



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

Thiago Henrique Meinicke Vieira

**Análise dos nichos da medula óssea na Leucemia
Mieloide Crônica**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em
Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues
Co-orientador: Dr. Cristiano Claudino Oliveira

**Botucatu
2019**

Thiago Henrique Meinicke Vieira

Análise dos nichos da medula óssea na
Leucemia Mieloide Crônica

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre
em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues
Co-orientador: Dr. Cristiano Claudino Oliveira

Botucatu
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação

Bibliotecária responsável: Márcia Della Flora Cortes – CRB10/1877

V658a Vieira, Thiago Henrique Meinicke
 Análise dos nichos da medula óssea na Leucemia Mieloide
 Crônica / Thiago Henrique Meinicke Vieira. - Botucatu, 2019.
 79 f. : il. ; 30 cm.

 Dissertação (Mestrado) – Área de concentração: Patologia.
 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade
 de Medicina de Botucatu. 2019.
 Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues
 Co-orientador: Dr. Cristiano Claudino Oliveira

 1. Leucemia Mieloide Crônica 2. Célula-tronco 3. Nicho.
 4. Medula óssea 5. Marcadores. I. Domingues, Maria Aparecida
 Custódio. II. Oliveira, Cristiano Claudino. III. Título.

CDU: 61

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação:

A meus pais, Tania e Carlos, pelo incentivo constante no meu crescimento profissional e por sempre terem me acompanhado durante toda a minha trajetória na Medicina.

Aos meus grandes amigos e companheiros de residência médica em Patologia: Flávia Fazzio Barbin, Jessica Aline Tomelin Cursi, Vinícius Cardoso Nóbrega, Rodrigo Tavares Macedo, Giana Bachega Badiale, Luiza Jacqueline Costa Nicolau Berriel, Jéssica Oliveira Carvalho e Rodrigo José Pizzello Zogheib; que me acompanharam no decorrer dos 3 anos de formação e juntos tivemos a oportunidade de descobrir como é vasto, complexo e enigmático o mundo da Patologia.

Aos meus mestres do departamento de Patologia da FMB UNESP, que me tornaram o patologista, que hoje sou.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria, minha orientadora, mas também minha amiga e professora durante a graduação e residência médica, pelos contínuos ensinamentos e por ter me apresentado ao mundo da Hematopatologia;

Ao Dr. Cristiano, meu co-orientador, por toda a disposição e empenho em me ajudar nas etapas que mais tive dificuldade na elaboração deste trabalho;

À Bruna Pagnin Augusto, por todo o grande auxílio fornecido durante o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Fernando Franchi, pela ajuda na realização do estudo imuno-histoquímico;

À Rita de Cássia de Moraes, por resgatar os blocos de parafina armazenados na blocoteca do departamento de Patologia;

Ao Pedro Casagrande, pela coleta dos dados clínicos dos pacientes envolvidos nesta pesquisa e disposição em ajudar na obtenção de informações adicionais;

Ao professor João Lauro Viana de Camargo, por conceder autorização para realização de TMA no laboratório TOXICAM.

EPIÍGRAFE

“Guarda esses versos que escrevi chorando como um alívio a minha saudade, como um dever do meu amor; e quando houver em ti um eco de saudade, beija estes versos que escrevi chorando.”

Machado de Assis

RESUMO

Introdução: A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) consiste em uma neoplasia hematopoiética maligna de células-tronco, caracterizada pela aquisição do gene de fusão *BCR-ABL1* associado à translocação [t(9;22)(q34;q11)]. O início é insidioso com progressão lenta seguida por uma fase acelerada, que culmina na crise blástica. Os nichos da medula óssea estão relacionados com o microambiente tumoral, afetando a sobrevivência e a proliferação das células-tronco leucêmicas. **Objetivos:** Análise da quantidade e distribuição de células-tronco hematopoiéticas nos diferentes nichos na LMC em diferentes fases e correlação destes achados com a distribuição de galectina-3 nas fases acelerada e blástica. **Material e métodos:** Revisão clínico-morfológica de 20 pacientes na fase crônica da LMC, 1 paciente na fase acelerada e 1 paciente na crise blástica. Análise imunofenotípica (CD34, CD31, CD44, CD117 e galectina-3) em *Tissue Microarrays* para avaliação dos diferentes nichos e sua correlação com a matriz proteica. **Resultados:** Observou-se aumento na expressão de todos os marcadores na fase crônica quando comparados ao controle. Na fase acelerada há aumento na expressão de CD44 e galectina-3 quando comparado ao controle enquanto que na crise blástica há aumento na expressão de CD44 e CD117. **Conclusão:** A LMC constitui uma neoplasia mieloproliferativa em que o remodelamento dos nichos malignos favorece a manutenção das células-tronco leucêmicas. O presente estudo demonstrou elevação em todos os marcadores imunohistoquímicos avaliados nas diferentes fases da doença de modo que os achados significativos foram que os altos níveis de CD44, CD31 e galectina-3 associados à mudança na expressão desses marcadores nos nichos se correlacionam com desfecho desfavorável e propensão à evolução para crise blástica.

Palavras-chave: LMC; célula-tronco; nicho; medula óssea; marcadores

ABSTRACT

Introduction: Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a malignant hematopoietic stem cell neoplasm, characterized by the acquisition of the translocation-associated BCR-ABL1 gene [t(9;22)(q34;q11)]. The onset is insidious with the slow progression followed by an accelerated phase, culminating in the blast crisis. The bone marrow niches are related to the tumor microenvironment, the survival and proliferation of the leukemic stem cells. **Objectives:** To analyze the amount and distribution of hematopoietic stem cells in different niches in CML in different phases and correlate these findings with the galectin-3 distribution in the accelerated and blastic phases. **Material and methods:** Clinical-morphological review of 20 patients in CML chronic phase, 1 patient in the accelerated phase and 1 patient in the blast crisis. Immunophenotypic analysis (CD34, CD31, CD44 and galectin-3) in Tissue Microarrays to evaluate the different niches and correlation with the protein matrix. **Results:** We observed the presence of all markers in the chronic phase when compared to the control. In the accelerated phase there is an increase in expression of CD44 and galectin-3, when compared to control while in blast crisis there is an increase in expression of CD44 and CD117. **Conclusion:** CML is a myeloproliferative neoplasm in which remodeling of malignant niches favors the maintenance of leukemic stem cells. The present study demonstrated an increase in expression of all immunohistochemical markers at different stages of the disease so that the relevant findings were the high levels of CD44, CD31 and galectin-3 associated with change in the expression of these markers at the niches are related to unfavorable outcome and propensity to blast crisis.

Keywords: CML; stem cell; niche; bone marrow; markers

Lista de ilustrações

Figura 1 - Esquema indicando a formação do cromossomo Filadélfia a partir da translocação cromossômica recíproca t(9;22) (q34;q11) na LMC.

Figura 2 – LMC fase crônica, subtipo Gran-Meg: hiper celularidade absoluta e relativa das séries granulocítica e megacariocítica com presença de megacariócitos hipolobulados (H&E, 40x).

Figura 3 – LMC fase crônica, subtipo Gran: hiper celularidade absoluta e relativa da série granulocítica com células em diversos estágios de maturação. Hipocelularidade das demais séries (H&E, 40x).

Figura 4 – LMC fase crônica, subtipo Meg: hiper celularidade absoluta e relativa da série megacariocítica com presença de megacariócitos hipolobulados formando agrupamentos. Hipocelularidade das demais séries (H&E, 40x).

Figura 5 – LMC fase acelerada: hiper celularidade absoluta e relativa da série granulocítica com acentuado retardo de maturação, correspondendo às células blásticas (H&E, 40x).

Figura 6 – LMC crise blástica: predomínio de células blásticas volumosas com núcleos ovais, dispostas em padrão de infiltração difuso (H&E, 40x).

Figura 7 – Nicho osteoblástico, região subosteal (H&E, 10x).

Figura 8 – Nicho osteoblástico, região peritrabecular (H&E, 10x).

Figura 9 – Nicho perivascular (H&E, 20x).

Figura 10 – CD44: positividade em membrana nos nichos 2 e 3 (40x).

Figura 11 – CD34: positividade em membrana e citoplasmática no nicho 3 (40x).

Figura 12 – CD31: positividade citoplasmática nos nichos 2 e 3 (40x).

Figura 13 – CD117: positividade citoplasmática nos nichos 2 e 3 (40x).

Figura 14 – Galectina-3: positividade citoplasmática e estromal nos nichos 2 e 3 (40x).

Figura 15 - retículo grau 1: fibras reticulínicas lineares dispersas, correspondendo à medula óssea normal (Impregnação argêntica, 40x).

Figura 16 - retículo grau 2: rede frouxa de fibras reticulínicas com intersecções (Impregnação argêntica, 40x).

Figura 17 - retículo grau 3: aumento denso e difuso de fibras reticulínicas com numerosas intersecções e fibras espessadas (Impregnação argêntica, 40x).

Figura 18 - retículo grau 4: numerosas fibras reticulínicas espessadas com intersecções associadas à deposição de colágeno (Impregnação argêntica, 40x).

Lista de tabelas

Tabela 1 – Perfil epidemiológico, clínico-evolutivo e morfológico dos pacientes com LMC

Tabela 2 – Perfil epidemiológico, clínico-evolutivo e morfológico dos pacientes do grupo controle

Tabela 3 - Análise morfológica e imuno-histoquímica

Lista de quadros

Quadro 1 - Fatores que caracterizam a Fase Acelerada da Leucemia
Mieloide Crônica

Quadro 2 - Fatores que caracterizam a Crise Blástica da Leucemia
Mieloide Crônica

Quadro 3 - Resumo da função dos marcadores estudados em relação às
CTH e nichos

Quadro 4 - Painel de anticorpos utilizados

Lista de abreviaturas

CD31/PECAM1: Platelet endothelial cell adhesion molecule 1

CD34: CD 34 molecule

CD44: CD 44 molecule (Indian blood group)

CD117: KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase

CTH: Célula-tronco hematopoiética

CXCL12: Chemokine [C-X-C motif] ligand 12

CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4

DHL: Desidrogenase láctica

G:E: Relação série granulocítica e eritroide

FISH Hibridização in situ fluorescente

G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor

LLA-B: Leucemia linfoblástica aguda B

LMC: Leucemia mieloide crônica

MEC: Matriz extracelular

NFKB1: Nuclear factor kappa B subunit 1

Ph: Cromossomo Filadélfia

RT-PCR: Reverse transcription polimerase chain reaction

SCF: Stem cell factor

TGFB1: Transforming growth factor beta 1

TMA: Tissue microarray

VEGFR2: Vascular endothelial growth factor receptor 2

VLA-4: Very Late Antigen-4

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

Revisão de Literatura	08
1.Introdução	08
1.1 Leucemia Mieloide Crônica (LMC)	08
1.2 Aspectos Clínicos	11
1.3 Histopatologia da medula óssea na LMC	15
1.4 Nichos da Medula óssea e LMC	22
1.5 LMC e estroma da medula óssea	28
1.6 Identificação das células-tronco hematopoiéticas	30
1.6.1 CD34	30
1.6.2 CD31	30
1.6.3 CD44	31
1.6.4 CD117	31
1.6.5 Galectina-3	32
2.Justificativa	35
3.Objetivos	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4.Material e métodos	37

4.1 Delineamento do estudo e casuística	37
4.2 Critérios de inclusão	38
4.3 Critérios de exclusão	38
4.4 Desenho do estudo	38
4.5 Preparo prévio das amostras	38
4.6 Análise morfológica	39
4.7 Estudo imuno-histoquímico	40
4.8 Leitura do estudo imuno-histoquímico	43
4.9 Distribuição dos casos	44
4.10 Obtenção de dados clínicos	45
4.11 Metodologia estatística	45
4.12 Análise do risco	46
 5.Resultados	47
 6.Discussão	64
 7.Conclusão	72
 Referências	75

REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Leucemia Mieloide Crônica (LMC)

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa do sistema hematopoiético, que se caracteriza pela expansão clonal da célula-tronco pluripotente, a qual possui capacidade de se diferenciar nas linhagens mieloide, monocítica, megacariocítica, eritroide e linfoide. Como consequência, há um aumento na contagem periférica do setor mieloide, que mantém certo grau de diferenciação e consequente supressão das demais séries^(1,2,3).

É a mais comum das doenças mieloproliferativas crônicas, perfazendo 15-20% de todos os casos de leucemias, com uma incidência mundial de 1-1.5 casos por 100.000 habitantes/ano. Pode ocorrer em qualquer idade, mas a maior incidência é entre a quinta e a sexta décadas de vida. Há discreto predomínio no sexo masculino. Fatores etiológicos predisponentes à LMC são desconhecidos. A exposição prévia à irradiação tem sido correlacionada com alguns casos^(4,5).

Ela foi a primeira neoplasia a ser definida em bases citogenéticas e moleculares por estar associada à translocação [t(9;22) (q34;q11)] e à subsequente fusão no gene *BCR-ABL1*, que possui atividade de tirosina quinase constitutivamente ativa, sendo necessária e suficiente para a

transformação maligna^(6,7).

Ao diagnóstico, 90% dos pacientes mostram, na maioria das metáfases das células da medula óssea, um marcador cariotípico, que é o resultado da translocação envolvendo os cromossomos 9 e 22⁽⁸⁾. Foi descrito em 1960, por Nowelle e Hungerford, associado especificamente à LMC. Em 1990, Rowley deu o nome de cromossomo Filadélfia (Ph) a esse marcador⁽⁹⁾.

A porção 3' do gene ABL1 é movida do cromossomo 9q34 para a porção 5' do gene BCR no cromossomo 22q11. Os pontos de quebra no gene ABL no 9q34 podem ocorrer em qualquer lugar entre uma região de 140kb entre o primeiro éxon alternativo 1b e éxon 2. No gene BCR a quebra ocorre em uma área de 5,8kb entre os éxons 1b a 5b, denominada ponto de quebra maior (M-BCR). Diversos pontos de quebra no gene BCR resultam na t(9;22) de modo que essa heterogeneidade é citogeneticamente indistinguível sendo detectada por técnicas moleculares. M-BCR produz uma proteína de fusão p210, presente em cerca de 90% dos pacientes com LMC e sendo também observada em 40% de pacientes adultos e 10% de pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B)⁽¹⁰⁾.

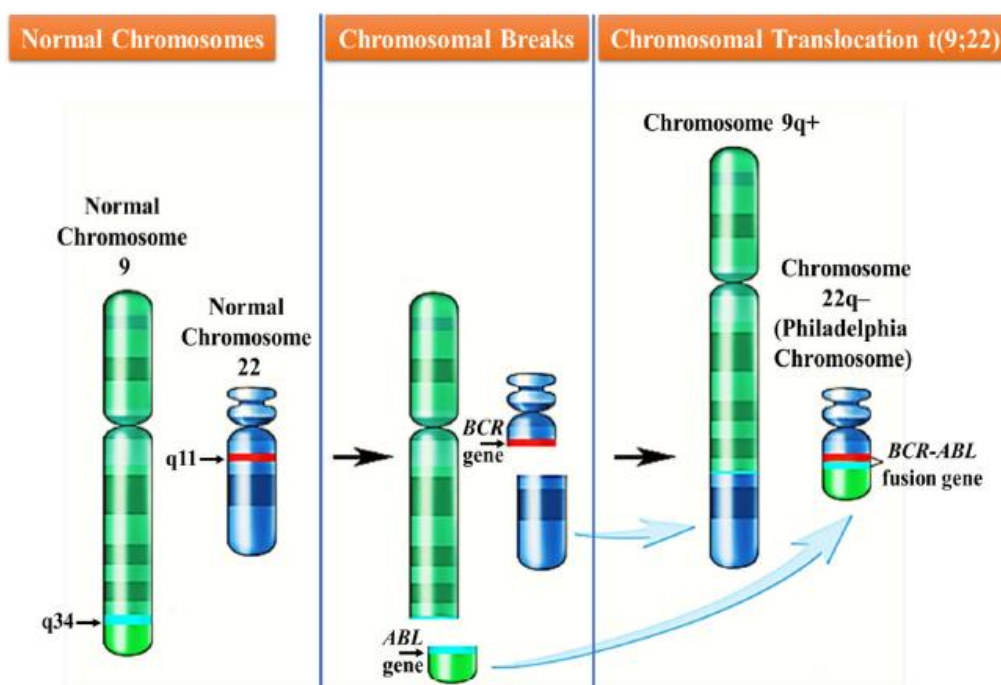


Figura 1: Esquema indicando a formação do cromossomo Filadélfia a partir da translocação cromossômica recíproca t(9;22) (q34;q11) na LMC⁽¹⁾.

Três mecanismos principais são responsáveis pela malignização das células-tronco a partir da proteína BCR-ABL1: alteração nas propriedades de adesão, ativação de vias mitogênicas e inibição da apoptose. As células-tronco hematopoiéticas normais se aderem à matriz extracelular através de integrinas, que correspondem a glicoproteínas localizadas na superfície celular. As células-tronco leucêmicas apresentam adesão reduzida às células estromais e matriz extracelular, facilitando a sua liberação no sangue periférico⁽¹⁾.

A proteína BCR-ABL1 ativa vias de sinalização mitogênicas que resultam na ativação da proliferação celular e promoção de instabilidade genética, induzindo à transformação leucêmica. As principais vias são

RAS/RAF/MEK/ERK; JAK-STAT; PI3K/AKT/BAD/BCL-X e MYC. A expressão da proteína BCR-ABL1 impede apoptose por intermédio de sua atividade tirosina quinase, ocasionando proliferação celular desordenada^(1,11).

Aproximadamente 5-10% dos pacientes com LMC não possuem evidência citogenética do cromossomo Filadélfia, de modo que pode ser realizada detecção molecular por meio

. de FISH (hibridização *in situ* fluorescente) ou RT-PCR (*reverse transcription polimerase chain reaction*). O prognóstico dos pacientes com Ph negativo não é diferente dos Ph positivo e, portanto, o tratamento é similar. Com a progressão da LMC, anormalidades cromossômicas adicionais ocorrem como surgimento de uma segunda cópia de Ph, i(17q), trissomia dos cromossomos 8 e 19. O aumento da instabilidade genética nos clones leucêmicos Ph⁺ facilita o aparecimento de subclones com fenótipos altamente malignos⁽¹⁾.

1.2 - Aspectos Clínicos

As manifestações clínicas da LMC dependem da fase e do volume da doença. Ela se inicia por uma fase crônica de duração mediana de quatro a cinco anos, seguida por uma fase acelerada de duração mais curta e, finalmente, uma fase chamada crise blástica^(2,12,13).

- Fase Crônica: As manifestações mais comuns são sintomas

constitucionais como fadiga, perda de peso, sudorese, febrícula acompanhada de palidez, dor no quadrante superior esquerdo decorrente de esplenomegalia (achado clínico mais comum, presente em 40-50% dos casos). Manifestações menos frequentes incluem sangramentos (em decorrência de plaquetopenia ou disfunção plaquetária) e trombose (associada à trombocitose ou acentuada leucocitose). Sintomas leucostáticos como dispneia, tontura, priapismo, perda de coordenação motora e confusão mental podem ocorrer em razão da circulação das células leucêmicas pelos vasos pulmonares e cerebrais, porém constituem sintomas incomuns^(5,11). A maior parte dos pacientes é assintomática e o diagnóstico é realizado a partir de achados anormais de exames laboratoriais. O hemograma revela leucocitose geralmente acima de 25.000/ μ L com desvio à esquerda. Caracteristicamente, na contagem diferencial, encontram-se granulócitos em todas as fases de diferenciação, predominando os mielócitos e as formas maduras, enquanto os mieloblastos e promielócitos representam menos de 10%. Basofilia é um achado comum e eosinofilia pode ocorrer. Anemia normocrômica e normocítica discreta é comum. As plaquetas são normais ou aumentadas: 30% dos pacientes exibem trombocitose e menos de 10%, trombocitopenia. O mielograma mostra intensa hiperplasia granulocítica, exibindo morfologia normal com exceção

de ocasionais elementos mostrando sinais displásicos. É comum ocorrer hiperplasia megacariocítica, que apresenta morfologia normal^(4,11). Sem terapia efetiva, o quadro clínico da fase crônica da LMC evolui, invariavelmente, para crise blástica (diretamente ou através da fase acelerada), em um período de 3 a 5 anos^(2,14).

- Fase Acelerada: É a fase terminal da doença, de curta duração. Esta fase caracteriza-se por queda do status funcional, sintomas constitucionais como febre e perda de peso, resistência à terapêutica, aumento da esplenomegalia, da basofilia e do número de células blásticas, além de trombocitose ou trombocitopenia, mielofibrose e evolução clonal. Nesta fase, os pacientes apresentam febre, perda de peso, cefaleia, artralgia, dores ósseas e dor aguda no quadrante superior esquerdo devido a infarto esplênico. Os critérios para caracterizar a fase acelerada foram propostos pela *World Health Organization* (WHO), conforme o quadro 1^(2,5,11,13).

Quadro 1: Fatores que caracterizam a Fase Acelerada* da Leucemia Mieloide Crônica

Critérios hematológicos/citogenéticos:
Leucocitose persistente ou crescente (contagens de leucócitos superiores a $10 \times 10^9/L$), não responsiva ao tratamento
Esplenomegalia persistente ou crescente, não responsiva ao tratamento
Trombocitose persistente (contagens de plaquetas superiores a $1000 \times 10^9/L$), não responsiva ao tratamento
Trombocitopenia persistente (contagens de plaquetas inferiores a $100 \times 10^9/L$), não relacionada ao tratamento
Basófilos $\geq 20\%$ no sangue periférico
Blastos 10-19% no sangue periférico ou na medula óssea
Anormalidade citogenética clonal adicional à presença do cromossomo Ph
Critérios provisórios relacionados à resposta aos inibidores de tirosina quinase (TKI):
Resistência hematológica (ou falha na obtenção de resposta hematológica completa) ao primeiro TKI
Qualquer evidência de resistência hematológica, citogenética ou molecular a dois TKI seqüenciais
Ocorrência de duas ou mais mutações no gene BCR-ABL1 durante a terapia com TKI

* A presença de um ou mais dos achados indicados caracteriza a fase acelerada.

- Crise Blástica: A crise blástica caracteriza-se por contagem de blastos no sangue periférico ou na medula óssea igual ou superior a 20%. Estas células imaturas são mieloblastos em 50% dos casos,

linfoblastos em 25%, e no restante dos casos, células indiferenciadas ou bifenotípicas. Nesta fase é comum a piora evidente do “*performance status*”, com intensificação da anorexia e da perda de peso. A esplenomegalia aumenta e é comum a infiltração extramedular na pele, nos linfonodos, nos ossos e no sistema nervoso central. A sintomatologia é semelhante à leucemia aguda. A expectativa de sobrevida é de 3 a 6 meses após o início da crise blástica^(13,14,15,16). Os fatores que caracterizam a crise blástica da LMC estão indicados no quadro 2.

Quadro 2: Fatores que caracterizam a crise blástica* da Leucemia Mieloide Crônica

Crise blástica* da Leucemia Mieloide Crônica
Blastos ≥20% no sangue periférico ou na medula óssea
Acometimento extramedular (excluindo fígado e baço; incluindo linfonodo, pele, sistema nervoso central, ossos e pulmões)

* A presença de qualquer um dos achados indicados é suficiente para a caracterização da crise blástica.

1.3 - Histopatologia da medula óssea na LMC

A biópsia de medula óssea na LMC em fase crônica apresenta-se hipercelular, com perda dos espaços gordurosos. Há uma hiperplasia absoluta do setor granulocítico, com elementos em várias fases de maturação, predomínio de elementos maduros e redução de precursores eritroides. Consequentemente, há aumento da relação entre as linhagens

granulocítica e eritroide (G:E), sendo frequentemente maior do que 10:1. Não há displasia significativa⁽⁵⁾.

Basofilia é comum e eosinófilos podem ser proeminentes. Blastos perfazem menos de 5% da celularidade global e são vistos em pequenos agrupamentos peritrabeculares. Os megacariócitos são menores do que o normal com núcleo hipolobulado. Há moderada a acentuada fibrose reticulínica que se correlaciona com o número de megacariócitos, o tamanho do baço e o grau de anemia. Durante a terapia há mudanças na composição da medula óssea com redução da celularidade granulocítica, normalização da megacariopoese e regressão da fibrose. Há três subtipos de LMC: Gran-Meg, Gran e Meg. O subtipo Gran-Meg caracteriza-se por hiperplasia das séries granulocítica e megacariocítica enquanto que no subtipo Gran há somente hiperplasia granulocítica e no subtipo Meg somente hiperplasia megacariocítica^(2,5,17). As figuras 2-4 ilustram, respectivamente, os subtipos Gran-Meg, Gran e Meg em biópsias de medula óssea com LMC.

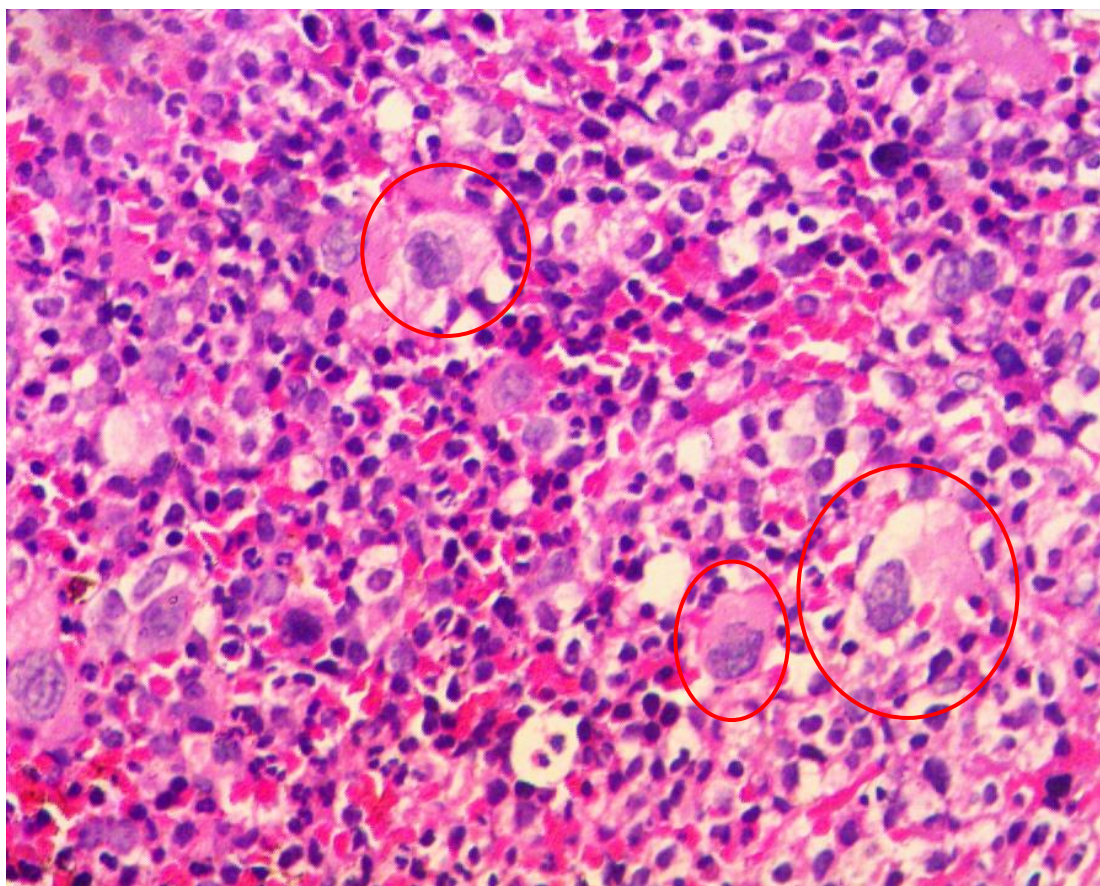


Figura 2 – LMC fase crônica, subtipo Gran-Meg: hipercelularidade absoluta e relativa das séries granulocítica e megacariocítica com presença de megacariócitos hipolobulados (H&E, 40x).

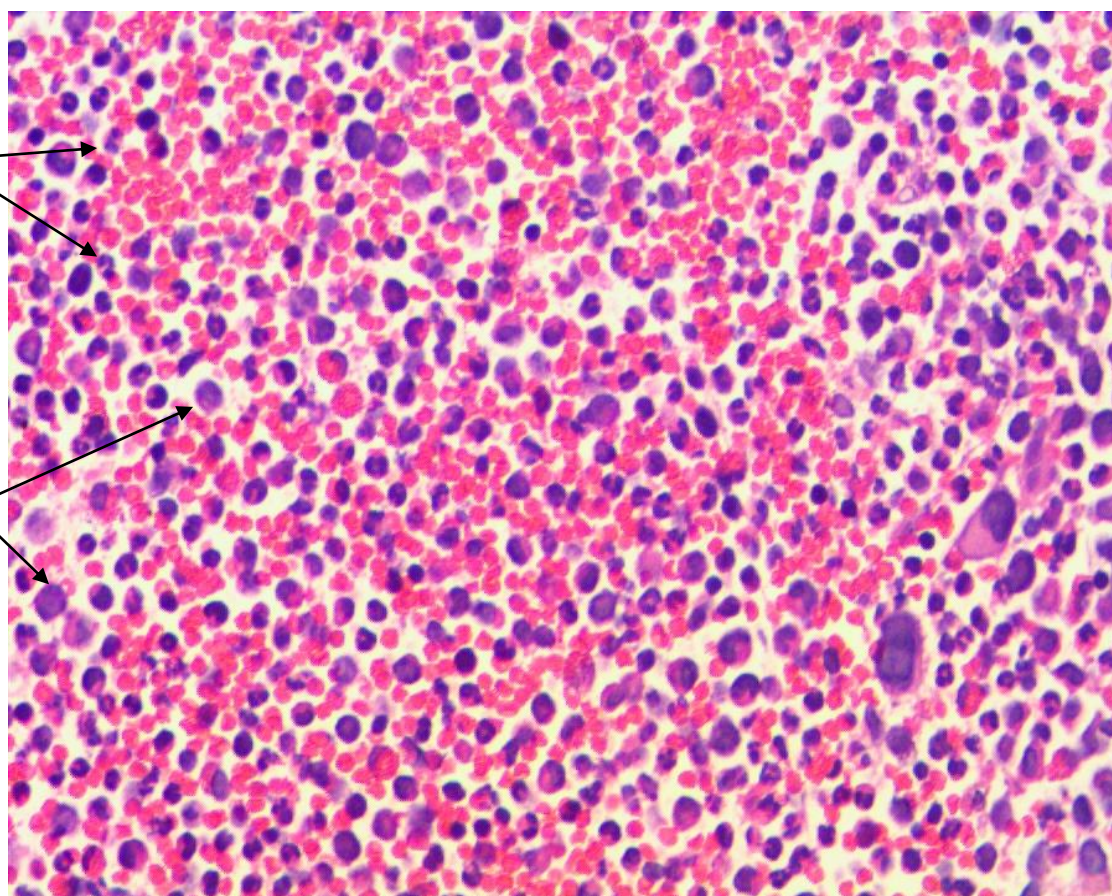


Figura 3 – LMC fase crônica, subtipo Gran: hiper celularidade absoluta e relativa da série granulocítica com células em diversos estágios de maturação. Hipocelularidade das demais séries (H&E, 40x).

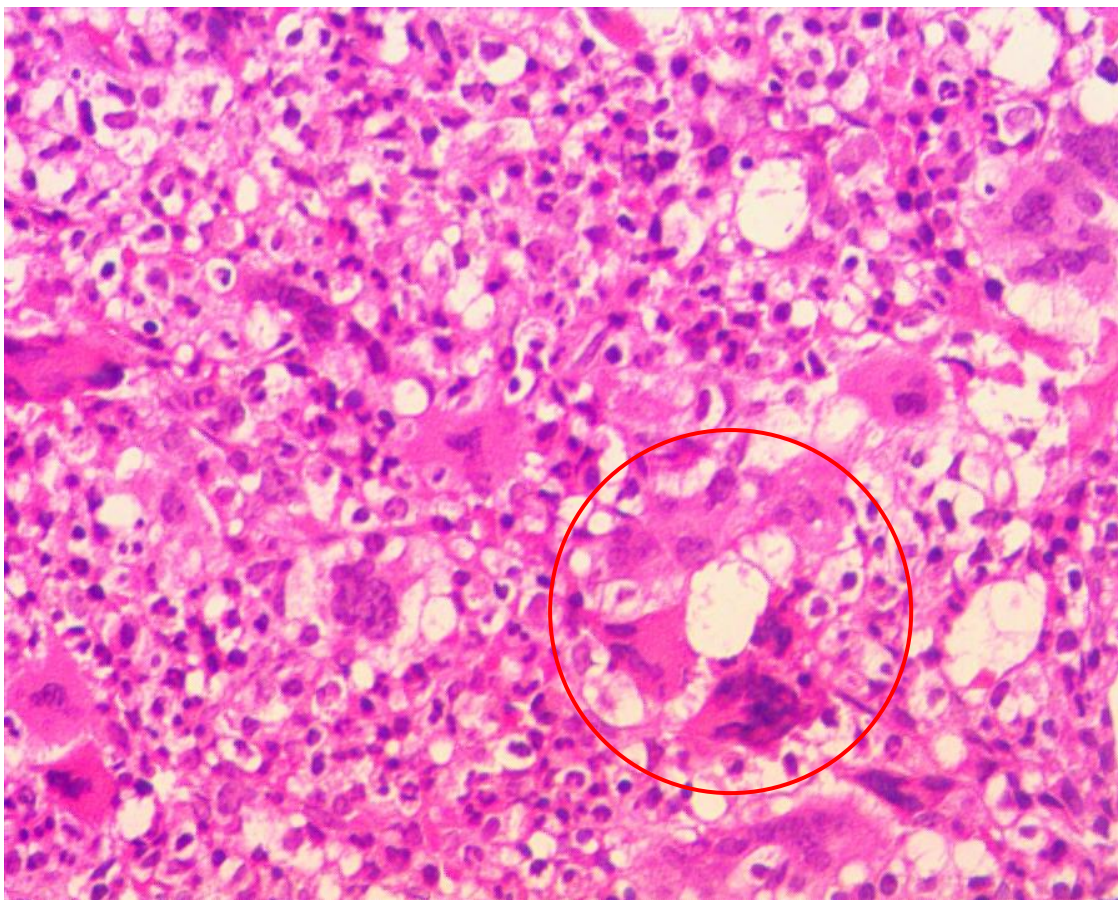


Figura 4 – LMC fase crônica, subtipo Meg: hiper celularidade absoluta e relativa da série megacariocítica com presença de megacariócitos hipolobulados formando agrupamentos. Hipocelularidade das demais séries (H&E, 40x).

Na fase acelerada, a medula óssea é hiper celular e alterações displásicas podem ser vistas em qualquer linhagem mieloide assim como proliferação de micromegacariócitos e, ocasionalmente, marcada fibrose. A proporção aumentada de blastos (10-19%) pode ser evidenciada através da marcação imuno-histoquímica para CD34. Na maior parte dos casos, os blastos possuem fenótipo mieloide, porém blastos linfoides podem ser observados⁽²⁾. A figura 5 ilustra uma biópsia de medula óssea com LMC em fase acelerada.

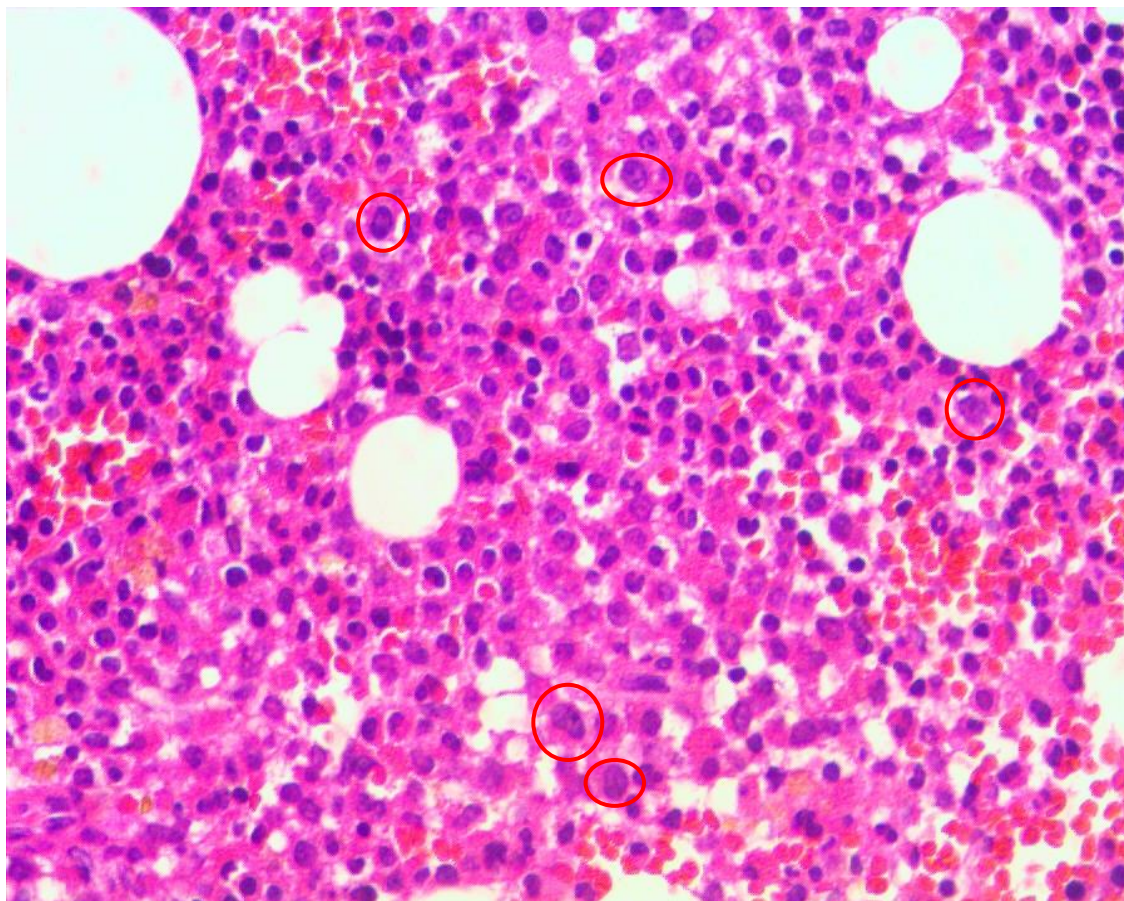


Figura 5 – LMC fase acelerada: hipercelularidade absoluta e relativa da série granulocítica com acentuado retardo de maturação, correspondendo às células blásticas (H&E, 40x).

Na fase blástica, o aspecto anatomopatológico assemelha-se à leucemia aguda, com grandes agregados de blastos alterando a arquitetura da medula óssea, geralmente de origem mieloide (70% blastos granulocíticos, 10-20% blastos megacariocíticos, <10% blastos eritroides, <5% blastos monocíticos)⁽¹⁸⁾. A figura 6 ilustra uma biópsia de medula óssea com LMC em crise blástica.

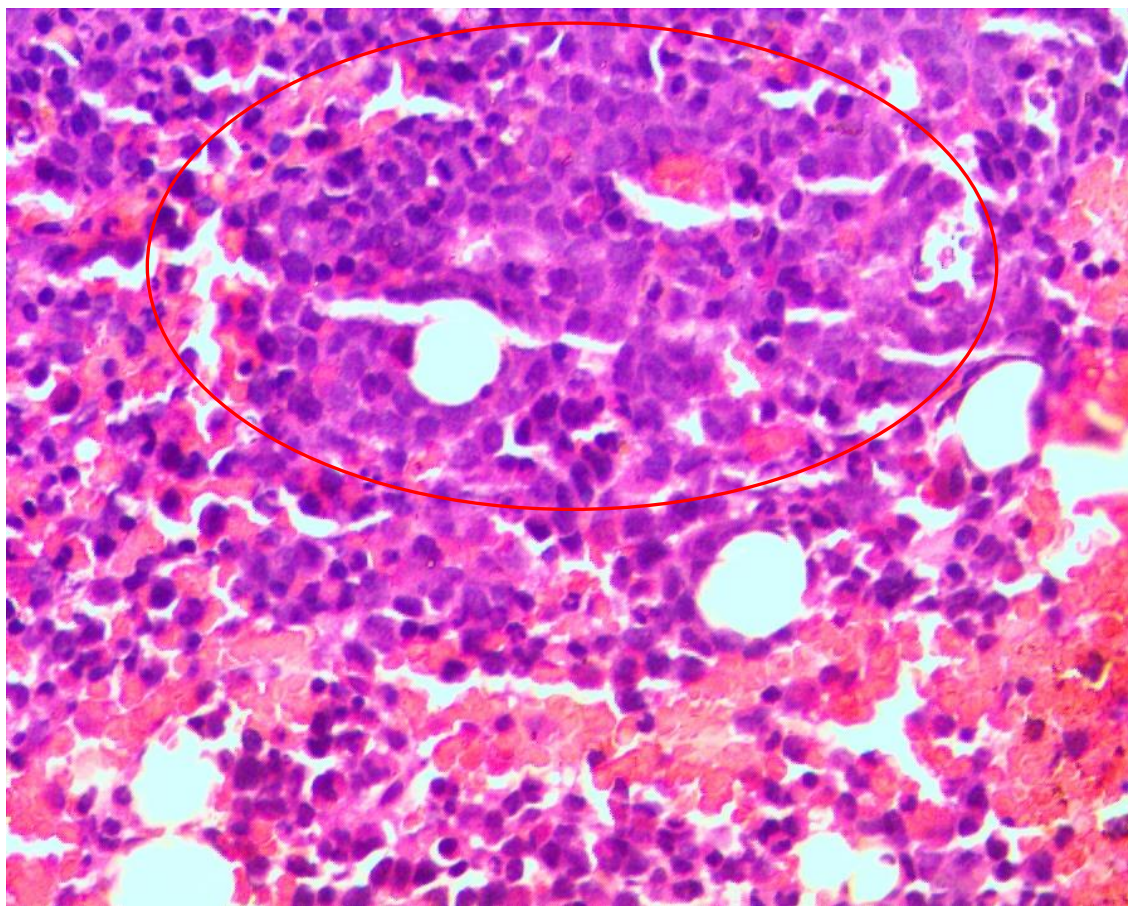


Figura 6 – LMC crise blástica: predomínio de células blásticas volumosas com núcleos ovais, dispostas em padrão de infiltração difuso (H&E, 40x).

Os critérios morfológicos das três fases da LMC são muito próximos, gerando dificuldade para o diagnóstico baseado na morfologia⁽²⁾. Com exceção do número de blastos, controvérsias persistem sobre a diferença dos outros constituintes (fibras reticulínicas, megacariócitos, precursores eritroides e macrófagos) para se fazer tal diagnóstico. O papel preditivo destes elementos é pouco conhecido. Estudos recentes tentam buscar critérios morfológicos que sinalizem eminente aceleração e crise blástica antes da maturação evidente ser substituída pela formação de numerosos blastos⁽¹⁹⁾.

1.4 - Nichos da Medula óssea e LMC

Ray Schofield, em 1978, conceituou *nicho* como local específico dentro da medula óssea, onde a célula-tronco hematopoiética (CTH) se origina, assenta e prolifera. Atualmente sabe-se que o nicho é mais do que um simples compartimento morfológico, mas um sítio funcional e dinâmico, que se remodela e influencia a função da CTH e suas progenitoras, exercendo papel definitivo na CTH normal e na neoplásica⁽²⁰⁾.

Os componentes celulares dos nichos podem ser categorizados em dois tipos funcionais: células que interagem próximo às células-tronco como células endoteliais, células mesenquimais estromais e megacariócitos; e células acessórias como osteoblastos, macrófagos especializados e células nervosas como neurônios simpáticos e células de Schwann, que influenciam indiretamente as células-tronco⁽²¹⁾.

Há ainda nos nichos, grandes quantidades de fatores humorais e celulares, proteínas de matriz, por exemplo, fibronectina e ácido hialurônico, que regulam a diferenciação e multiplicação das CTH⁽²¹⁾.

Acredita-se que os adipócitos modulem negativamente as células-tronco, pois observou-se que há aumento na recuperação da medula óssea após quimioterapia quando são utilizados agente que bloqueiam a adipogênese. Macrófagos promovem a secreção de CXCL12 (*chemokine [C-X-C motif] ligand 12*) por células estromais mesenquimais, ocasionando

retenção das células-tronco no nicho⁽²²⁾.

Os estudos e o reconhecimento dos nichos na medula óssea só foram possíveis graças a avanços técnicos de análise de imagem do interior da medula óssea, bem como uma série de elegantes estudos em modelos murinos. Nestes trabalhos foram descritos os nichos: osteoblástico e perivascular⁽²³⁾, ilustrados nas figuras 7 a 9.

O nicho osteoblástico se situa perto das trabéculas ósseas e localiza-se nas regiões subosteal e peritrabecular. Promove o microambiente necessário para a manutenção do estado de quiescência da CTH enquanto no nicho vascular ocorre a diferenciação e proliferação, sendo atualmente ambos considerados como uma unidade funcional em virtude de sua semelhança anatômica e funcional. As células-tronco situadas no nicho osteoblástico são mantidas a partir da interação entre moléculas de adesão como CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*), que é expressa pelas células-tronco, e CXCL12; e fibronectina da matriz extracelular⁽²³⁾.

As células endoteliais estão localizadas na interface entre a corrente sanguínea e o microambiente estromal intersticial ao redor dos vasos sanguíneos. São identificadas a partir de marcadores de superfície como CD31 e VEGFR2 (*Vascular endothelial growth factor receptor 2*). No nicho vascular produzem fatores que promovem a auto-renovação das células-tronco como SCF (*stem cell factor*), CXCL12 e E-selectina regulando desse modo a renovação e proliferação das células-tronco no nicho⁽²¹⁾.

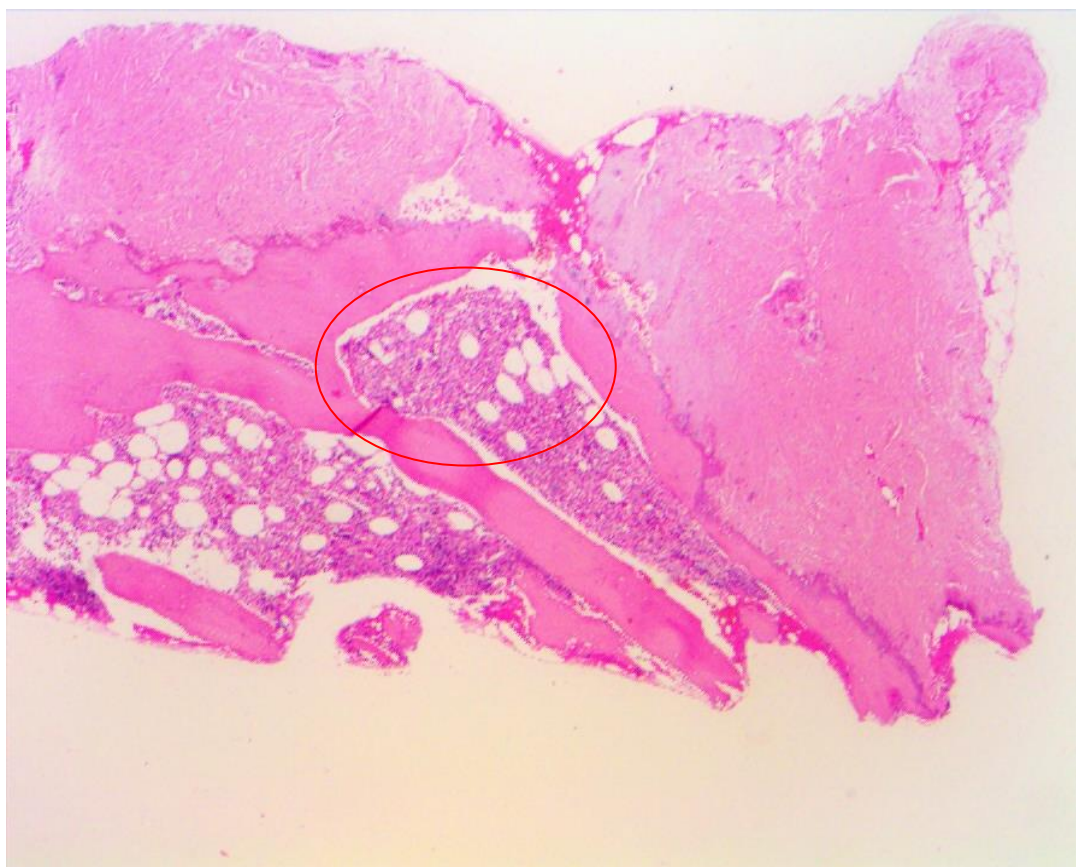


Figura 7 – Nicho osteoblástico, região subosteal (H&E, 10x).

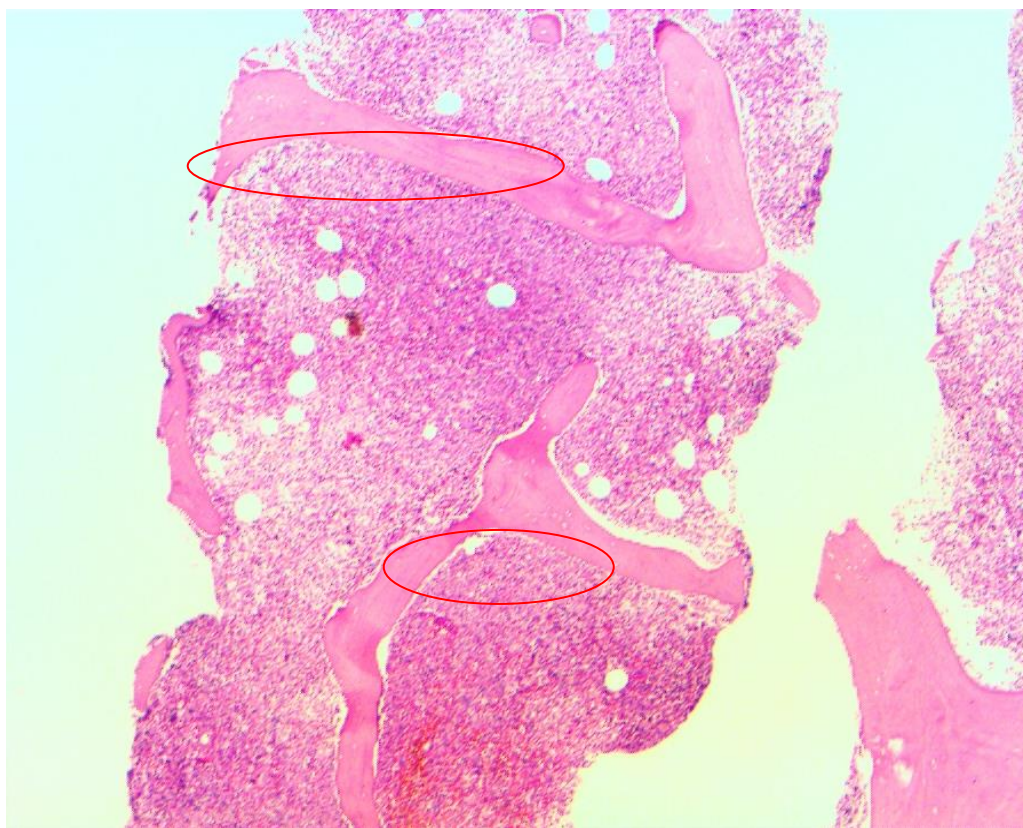


Figura 8 – Nicho osteoblástico, região peritrabecular (H&E, 10x).

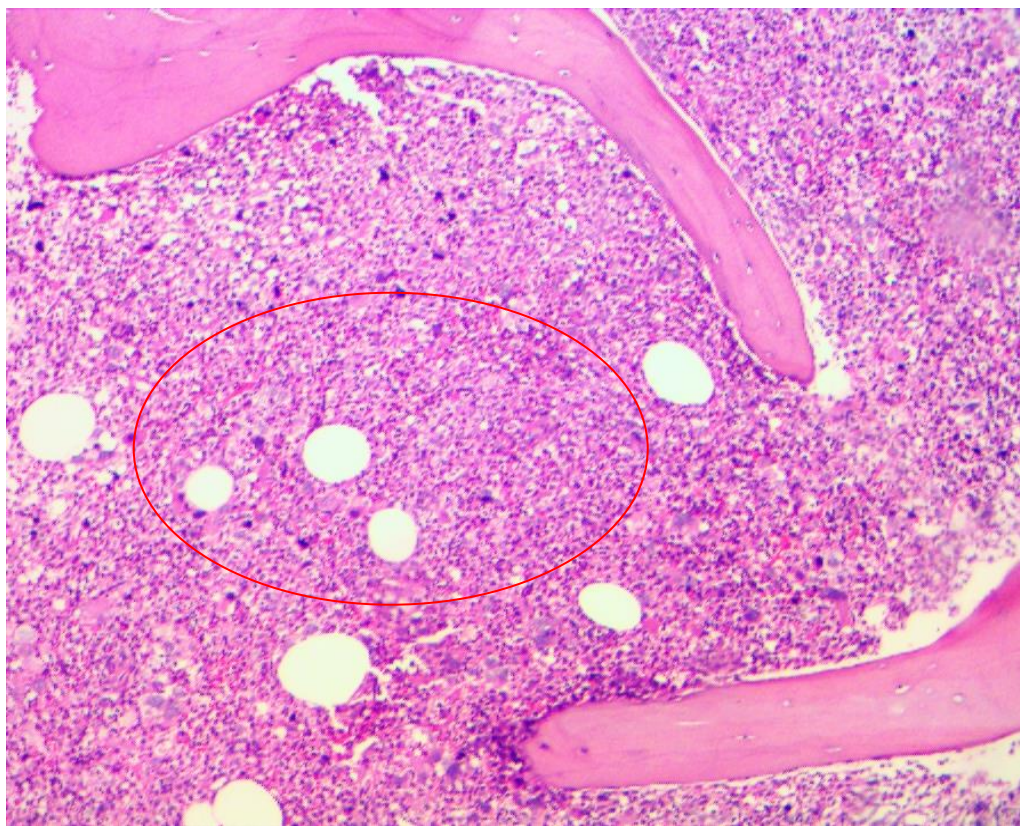


Figura 9 – Nicho perivascular (H&E, 20x).

As células-tronco mesenquimais se localizam ao redor de vênulas e arteríolas e as que estão em contato direto com a porção não luminal das células endoteliais são chamadas de células-tronco mesenquimais perivasculares. Sabe-se que, assim como as células endoteliais, controlam a atividade das CTH pela produção dos mesmos fatores SCF e CXCL12^(21,24).

O sistema nervoso simpático participa da funcionalidade do nicho através da interação sináptica de fibras nervosas simpatominérgicas com as células perivasculares, resultando na regulação circadiana da produção de CXCL12 pelas células perivasculares⁽²⁵⁾. As células de Schwann não

mielinizadas produzem TGFB1 (*Transforming growth factor beta 1*), que mantém as CTH em estado quiescente⁽²⁶⁾.

Há evidências crescentes indicando que os nichos hematopoiéticos influenciam a proliferação, sobrevivência e migração das células-tronco leucêmicas devido à alteração arquitetural da medula óssea e ao desbalanço da quiescência, ativação e diferenciação das células-tronco na vigência de neoplasias mieloproliferativas^(21,27,28).

Na LMC as células neoplásicas remodelam o nicho osteoblástico, prejudicando a hematopoiese de modo que existe associação entre os osteoblastos com função alterada e desenvolvimento de mielofibrose com expansão do osso trabecular^(20,21). Estudos experimentais demonstram correlação entre as células-tronco não neoplásicas presentes nos nichos e células malignas, resultando na modulação de ambas as populações, sendo o nicho um ecossistema que proporciona sinais para a manutenção e proliferação das células-tronco⁽²⁰⁾.

O nicho vascular contribui para a auto-renovação das células-tronco no contexto de leucomogênese pela secreção de fatores de crescimento por uma população de células endoteliais ativadas, resultando na indução do crescimento de células leucêmicas. Torna-se inflamatório e hipóxico devido ao microambiente tumoral desencadeando proliferação vascular para suprir o aporte de oxigênio juntamente com a ativação de vias de sinalização de citocinas e transcrição gênica, que influenciam na proliferação celular⁽²⁹⁾.

1.5 - LMC e estroma da medula óssea

A hemopoese normal é controlada na medula óssea pela interação célula/célula, célula/matriz estromal e célula/fator de crescimento. Uma cascata de sinais específicos é necessária para iniciar, além de controlar, a proliferação e a diferenciação das células hematopoiéticas. Sob condições normais, existe um equilíbrio entre autorrenovação das células-tronco pluripotentes e maturação das células a serem liberadas da medula óssea e morte celular⁽³⁰⁾.

Neste fenômeno, estão envolvidos inúmeros fatores reguladores e moléculas de adesão: o microambiente da medula óssea é formado por várias células estromais, citocinas secretadas e ligadas a membranas, e um complexo de matriz extracelular (MEC). As células estromais formam uma população heterogênea: fibroblastos-*like*, adipócitos, macrófagos e células endoteliais. Estas células sintetizam e secretam várias citocinas, incluindo fatores estimuladores de colônias, interferons e interleucinas⁽³¹⁾.

Estes fatores de crescimento podem interagir com as células hematopoiéticas em desenvolvimento, ou podem ser secretados e armazenados na MEC. Esta pode apresentar os fatores de desenvolvimento das células hematopoiéticas na forma de atividade biológica⁽³²⁾.

A MEC não é inerte, ao contrário, tem um papel ativo no controle de adesão celular e migração dentro da medula óssea, apresentação de

citocinas e no processo de proliferação celular⁽³²⁾. Acredita-se também que esteja envolvida na compartimentalização da medula óssea, dando sítios específicos para diferenciação celular. As proteínas mais abundantes da MEC são colágeno IV, glicosaminoglicanos, fibronectina, tenascina, trombospondina e hemonectina⁽³¹⁾.

Esse equilíbrio normal de interação célula/matriz está alterado na vigência de LMC, interferindo, conseqüentemente, na regulação da proliferação e diferenciação celular, bem como explicando o grande número de células neoplásicas mais ou menos diferenciadas na corrente sanguínea⁽³³⁾.

O estroma medular da LMC possui características que asseguram a sobrevivência e crescimento do clone neoplásico ao passo em que a capacidade proliferativa das células-tronco hematopoiéticas normais está diminuída^(23,33,34). As células-tronco leucêmicas induzem a produção de fatores pró-inflamatórios pelas células estromais da medula óssea, que por sua vez promovem a proliferação das células-tronco leucêmicas, originando um círculo de auto-perpetuação⁽²¹⁾.

A adesão das células-tronco leucêmicas à MEC aumenta a resistência à quimioterapia e contribui para a persistência da doença. Na LMC a atividade da quinase BCR-ABL1 altera a adesão celular⁽³⁵⁾.

1.6 – Identificação das células-tronco hematopoiéticas

Células-tronco hematopoiéticas podem ser identificadas a partir de marcadores como CD34, CD31, CD44 e CD117. No decorrer da diferenciação há perda de expressão desses marcadores^(36,37).

1.6.1 – CD34

CD34 (CD34 *molecule*) é uma fosfoglicoproteína transmembrana com um peso molecular de 115 kDa. Atualmente, é considerado o melhor marcador de células-tronco hematopoiéticas e progenitoras de linhagem B, T ou mieloide. É altamente expressa em células pluripotentes e sua expressão reduz gradualmente com o aumento da maturação das linhagens hematopoiéticas a ponto de ser completamente ausente em células plenamente maturadas^(38,39). Diversos outros tipos celulares expressam CD34 como células endoteliais, células-tronco mesenquimais e células dendríticas intersticiais⁽⁴⁰⁾.

1.6.2 - CD 31

CD31/PECAM1(*Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1*) é uma glicoproteína transmembrana de 130kDa e membro da superfamília de imunoglobulina, que é expressa na superfície de células endoteliais e células hematopoiéticas como granulócitos, monócitos e plaquetas^(41,42)

sendo também expressa na célula-tronco hematopoiética⁽³⁶⁾.

Sua função está relacionada com a migração transendotelial entre medula óssea e a corrente sanguínea. A expressão de CD31 em células CD34+ assim como em células endoteliais promove sinais anti-apoptóticos através da adesão à proteína VLA-4 (Very Late Antigen-4)⁽⁴³⁾.

1.6.3 – CD44

A proteína CD44 [CD44 *molecule (Indian blood group)*] compõe uma família de glicoproteínas transmembrana, pertencentes à classe das moléculas de adesão. É codificada por um único gene localizado no cromossomo 11, envolvendo 20 éxons, sendo expressa no epitélio de diversos órgãos, células endoteliais, células mesenquimais e células hematopoiéticas^(44,45). A molécula de adesão CD44 corresponde ao receptor principal do ácido hialurônico, um glicosaminoglicano de alto peso molecular presente na matriz extracelular, porém também se liga à fibronectina e à osteopoetina. Na hematopoiese é essencial para o nicho osteoblástico, pois a partir da interação entre CD44 e ácido hialurônico na superfície celular das células-tronco há migração seletiva para o nicho osteoblástico⁽⁴⁴⁾.

1.6.4 – CD117

O proto-oncogene CD117 (KIT *proto-oncogene, receptor tyrosine*

kinase) consiste em uma única cópia localizada no cromossomo 4 (4q12) compreendendo aproximadamente 88kb. Codifica um receptor tirosina quinase, presente na superfície de células CD34+, caracterizado por um domínio extracelular, um domínio hidrofóbico transmembrana e um domínio intracelular com atividade tirosina quinase. A partir da interação entre seu ligante, SCF, produzido por células estromais, há regulação da capacidade de auto-renovação e diferenciação das células-tronco. CD117 está presente na superfície celular de células-tronco imaturas e à medida que há diferenciação celular, ocorre perda de expressão desse marcador^(37,38,46).

1.6.5 – Galectina-3

Também conhecida como LGALS3, é uma proteína de 30kDa pertencente à família das proteínas ligantes β -galactosídeo. Liga-se a porções de carboidratos das glicoproteínas e dos glicolipídeos da superfície celular.

Está expressa tanto em células normais como neoplásicas e regula o crescimento, a adesão, a diferenciação e a morte celular. Localiza-se no interior das células (núcleo/citoplasma) ou extracelularmente. Possui três domínios de ligação: domínio NH2, sequência repetitiva colágeno-*like*, rica em glicina, prolina e tirosina, e um domínio COOH-terminal reconhecedor de carboidrato (CRD, domínio lectina)^(47,48,49).

A galectina-3 está expressa nas células epiteliais (mucosa gástrica,

cólon, epitélio mamário, próstata) e nas células do sistema imune (monócitos e macrófagos)⁽⁵⁰⁾. Possui atividade biológica pleiotrópica pelo fato de desempenhar diferentes funções no contexto tumoral como crescimento celular, apoptose, adesão, angiogênese, potencial metastático e ainda resistência à quimioterapia.

Os níveis de galectina-3 dependem dos órgãos e tecidos, sugerindo que neoplasias e tecidos específicos podem modular a expressão dessa proteína. Níveis elevados estão relacionados a pior prognóstico. Consequentemente, a galectina-3 está associada ao câncer, tendo um importante papel durante a carcinogênese e/ou progressão tumoral⁽⁵¹⁾.

Durante a década passada, observou-se que a galectina-3 exercia sobre a célula neoplásica um efeito anti-apoptótico, garantindo à célula uma progressão maior. É sugerido atualmente que a atividade anti-apoptótica da galectina-3 siga o caminho de sinalização do NFkB1 (*nuclear factor kappa B subunit 1*), fator de transcrição bem conhecido e indutor de atividade anti-apoptótica⁽⁴⁷⁾.

Quadro 3 – Resumo da função dos marcadores estudados em relação à CTH e nichos

Marcadores	Função em relação à CTH e nichos
CD34	Citoadesão, controle de diferenciação e proliferação celular; endereçamento das CTH nos nichos
CD31	Migração transendotelial entre medula óssea (nicho vascular) e corrente sanguínea
CD117	Controle de proliferação e diferenciação celular; endereçamento das CTH nos nichos
CD44	Migração seletiva das CTH para o nicho osteoblástico
Galectina-3	Controle da proliferação celular e apoptose; adesão aos nichos

2. JUSTIFICATIVA

Em estudos prévios de nosso grupo observou-se que há um aumento da galectina-3 nos casos que evoluíram para crise blástica. Atualmente busca-se entender a correlação da destruição dos nichos e a formação de clones neoplásicos. Acredita-se que a interação dos nichos com as CTH quiescentes ou ativadas facilite a multiplicação e infiltração das células neoplásicas na medula óssea.

Portanto, a destruição e desorganização dos nichos, levariam à multiplicação de células portadoras de translocações, que necessariamente influenciariam o microambiente. Dando continuidade aos achados das proteínas do MEC na LMC, este projeto propõe estudar as alterações em número e distribuição das CTH nos nichos osteoblástico e perivascular.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Analisar a quantidade e a distribuição de células-tronco hematopoiéticas na Leucemia Mieloide Crônica em diferentes fases e correlacionar com as proteínas de matriz;

3.2 - Objetivos Específicos

- Descrever na Leucemia Mieloide Crônica, a quantidade e a distribuição de células-tronco hematopoiéticas nos diferentes nichos, e correlacionar com a evolução da doença e prognóstico;
- Correlacionar estes achados com a distribuição da galectina-3, na fase acelerada e crise blástica.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 - Delineamento do estudo e casuística:

29 casos de biópsias de medula óssea foram selecionados do arquivo do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (FMB-UNESP), do período de 2001 a 2017, que tiveram o diagnóstico patológico e clínico prévio de Leucemia Mieloide Crônica.

Realizou-se revisão do prontuário para coleta de informações epidemiológicas e clínico-evolutivas, e revisão morfológica de todos os casos. As lâminas foram reavaliadas e classificadas em três grupos: fase crônica, fase acelerada e crise blástica. O grupo controle foi constituído por 4 casos de amostras normais de medula óssea (biópsias de estadiamento de linfomas, negativas para infiltração) do Serviço de Patologia, do HC-FMB-UNESP.

O estudo recebeu parecer favorável a sua realização pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMB-UNESP (CAAE 75421417.0.0000.5411; parecer 2.309.962).

O Hospital das Clínicas da FMB-UNESP (HC-FMB-UNESP) é um hospital escola em que é realizado atendimento em especialidades clínicas e cirúrgicas, abrangendo doenças neoplásicas, entretanto não constitui um hospital oncológico. Logo, não há casuística elevada de doenças hematológicas neoplásicas de modo que os pacientes portadores

de doenças onco-hematológicas são tratados no Hospital Amaral Carvalho de Jaú, que corresponde a um hospital de câncer e serviço de referência na região para tratamento das neoplasias hematológicas, justificando, portanto, a reduzida casuística do presente estudo.

4.2 - Critérios de inclusão:

A amostra parafinada deve ser representativa da medula óssea, contendo mais de três espaços intertrabeculares.

Ter o paciente dado o aceite para utilização da amostragem.

4.3 - Critérios de exclusão:

Amostras pouco representativas e com artefatos de processamento.

4.4 - Desenho do estudo:

É um estudo do tipo transversal, retrospectivo e descritivo, com grupo controle. Os desfechos avaliados foram óbito e sobrevida em um período inferior a 5 anos.

4.5 - Preparo prévio das amostras:

As amostras foram recebidas em formol tamponado a 10% em recipiente identificado, contendo fragmento cilíndrico de osso esponjoso.

Após o recebimento, foi desprezado o formol e adicionado descalcificador (EDTA ácido acético 0,5%) pelo período de 8 horas.

As amostras foram lavadas em álcool 70% por duas horas e transferidas para um cassete identificado (nome e número da amostra), e processadas em autotécnico (Leica), onde foram desidratadas, com a passagem de gradiente de álcoois, seguido de banhos no xilol e impregnadas por parafina, “over night”.

Posteriormente, o fragmento foi retirado do cassete, incluído em parafina líquida a 60°C, e seccionado em cortes de 3 *micras*. Após desparafinização, os cortes foram corados em hematoxilina-eosina, coloração de Perls e impregnação argêntica. Ao término do processo de confecção das lâminas e a subsequente leitura e conclusão diagnóstica, os blocos e lâminas foram armazenados na blocoteca do Departamento de Patologia.

4.6 - Análise morfológica:

Foram analisadas as lâminas coradas em HE, Perls e impregnação argêntica, descrevendo:

- Celularidade global, relação G:E; série eritroide, série granulocítica, série megacariocítica, série linfoplasmacítica, arcabouço reticulínico e depósitos de hemossiderina.
- Subclassificação nos subtipos Gran, Gran-Meg e Meg.

- Arcabouço reticulínico: Grau I a IV;
- Quantificação dos depósitos de hemossiderina: 1+ a 6+.

4.7 - Estudo imuno-histoquímico:

Para avaliação imuno-histoquímica utilizou-se a plataforma de *Tissue Microarrays* (TMA), localizada no laboratório TOXICAM (Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana) pertencente à FMB-UNESP, sendo a autorização concedida pelo professor João Lauro Viana de Camargo.

O bloco de TMA foi confeccionado a partir dos blocos parafinados dos coágulos, porém não foram encontrados os blocos parafinados de 2 casos, sendo assim descartados. Os cortes de TMA foram confeccionados a partir de áreas selecionadas de cada uma das amostras dos pacientes, sendo que os cortes tiveram espessura de 3µm e foram representados com 1.0 mm de diâmetro, espaçados a cada 0,2 mm e montados em lâminas de vidro silanizadas (Sigma Chemical Corporation, P-7886, Saint Louis, MO, EUA). Os cortes foram 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 sendo então aplicada a solução de bloqueio de peroxidase por 5 minutos (Envision Flex peroxidase block) – tampão fosfato contendo peróxido de hidrogênio, NaN_3 e detergente.

Posteriormente, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários de acordo com o especificado no quadro 3, por pelo menos 12 horas durante o período noturno à temperatura de 4°C. Após lavagem em PBS, aplicou-se o polímero por 20 minutos (Envision Flex/HRP) – dextran acoplado com moléculas de peroxidase e anticorpo secundário direcionado contra imunoglobulinas de coelho ou 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, lavagem por 5 minutos. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Meyer e as lâminas foram montadas com resina e rotuladas.

Quadro 4 – Painel de anticorpos utilizados

Anticorpo Primário	Clone	Diluição	Empresa	Marcação
CD34 Monoclonal	QBEnd-10	1:100	Dako	Membranosa
CD31 Monoclonal	m0823	1:100	Dako	Citoplasmática e membranosa
CD117, c-Kit Policlonal	A4502	1:200	Dako	Citoplasmática e membranosa
CD44 Monoclonal	DF1485	1:100	Dako	Membranosa
Anti-galectina-3 Monoclonal	9C4	1:400	RDI	Citoplasmática, nuclear, estromal

4.8 - Leitura do estudo imuno-histoquímico:

A leitura do estudo imuno-histoquímico foi realizada em microscópio binocular e analisador de imagem escaneada (Scanner 3DHitech) avaliando-se:

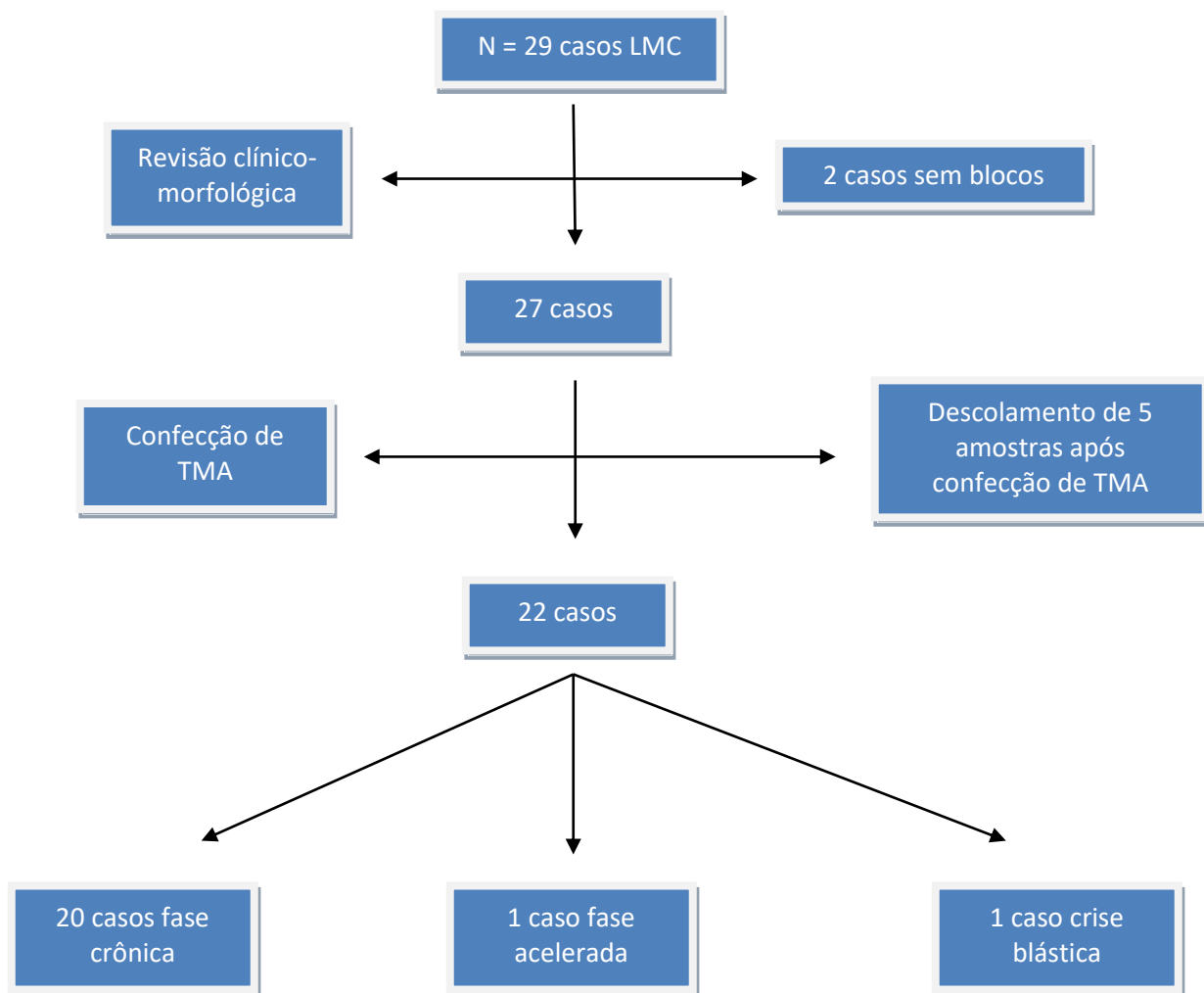
- Número de células marcadas com CD34, CD31, CD44, CD117, galectina-3 e distribuição (subosteal, peritrabecular e periendotelial);
- Presença de marcação para galectina-3 no estroma peritrabecular.

Após a realização do TMA, observou-se que 5 amostras apresentaram descolamento do material da lâmina, inviabilizando a análise. Dessa forma, também foram descartadas. Portanto, foi efetuada a análise imuno-histoquímica dos marcadores no material de TMA em 22 casos, sendo 20 casos na fase crônica, 1 caso na fase acelerada e 1 caso na crise blástica. Foram avaliadas a distribuição de células nos nichos 2 (perivascular) e 3 (osteoblástico, região peritrabecular) juntamente com a porcentagem de marcação em relação ao total de células presentes na amostra. Para avaliação da distribuição das células marcadas, foi considerada marcação individual apenas no nicho 2 ou 3 e também em ambos os nichos simultaneamente.

No material de TMA, não foi possível análise do nicho 1 (osteoblástico, região subosteal) visto que foram utilizadas amostras de

coágulo de medula óssea e o nicho 1 somente pode ser avaliado na biópsia de medula óssea contendo osso. O grupo controle consistiu em 4 casos de coágulo de medula óssea. Foi realizada imuno-histoquímica em cada caso individualmente e procedeu-se à análise do estudo imuno-histoquímico de maneira análoga à do material de TMA.

4.9 - Distribuição dos casos:



4.10 - Obtenção de dados clínicos:

As informações clínicas (idade, sexo, sintomas constitucionais, marcadores laboratoriais/bioquímicos, tempo de evolução para progressão de doença após tratamento, comorbidades associadas neoplásicas e não neoplásicas, estadiamento clínico, terapêutica indicada, evolução clínica, sobrevida e óbito) foram obtidas a partir de revisão dos prontuários e laudos anatomopatológicos dentro do HCFMB-UNESP.

4.11 - Metodologia estatística:

A análise estatística, assim como a escolha pelo teste de comparação, foi executada respeitando os pressupostos determinados pelos resultados, características e comportamento das variáveis de estudo.

As amostras foram caracterizadas a partir das frequências absolutas e relativas das variáveis qualitativas (expressão imuno-histoquímica dos marcadores). Foi realizado um teste Qui-quadrado para comparar as proporções de expressão entre os marcadores, estratificados por intervalos percentuais e distribuição nos nichos. As análises foram realizadas a partir do software R. Considerou-se um nível de significância de 5%. Embora alguns resultados tenham apresentado significância estatística, o teste pode ter sido influenciado pelo tamanho amostral (apenas 4 casos no grupo controle).

4.12 - Análise do risco:

Devido à utilização de tecidos fixados em formol e incluídos em parafina (blocos de parafina), não houve qualquer risco de contaminação dos pesquisadores e técnicos envolvidos na pesquisa de modo que os riscos a que foram expostos são inerentes às atividades cotidianas realizadas no laboratório de Patologia como risco de corte a partir da utilização do micrótomo, estando assim dentro do padrão habitual. Os riscos são controlados e minimizados a partir de práticas de segurança previamente estabelecidas no laboratório. Os reagentes utilizados não ofereceram risco ambiental ou humano. Não houve utilização de materiais radioativos e/ou microorganismos patogênicos. Portanto, não houve exposição a riscos químicos, biológicos e radioativos

5. RESULTADOS

Os resultados referentes aos pacientes com LMC nas fases crônica, acelerada e crise blástica estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Perfil epidemiológico, clínico-evolutivo e morfológico dos pacientes com LMC.

	Grupos estudados			
	Fase crônica (n=20)		Fase acelerada (n=1)	Crise blástica (n=1)
	N	%	N	N
Dados epidemiológicos				
Sexo feminino	12	60	1	0
Sexo masculino	8	40	0	1
Idade acima de 60 anos	3	15	1	0
Padrão morfológico				
Celularidade global				
<i>Aumentada para a idade</i>	20	100	1	1
<i>Normal para a idade</i>	0	0	0	0
<i>Diminuída para a idade</i>	0	0	0	0
Retículo				
<i>Grau 1</i>	0	0	0	1
<i>Grau 2</i>	5	25	0	0
<i>Grau 3</i>	13	65	1	0
<i>Grau 4</i>	2	10	0	0
Subtipo				
Gran	3	15	0	1
Gran-Meg	15	75	1	0
Meg	2	10	0	0

Tratamento e prognóstico

Quimioterapia/Radioterapia	20	100	1	1
Sobrevida <5 anos	3	15	0	1
Óbito	4	20	1	1
Remissão com recidiva	0	0	0	0

Os resultados referentes ao grupo controle estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Perfil epidemiológico, clínico-evolutivo e morfológico dos pacientes do grupo controle.

	Controle (n=4)	
	N	%
Dados epidemiológicos		
Sexo feminino	1	25
Sexo masculino	3	75
Idade acima de 60 anos	2	50
Padrão morfológico		
Celularidade global		
<i>Aumentada para a idade</i>	0	0
<i>Normal para a idade</i>	4	100
<i>Diminuída para a idade</i>	0	0
Tratamento e prognóstico		
Quimioterapia/Radioterapia	0	0
Transplante de medula óssea	0	0
Óbito	2	50
Recidiva	0	0

Fase crônica

O perfil epidemiológico dos pacientes enquadrados nessa fase foi caracterizado com base na idade e sexo. Dos 20 pacientes, 12 (60%)

eram do sexo feminino e 8 (40%) pacientes do sexo masculino sendo 3 (15%) com idade superior a 60 anos.

O perfil clínico-evolutivo incluiu os seguintes itens: sinais e sintomas, comorbidades neoplásicas e não neoplásicas associadas, evolução para óbito, tempo de sobrevida e realização de quimioterapia. Os principais sinais e sintomas foram leucocitose, dor em hipocôndrio direito e esquerdo, fadiga, tontura, cefaleia, esplenomegalia, perda ponderal, anemia e sudorese noturna. As comorbidades não neoplásicas associadas foram malária, febre tifoide, nefrolitíase, síndrome do pânico, doença arterial coronariana, hipotireoidismo, transplante renal. Uma paciente foi diagnosticada durante a gestação. As comorbidades neoplásicas associadas foram carcinoma de tireoide, adenocarcinoma de cólon, sarcoma granulocítico, policitemia vera, adenocarcinoma de próstata e miomatose uterina.

Todos realizaram tratamento quimioterápico sendo que 4 pacientes evoluíram para óbito. O tempo de sobrevida de cada paciente foi: 13 anos e 8 meses; 3 anos e 6 meses; 10 meses e 2 meses. Logo, constata-se que 3 pacientes apresentaram sobrevida menor do que 5 anos. Os principais esquemas quimioterápicos envolveram associações dos seguintes medicamentos Hydrea, Interferon, Imatinib (Gleevec).

Em relação à classificação em subtipo Gran, Gran-Meg e Meg, 15 pacientes (75%) foram enquadrados como Gran-Meg, 3 (15%) como Gran e 2 (10%) como Meg.

Fase acelerada

O único paciente enquadrado nesse grupo é do sexo feminino, de 63 anos no momento do diagnóstico. Apresentava como comorbidade doença de Chagas nas formas cardíaca e esofágica. Evoluiu para óbito após 10 anos e 7 meses do diagnóstico, tendo feito ciclos de quimioterapia com Hydrea, Zyloric, Imatinib e Interferon. O subtipo de LMC foi Gran-Meg e apresentou retículo grau 3 difuso.

Crise blástica

O único paciente enquadrado nesse grupo é do sexo masculino, de 41 anos no momento do diagnóstico. Há relato no prontuário de paralisia do quinto e sétimo par de nervos cranianos com valor de desidrogenase láctica (DHL) superior a 3.000 U/L. Não apresentava comorbidades. Evoluiu para óbito após 2 anos e 2 meses após o diagnóstico. Foi realizada quimioterapia com Hydrea e Interferon. Apresentou retículo grau 1.

Os resultados referentes à análise morfológica e imuno-histoquímica dos pacientes nas 3 fases da LMC e grupo controle estão dispostos na Tabela 3.

Fase crônica:

Dentre os 20 casos de fase crônica da LMC, o estudo imuno-histoquímico revelou que houve expressão de CD44 em 18 casos (90% do total de casos), com predomínio de distribuição nos nichos 2 e 3 (94,4%), simultaneamente, e com maior percentual de marcação compreendendo o intervalo entre 1-10% (6 casos). Tanto a distribuição nos nichos 2 e 3 quanto a marcação compreendendo o intervalo entre 1-10% apresentaram significância estatística com valores de p de 0,004 e 0,042, respectivamente. O grupo controle, constituído por 4 casos, apresentou positividade de 100% apenas no nicho 3 com percentual de marcação compreendendo o intervalo entre 1-10%. Observa-se, portanto, aumento na expressão de CD44 no que concerne à distribuição dos nichos visto que o nicho 2 também apresentou expressão positiva. À semelhança do grupo controle, a maior parte das células apresentou baixa positividade de marcação, entretanto 5 casos apresentaram alta expressão, correspondendo ao intervalo 71-90%.

A expressão imuno-histoquímica de CD44 é observada a partir da positividade na membrana citoplasmática das células conforme demonstrado pela figura 10.

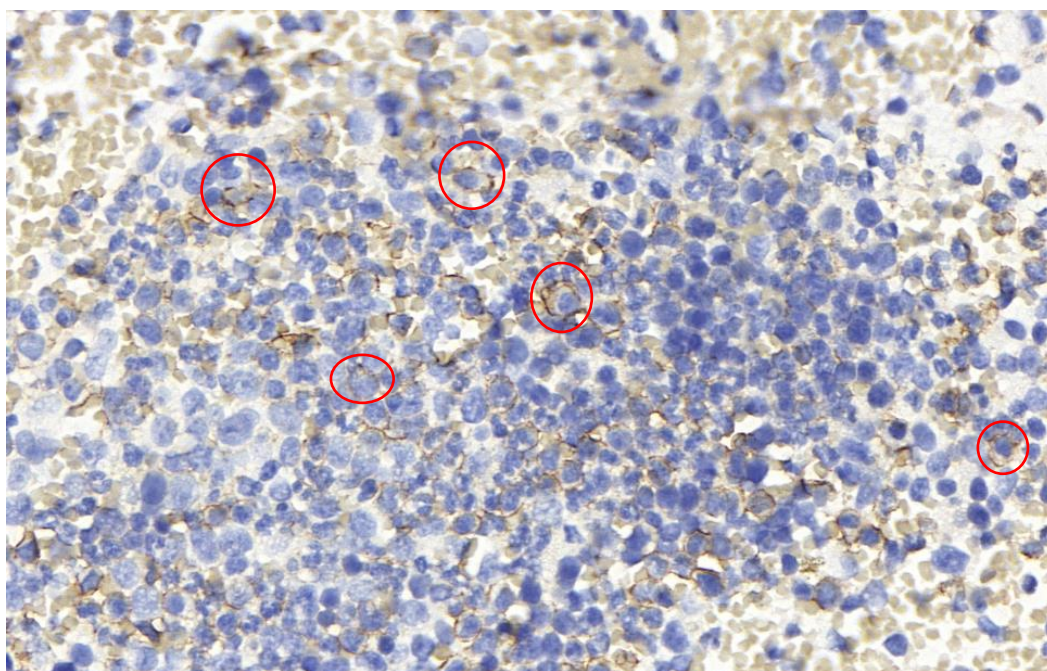


Figura 10 – CD44: positividade em membrana nos nichos 2 e 3 (40x).

Em relação à expressão de CD34, 9 casos foram positivos (45% do total de casos), com predomínio de distribuição apenas no nicho 3 (55,5%) sendo que 100% dos casos exibiram marcação no intervalo entre 1-10%. No grupo controle não houve expressão de CD34 em nenhum caso. Portanto, constata-se que na fase crônica da LMC há baixa expressão de CD34 com predomínio no nicho 3.

A expressão imuno-histoquímica de CD34 é observada a partir da positividade na membrana citoplasmática e citoplasma das células conforme demonstrado pela figura 11.

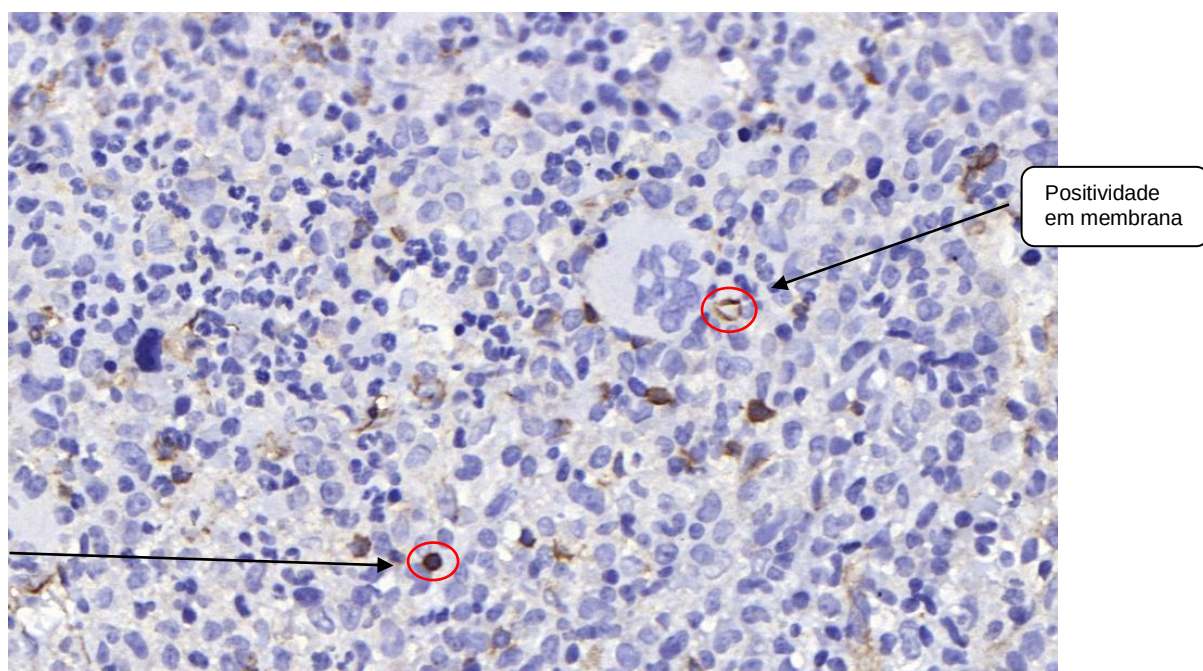


Figura 11 – CD34: positividade em membrana e citoplasmática no nicho 3 (40x).

Houve expressão de CD31 em 18 casos (90% do total de casos), com predomínio de distribuição nos nichos 2 e 3 (83,3%), simultaneamente, e com maior percentual de marcação compreendendo o intervalo entre 1-10% (6 casos). No grupo controle, os achados foram similares tendo em vista que 75% dos casos apresentaram baixa expressão de CD31 (1-10%) preferencialmente nos nichos 2 e 3. Portanto, observa-se pequeno aumento na quantidade de casos expressando CD31, porém com manutenção no percentual de marcação e distribuição nos nichos.

A expressão imuno-histoquímica de CD31 é observada a partir da positividade no citoplasma das células conforme demonstrado pela figura 12.

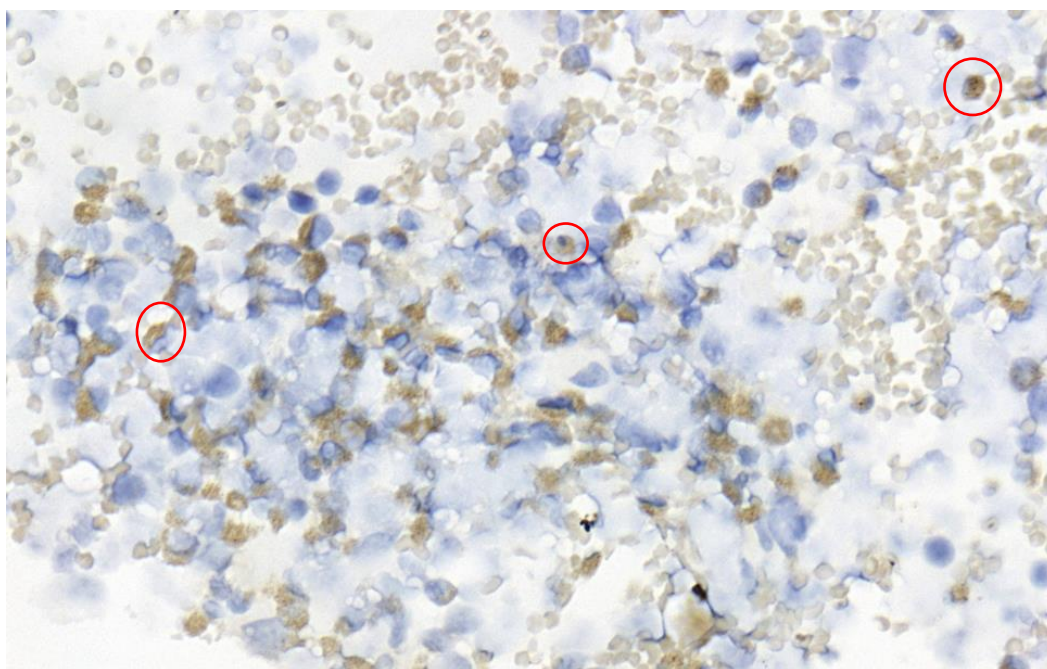


Figura 12 – CD31: positividade citoplasmática nos nichos 2 e 3 (40x)

Em relação à expressão de CD117, 9 casos foram positivos (45% do total de casos) com predomínio de distribuição nos nichos 2 e 3 (88,8%) com percentual de marcação envolvendo o intervalo entre 1-10%. No grupo controle apenas 1 caso (25%) apresentou baixa expressão nos nichos 2 e 3. Portanto, observa-se que na LMC há aumento na expressão de CD117, porém a expressão está presente nos nichos 2 e 3 assim como no grupo controle.

A expressão imuno-histoquímica de CD117 é observada a partir da positividade no citoplasma das células conforme demonstrado pela figura 13.

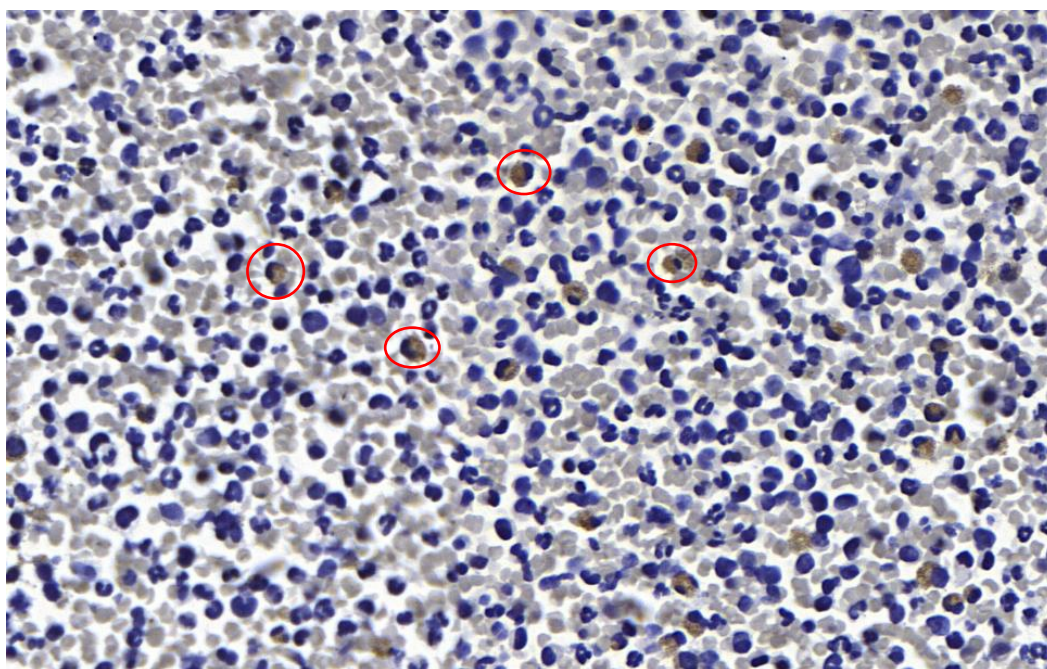


Figura 13 – CD117: positividade citoplasmática nos nichos 2 e 3 (40x).

Foi analisada tanto a expressão celular da galectina-3 quanto a expressão estromal e verificou-se que 17 casos (85%) revelaram expressão celular na faixa entre 11-30% preferencialmente nos nichos 2 e 3. No grupo controle, 3 casos (75%) apresentaram positividade com predomínio no intervalo entre 11-30% e preferencialmente nos nichos 2 e 3. Logo, constata-se discreto aumento na quantidade de casos com expressão celular de galectina-3 na mesma proporção (11-30%) e distribuição dos nichos (nichos 2 e 3) quando comparado ao grupo controle.

Em relação à expressão estromal de galectina-3, houve expressão em 9 casos (45%) com a maior parcela dos casos compreendendo o intervalo entre 1-10% e predomínio de distribuição nos nichos 2 e 3

(44,4%). No grupo controle, apenas 1 caso (25%) apresentou expressão somente no nicho 2. Portanto, na fase crônica da LMC há aumento na expressão estromal de galectina-3 com baixo percentual de marcação (1-10%) e positividade no nicho 2 (similarmente ao grupo controle), mas também com positividade no nicho 3.

A expressão imuno-histoquímica de galectina-3 é observada a partir da positividade no citoplasma das células e estroma conforme demonstrado pela figura 14.

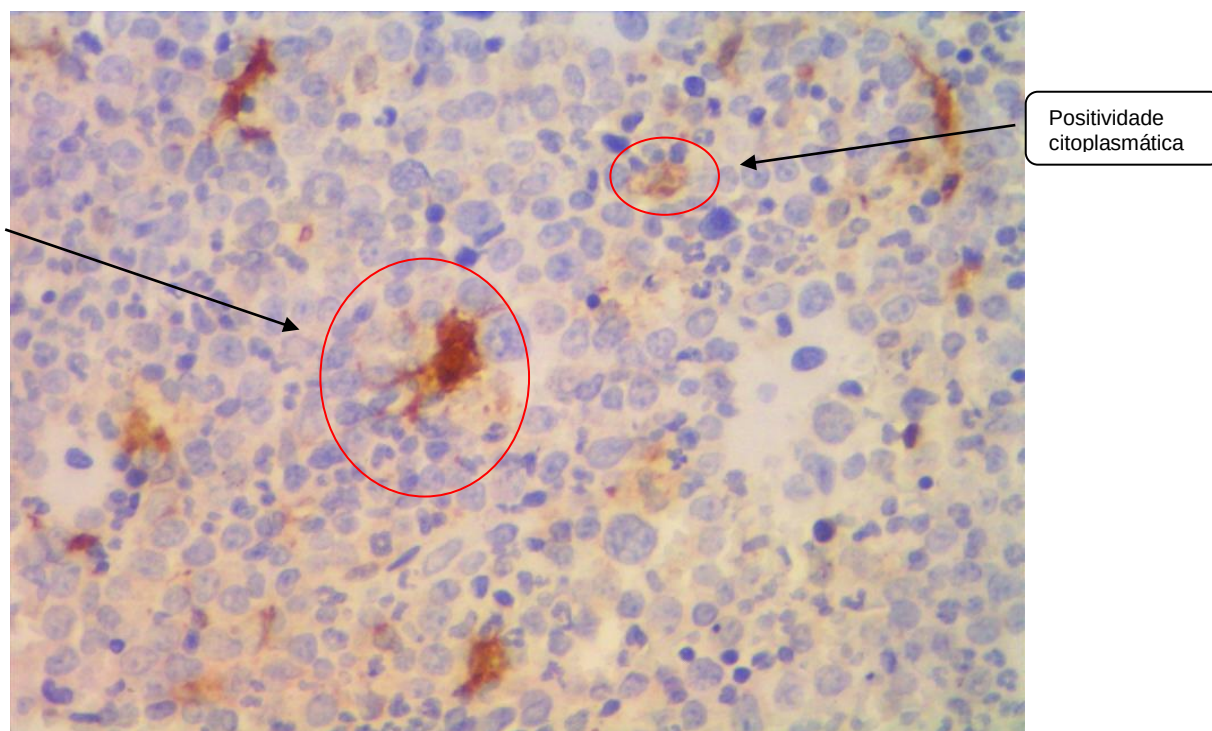


Figura 14 – Galectina-3: positividade citoplasmática e estromal nos nichos 2 e 3 (40x).

O arcabouço reticulínico, avaliado pela impregnação argêntica, foi graduado em uma escala de 1 a 4 de acordo com o sistema de Bauermeister em que o grau 1 corresponde à normalidade e o grau 4 à fibrose estromal. Nos graus 2 e 3 é observado espessamento colagênico

leve e moderado, respectivamente. O arcabouço reticulínico foi classificado como grau 3 em 13 casos (65% do total de casos). Apenas 2 casos (10%), apresentaram fibrose estromal (grau 4) e 5 casos (25%) foram classificados como grau 2. Todos os casos pertencentes ao grupo controle foram graduados como grau 1, correspondendo à normalidade.

As figuras 15-18 ilustram as graduações de 1 a 4 para o arcabouço reticulínico.

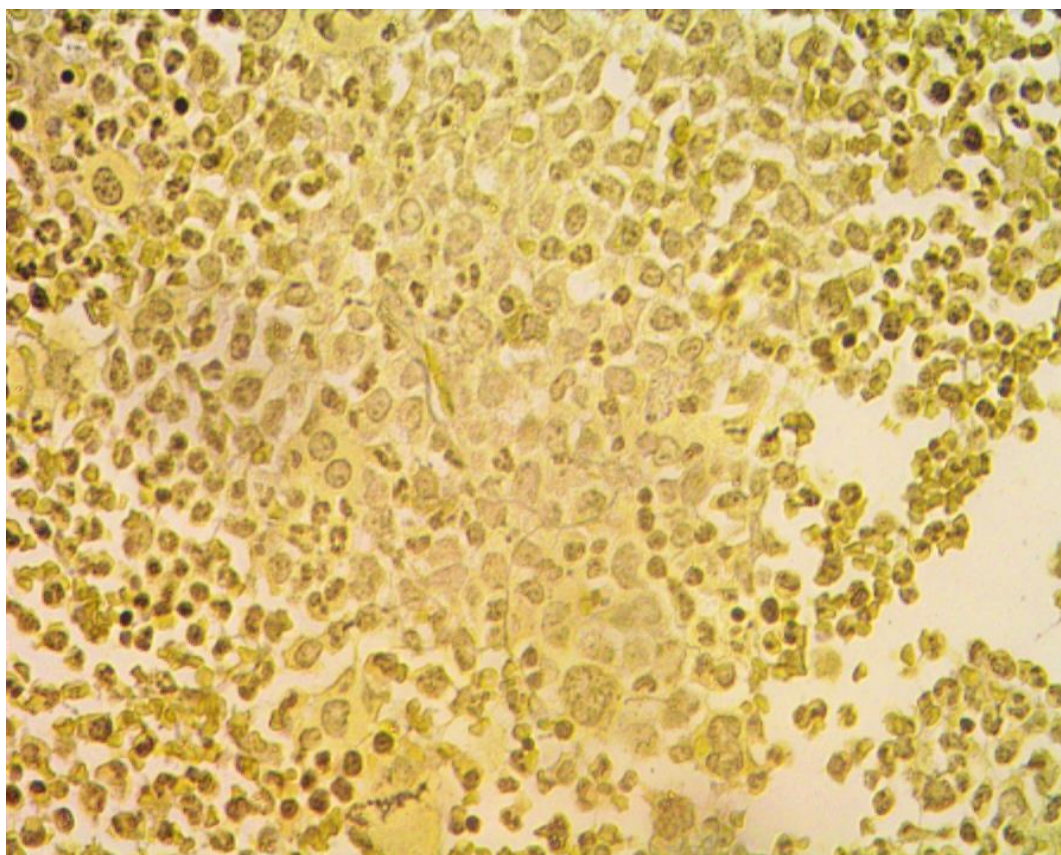


Figura 15: retículo grau 1: fibras reticulínicas lineares dispersas, correspondendo à medula óssea normal (Impregnação argêntica, 40x).

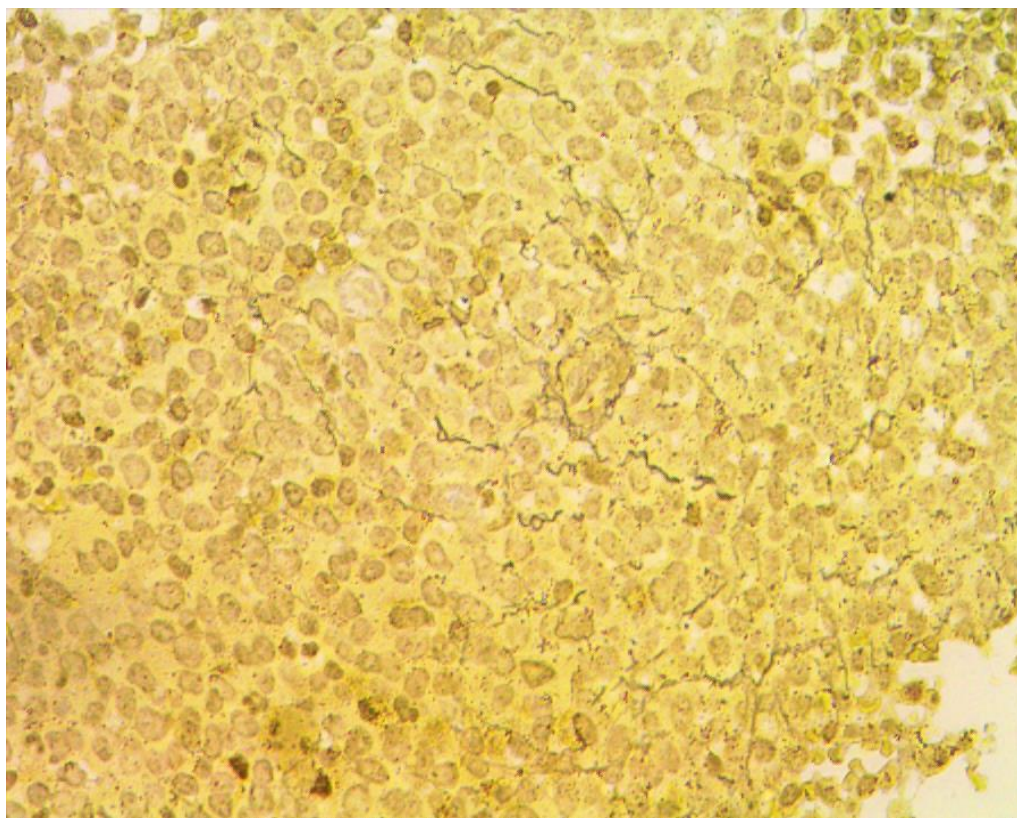


Figura 16: retículo grau 2: rede frouxa de fibras reticulínicas com intersecções (Impregnação argêntica, 40x).

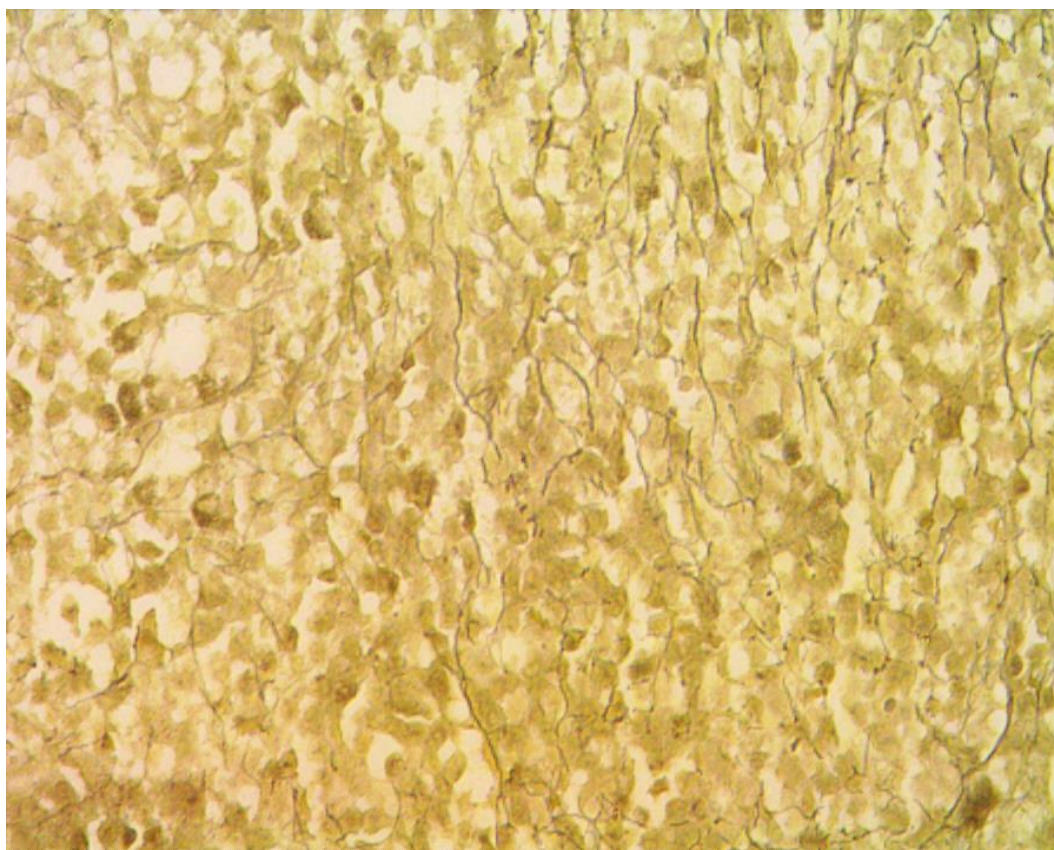


Figura 17: retículo grau 3: aumento denso e difuso de fibras reticulínicas com numerosas intersecções e fibras espessadas (Impregnação argêntica, 40x).

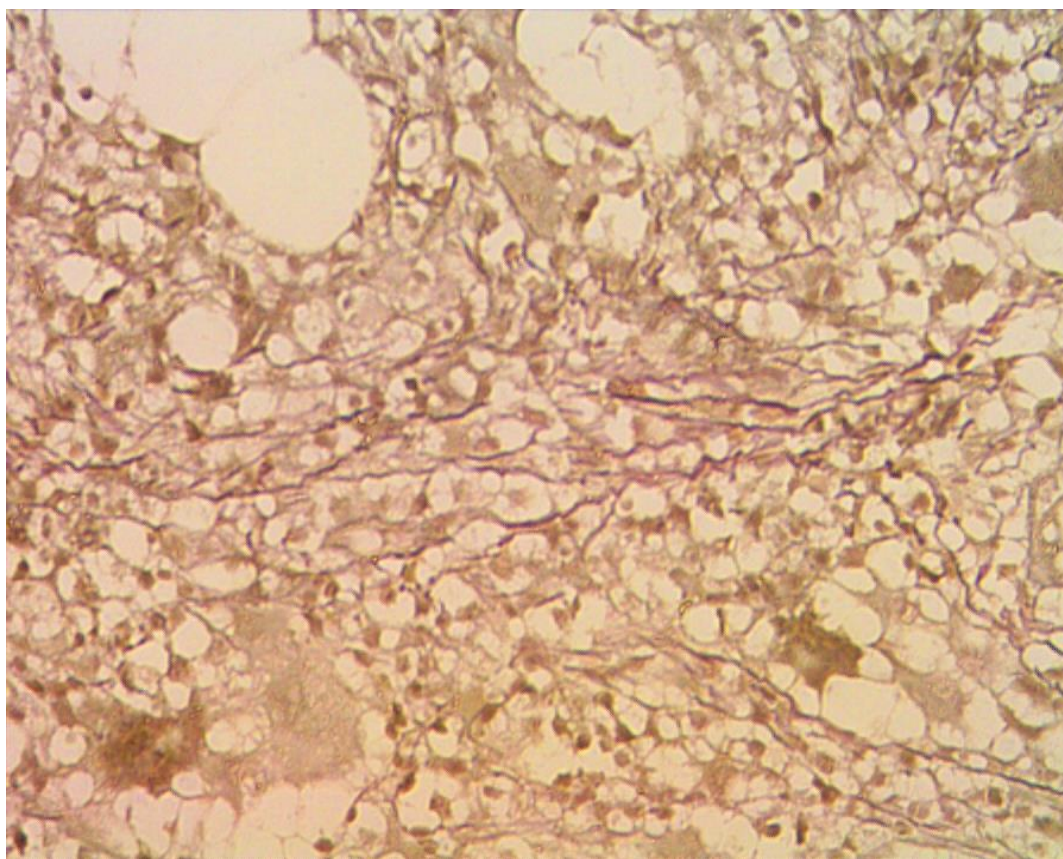


Figura 18: retículo grau 4: numerosas fibras reticulínicas espessadas com intersecções associadas à deposição de colágeno (Impregnação argêntica, 40x).

Fase acelerada

Em relação ao CD44, o único caso pertencente ao grupo apresentou expressão na faixa entre 1-10% nos nichos 2 e 3. Comparado ao grupo controle e fase crônica, verifica-se que semelhantemente à fase crônica, há baixa expressão de CD44 (1-10%) nos nichos 2 e 3, diferindo do grupo controle que também apresenta baixa expressão, porém somente no nicho 3.

Em relação aos marcadores CD34 e CD117 não foi verificada expressão. O achado pode ser decorrente do fato de o grupo ser

constituído por apenas um caso, limitando a representatividade do grupo, ou pela fixação da amostra ou ainda pelo fato de ocorrer perda de expressão pelo acúmulo de instabilidades genéticas observadas nessa fase.

Para CD31 houve baixa positividade (1-10%) nos nichos 2 e 3. Portanto, assim como no grupo controle e fase crônica há baixa expressão nos nichos 2 e 3.

Observou que houve expressão celular de galectina-3 nos nichos 2 e 3 em 31-50% do total de células. Comparando com o grupo controle e fase crônica, constata-se manutenção na distribuição dos nichos, porém com aumento na expressão.

Em relação à expressão estromal de galectina-3, verificou-se que houve positividade apenas no nicho 3 em 1-10% do total de células presentes. Similarmente ao grupo controle e fase crônica, há manutenção da baixa expressão, porém com alteração no nicho envolvido pelo fato de somente o nicho 3 apresentar positividade.

O arcabouço reticulínico foi classificado como grau 3.

Crise blástica

Em relação ao CD44, o único caso pertencente ao grupo apresentou expressão na faixa entre 51-70% nos nichos 2 e 3. Comparado ao grupo controle, fases crônica e acelerada, verifica-se que na crise blástica há

aumento no percentual de expressão sendo que a positividade é verificada nos nichos 2 e 3 assim como foi constatado nas fases crônica e acelerada. A quantidade de casos na fase crônica com expressão entre 51-70% pode indicar que talvez estivessem evoluindo para a fase acelerada e posteriormente crise blástica ou diretamente para crise blástica visto que nessa fase há aumento na expressão de CD44.

Não houve expressão de CD34 e CD31. A negatividade pode ser justificada pelas mesmas hipóteses levantadas para justificar a negatividade para CD34 e CD117 na fase acelerada.

Houve expressão de CD117 na faixa entre 11-30% nos nichos 2 e 3. Comparado ao grupo controle e fase crônica houve manutenção na positividade nos nichos 2 e 3, entretanto constata-se que na crise blástica há aumento no percentual de marcação (11-30%) em relação à fase crônica.

A expressão celular de galectina-3 foi observada nos nichos 2 e 3 em 11-30% do total de células. Houve, portanto, similaridade tanto na distribuição dos nichos quanto no percentual de marcação comparado com o controle e fase crônica, e redução no percentual de marcação comparado com a fase acelerada.

A expressão estromal de galectina-3 foi observada novamente apenas no nicho 3 em 1-10% do total de células presentes assim como na fase acelerada.

O arcabouço reticulínico foi classificado como grau 1.

6. DISCUSSÃO

As células malignas remodelam seu nicho em um microambiente anormal que fornece suporte preferencial para o seu desenvolvimento em detrimento da hematopoiese. A produção elevada de G-CSF (*Granulocyte-colony stimulating factor*) pelas células-tronco leucêmicas proporciona redução na expressão de CXCL12 pelas células estromais da medula óssea e aumento de citocinas pró-inflamatórias, incapacitando as células-tronco normais⁽⁵²⁾. As células-tronco leucêmicas se distribuem no nicho vascular e interferem na sinalização mediada por CXCL12 e E-selectina, que são importantes para o endereçamento das células-tronco normais no nicho⁽²¹⁾.

As células-tronco mesenquimais são estimuladas pelas células-tronco leucêmicas a adotarem um modelo de diferenciação anormal, resultando na produção de células osteoblásticas funcionalmente alteradas, que são incapazes de produzir substratos para as células-tronco normais ao passo que as células-tronco leucêmicas se mantêm viáveis nesse microambiente remodelado⁽²²⁾.

Esses osteoblastos anômalos se acumulam na cavidade medular e desempenham função mielofibrótica a partir da superexpressão de genes relacionados à mielofibrose e inflamação, contribuindo para a fibrose da medula óssea, frequentemente observada na LMC. Consequentemente, há comprometimento da vitalidade das células-tronco normais ao passo

que as células-tronco leucêmicas não são afetadas pelo nicho maligno fibrótico remodelado⁽⁵²⁾.

No presente trabalho, dois casos apresentaram fibrose reticulínica difusa caracterizada por um arcabouço reticulínico grau 4 e foram classificados na fase crônica como subtipo Gran-Meg, corroborando os dados da literatura que indicam que casos Gran-Meg evoluem para mielofibrose⁽¹⁷⁾. Na maioria dos outros casos, o arcabouço reticulínico foi graduado como 3, tornando evidente a alteração estromal presente nas fases crônica e acelerada da LMC em comparação ao microambiente medular normal. No entanto, no único caso de crise blástica, não foi observada alteração no arcabouço reticulínico e foi classificado como subtipo Gran, que apresenta propensão à evolução para crise blástica.

O ácido hialurônico e osteopoetina são particularmente abundantes no microambiente da medula óssea. A expressão de ácido hialurônico é concentrada ao redor de vasos sanguíneos na medula óssea sadia. As células-tronco mesenquimais expressam altos níveis de ácido hialurônico sintetase de modo que há formação de ácido hialurônico ao redor dessas células. Consequentemente, acredita-se que haja potencial para manutenção autócrina pela interação entre ácido hialurônico e CD44 nas células-tronco, permitindo a sua sobrevivência por adesão à matriz^(31,53).

Uma quantidade ainda maior de ácido hialurônico é observada no microambiente medular da LMC e LMA⁽⁵³⁾ sendo que a expressão de CD44 está aumentada na LMC⁽⁵⁴⁾. As células-tronco leucêmicas são mais

dependentes na ancoragem extracelular à matriz mediada por CD44 e selectinas do que as células-tronco normais⁽⁵⁵⁾, evidenciando a importância da interação entre as células-tronco leucêmicas com expressão de CD44 e a matriz extracelular.

O presente estudo evidenciou que existe expressão de CD44 no nicho 2 ao contrário do controle em que há expressão apenas no nicho 3. A positividade no nicho 2 pode ser explicada pela maior quantidade de ácido hialurônico expressa ao redor dos vasos na LMC. Consequentemente, a partir do remodelamento do nicho com aumento da interação entre CD44 e ácido hialurônico ao longo da progressão da LMC é observada expressão maior de CD44 na crise blástica, conforme exposto nesse estudo.

Recentemente, demonstrou-se que a expressão de CD44 nas células-tronco leucêmicas CD34+ é regulada a partir do gene AF1q e está relacionada com a progressão para as fases acelerada e crise blástica, e resistência ao Imatinib. A partir do bloqueio da ação gênica e o decréscimo na expressão de CD44, há aumento da sensibilidade ao Imatinib⁽⁵⁶⁾ de modo que CD44 pode representar um alvo terapêutico no tratamento da LMC. O bloqueio de CD44 *in vivo* impede a migração de células-tronco leucêmicas para o microambiente promotor de crescimento, erradicando-as⁽⁵⁷⁾.

A proteína CD117 desenvolve uma super ativação para se tornar oncogênica e ocasionar alterações em vias de sinalização, exacerbando a

proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação celular. O ganho de mutações funcionais é observado em diversas malignidades como leucemia mieloide aguda, tumor estromal gastrointestinal e melanoma⁽³⁷⁾. No presente estudo, a elevação na expressão de CD117 verificada na fase crônica e o aumento ainda maior observado na crise blástica pode ser decorrente da ativação do potencial oncogênico do gene, contribuindo desse modo para a persistência e progressão da LMC.

Houve aumento discreto na expressão de CD31 quando comparado ao grupo controle na fase crônica e um aumento ainda maior na fase acelerada, evidenciando elevação na expressão do marcador com a progressão da doença. Gallay et al. (2007) demonstraram que na LMA o excesso de CD31 promove egresso de células leucêmicas do compartimento medular a partir da migração transendotelial⁽⁵⁸⁾. Na LMC, pode-se supor que o CD31 desempenhe a mesma função pela elevação encontrada nas fases crônica e acelerada quando comparada ao grupo controle.

Houve aumento na expressão celular de galectina-3 na fase crônica quando comparado ao controle e aumento ainda maior na fase acelerada, corroborando o estudo de Yamamoto et al. (2011) que constatou que há superexpressão de galectina-3 nas células da LMC virgens de tratamento na fase crônica. A superexpressão é responsável pela promoção de proliferação celular e confere às células leucêmicas resistência a drogas conforme experimentos *in vitro*, sendo, portanto, um possível novo alvo

terapêutico⁽⁵⁹⁾.

Observou-se expressão estromal de galectina-3 no nicho 3 nas fases crônica, acelerada e crise blástica na mesma proporção assim como no controle, diferindo somente no fato de haver marcação no nicho 2 na fase crônica e controle. A galectina-3 extracelular é secretada por células normais do estroma e por células neoplásicas. É aceito que a maior adesão das células na matriz extracelular funcionaria como fator de proteção contra a apoptose e que a galectina-3 estaria envolvida neste processo^(59,60).

É bem conhecida a ligação da galectina-3 a integrinas, como $\alpha 1\beta 1$ integrinas, que vão intermediar a ligação da célula tumoral com a matriz extracelular. Isto vai depender da quantidade de galectina-3 extracelular: em baixos níveis a moderados, a adesão normal da célula tumoral à matriz extracelular dá-se, diretamente (matriz extracelular/galectina-3/célula tumoral) ou, indiretamente, por meio das integrinas (matriz extracelular/integrinas/galectina-3/célula tumoral). Quando ocorrem altos níveis de galectina-3 extracelular, a interação galectina-3/integrinas, principalmente da família VLA, encontra-se reduzida, assim como a ligação à célula tumoral e à matriz extracelular⁽⁶⁰⁾.

Na fase crônica foi observada expressão de CD34 entre 1-10%. Os achados estão de acordo com a definição de fase crônica de LMC de acordo com a WHO⁽²⁾, em que na fase crônica há até 10% de blastos. Entretanto, esperava-se que houvesse marcação superior a 10% de CD34

tanto na fase acelerada quanto na crise blástica. A negatividade pode ser justificada pela amostra reduzida constituída por apenas um caso em cada grupo; fixação inadequada, comprometendo a marcação do estudo imuno-histoquímico ou perda de expressão anômala, que pode ser decorrente do acúmulo de mutações genéticas adicionais, fenômeno observado nas fases de progressão da LMC de modo que a célula-tronco leucêmica se tornaria tão imatura e instável geneticamente a ponto de perder a expressão de CD34. No trabalho de Narang et al. (2016), foi realizado imunofenótipo de 15 casos de LMC na crise blástica e observou-se positividade para CD34 nos 14 casos de crise blástica de origem mieloide⁽⁶¹⁾. O único caso que revelou negatividade para CD34 era de origem linfóide B. Portanto, outra hipótese para justificar a negatividade do único caso de crise blástica para CD34 e por extensão o caso de fase acelerada é que ambos sejam de origem linfóide B.

Zhao et al. (2018) observaram que as células-tronco leucêmicas não expressam CD34 quando adquirem resistência *in vitro* ao Imatinib (Gleevec)⁽⁶²⁾. Em nosso estudo, os pacientes da fase acelerada e crise blástica foram tratados com Imatinib no esquema quimioterápico, podendo-se, portanto, supor que houve desenvolvimento de quimiorresistência, resultando na ausência de expressão de CD34 nas células neoplásicas.

Na fase crônica, 4 pacientes evoluíram para óbito. O paciente com menor tempo de sobrevida (óbito 2 meses após o diagnóstico),

apresentou expressão de CD44 nos nichos 2 e 3 em 80% das células e retículo grau 3 difuso. Os demais marcadores não exibiram diferenças em relação ao controle ou foram negativos.

Um paciente evoluiu para óbito após 3 anos e 6 meses do diagnóstico sendo que apresentava expressão de CD44 nos nichos 2 e 3 em 70% das células e expressão de CD31 nos nichos 2 e 3 em 40% do total de células. O retículo foi classificado como grau 3 focal. Os demais marcadores não exibiram diferenças em relação ao controle ou foram negativos.

O paciente que evoluiu para óbito após 10 meses do diagnóstico apresentou como achados relevantes expressão celular de galectina-3 nos nichos 2 e 3 em 40% das células e expressão de CD31 nos nichos 2 e 3 em 20% das células, ambos os percentuais são superiores quando comparados ao grupo controle e demais casos de fase crônica da LMC. O retículo foi classificado como grau 2 focal.

O paciente que evoluiu para óbito, porém com maior tempo de sobrevida (13 anos e 8 meses) não apresentou resultados relevantes comparados ao controle.

Logo, observa-se que a elevação de CD44 associada à expressão em ambos os nichos se correlaciona com pior prognóstico visto que metade dos casos com evolução para óbito exibiu aumento acentuado na expressão de CD44. Elevações de CD31 e galectina-3 também podem ser associadas com má evolução de modo que a elevação de galectina-3 no

nicho osteoblástico na LMC torna a interação célula-tronco leucêmica e matriz extracelular ineficaz permitindo que haja deslocamento das células-tronco leucêmicas para o nicho perivascular em que há altos níveis de CD31, facilitando a migração transendotelial por intermédio desse marcador e consequente acometimento do sangue periférico e desenvolvimento de crise blástica.

7. Conclusão

O presente trabalho revelou que há alteração no microambiente medular na fase crônica da LMC pelo aumento na expressão de todos os marcadores imuno-histoquímicos avaliados nos diferentes nichos. Essa alteração se propaga nas fases subsequentes a partir da constatação da expressão diferente do grupo controle. Entretanto, achados discordantes foram referentes às expressões de CD34 na fase acelerada e crise blástica; CD117 na fase acelerada e CD31 na crise blástica.

Observou-se que na crise blástica houve maior percentual de expressão de CD44 nos nichos osteoblástico e perivascular quando comparado às fases anteriores e que os casos com percentual de expressão elevado na fase crônica evoluíram com desfecho desfavorável de modo que metade dos casos com evolução para óbito apresentou aumento significativo na expressão de CD44. Os achados corroboram dados da literatura que indicam haver maior quantidade de células CD44+ na LMC, promovendo manutenção e evolução da doença. Logo, pode-se inferir que a alta expressão de CD44 principalmente no nicho perivascular se correlaciona com pior prognóstico e propensão à evolução para crise blástica.

A partir da constatação do aumento de expressão estromal de galectina-3 no nicho 3 nas fases acelerada e crise blástica, pode-se supor que haja mobilização das células-tronco leucêmicas no nicho

osteoblástico devido à interação ineficaz entre as células-tronco e galectina-3 em altos níveis, e subsequente deslocamento das células para o nicho perivascular em que há elevada expressão de CD31, possibilitando a migração transendotelial das células-tronco leucêmicas para a corrente sanguínea. Dessa forma, a expressão elevada de CD31 e galectina-3 pode ser o indício de evolução para crise blástica.

Observou-se aumento na expressão de CD117 na fase crônica e crise blástica quando comparado ao grupo controle, porém sem alteração na distribuição dos nichos de modo que o aumento na expressão pode estar relacionado à ativação do potencial oncogênico, contribuindo para a progressão da doença.

O aumento do arcabouço reticulínico, verificado em todos os casos de LMC nas fases crônica e acelerada, reflete a atividade mielofibrótica desenvolvida pelos nichos malignos remodelados.

Portanto, há na LMC alterações morfofuncionais decorrentes do remodelamento dos nichos a favor da manutenção e proliferação das células-tronco leucêmicas de modo que há um reflexo morfológico manifestado na fibrose estromal e aumento na expressão de marcadores de superfície celular presentes nas células neoplásicas. É importante o reconhecimento das alterações e correlação com os mecanismos fisiopatológicos para a elaboração de novos alvos terapêuticos, capazes de retardar a progressão da doença e promover aumento da sobrevida. Ressalta-se a importância do papel do patologista no algoritmo

diagnóstico da LMC por intermédio de análise imuno-histoquímica da medula óssea para avaliação dos nichos conforme demonstrado por esse trabalho e, conseqüentemente, do prognóstico.

REFERÊNCIAS

1. Mohamed A. Chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors: an evolving paradigm of molecularly targeted therapy. *Mol Diagn Ther.* 2016;20(4):315-33.
2. Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition). 4th ed. Lyon: IARC; 2017. p. 30-6.
3. Arrigoni E, Del Re M, Galimberti S, Restante G, Rofi E, Crucitta S, et al. Concise review: chronic myeloid leukemia: stem cell niche and response to pharmacologic treatment. *Stem Cells Transl Med.* 2018;7(3):305-314.
4. D' Antonio J. Chronic myelogenous leukemia. *Clin J Oncol Nurs.* 2005;9(5):535-8.
5. Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, Mahon FX, Janssen JJWM, Hjorth-Hansen H, et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol.* 2017;28(4):iv41-51.
6. Satller M, Griffin JD. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Semin Hematol.* 2003; 40(2 Suppl 2): 4-10.
7. Tabarestani S, Movafagh A. New developments in chronic myeloid leukemia: implications for therapy. *Int J Cancer Prev.* 2016;9(1):e3961.
8. Rousselot P. Diagnosis and treatment of chronic myelogenous leukemia. *Rev Prat.* 2005; 55(15):1647-57.
9. Hagemeijer A. Chromosome abnormalities in CML. *Baillieres Clin Haematol.* 1987;1(4):963-81.
10. Bennour A, Saad A, Sennana H. Chronic myeloid leukemia: relevance of cytogenetic and molecular assays. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;97:263-74.
11. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol.* 2018;93(3):442-59.
12. Silver RT. Chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2003;17(5):1159-73.

13. Correll PH, Paulson RF, Wei X. Molecular regulation of receptors tyrosine kinases in hematopoietic malignancies. *Gene*. 2006;374:26-38.
14. Wertheim JA, Perera SA, Hammer DA, Ren R, Boettiger D, Pear WS. Localization of BCR-ABL to F-actin regulates cell adhesion but does not attenuate CML development. *Blood*. 2003;102(6):2220-8.
15. Karbasian EM, Morris EL, Dutcher JP, Wiernick PH. Blastic phase of chronic myelogenous Leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2006;7(3):189:99.
16. Kumar H, Raj U, Gupta S, Tripathi R, Varadwaj PK. Systemic review on chronic myeloid leukemia: therapeutic targets, pathways and inhibitors. *J Nucl Med Radiat Ther*. 2015;6(6):257-63.
17. Lorand-Metze I, Vassalo J, Souza CA. Histological and cytological heterogeneity of bone marrow in Philadelphia-positive chronic myelogenous leukaemia at diagnosis. *Br J Haematol*. 1987;67(1):45-9.
18. Foucar K, Chabot-Richards D, Czuchlewski D, Karner K, Reichard K, Vasef M, et al. Diagnostic pathology: blood and bone marrow. 2th ed. Salt Lake City: Elsevier; 2017. p. 462-6.
19. Thiele J, Fischer R. Prognostic implications of bone marrow features in chronic myelogenous leukemia. *Virchows Archiv A Pathol Anat*. 1992;421(5):367-70.
20. Schmitt-Graeff AH, Nitschke R, Zeiser R. The Hematopoietic niche in myeloproliferative neoplasms. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:347270.
21. Schepers K, Pietras EM, Reynaud D, Flach J, Binnewies M, Garg T, et. Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell*. 2013;13(3):285-99.
22. Asada N, Katayama Y. Regulation of hematopoiesis in endosteal microenvironments. *Int J Hematol*. 2014;99(6):679-84.
23. Aristizábal JA, Chandia M, Cañizo MC, Sánchez-Guijo F. Microambiente medular en la leucemia mieloide crónica: su relación con la enfermedad y la respuesta al tratamiento. *Rev Med Chile*. 2014;142(5):599-605.
24. Seshadri M, Qu CK. Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells and its implications in leukemogenesis. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(4):339-45.

25. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505(7483):327-34.
26. Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol*. 2013;35(1):32-37.
27. Ehninger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med*. 2011;208(3):421-8.
28. Lassailly F, Foster K, Lopez-Onieva L, Currie E, Bonnet D. Multi-modal imaging reveals structural and functional heterogeneity in different bone marrow compartments: functional implications on hematopoietic stem cells. *Blood*. 2013;122(10):1730-40.
29. Raynaud CM, Butler JM, Halabi NM, Ahmad FS, Ahmed B, Raffii S, et al. Endothelial cells provide a niche for placental hematopoietic stem/progenitor cell expansion through broad transcriptomic modification. *Stem Cell Res*. 2013;11(3):1074-90.
30. Attar A. Changes in the cell surface markers during normal hematopoiesis: a guide to cell isolation. *G J Hematol Blood Trans*. 2014;1(1):20-8.
31. Krause DS, Scadden DT. A hostel for the hostile: the bone marrow niche in hematologic neoplasms. *Haematologica*. 2015;100(11):1376-87.
32. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(8):2506-19.
33. Yu XF, Han ZC. Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Histol Histopathol*. 2006;21(5):519-31.
34. Klein G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia*. 1995;51(9-10):914-26.
35. Maia V, Ortiz-Rivero S, Sanz M, Gutierrez-Berzal J. C3G forms complexes with bcr-abl and p38alpha MAPK at the focal adhesions in chronic myeloid leukemia cells: Implication in the regulation of leukemic cell adhesion. *Cell Commun Signal*. 2013;11(1):9-25.
36. Baumann CI, Bailey AS, Li W, Ferkowicz MJ, Yoder MC, Fleming WH. PECAM-1 is expressed on hematopoietic stem cells throughout on-

- togeny and identifies a population of erythroid progenitors. *Blood*. 2004;104(4):1010-6.
37. Foster BM, Zaidi D, Young TR, Mobley ME, Kerr BA. CD117/c-kit in cancer stem cell-mediated progression and therapeutic resistance. *Biomedicines*. 2018;6(1):31-50.
 38. Carvalho JM, Souza MK, Buccheri V, Rubens CV, Kerbau J, Oliveira JSR. CD34-positive cells and their subpopulations characterized by flow cytometry analyses on the bone marrow of healthy allogenic donors. *Sao Paulo Med J*. 2009;127(1):12-8.
 39. Cha CH, Park CJ, Chi HS, Seo EJ, Jang S, Cho YU, et al. CD34 and p53 Immunohistochemical Stains Differentiate Hypocellular Myelodysplastic Syndrome (hMDS) from Aplastic Anemia and a CD34 Immunohistochemical Stain Provides Useful Survival Information for hMDS. *Ann Lab Med*. 2014;34(6):426-32.
 40. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 2014;32(6):1380-9.
 41. Kim H, Cho HJ, Kim SW, Liu B, Choi YJ, Lee J, et al. CD31+ cells represent highly angiogenic and vasculogenic cells in bone marrow: novel role of nonendothelial CD31+ cells in neovascularization and their therapeutic effects on ischemic vascular disease. *Circ Res*. 2010;107(5):602-14.
 42. Marelli-Berg FM, Clement M, Mauro C, Caligiuri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 11):2343-52.
 43. Ross EA, Freeman S, Zhao Y, Dhanjal TS, Ross EJ, Lax S, et al. A novel role for PECAM-1 (CD31) in regulating haematopoietic progenitor cell compartmentalization between the peripheral blood and bone marrow. *PLoS One*. 2008;3(6):e2338.
 44. Singh R, Thirupathi P, Zöller M. The Contribution of hematopoietic stem/progenitor cell and bone marrow stroma cell Cd44v6 and Cd4v7 to hematopoiesis. *J Stem Cell Res Ther*. 2015;5(7):295-310.
 45. Krause DS, Spitzer T, Stowell C. The concentration of CD44 is increased in hematopoietic stem cell grafts of patients with acute myeloid leukemia, plasma cell myeloma, and non-Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134:1033-8.

46. Shin JY, Hu W, Naramura M, Park CY. High c-Kit expression identifies hematopoietic stem cells with impaired self-renewal and megakaryocytic bias. *J Exp Med*. 2014;211(2):217-31.
47. Nilsson SK, Debatis ME, Dooner MS, Madri JA, Quesenberry PJ, Becker PS. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(3):371-7.
48. Ruvolo PP. Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(3):427-37.
49. Oliveira FL, Santos SN, Ricon L, Costa TP, Pereira JX, Brand C, et al. Lack of galectin-3 modifies differentially Notch ligands in bone marrow and spleen stromal cells interfering with B cell differentiation. *Sci Rep*. 2018;8:3495. doi:10.1038/s41598-018-21409-7.
50. Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*. 2005;10(2):267-75.
51. Hu K, Gu Y, Lou L, Liu L, Hu Y, Wang B, et al. Galectin-3 mediates bone marrow microenvironment-induced drug resistance in acute leukemia cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Hematol Oncol*. 2015;8:1-10. doi: 10.1186/s13045-014-0099-8.
52. Sánchez-Aguilera A, Méndez-Ferrer S. The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(4):579-90.
53. Morath I, Hartmann TN, Orian-Rousseau V. CD44: more than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;81(Pt A):166-73.
54. Chang G, Zhang H, Wang J, Zhang Y, Xu H, Wang C, et al. CD44 targets Wnt/ β -catenin pathway to mediate the proliferation of K562 cells. *Cancer Cell Int*. 2013;13(1):117-29.
55. Chen Y, Li S. Molecular signature of chronic myeloid leukemia stem cells. *Biomark Res*. 2013;1(1):21.
56. Li W, Ji M, Lu F, Pang Y, Dong X, Zhang J, et al. Novel AF1q/MLLT11 favorably affects imatinib resistance and cell survival in chronic myeloid leukemia. *Cell Death Dis*. 2018;9(9):855-79.
57. Riether C, Schürch CM, Ochsenbein AF. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death Differ*. 2015;22(2):187-98.

58. Gallay N, Anani L, Lopez A, Colombat P, Binet C, Domenech J, et al. The role of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) and CD38 antigens in marrow microenvironmental retention of acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.* 2007;67(18):8624-32.
59. Yamamoto-Sugitani M, Kuroda J, Ashihara E, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, et al. Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(42):17468-73.
60. Van den Brûle F, Califice S, Castronovo V. Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J.* 2002;19(7-9):537-42.
61. Narang V, Sachdeva MUS, Bose P, Varma N, Malhotra P, Varma S. Immunophenotyping in chronic myeloid leukemia blast crisis: looking beyond morphology. *J Postgrad Med Edu Res.* 2016;50(4):181-4.
62. Zhao Y, Wu K, Wu Y, Melendez E, Smbatyan G, Massiello D, et al. Characterization of imatinib resistant CML leukemic stem/initiating cells and their sensitivity to CBP/Catenin antagonists. *Curr Mol Pharmacol.* 2018;11(2):113-21.