ou achados de medula óssea (células tumorais e microambiente) com significância estatística em relação ao grupo controle. Na literatura, *plateau* é variável e independe do estágio clínico, mas tem estreita relação com as manifestações sistêmicas e comprometimento da qualidade de sobrevivência. Por tratar-se de estado quiescente citocineticamente, em comparação com as fases de indução e recidiva mais ativas, mostra-se favorável quanto à prevenção de tratamento agressivo em fase sem comprometimento fisiológico e a descontinuação do tratamento de manutenção em pacientes nesta fase. No nosso estudo, concordamos com a literatura quanto ao tempo mínimo com pacientes sem necessidade de intervenção (tempo mediano de 36 meses, limite inferior do intervalo de confiança de 20 meses). Como alguns pacientes foram censurados (morte por outras causas ou falta de informação registrada/perda de contato) e outros tiveram sinais de progressão de doença, progressão para fase com intervenção terapêutica, em relação à progressão da doença após tratamento, dos 83 pacientes avaliados, um quinto manteve-se em remissão, mas não foi possível identificar características clínicas ou laboratoriais prognósticas que implicassem na manutenção de *plateaus* prolongados.

Durante o tempo em que foram acompanhados, dois quintos recidivaram menos de um ano do término do primeiro tratamento (recidiva precoce) e outros dois quintos tiveram recidiva tardia, com tempo de *plateau* prolongado, mas não foi possível identificar variáveis clínicas ou de avaliação da medula

óssea, com significância estatística, definidoras do comportamento biológico tumoral destes pacientes. Clinicamente, pacientes em *plateau* têm melhor qualidade de sobrevida. É possível que mais de uma variável seja necessária para este desfecho, sendo mais prováveis as combinações que envolvam melhor estado de performance ao diagnóstico, com possibilidade de tratamento mais intensificado como primeira linha, diagnóstico precoce e com menos lesões de órgãos-alvo, bem como ausência de alterações genéticas de mau prognóstico, que já estão descritas, mas não foi possível avaliar nessa amostra, neste estudo. Como foi validado o estudo com amostras em bloco de TMA, estudos futuros com pesquisa de mutações por FISH poderiam nos permitir melhor interpretação desse aspecto.

Quando analisamos as curvas de incidência acumulada de óbitos – curva de sobrevivência dos pacientes diagnosticados com MM, curvas de mortes devido ao câncer e aquelas relativas às mortes totais incluindo aquelas por outras causas e sobrevida em relação à faixa etária e resposta terapêutica, pelo baixo quantitativo de pacientes com idade inferior a 40 anos, houve dificuldade em evidenciar a diferença entre as curvas de sobrevida; entretanto, a evidência de evolução clínica favorável, na prática de acompanhamento desses casos e o $p=0,088$, muito próximo de nível de confiança 5% nos permite acreditar que os pacientes mais jovens não necessariamente apresentam maior dano genético, diferente de outras patologias hematológicas de pacientes mais velhos, em que o comportamento costuma ser mais agressivo quando o diagnóstico acontece em faixas etárias mais precoces.

Quanto aos achados de análise de amostras citológicas, histológicas e de TMA, a evolução clínica independe do grau de infiltração ao mielograma, mas pode ser agravada pela menor reserva medular em casos de infiltração maciça. Mesmo assim, provavelmente porque MM tem importante relação com o microambiente medular, pacientes podem ser oligossintomáticos, com leve comprometimento em órgãos-alvo apesar de 100% de infiltração medular por células tumorais. Já em relação ao padrão morfológico de Bartl & Frish, semelhante ao estudo de descrição desta classificação, pacientes com padrões de células variáveis e com maior semelhança a células imaturas, provavelmente devem ter múltiplos clones com características de maior índice

de proliferação e agressividade neoplásica; contudo, não tivemos quantidade suficiente de pacientes para tal conclusão. Os padrões mais comuns de infiltração histológica, semelhante à literatura, foram o nodular ou difuso com erosão óssea, fibrose variável e neoformação vascular, mas sem predomínio ou tendência biológica estatisticamente significativa para marcadores específicos das células tumorais ou do estroma medular. Existe heterogeneidade intraclonal dentre os clones de MM predominantes, a qual está estreitamente relacionada ao comportamento biológico, progressão de doença e desenvolvimento de resistência terapêutica, que também foram observados na análise evolutiva dos casos mais agressivos da amostra; contudo, nosso número de casos não foi suficiente para evidenciar significância estatística. Com estudo imuno-histoquímico, foi possível identificar marcadores relacionados com pior evolução clínica e que são passíveis de estudos futuros quanto às melhores indicações terapêuticas iniciais, especialmente imunexpressão de p53, ciclina-D1 e CD45 que mostraram estreita relação com refratariedade terapêutica e consequente, impacto na sobrevida. Assim também, pacientes que expressam cadeia leve de imunoglobulina kappa tiveram mais resposta terapêutica completa em detrimento de cadeia leve de imunoglobulina lambda, com prevalência de resposta terapêutica parcial. Talvez a diferenciação e expressão de cadeia leve tenha relação com grau de maior maturidade da célula neoplásica, no contexto fisiológico e sua interação com microambiente tumoral relacione-se com respostas menos danosas a órgãos-alvo.

Com relação ao estudo imuno-histoquímico para parâmetros do microambiente, avaliados por estudo imuno-histoquímico no TMA, semelhante ao descoberto na literatura, infiltrado intersticial por linfócitos T aumentado não consegue proteger pacientes de desfechos graves ósseos, apesar de sua interação com osteoclastos. Mais uma vez, tendemos a pensar em como o microambiente da medula óssea contribui para a proteção da célula tumoral e seu gerenciamento sobre a hematopoese. Seria razoável imaginarmos que o plasmócito possa exercer ação sobre a célula unipotente hematopoética, o que pode ser alvo de novos estudos nesta casuística.

Semelhante à importância na literatura quanto ao efeito de imunomoduladores de neovascularização no tratamento de pacientes com MM,

apesar de não termos quantidade de pacientes suficientes para demonstrar associação estatística, evidenciamos que os pacientes apresentam variável prevalência de maior positividade de CD34 que denuncia aumento da trama vascular na amostra e menor risco de morte e maior curva de sobrevida para os tratados com talidomida, cujo alvo de ação é impedir progressão tumoral pela imunomodulação da angiogênese. O plasmócito tumoral induz vascularização para garantir sobrevivência, semelhante a células de tumores sólidos, que expressam moléculas de adesão. Estudos futuros podem tentar associar o papel dessas moléculas de adesão, prevalentes nos plasmócitos mas não em outras células hematopoéticas, na fisiopatogênese do MM, hemopatia tão ímpar e ainda de evolução tão variável.

Foi óbvio o achado de que pacientes mais jovens estiveram mais relacionados a tratamentos mais intensos, como o transplante autólogo de medula óssea, já que o estado de *performance* é um importante critério para indicação deste procedimento. Contudo, observando a evolução desses pacientes e características semelhantes com outras faixas etárias, seria coerente aventar a indicação de terapêuticas mais agressivas, com combinação de drogas mais potentes ao diagnóstico, a fim de debelar clones mais agressivos na primeira linha terapêutica, como advogam algumas correntes atuais de estudo em mieloma múltiplo. Por técnicas estatísticas mais complexas, como a análise fatorial para dados mistos – análise de contribuição de variáveis e suas relações, podemos entender a importância do estadiamento em relação à expectativa de resposta terapêutica e do tipo de quimioterapia escolhida como inicial e chance de recidiva. Pela complexidade intraclonal do plasmócito neoplásico, consideramos, também em nossos estudos, que essa corrente esteja correta e que, em MM, as melhores opções terapêuticas devessem ser usadas em primeira linha a fim de minimizar seleção clonal e prognóstico reservado por refratariedade terapêutica precoce.

Já pela técnica multivariada de modelos lineares generalizados em busca de variáveis explicativas para tempo de sobrevida, não foram encontradas associações com sexo, tratamento com radioterapia, tipo de quimioterapia, faixa etária, estadiamento precoce e anemia, mas há com uso de Talidomida e estadiamento intermediário ou alto. Com o modelo estatístico de Cox, em que a variável resposta é o tempo total de sobrevida e as variáveis

explicativas foram os marcadores, nenhum dos marcadores explicou isoladamente o tempo total de sobrevida dos pacientes.

Nosso trabalho foi importante para dissipar algumas inferências errôneas sobre evolução de pacientes com mieloma múltiplo e suscitar muitas novas perspectivas de estudo tendo como base de dados esses pacientes.

Conclusões

- Não houve característica isolada do microambiente da medula óssea que se correlacione de forma prognóstica, estatisticamente.
- Foram observadas diferenças significativas entre as curvas de sobrevida em função do Estádio ISS; o tempo médio de vida para o Estádio ISS= 1 foi de 185 meses, para o Estádio ISS = 2 foi de 94 meses e para o estágio ISS = 3 foi de 67 meses.
- Apresentaram associação com o Status de vida o tratamento com Talidomida (reduz risco de morte), estar nos Estádio ISS 2 ou 3 (aumenta o risco de morte). Há forte indício de associação com QT = M2 (reduz risco de morte).
- Para Talidomida igualmente foi observada diferença significativa entre as curvas de sobrevida, o TTS médio para que se tratou com Talidomida foi de 152 meses, já para os que não receberam esse tratamento foi de 92 meses.
- Nenhum dos marcadores explicou significativamente o tempo total de sobrevida dos pacientes; contudo, houve associação significativa entre Resposta terapêutica e Ciclina D1, CD45, Kappa e Lambda, os demais não apresentaram associação significativa – essa associação com a resposta terapêutica não refletiu nas sobrevidas.
- Foi feita caracterização epidemiológica da nossa amostragem.
- O tempo de recidiva não é afetado pelo sexo do paciente, $p=0,48$.
- A Faixa etária também não influenciou o tempo de recidiva, $p=0,51$.
- A Faixa etária se associou significativamente com as seguintes variáveis: Tipo de QT, $p=0,019104$ (o tipo VAD ficou fortemente associado à faixa etária de 41 a 60 anos); TaMO (foi aplicado preferencialmente na faixa etária de 41 a 60 anos).
- Há forte indicativo de influência da faixa etária nas curvas de sobrevida ($p=0,088$), não foi possível evidenciar pelo baixo número de pacientes com menos de 40 anos de idade. O tempo médio de sobrevida para pacientes entre 41 e 60 anos foi de 57 meses, para o grupo acima de 60 anos foi de 43 meses.

- As curvas de sobrevida são distintas em função da resposta terapêutica ao tratamento, se a resposta é Completa, o TTS médio foi de 163 meses, para resposta Parcial o TTS foi de 121 meses, já para o grupo Refratário foi de apenas 47 meses.
- Não houve identificação de fatores prognósticos independentes relacionados aos tipos citológicos, nesta amostra.
- Não foi possível evidenciar associação entre CD34 e Ki-67 devido ao pequeno número de pacientes com medida de Ki-67, foram apenas 11.
- Há indícios de que a faixa etária se associe à Infiltração ($p=0,10934$).
- Há indícios de que a faixa etária se associe a p53 ($p=0,062806$).
- As curvas de sobrevida segundo o grupo secretor não diferiram significativamente, $p=0,61$.
- A técnica de plataforma de microarranjo de tecidos de medula óssea com citoinclusão de coágulo de aspirado é adequada para estudo histológico e imunofenotípico em Mieloma múltiplo.

Bibliografia

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; **127**(20): 2391-405.
2. Borsi E, Perrone G, Terragna C, Martello M, Zamagni E, Tacchetti P *et al.* HIF-1alpha inhibition blocks the cross talk between multiple myeloma plasma cells and tumor microenvironment. *Exp Cell Res* 2014; **328**(2): 444-55.
3. Andrews SW, Kabrah S, May JE, Donaldson C, Morse HR. Multiple myeloma: the bone marrow microenvironment and its relation to treatment. *Br J Biomed Sci* 2013; **70**(3): 110-20.
4. Manni S, Carrino M, Semenzato G, Piazza F. Old and Young Actors Playing Novel Roles in the Drama of Multiple Myeloma Bone Marrow Microenvironment Dependent Drug Resistance. *Int J Mol Sci* 2018; **19**(5).
5. Etto LY, Morelli VM, Silva VC, Hungria VT, Ciconelli RM, Almeida MS *et al.* Autologous stem cell transplantation improves quality of life in economically challenged, Brazilian multiple myeloma patients. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; **66**(11): 1855-9.
6. Mehta GR, Suhail F, Haddad RY, Zalzaleh G, Lerma EV. Multiple myeloma. *Dis Mon* 2014; **60**(10): 483-8.
7. Teras LR, Kitahara CM, Birmann BM, Hartge PA, Wang SS, Robien K *et al.* Body size and multiple myeloma mortality: a pooled analysis of 20 prospective studies. *Br J Haematol* 2014; **166**(5): 667-76.
8. Ozerova M, Nefedova Y. Estrogen promotes multiple myeloma through enhancing the immunosuppressive activity of MDSC. *Leuk Lymphoma* 2019: 1-6.
9. Abdulkadyrov KM, Rukavitsyn OA, Bessmel'tsev SS, Rugal VI. [Morphologic structural characteristics of the hematopoietic microenvironment in patients with multiple myeloma]. *Gematol Transfuziol* 1996; **41**(1): 13-6.
10. Leung N, Behrens J. Current approach to diagnosis and management of acute renal failure in myeloma patients. *Adv Chronic Kidney Dis* 2012; **19**(5): 297-302.
11. Sanders PW, Booker BB. Pathobiology of cast nephropathy from human Bence Jones proteins. *J Clin Invest* 1992; **89**(2): 630-9.

12. 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; **36**(3): 842-54.
13. Bataille R, Durie BG, Grenier J, Sany J. Prognostic factors and staging in multiple myeloma: a reappraisal. *J Clin Oncol* 1986; **4**(1): 80-7.
14. Filonzi G, Mancuso K, Zamagni E, Nanni C, Spinnato P, Cavo M *et al.* A Comparison of Different Staging Systems for Multiple Myeloma: Can the MRI Pattern Play a Prognostic Role? *AJR Am J Roentgenol* 2017; **209**(1): 152-158.
15. 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; **23**(15): 3412-20.
16. Fonseca R, San Miguel J. Prognostic factors and staging in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007; **21**(6): 1115-40, ix.
17. Tao ZF, Fu WJ, Yuan ZG, Wang DX, Chen YB, Hou J. Prognostic factors and staging systems of multiple myeloma. *Chin Med J (Engl)* 2007; **120**(19): 1655-8.
18. Hungria VT, Maiolino A, Martinez G, Colleoni GW, Coelho EO, Rocha L *et al.* Confirmation of the utility of the International Staging System and identification of a unique pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2008; **93**(5): 791-2.
19. Lu J, Du J, Fu WJ, He HY, Li L, Li R *et al.* [Prognostic value of the revised international staging system for newly diagnosed multiple myeloma patients]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2017; **38**(6): 475-479.
20. Todaro J, Bigonha J, Borducchi DM, Matos LL, Trufelli DC, Sales SM *et al.* Multiple myeloma: five-year experience at a University Hospital. *Einstein (Sao Paulo)* 2011; **9**(2): 145-50.
21. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV *et al.* International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; **15**(12): e538-48.
22. Zheng Y, Cai Z, Wang S, Zhang X, Qian J, Hong S *et al.* Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood* 2009; **114**(17): 3625-8.
23. Dalton WS. The tumor microenvironment: focus on myeloma. *Cancer Treat Rev* 2003; **29 Suppl 1**: 11-9.
24. Konttinen YT, Pajarinen J, Takakubo Y, Gallo J, Nich C, Takagi M *et al.* Macrophage polarization and activation in response to implant debris:

- influence by "particle disease" and "ion disease". *J Long Term Eff Med Implants* 2014; **24**(4): 267-81.
25. Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; **12**(10): 643-55.
 26. Zipori D. The hemopoietic stem cell niche versus the microenvironment of the multiple myeloma-tumor initiating cell. *Cancer Microenviron* 2010; **3**(1): 15-28.
 27. Abdi J, Qiu L, Chang H. Micro-RNAs, New performers in multiple myeloma bone marrow microenvironment. *Biomark Res* 2014; **2**: 10.
 28. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, Hulkki S, Potter NE, Johnson DC *et al*. Intracloal heterogeneity and distinct molecular mechanisms characterize the development of t(4;14) and t(11;14) myeloma. *Blood* 2012; **120**(5): 1077-86.
 29. Bolzoni M, Toscani D, Costa F, Vicario E, Aversa F, Giuliani N. The link between bone microenvironment and immune cells in multiple myeloma: Emerging role of CD38. *Immunol Lett* 2018.
 30. Abe M. [Mutual interaction between myeloma cells and bone marrow microenvironment]. *Rinsho Ketsueki* 2009; **50**(6): 453-60.
 31. Alonso S, Hernandez D, Chang YT, Gocke CB, McCray M, Varadhan R *et al*. Hedgehog and retinoid signaling alters multiple myeloma microenvironment and generates bortezomib resistance. *J Clin Invest* 2016; **126**(12): 4460-4468.
 32. Wang Y, Pivonka P, Buenzli PR, Smith DW, Dunstan CR. Computational modeling of interactions between multiple myeloma and the bone microenvironment. *PLoS One* 2011; **6**(11): e27494.
 33. De Raeve HR, Vanderkerken K. The role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Histol Histopathol* 2005; **20**(4): 1227-50.
 34. Dhodapkar MV, Sanderson RD. Syndecan-1 (CD 138) in myeloma and lymphoid malignancies: a multifunctional regulator of cell behavior within the tumor microenvironment. *Leuk Lymphoma* 1999; **34**(1-2): 35-43.
 35. Caligaris-Cappio F, Gregoret MG, Merico F, Gottardi D, Ghia P, Parvis G *et al*. Bone marrow microenvironment and the progression of multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1992; **8**(1-2): 15-22.
 36. Morgan JJ, McAvera RM, Crawford LJ. TRAF6 Silencing Attenuates Multiple Myeloma Cell Adhesion to Bone Marrow Stromal Cells. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(3).

37. Abe M. Targeting the interplay between myeloma cells and the bone marrow microenvironment in myeloma. *Int J Hematol* 2011; **94**(4): 334-343.
38. An G, Acharya C, Feng X, Wen K, Zhong M, Zhang L *et al*. Osteoclasts promote immune suppressive microenvironment in multiple myeloma: therapeutic implication. *Blood* 2016; **128**(12): 1590-603.
39. Muller J, Duray E, Lejeune M, Dubois S, Plougonven E, Leonard A *et al*. Loss of Stromal Galectin-1 Enhances Multiple Myeloma Development: Emphasis on a Role in Osteoclasts. *Cancers (Basel)* 2019; **11**(2).
40. D'Souza S, Kurihara N, Shiozawa Y, Joseph J, Taichman R, Galson DL *et al*. Annexin II interactions with the annexin II receptor enhance multiple myeloma cell adhesion and growth in the bone marrow microenvironment. *Blood* 2012; **119**(8): 1888-96.
41. Atanackovic D, Luetkens T, Radhakrishnan S, Kroger N. Coinhibitory Molecule PD-1 as a Therapeutic Target in the Microenvironment of Multiple Myeloma. *Curr Cancer Drug Targets* 2017; **17**(9): 839-845.
42. Abeltino M, Bonomini S, Bolzoni M, Storti P, Colla S, Todoerti K *et al*. The proapoptotic effect of zoledronic acid is independent of either the bone microenvironment or the intrinsic resistance to bortezomib of myeloma cells and is enhanced by the combination with arsenic trioxide. *Exp Hematol* 2011; **39**(1): 55-65.
43. Berardi S, Ria R, Reale A, De Luisi A, Catacchio I, Moschetta M *et al*. Multiple myeloma macrophages: pivotal players in the tumor microenvironment. *J Oncol* 2013; **2013**: 183602.
44. Mahaweni NM, Bos GMJ, Mitsiades CS, Tilanus MGJ, Wieten L. Daratumumab augments alloreactive natural killer cell cytotoxicity towards CD38+ multiple myeloma cell lines in a biochemical context mimicking tumour microenvironment conditions. *Cancer Immunol Immunother* 2018; **67**(6): 861-872.
45. Mahaweni NM, Ehlers FAI, Sarkar S, Janssen JWH, Tilanus MGJ, Bos GMJ *et al*. NKG2A Expression Is Not per se Detrimental for the Anti-Multiple Myeloma Activity of Activated Natural Killer Cells in an In Vitro System Mimicking the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* 2018; **9**: 1415.
46. Morris EV, Edwards CM. Bone marrow adiposity and multiple myeloma. *Bone* 2019; **118**: 42-46.
47. Andersen NF, Kristensen IB, Preiss BS, Christensen JH, Abildgaard N. Upregulation of Syndecan-1 in the bone marrow microenvironment in multiple myeloma is associated with angiogenesis. *Eur J Haematol* 2015; **95**(3): 211-7.

48. Calcinotto A, Ponzoni M, Ria R, Grioni M, Cattaneo E, Villa I *et al*. Modifications of the mouse bone marrow microenvironment favor angiogenesis and correlate with disease progression from asymptomatic to symptomatic multiple myeloma. *Oncoimmunology* 2015; **4**(6): e1008850.
49. Accardi F, Toscani D, Bolzoni M, Dalla Palma B, Aversa F, Giuliani N. Mechanism of Action of Bortezomib and the New Proteasome Inhibitors on Myeloma Cells and the Bone Microenvironment: Impact on Myeloma-Induced Alterations of Bone Remodeling. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 172458.
50. Zarfati M, Avivi I, Brenner B, Katz T, Aharon A. Extracellular vesicles of multiple myeloma cells utilize the proteasome inhibitor mechanism to moderate endothelial angiogenesis. *Angiogenesis* 2019; **22**(1): 185-196.
51. Corso A, Ferretti E, Lazzarino M. Zoledronic acid exerts its antitumor effect in multiple myeloma interfering with the bone marrow microenvironment. *Hematology* 2005; **10**(3): 215-24.
52. Yaccoby S, Pearse RN, Johnson CL, Barlogie B, Choi Y, Epstein J. Myeloma interacts with the bone marrow microenvironment to induce osteoclastogenesis and is dependent on osteoclast activity. *Br J Haematol* 2002; **116**(2): 278-90.
53. Cheung WC, Van Ness B. The bone marrow stromal microenvironment influences myeloma therapeutic response in vitro. *Leukemia* 2001; **15**(2): 264-71.
54. Bolzoni M, Storti P, Bonomini S, Todoerti K, Guasco D, Toscani D *et al*. Immunomodulatory drugs lenalidomide and pomalidomide inhibit multiple myeloma-induced osteoclast formation and the RANKL/OPG ratio in the myeloma microenvironment targeting the expression of adhesion molecules. *Exp Hematol* 2013; **41**(4): 387-97 e1.
55. Chung C. Role of Immunotherapy in Targeting the Bone Marrow Microenvironment in Multiple Myeloma: An Evolving Therapeutic Strategy. *Pharmacotherapy* 2017; **37**(1): 129-143.
56. Thirukkumaran CM, Shi ZQ, Nuovo GJ, Luider J, Kopciuk KA, Dong Y *et al*. Oncolytic immunotherapy and bortezomib synergy improves survival of refractory multiple myeloma in a preclinical model. *Blood Adv* 2019; **3**(5): 797-812.
57. Castella B, Foglietta M, Riganti C, Massaia M. Vgamma9Vdelta2 T Cells in the Bone Marrow of Myeloma Patients: A Paradigm of Microenvironment-Induced Immune Suppression. *Front Immunol* 2018; **9**: 1492.
58. Dhodapkar MV, Krasovsky J, Olson K. T cells from the tumor microenvironment of patients with progressive myeloma can generate strong, tumor-specific cytolytic responses to autologous, tumor-loaded dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(20): 13009-13.

59. Rosenblatt J, Avigan D. Cellular Immunotherapy for Multiple Myeloma. *Cancer J* 2019; **25**(1): 38-44.
60. Wang W, Corrigan-Cummins M, Barber EA, Saleh LM, Zingone A, Ghafoor A *et al.* Aberrant Levels of miRNAs in Bone Marrow Microenvironment and Peripheral Blood of Myeloma Patients and Disease Progression. *J Mol Diagn* 2015; **17**(6): 669-78.
61. Li B, Hong J, Hong M, Wang Y, Yu T, Zang S *et al.* piRNA-823 delivered by multiple myeloma-derived extracellular vesicles promoted tumorigenesis through re-educating endothelial cells in the tumor environment. *Oncogene* 2019.
62. Di Marzo L, Desantis V, Solimando AG, Ruggieri S, Annese T, Nico B *et al.* Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: emerging new players. *Oncotarget* 2016; **7**(37): 60698-60711.
63. Wang J, De Veirman K, De Beule N, Maes K, De Bruyne E, Van Valckenborgh E *et al.* The bone marrow microenvironment enhances multiple myeloma progression by exosome-mediated activation of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* 2015; **6**(41): 43992-4004.
64. Raimondo S, Saieva L, Vicario E, Pucci M, Toscani D, Manno M *et al.* Multiple myeloma-derived exosomes are enriched of amphiregulin (AREG) and activate the epidermal growth factor pathway in the bone microenvironment leading to osteoclastogenesis. *J Hematol Oncol* 2019; **12**(1): 2.
65. de Haart SJ, van de Donk NW, Minnema MC, Huang JH, Aarts-Riemens T, Bovenschen N *et al.* Accessory cells of the microenvironment protect multiple myeloma from T-cell cytotoxicity through cell adhesion-mediated immune resistance. *Clin Cancer Res* 2013; **19**(20): 5591-601.
66. Bartl R, Frisch B, Fateh-Moghadam A, Kettner G, Jaeger K, Sommerfeld W. Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases. *Am J Clin Pathol* 1987; **87**(3): 342-55.
67. Friendly M, Meyer D. *Discrete data analysis with R : visualization and modeling techniques for categorical and count data.*
68. Jombart T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 2008; **24**(11): 1403-5.
69. Dobson AJ, Dobson AJItsm. *An introduction to generalized linear models*, Chapman and Hall, 1990.
70. Madsen H, Thyregod P. *Introduction to general and generalized linear models*, CRC: Boca Raton, Fla., 2011.

71. Matthews DE, Farewell VT. *Using and understanding medical statistics*, 4th, completely rev. and enl. edn Karger: Basel ; New York, 2007.
72. Rich JT, Neely JG, Paniello RC, Voelker CC, Nussenbaum B, Wang EW. A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; **143**(3): 331-6.
73. Link CL. Confidence intervals for the survival function using Cox's proportional-hazard model with covariates. *Biometrics* 1984; **40**(3): 601-9.
74. Cox DR. *Renewal theory*, Methuen and Co Ltd: [S.l.], 1962.
75. Dobson AJ. *An introduction to generalized linear models*, 2nd ed. edn Chapman and Hall, 1990.
76. Holmberg H, Brostrom G. On statistical methods for clustering: a case study on infant mortality, Northern Sweden, 1831-1890. *Biodemography Soc Biol* 2012; **58**(2): 173-84.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Artigo com publicação da técnica de construção de TMA de coágulo validada na tese de Doutorado



Pathology - Research and Practice

Available online 1 November 2019, 152721

In Press, Corrected Proof



Short Communication

Tissue microarrays of bone marrow aspirate clot allow assessment of multiple samples

Pollyanna Domeny-Duarte ^a , Ligia Niero ^b, Maria Ap. Custodio Domingues ^a

[Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152721>

[Get rights and content](#)

Abstract

Time optimization and cost reduction without quality loss is fundamental for scientific production. The TMA technique allows large-scale analysis of paraffin-embedded and fixed tissues using non-decalcified bone marrow specimens. Cytoinclusion samples (n = 264) were selected from patients diagnosed with monoclonal gammopathy (n = 189) at Botucatu Medical School, São Paulo State University. Slides were cut from the TMA block and stained with H&E and immunohistochemical markers. Of the 276 fragments included in the receptor block, 45 core detachments were observed, thus 84% of the samples remained viable. The representative material allowed for adequate analysis of isolated cells, which showed nuclear, cytoplasmic and membrane staining. Thus, we verified that inclusion of bone marrow aspirate clot is a valid alternative for TMA histological and immunohistochemical analyses.

Keywords

TMA; Bone marrow clots; Immunohistochemistry

ANEXOS

Anexo 2 – Taxa de sobreviventes (Surv), taxa acumulada de morte por câncer(MMtaxa acumulada de morte por outras causas (OUTRAS CAUSAS) e respectivos desvios padrão (se.Surv, se.MM, se.OUTRAS CAUSAS)

time(month)	Surv	MM	OUTRAS CAUSAS	se.Surv	se.MM	se.OUTRAS CAUSAS
0.00	1.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.03	0.99614	0.00386	0.00000	0.00385	0.00385	0.00000
0.10	0.98069	0.01931	0.00000	0.00855	0.00855	0.00000
0.13	0.97683	0.01931	0.00386	0.00935	0.00855	0.00385
0.17	0.97296	0.02318	0.00386	0.01008	0.00935	0.00385
0.20	0.96907	0.02707	0.00386	0.01077	0.01009	0.00385
0.23	0.96128	0.03486	0.00386	0.01200	0.01142	0.00385
0.33	0.95343	0.04270	0.00386	0.01313	0.01260	0.00385
0.37	0.94556	0.05058	0.00386	0.01415	0.01367	0.00385
0.40	0.94162	0.05452	0.00386	0.01463	0.01417	0.00385
0.43	0.93766	0.05848	0.00386	0.01509	0.01465	0.00385
0.50	0.93369	0.06245	0.00386	0.01554	0.01512	0.00385
0.53	0.92971	0.06643	0.00386	0.01598	0.01557	0.00385
0.57	0.92574	0.07040	0.00386	0.01640	0.01600	0.00385
0.63	0.92177	0.07437	0.00386	0.01680	0.01642	0.00385
0.67	0.91779	0.07835	0.00386	0.01719	0.01682	0.00385
0.77	0.91379	0.08235	0.00386	0.01758	0.01722	0.00385
0.80	0.90978	0.08636	0.00386	0.01795	0.01761	0.00385
0.87	0.90577	0.09037	0.00386	0.01831	0.01798	0.00385
0.90	0.90174	0.09037	0.00789	0.01867	0.01798	0.00556
0.93	0.89369	0.09842	0.00789	0.01935	0.01870	0.00556
1.00	0.88967	0.10245	0.00789	0.01968	0.01904	0.00556
1.03	0.88564	0.10647	0.00789	0.02000	0.01938	0.00556
1.17	0.88162	0.10647	0.01191	0.02031	0.01938	0.00684
1.23	0.87755	0.11053	0.01191	0.02062	0.01971	0.00684
1.93	0.87345	0.11464	0.01191	0.02092	0.02004	0.00684
1.97	0.86935	0.11464	0.01601	0.02122	0.02004	0.00794
2.00	0.86525	0.11874	0.01601	0.02152	0.02037	0.00794
2.03	0.86115	0.12284	0.01601	0.02180	0.02068	0.00794
2.07	0.85291	0.13108	0.01601	0.02236	0.02129	0.00794
2.30	0.84871	0.13528	0.01601	0.02264	0.02160	0.00794
2.33	0.84451	0.13528	0.02021	0.02291	0.02160	0.00895
2.63	0.84028	0.13950	0.02021	0.02319	0.02190	0.00895
2.87	0.83604	0.14375	0.02021	0.02345	0.02220	0.00895

2.90	0.83180	0.14375	0.02446	0.02371	0.02220	0.00987
4.00	0.82753	0.14801	0.02446	0.02397	0.02250	0.00987
4.67	0.82322	0.15232	0.02446	0.02423	0.02279	0.00987
4.73	0.81891	0.15663	0.02446	0.02449	0.02308	0.00987
4.83	0.81460	0.15663	0.02877	0.02473	0.02308	0.01072
5.03	0.81029	0.16094	0.02877	0.02498	0.02336	0.01072
5.13	0.80596	0.16527	0.02877	0.02522	0.02364	0.01072
6.13	0.80160	0.16963	0.02877	0.02545	0.02391	0.01072
6.20	0.79724	0.17399	0.02877	0.02568	0.02418	0.01072
6.73	0.79284	0.17839	0.02877	0.02592	0.02445	0.01072
7.10	0.78841	0.18282	0.02877	0.02615	0.02472	0.01072
7.37	0.78398	0.18725	0.02877	0.02637	0.02498	0.01072
7.47	0.77953	0.18725	0.03322	0.02660	0.02498	0.01156
8.17	0.77507	0.19170	0.03322	0.02682	0.02523	0.01156
8.37	0.77054	0.19624	0.03322	0.02704	0.02550	0.01156
8.90	0.76598	0.20080	0.03322	0.02726	0.02576	0.01156
9.43	0.76139	0.20538	0.03322	0.02748	0.02601	0.01156
9.60	0.75681	0.20538	0.03781	0.02770	0.02601	0.01238
9.80	0.75222	0.20997	0.03781	0.02791	0.02626	0.01238
11.03	0.74761	0.20997	0.04242	0.02811	0.02626	0.01316
11.47	0.74299	0.21458	0.04242	0.02832	0.02651	0.01316
12.17	0.73835	0.21458	0.04707	0.02852	0.02651	0.01389
12.43	0.73370	0.21923	0.04707	0.02871	0.02676	0.01389
13.13	0.72900	0.22393	0.04707	0.02891	0.02701	0.01389
13.27	0.72427	0.22393	0.05180	0.02911	0.02701	0.01460
13.63	0.71950	0.22870	0.05180	0.02930	0.02726	0.01460
13.67	0.71474	0.23346	0.05180	0.02950	0.02750	0.01460
14.40	0.70997	0.23823	0.05180	0.02968	0.02774	0.01460
15.80	0.70514	0.24306	0.05180	0.02987	0.02798	0.01460
16.63	0.70031	0.24789	0.05180	0.03005	0.02822	0.01460
16.90	0.69548	0.25272	0.05180	0.03023	0.02845	0.01460
17.27	0.69065	0.25272	0.05663	0.03041	0.02845	0.01530
17.50	0.68582	0.25272	0.06146	0.03057	0.02845	0.01597
17.73	0.68099	0.25755	0.06146	0.03074	0.02867	0.01597
18.10	0.67606	0.26248	0.06146	0.03091	0.02890	0.01597
18.27	0.67112	0.26248	0.06640	0.03107	0.02890	0.01663
18.87	0.66615	0.26745	0.06640	0.03124	0.02913	0.01663
18.90	0.66118	0.27242	0.06640	0.03140	0.02935	0.01663
19.00	0.65617	0.27743	0.06640	0.03156	0.02957	0.01663
20.73	0.65105	0.28256	0.06640	0.03173	0.02980	0.01663
21.17	0.64592	0.28768	0.06640	0.03189	0.03003	0.01663
21.23	0.64079	0.29281	0.06640	0.03204	0.03024	0.01663
21.40	0.63567	0.29794	0.06640	0.03219	0.03046	0.01663

22.00	0.63054	0.29794	0.07152	0.03234	0.03046	0.01731
22.63	0.62537	0.29794	0.07669	0.03249	0.03046	0.01796
23.00	0.62020	0.30311	0.07669	0.03263	0.03067	0.01796
24.00	0.61499	0.30832	0.07669	0.03277	0.03087	0.01796
25.67	0.60955	0.30832	0.08213	0.03292	0.03087	0.01866
26.63	0.60396	0.31391	0.08213	0.03309	0.03113	0.01866
27.27	0.59837	0.31950	0.08213	0.03326	0.03137	0.01866
27.67	0.59277	0.32509	0.08213	0.03341	0.03160	0.01866
27.93	0.58707	0.33079	0.08213	0.03357	0.03185	0.01866
28.03	0.58137	0.33649	0.08213	0.03373	0.03208	0.01866
28.10	0.57567	0.34219	0.08213	0.03388	0.03230	0.01866
28.53	0.56992	0.34795	0.08213	0.03402	0.03253	0.01866
29.53	0.55817	0.35970	0.08213	0.03432	0.03298	0.01866
31.00	0.55216	0.36570	0.08213	0.03447	0.03321	0.01866
31.07	0.54616	0.36570	0.08814	0.03462	0.03321	0.01947
33.10	0.54003	0.37184	0.08814	0.03477	0.03344	0.01947
33.47	0.53389	0.37798	0.08814	0.03491	0.03367	0.01947
33.83	0.52775	0.37798	0.09427	0.03504	0.03367	0.02028
34.27	0.52154	0.38418	0.09427	0.03518	0.03390	0.02028
35.27	0.51533	0.39039	0.09427	0.03530	0.03411	0.02028
35.57	0.50897	0.39676	0.09427	0.03543	0.03434	0.02028
35.67	0.50253	0.40320	0.09427	0.03557	0.03457	0.02028
36.10	0.49609	0.40320	0.10071	0.03569	0.03457	0.02112
36.20	0.48964	0.40964	0.10071	0.03580	0.03478	0.02112
37.40	0.48312	0.41617	0.10071	0.03592	0.03500	0.02112
37.93	0.47650	0.42279	0.10071	0.03603	0.03521	0.02112
41.00	0.46928	0.43001	0.10071	0.03620	0.03549	0.02112
41.40	0.46206	0.43723	0.10071	0.03635	0.03576	0.02112
43.97	0.45484	0.44445	0.10071	0.03650	0.03601	0.02112
44.23	0.44762	0.45167	0.10071	0.03662	0.03625	0.02112
45.53	0.44040	0.45889	0.10071	0.03674	0.03647	0.02112
47.03	0.43306	0.46623	0.10071	0.03685	0.03669	0.02112
49.13	0.42559	0.47369	0.10071	0.03697	0.03691	0.02112
50.00	0.41813	0.48116	0.10071	0.03706	0.03711	0.02112
51.83	0.41052	0.48876	0.10071	0.03716	0.03732	0.02112
52.37	0.40292	0.49636	0.10071	0.03724	0.03751	0.02112
55.37	0.39517	0.50411	0.10071	0.03732	0.03770	0.02112
56.10	0.38727	0.51202	0.10071	0.03740	0.03789	0.02112
57.67	0.37937	0.51992	0.10071	0.03747	0.03806	0.02112
60.63	0.37129	0.52799	0.10071	0.03753	0.03823	0.02112
61.73	0.36322	0.53606	0.10071	0.03757	0.03838	0.02112
67.20	0.35497	0.54432	0.10071	0.03761	0.03854	0.02112
69.60	0.34587	0.55342	0.10071	0.03773	0.03878	0.02112

70.40	0.33652	0.56277	0.10071	0.03785	0.03903	0.02112
72.20	0.32690	0.56277	0.11033	0.03797	0.03903	0.02296
73.53	0.30767	0.57238	0.11994	0.03810	0.03927	0.02459
74.00	0.29806	0.57238	0.12956	0.03810	0.03927	0.02607
78.90	0.28844	0.58200	0.12956	0.03807	0.03948	0.02607
79.50	0.27883	0.59161	0.12956	0.03799	0.03965	0.02607
81.13	0.26921	0.60123	0.12956	0.03788	0.03978	0.02607
81.40	0.24999	0.61084	0.13917	0.03753	0.03987	0.02742
82.33	0.23076	0.62046	0.14879	0.03703	0.03993	0.02865
86.57	0.22027	0.63094	0.14879	0.03680	0.04006	0.02865
94.70	0.20978	0.64143	0.14879	0.03651	0.04014	0.02865
112.90	0.19744	0.65377	0.14879	0.03639	0.04042	0.02865
114.43	0.18510	0.66611	0.14879	0.03615	0.04060	0.02865
126.30	0.16967	0.68154	0.14879	0.03628	0.04120	0.02865
138.83	0.14846	0.70275	0.14879	0.03743	0.04287	0.02865
174.37	0.11877	0.70275	0.17848	0.04003	0.04287	0.03880
224.60	0.07918	0.70275	0.21807	0.04192	0.04287	0.04801
269.93	0.00000	0.78193	0.21807	0.00000	0.04801	0.04801