



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

Bruna Pagnin Augusto

**Análise dos nichos nas doenças primárias,
secundárias e reacionais da medula óssea**

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues
Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Claudino Oliveira

**Botucatu
2019**

Bruna Pagnin Augusto

Análise dos nichos nas doenças primárias,
secundárias e reacionais da medula óssea

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues
Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Claudino Oliveira

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Augusto, Bruna Pagnin.

Análise dos nichos nas doenças primárias, secundárias e reacionais da medula óssea / Bruna Pagnin Augusto. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Aparecida Custódio Domingues

Coorientador: Cristiano Claudino Oliveira

Capes: 40105008

1. Medula óssea. 2. Células-tronco hematopoéticas. 3. Microambiente celular. 4. Imuno-histoquímica.

Palavras-chave: célula tronco hematopoética; imuno-histoquímica; medula óssea; microambiente.

Dedicatória

Dedico esta dissertação:
Aos meus pais, que sempre me apoiaram
incondicionalmente;
À minha irmã, como um incentivo para adentrar o
maravilhoso mundo da investigação científica;
Aos pacientes com doenças
hematológicas, que as informações que constam desta pesquisa sirvam
para auxiliar o melhor entendimento e indiquem os caminhos para aliviar
a dor e o sofrimento por eles afligidos.

Agradecimentos

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço muito a Deus, ao meu guia espiritual e a todos os espíritos de luz que sempre me acompanham, e sempre me ajudam a enxergar luz onde há escuridão.

Aos meus pais, por me acalmarem nos momentos de ansiedade e me ajudarem a seguir em frente; e a toda a minha família, que sempre me incentivou nos estudos, sempre acreditou em mim, e sempre se orgulhou muito de mim com cada conquista. Toda essa luta é por vocês.

À Lais Zimback, minha psicóloga, que me ajudou a enxergar através do medo, me fez entender que ele deve ser o que me incentiva à novas buscas, e não o que me bloqueia.

À Cristina, biomédica do setor de hematologia, que me deu aulas particulares sobre Imunologia e Hematologia, e que foram fundamentais para as descobertas desta pesquisa.

Também quero agradecer imensamente a cada pessoa do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por todo o apoio e pelas oportunidades. Muito obrigada Marcos Franchi, Fernando Franchi, Francismarie Faria, Edison Martins, Daniela Barbosa, Carlos Ramos, Luciano Donini, Roberto Costa, Claudinei Figueira, Rita de Cássia de Moraes, Dr. Marcelo Padovani e Dra. Maria Luiza de Oliveira, vocês foram essenciais para que esse projeto virasse realidade.

Aos médicos residentes da patologia, pela amizade e por sempre me ajudarem com as dúvidas que surgiram pelo caminho.

À Amanda, por me ensinar a confecção do TMA. E também ao Dr. João Lauro Viana, por ceder o equipamento e local para a realização destes.

Ao Pedro Casagrande, aluno do quinto ano da graduação médica, que foi importantíssimo ao revisar os prontuários dos pacientes incluídos na casuística, me ajudando sempre que solicitado.

À Dra. Bárbara e toda equipe do Hemocentro, que ajudou com a disponibilização dos prontuários e arquivos dos pacientes.

Ao Dr. Cristiano, meu coorientador, que me ensinou importantes questões burocráticas da pesquisa e por sempre ser tão paciente e prestativo.

À Dra. Maria, minha orientadora, pessoa com uma aura maravilhosa, cheia de boas vibrações e que sempre foi muito atenciosa. Agradeço muito por ter me aceitado como aluna, por desde o começo sempre ser muito paciente em me ensinar tudo sobre medula óssea, e ser a responsável pelo meu amor por esse mundo da patologia, principalmente da hemopatologia.

Aos nossos pacientes, muitos já falecidos, mas que tornaram esse estudo possível, e que nos incentivam a sempre estudar mais, investigar, descobrir e promover uma boa saúde e qualidade de vida a todos.

Epígrafe

***“E guardemos a certeza pelas próprias dificuldades já superadas que
não há mal que dure para sempre.”
Chico Xavier***

Resumo

Resumo

Introdução: A medula óssea é o órgão responsável pela hematopoiese, fenômeno que se relaciona com a diferenciação da célula tronco hemopoética (CTH) em eritrócitos, granulócitos, monócitos, linfócitos e plaquetas. É constituída pelo tecido hematopoiético, tecido gorduroso, matriz proteica e sinusoidais e está contida no interior dos ossos esponjosos, em contato com o tecido ósseo cortical e trabecular. Em 1978, Ray Schofield conceituou *nicho* como local específico, dentro da medula óssea, onde a 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 neoplásica. Estudos demonstram que os nichos e seus componentes celulares e proteicos, influenciam e determinam a manutenção de CTH ativas e quiescentes, sendo determinante na manutenção, progressão e recaída de doenças da medula óssea. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar na medula óssea humana, acometida por doenças primárias, secundárias e reacionais, o comportamento da CTH, descrevendo localização e quantificação destas. **Material e métodos:** Para realização deste estudo, foram selecionados quatro grupos de doenças hematológicas, divididas em mieloma múltiplo (n= 10), leucemia linfóide crônica (n= 10), síndrome mielodisplásica (n= 10) e reacional (n= 10). Foi realizado um estudo imuno-histoquímico para avaliação da marcação e dos nichos dos marcadores CD44, CD34, CD31 e CD117. **Resultados:** O marcador CD44, molécula de adesão importante na manutenção de CTH e nicho de células tumorais, foi encontrado em maior quantidade durante o estudo, e principalmente no nicho 2. Também foi possível observar que em neoplasias hematológicas, existe uma marcação positiva no nicho 3, sugerindo assim, uma ativação e migração das CTH para outros microambientes. **Conclusão:** De todos os marcadores estudados, o CD44 é o que teve maior importância e impacto no funcionamento das CTH, sugerindo que este possa ser considerado um marcador para estudar a biologia das CTH.

Palavras-chaves: medula óssea; célula tronco hematopoética; microambiente; imuno-histoquímica.



Abstract

Abstract

Introduction: Bone marrow is the organ responsible for hematopoiesis, a phenomenon that is related to the differentiation of hemopoietic stem cell (HSC) into erythrocytes, granulocytes, monocytes, lymphocytes and platelets. It consists of hematopoietic tissue, fatty tissue, protein and sinusoidal matrix and is contained within the spongy bones, in contact with the cortical and trabecular bone tissue. In 1978, Ray Schofield conceptualized a niche as a specific site within the bone marrow, where the HSC originated, settled, and proliferated. It is now known that the niche is more than a simple morphological compartment, but a functional and dynamic site, which remodels and influences the function of HSC and its progenitors, playing a definitive role in normal and neoplastic HSC. Studies demonstrate that niches and their cellular and protein components influence and determine the maintenance of active and quiescent HSC, being determinant in the maintenance, progression and relapse of diseases of the bone marrow. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the behavior of HSC in the human bone marrow, affected by primary, secondary and reactional diseases, describing their location and quantification. **Materials and methods:** Four groups of hematological diseases were selected, divided into multiple myeloma (n = 10), chronic lymphocytic leukemia (n = 10), myelodysplastic syndrome (n = 10) and reactional (n = 10). An immunohistochemical study was performed to evaluate the marking and niches of the CD44, CD34, CD31 and CD117 markers. **Results:** The CD44 marker, an important adhesion molecule in the maintenance of CTH and tumor cell niche, was found in greater quantity during the study, and especially in the niche 2. It was also possible to observe that in hematological malignancies, there is a positive marking in the niche 3, thus suggesting an activation and migration of the HTC to other microenvironments. **Conclusion:** Of all the markers studied, CD44 is the one that had the greatest importance and impact on the functioning of HTCs, suggesting that it could be considered a marker to study the biology of HTCs.

Keywords: bone marrow; hematopoietic stem cell; microenvironment; immunohistochemistry.

Lista de ilustrações

Lista de ilustrações

Figura 1 – Distribuição e funcionamento dos nichos na medula óssea normal.

Figura 2 – Distribuição dos grupos.

Figura 3 – Aspecto morfológico e análise imuno-histoquímica do grupo com Leucemia Linfocítica Crônica.

Figura 4 – Aspecto morfológico e análise imuno-histoquímica do grupo com Mieloma Múltiplo em comparação com o controle.

Lista de tabelas

Lista de tabelas

Tabela 1 – Descrição dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Tabela 2 – Perfil epidemiológico, clínico-evolutivo e morfológico dos pacientes com medula óssea neoplásica, reacional e controle (N_i).

Tabela 3 – Perfil epidemiológico, clínico-evolutivo e morfológico dos pacientes com medula óssea neoplásica, reacional e controle (N_i) dos casos de TMA.

Tabela 4 – Perfil clínico-evolutivo dos grupos estudados

Tabela 5 – Perfil epidemiológico, clínico-evolutivo e morfológico dos pacientes com medula óssea neoplásica, reacional e controle (N_i) dos casos de biópsia óssea de MO.

Tabela 6 – Resultados do estudo imuno-histoquímico no grupo controle (BMO e Coágulo).

Tabela 7 – Resultados do estudo imuno-histoquímico no grupo com LLC (BMO e Coágulo/TMA).

Tabela 8 – Resultados do estudo imuno-histoquímico no grupo com MM (BMO e Coágulo/TMA).

Tabela 9 – Resultados do estudo imuno-histoquímico no grupo com SMD (BMO e Coágulo/TMA).

Tabela 10 – Resultados do estudo imuno-histoquímico no grupo com MOR (BMO e Coágulo/TMA).

Tabela 11 – Análise estatística.

Lista de abreviaturas

Lista de abreviaturas

BMO: Biópsia de Médula Óssea
CAR: Células Reticulares associadas à Citocina CXCR12
CD44s: CD44 padrão
CD44v: CD44 variante
CTH: Célula-tronco Hematopoética
FNT: Fibronectina
G-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
GMSI: Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado
HA: Hialuronano
IRA: Insuficiência Renal Aguda
LES: Lúpus Eritomatoso Sistêmico
LLC: Leucemia Linfocítica Crônica
LMA: Leucemia Mieloide aguda
LMC: Leucemia Mieloide Crônica
LNH: Linfoma não-Hodgkin
MM: Mieloma Múltiplo
MO: Medula Óssea
MOR: Medula Óssea Reacional
NK: Células Natural Killer
NOB: Nicho Osteoblástico
NPN: Nicho Peri-neural
NPV: Nicho Peri-vascular
NV: Nicho Vascular
SMD: Síndrome Mielodisplásica
TMA: Tissue Microarray
TN-C: Tenascina
UNIPLEX: Unidade de Pesquisa Experimental

Sumário

Sumário

Introdução	18
Mieloma múltiplo	23
Leucemia linfocítica crônica	25
Síndrome mielodisplásica	26
Justificativa	28
Objetivos	29
Material e métodos	30
Resultados	40
Discussão	55
Conclusão	63
Referências bibliográficas	64

Introdução

A medula óssea (MO) é o órgão mais extenso dos mamíferos, sendo o local da hematopoiese e de diferenciação de células imunes, responsável por produzir eritrócitos, granulócitos, monócitos, linfócitos e plaquetas. Localiza-se na cavidade medular dos ossos esponjosos e consiste em aglomerados de tecido hematopoiéticos e células adiposas, cercados por seios vasculares ⁽¹⁾.

A hematopoiese é sustentada por células-tronco hematopoéticas (CTH), com capacidade de autorrenovação e diferenciação. Tais características são específicas e diferem as CTH de outras células dos mamíferos ^(1,2). São reguladas e mantidas por um microambiente complexo, organizado em compartimentos denominados de “nicho”. Ray Schofield, em 1978 ⁽³⁾, conceituou *nicho* como local específico, dentro da medula óssea, onde a 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 neoplásica ^(2, 4, 5). São compostos por grande quantidade de fatores humorais e celulares, proteínas de matriz, por exemplo, fibronectina e ácido hialurônico, e fatores de sinalização que regulam a diferenciação e multiplicação das CTH. Os estudos e o reconhecimento dos nichos na medula óssea só foram possíveis graças

aos avanços técnicos de análise de imagem do interior da medula óssea, bem como uma série de elegantes estudos em modelos murinos ^(2,6).

O primeiro nicho a ser descrito foi o “nicho endosteal ou osteoblástico” associado à região peritrabecular e região subcortical do tecido ósseo que contem o tecido hemopoietico; posteriormente foi descrito o “nicho vascular” junto aos vasos sinusoidais ^(7,8).

O nicho osteoblástico (NOB), tem como principal componente celular os osteoblastos, responsáveis pela formação óssea. Estes se dispõem na superfície de contato com a matriz óssea e o tecido hemopoietico ^(4,8). Já foram objetos de vários estudos, e revisado em um artigo de Seshadri e Qu (2016) ^(8,9), que definiram a relação entre a presença de osteoblastos e número de CTH: em ratos a ativação dos receptores de PTH/PTHrP, com consequente aumento do número de osteoblastos leva a um aumento do número de CTH; a deleção do gene Dicer I, expresso somente em progenitores osteogênicos afeta diretamente a hemopoiese ⁽⁸⁾. A osteopontina e a trombopoietina, proteínas associadas aos osteoclastos, relacionadas à adesão da CTH na superfície óssea, estão relacionadas com a manutenção da CTH quiescente. No NOB observam-se macrófagos que expressam receptor de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), que quando hiperexpressos suprimem a osteocalcina e CXCL-12 que irá mobilizar os osteoblastos e as CTHs ^(1,4,8).

O nicho vascular (NV) está localizado no interior da medula óssea,

próximo aos sinusóides. Estes representam o leito vascular da medula óssea. São compostos por células endoteliais fenestradas, cujo fenótipo e aspectos morfológicos são distintos de outros endotélios. O endotélio dos sinusóides da medula óssea é fenestrado, com membrana basal fina e escassos pericitos de sustentação ⁽²⁾.

É referido que parte do nicho vascular, denominado nicho peri vascular (NPV), contem células mesenquimais com funções específicas de regulação da CTH e sua diferenciação linfóide e eritróide ⁽⁶⁾. Tais células são denominadas: CAR (células reticulares associadas à citocina CXC-12) e células mesenquimais Nestina⁺. As primeiras expressam VCAM-1, CD44, receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRA e PDGFRB) e possui capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica ^(8,10). As células CAR exercem suas funções através da secreção de SCF e CXCL12 no micro ambiente da medula óssea e, há indícios, que regulem a diferenciação de CTH quiescentes. As células mesenquimais Nestina⁺ podem se diferenciar em osteoblastos; quando depletadas pela toxina botulínica ou pela Tamoxifen levando a diminuição de CTH imaturas, e consequente anemia por falência da medula óssea ^(8,10).

Outro nicho citado na literatura é o peri neural (NPN), localizado junto as células de Schwann não mielinizadas, distribuídas na região peri vascular, responsáveis por ativar o TGF- β , que por sua vez regula a ativação de CTH ^(1,6,8).

A matriz proteica extracelular do estroma da medula óssea (MEC) também é considerada um nicho. Nela encontram-se as proteínas: tenascina (TN-C), colágeno tipo I e IV e fibronectina (FNT). A TN-C está localizada ao longo do nicho periosteal, sendo responsável pela diferenciação e proliferação hematopoiética. Durante a manutenção da hematopoiese, as células CAR produzem grande quantidade de TN-C, que se relaciona com a produção de nicho específico para células tronco neoplásicas ^(8,10). Este fato está sendo estudado na Leucemia Mielóide Crônica (LMC), onde o aumento da TN-C se correlaciona com a progressão da doença ⁽⁷⁾. Nosso grupo evidenciou este mesmo fato com a FIBN e progressão da fase crônica para crise blástica em LMC. Em carcinomas indiferenciados de nasofaringe, nosso grupo também publicou a importância desta proteína de matriz como indicadora de pior prognóstico ⁽¹¹⁾.

Fazendo uma analogia, os nichos funcionam como estações e subestações funcionais interligadas por *cabos* (fatores de crescimento, interleucinas, proteínas de matriz) que informam e ajustam a diferenciação da CTH para compor o sangue com elementos figurados, conforme as necessidades do organismo. A CTH também pode deixar o nicho específico, ao receber sinais de mobilização, e entram na corrente sanguínea para assegurar a vigilância imunológica nos tecidos periféricos e sítios distantes. Assim, CTH depende criticamente do curto e longo alcance instrutivo provindos dos nichos do interior da medula óssea para

muitos aspectos da sua biologia, incluindo a manutenção do ciclo celular, e regulação da dinâmica das fases de quiescência/proliferação e ancoragem/mobilização ^(12,13).

As informações sobre a importância dos nichos na medula óssea murina tem aventado muitas teorias nas doenças primárias da medula óssea humana. Há hipóteses que descrevem, nas neoplasias malignas crônicas primárias da medula óssea (Leucemia Mieloide Crônica, Leucemia Linfocítica Crônica e Síndrome Mielodisplásica), danos acumulados no DNA, levando a um escape clonal, e acúmulo de células neoplásicas, associadas a mutações das células estromais ⁽¹⁰⁾.

Em murinos e em humanos as CTH primitivas CD34+ estão localizadas junto as células estromais perivasculares CXCL12 e CD31+ e as CTH com certo grau de diferenciação CD45+ e CD34+ estão junto a região periosteal. Aventa-se que o caráter focal de acometimento de determinadas infiltrações neoplásicas na medula óssea e recaídas precoces de leucemias tenham relação com os nichos e suas sinalizações. Nos murinos, as leucemias e síndrome mielodisplásica, os nichos da medula óssea estão destruídos ⁽¹⁴⁾. Nos humanos, em biopsia de medula óssea, usa-se este critério morfológico para o diagnóstico destas doenças, porém sem uma explicação biológica para tal.

A importância de se estabelecer a localização das CTH e seus nichos, e a relação destas nas doenças primárias, secundárias e reacionais da medula óssea é indubitável, vindo a responder e abrindo

caminhos para melhor interpretação da patogenia e diagnóstico morfológico destas doenças.

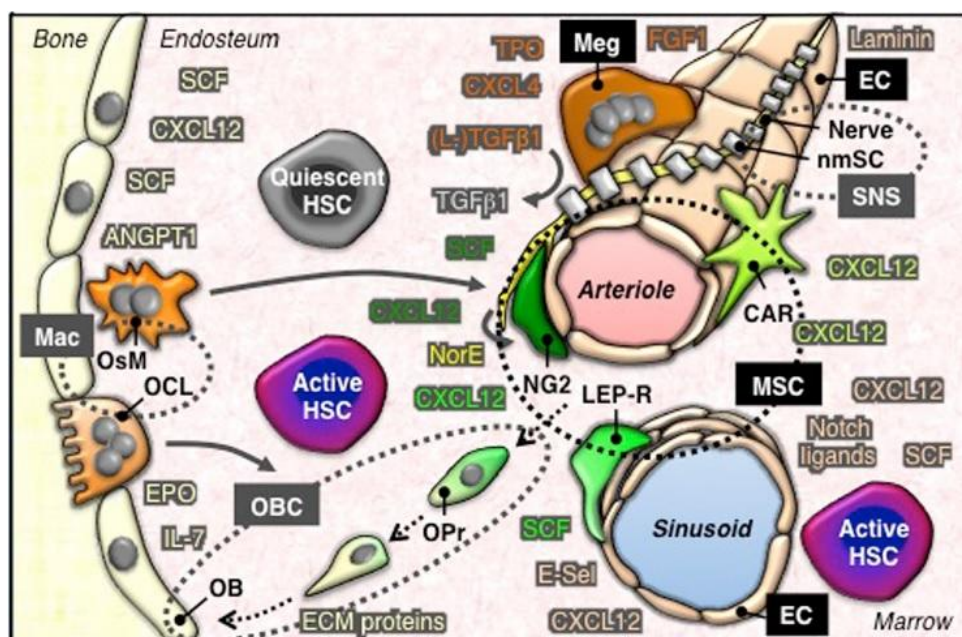


Figura 1 – Imagem retirada do artigo de Schepers et.al (2015) ⁽¹³⁾, ilustrando a distribuição e composição dos nichos descritos.

Mieloma Múltiplo

Mieloma múltiplo (MM), é uma neoplasia maligna fatal, que representa cerca de 13% de todos os cânceres hematológicos ⁽¹⁵⁾, acometendo principalmente idosos acima de 65 anos ⁽¹⁶⁾, mais homens do que mulheres, e mais negros do que brancos ⁽¹⁷⁾. O MM afeta as células B e caracteriza-se por uma proliferação de plasmócitos neoplásicos, produzindo proteínas M e podendo causar insuficiência renal, anemia e principalmente fraturas ósseas ⁽¹⁸⁾.

A doença pode ser iniciada como uma Gamopatia Monoclonal de

Significado Indeterminado (GMSI), evoluindo para um mieloma latente (assintomático), até chegar ao mieloma múltiplo propriamente dito, que é a fase sintomática, resultando em infiltração na MO e principalmente lesões ósseas ⁽¹⁶⁾.

Sabe-se que os osteoblastos são responsáveis pela formação óssea, e os osteoclastos pela lise e absorção óssea, e no MM, o equilíbrio entre essas células é distorcido para uma direção de perda óssea líquida. Esse desequilíbrio leva a um processo chamado de ciclo vicioso, onde a lise óssea osteoclástica induzida pelo MM, libera fatores de crescimento presentes no osso e promovem o crescimento do tumor, que por isso, estimula ainda mais a atividade dos osteoclastos ⁽¹⁶⁾.

Segundo Wennekens e colaboradores (2018), 20% dos pacientes com MM podem ter insuficiência renal aguda (IRA), e metade deles, podem necessitar de diálise, e a IRA pode ser agravada por várias circunstâncias como, desidratação, hipercalcemia, hiperuricemia, hiperviscosidade sanguínea, uso de drogas nefrotóxicas, etc. A causa da IRA primária no MM se explica pela alteração tubular proximal e distal, por dano celular devido as cadeias leves filtradas, amiloidose, doenças por depósitos de cadeias pesadas, crioglobulinemia, infiltração intersticial por células do MM. O envolvimento renal agudo ou crônico piora o prognóstico do paciente, e é geralmente a segunda causa de morte no MM.

Infecções são mais uma das principais complicações associadas ao MM e são também, uma causa importante para morbidades e a

principal causa de mortalidade desses pacientes. Pacientes acometidos pelo MM apresentam uma imunodeficiência relacionada à disfunção de células B (hipogamaglobulinemia), anormalidades de células T, células dendríticas e células natural killer (NK) ⁽¹⁹⁾.

Leucemia Linfocítica Crônica

A Leucemia Linfóide Crônica (LLC), é a leucemia mais comum nos adultos, sendo responsável por 25% das leucemias adultas e 25% dos Linfomas Não-Hodgkin, e acomete principalmente, os adultos mais velhos, com uma mediana de idade de 71 anos, e a incidência mais comum é em pessoas com história familiar de LLC, pessoas caucasianas e exposição ao agente laranja ^(20, 21). A evolução clínica dos pacientes com LLC, pode ser bem distinta uma da outra, onde alguns podem ter uma progressão bem rápida, com constantes recaídas após o tratamento, e outros com uma doença mais controlada, mesmo sem tratamento ⁽²¹⁾.

Trata-se de uma doença caracterizada por um acúmulo progressivo de linfócitos, que são morfologicamente bem parecidos com linfócitos maduros normais. Acredita-se que os linfócitos da LLC não se proliferam rapidamente, mas se acumulem no interior da medula óssea, ocupando o tecido hemopoiético normal. As características clínicas da doença, são, na maioria dos casos, linfocitose assintomática do sangue periférico ou leucocitose (menos comum), linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, falência da MO, infecções recorrentes, devido à

linfocitose, e ainda podem aparecer anemia hemolítica autoimune ou trombocitopenia autoimune ⁽²⁰⁾.

Nos pacientes com LLC, principalmente entre os idosos, as infecções são a principal causa de morbidade e mortalidade, por isso, recomenda-se que logo no momento do diagnóstico, que é quando ainda existe uma resposta imunológica residual, esses pacientes recebam vacinas contra *Streptococcus pneumoniae* e gripe, e evitem as vacinas atenuadas ⁽²¹⁾.

Outra consequência comum é que esses pacientes são mais suscetíveis a adquirirem neoplasias secundárias principalmente as de pele. Raramente, a LLC pode se transformar em Linfoma Difuso de Grandes Células B e Linfoma de Hodgkin, por isso, a patogênese molecular da LLC no microambiente do tecido linfoide é de extrema importância no crescimento e sobrevida dessas células neoplásicas ^(20, 21).

Síndrome Mielodisplásica

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são desordens clonais representadas por uma hematopoese ineficaz, com proliferação, diferenciação e apoptose defeituosas, citopenias periféricas, e pode ser chamada de fase pré-leucêmica, pois existe uma grande chance de evolução para uma Leucemia Mielóide Aguda (LMA) ^(22, 23). A patogênese da SMD ainda não é muito clara, e por isso, sem tratamentos específicos, além do transplante de MO ⁽²²⁾. Uma característica bem estabelecida, são

aberrações cromossômicas (-5 / del (5q), - 7 / del (7q), del (11q), del (12p) / (12q), -y e +8) e diferenciação do clone maligno, o que resulta em uma alta taxa de formação de blastos e insuficiência da medula óssea. Além das aberrações cromossômicas, certas alterações resultam de um microambiente anormal na medula óssea ^(22, 23).

Justificativa

O presente estudo faz-se importante frente aos novos conhecimentos sobre nichos da medula óssea e a relação destes com CTH ativas ou quiescentes. O esclarecimento de como a CTH se comporta em doenças primárias e secundárias à MO, neoplásicas e não neoplásicas, sua localização, número e relação com os nichos periosteal e perivascular, contribuirá com estudos prévios em murinos, que aventam hipóteses de alteração primária dos nichos e seus componentes nas leucemias agudas. O estudo atual irá avaliar, em biopsias de medula óssea humana, acometidas por doenças primárias, secundárias e reacionais, o comportamento da CTH, descrevendo localização e quantificação destas com os nichos periosteal e peri endotelial. É um estudo inédito que contribuirá com a patogenia, aspectos morfológicos e provável prognóstico destas doenças.

Objetivos

Objetivo Geral

- Analisar a quantidade e a distribuição de células tronco hematopoiéticas em diferentes doenças primárias e secundárias à medula óssea.

Objetivos Específicos

- Descrever na Leucemia Linfocítica Crônica, a quantidade e a distribuição de células tronco hematopoiéticas, e correlacionar com o prognóstico;
- Descrever no Mieloma Múltiplo, a quantidade e a distribuição de células tronco hematopoiéticas e correlacionar com carga e prognóstico;
- Descrever na Síndrome Mielodisplásica, a quantidade e a distribuição de células tronco hematopoiéticas e correlacionar com a evolução clínica;
- Descrever na Medula Óssea Reacional, a quantidade e distribuição de células tronco hematopoiéticas, e correlacionar com a gravidade dos casos.

Materiais e métodos

1. Casuística

Seleção dos casos: Foram selecionados 45 casos clínicos oriundos do Serviço de Patologia do Hospital da Clinicas da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, de pacientes de cidades do interior do estado de São Paulo, cujos laudos anatomopatológicos apontavam os diagnósticos de: Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), Mieloma Múltiplo (MM), Síndrome Melodisplásica (SMD) e Medula Óssea Reacional (MOR), entre os anos de 2007 a 2017, e tais doenças foram escolhidas por serem as neoplasias mais comuns atendidas no serviço, e por tanto, com maior número de amostras. Destes, selecionou-se 40 lâminas e blocos de parafina, representados por coágulo de aspirado de medula óssea (CAM); em oito casos foram selecionadas as biopsias de medula óssea (BMO), correspondentes a oito coágulos de aspirado, cujo os fragmentos ósseos eram representativos da doença, totalizando 48 amostras.

Grupo controle: Foram selecionados cinco casos clínicos oriundos do Serviço de Patologia do Hospital da Clinicas da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, cujos laudos anatomopatológicos apontavam os diagnósticos de: “medula óssea normocelular para a idade e ausência de neoplasia”. Destes casos foram separados lâminas e blocos de parafina, correspondentes ao coágulo do aspirado de medula óssea e/ou biopsia de

medula óssea, sendo que em um caso o fragmento ósseo correspondia ao coágulo selecionado, totalizando seis amostras.

2. Critérios de Inclusão:

Foram selecionadas amostras de medula óssea fixadas e incluídas em parafina, representativas das doenças a serem estudadas. Considerou-se amostra representativa quando o coágulo do aspirado de medula óssea, continha três espículas grandes ou cinco pequenas e, no fragmento de biópsia de medula óssea, mais de três espaços intertrabeculares.

Amostra deveria ser referente à primeira coleta para o diagnóstico, sem tratamento prévio.

3. Critérios de Exclusão:

Foram excluídas amostras pouco representativas, com artefatos de processamento e/ou coleta.

4. Preparo prévio das amostras:

4.1. Coágulo de Medula Óssea

Os coágulos de aspirados de medula óssea foram recebidos em formalina tamponada a 10%, no interior de recipiente com tampa, identificado (nome completo, registro hospitalar, data de nascimento), em volume igual ou maior que 10 vezes ao da amostra. Após fixação, de no

mínimo 6 horas, o coágulo era seccionado em finas fatias, transferidas para um cassete identificado (número da biópsia), e processado em um processador de tecidos (TP1020, Leica Instruments GmbH, Germany), onde era desidratado, com a passagem de variados álcoois absolutos, seguido de banhos em xilol e impregnado em parafina, “overnigth”. Após esse período o fragmento foi retirado do cassete, incluído em parafina líquida a 60°C, e seccionado em cortes de 4 *micras*. Estes foram corados em Hematoxilina Eosina, coloração de Perls e impregnação argêntica, de acordo com protocolo de coloração do Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

4.2. Biópsia de Medula Óssea (fragmento ósseo)

Os fragmentos ósseos, oriundos do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, produto da retirada de biópsia de crista ilíaca pósterio-superior, realizada com agulha de Jamshidit, foram recebidos em formalina tamponada a 10% em recipiente identificado (nome completo, registro hospitalar, data de nascimento), com tampa, em volume igual ou maior que 10 vezes o volume da amostra, medindo cerca de 1,5 cm. Após a fixação, de no mínimo 12 horas, a formalina tamponada foi desprezada e adicionado descalcificador (EDTA ácido acético 0,5%) pelo período de 8 horas. A amostra foi lavada em álcool absoluto por duas horas em seguida

transferida para um cassete identificado (nome e número da amostra), e processada em um processador de tecidos (TP1020, Leica Instruments GmbH, Germany), onde era desidratado, com a passagem de variados álcoois absolutos, seguido de banhos no xilol e impregnado em parafina, “overnight”. Após esse período o fragmento era retirado do cassete, incluído em parafina líquida a 60°C, e seccionado em cortes de 4 µm. Estes foram corados em Hematoxilina-Eosina, coloração de Perls e impregnação argêntica, de acordo com protocolo de coloração do Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

A escolha pelo método de descalcificação, com EDTA- ácido acético se justifica por ser um método de reação lenta, com melhor preservação dos epítomos antigênicos, garantindo uma análise imuno-histoquímica mais eficiente.

5. Construção Tissue Microarray (TMA):

Foram selecionadas 40 lâminas e blocos de parafina, contendo os coágulos dos aspirados de medula óssea, assim distribuídos: 10 casos de LLC, 10 casos de SMD e 10 casos de medula óssea reacional. Lâminas e blocos foram demarcados em áreas específicas. Foi elaborado um mapa, com a sequência dos números das biópsias e localização no bloco de parafina receptor. Utilizou-se dois fragmentos de placenta como indicadores do início e final da sequência mapeada. A confecção do TMA

foi realizada no Laboratório de Pesquisa Toxicológica, pertencente ao Departamento de Patologia, localizado na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX), da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp. Utilizou-se o equipamento manual Veridiam Semi Automated Tissue Arrayer (VTA-100). A partir da retirada de um fragmento cilíndrico, com 0,2 cm de diâmetro, do bloco de parafina doador organizou-se, no bloco receptor, o arranjo de tecidos, compondo uma plataforma de fragmentos com as 40 amostras representadas. Foram seccionados cortes com 3 µm de espessura, depositados em lâminas silanizadas, uma delas coradas em Hematoxilina-Eosina e as demais preparadas para o estudo imuno-histoquímico.

6. Estudo Imuno-histoquímico:

Para o estudo imuno-histoquímico utilizou os anticorpos primários descritos na Tabela 01:

Tabela 1 – Descrição dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Anticorpo Primário	Clone	Diluição	Empresa	Método	Localização
CD34	QBEnd-	1:100	Dako	Dako	Membrana
Classe II	10			Auto	
Monoclonal				stainer	
CD31	m0823	1:100	Dako	Dako	Membrana

Monoclonal				Auto stainer	
CD117, c- Kit Policlonal	A4502	1:200	Dako	Dako Auto stainer	Membrana e/ou Citoplasma
CD44 Monoclonal	DF1485	1:100	Dako	Dako Auto stainer	Membrana e/ou Citoplasma

O estudo imuno-histoquímico foi realizado em quatro lâminas, contendo secções da plataforma de TMA, cinco lâminas (casos controle) com tecidos inteiros representados e em oito casos contendo fragmentos ósseos de biópsias de medula óssea. Os cortes foram seccionados na espessura de 3µm e depositados 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 e aplicado 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 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 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, lavagem por 5 minutos. Os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Meyer e as lâminas foram montadas com resina e rotuladas.

Utilizou-se o procedimento padrão, abstraindo-se os anticorpos primários, para se realizar o controle negativo da reação.

7. Leitura das Lâminas:

A leitura das lâminas foi realizada por uma hemopatologista (MACD), do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp, acompanhada da aluna desse estudo, autora deste estudo.

7.1. Escore utilizado para a leitura do Estudo imuno-histoquímico:

A leitura foi realizada em microscópio óptico, biocular (Nikon) de dupla observação e através do analisador de imagem Scanner 3DHistotec. Usou-se uma escala semi-quantitativa, com os critérios, assim definidos:

- Localização das células marcadas pela reação de IMH: nicho 1 (subosteal); nicho 2 (peritrabecular); nicho 3 (peri-endotelial e intertrabecular).
- Marcação para o anticorpo primário estudado: para cada anticorpo estudado, nas lâminas de TMA, BMO (fragmento inteiro) e coagulo de aspirado de medula óssea (fragmento inteiro) descreveu-se a positividade da marcação.
- Porcentagem das células marcadas pela reação de IMH: fez-se uma análise semi-quantitativa, analisando-se a porcentagem de células marcadas nos nichos descritos anteriormente.

7.2 Análise Morfológica:

Dos laudos anatomopatológicos foram retiradas as informações morfológicas listadas a baixo:

- Celularidade global; relação G:E; descrição das séries eritróide, granulocítica, megacariocítica e linfoplasmacítica; grau do

arcabouço reticulínico (Grau 0-IV) ; análise semi-quantitativa dos depósitos de hemossiderina (1+ a 6+); distribuição da celularidade (peritrabecular, subcortical, intertarbacular); quantificação da gordura estromal e espessura da trabécula óssea.

8. Obtenção de dados clínicos

As informações clínicas (idade, sexo, sintomas constitucionais, marcadores laboratoriais/ bioquímicos, tempo de evolução para progressão de doença após tratamento, lesões de órgãos-alvo, comorbidades associadas, estadiamento clínico, terapêutica indicada, evolução clínica, sobrevida em cinco anos e óbito) foram obtidas a partir de revisão dos prontuários médicos e laudos anatomopatológicos.

9. Desenho do Estudo

É um estudo do tipo transversal e retrospectivo, com grupo controle.

10. Metodologia estatística:

A análise estatística, bem como a escolha pelos testes de comparação foram executadas respeitando os pressupostos determinados pelos resultados, características e comportamento das variáveis de estudo. Foi realizado teste de proporção, a fim de comparar as marcações obtidas pelo estudo IMH. Calculou-se as frequências e percentuais para cada grupo. O programa utilizado para realização dos testes foi o R.

v.3.3.3.

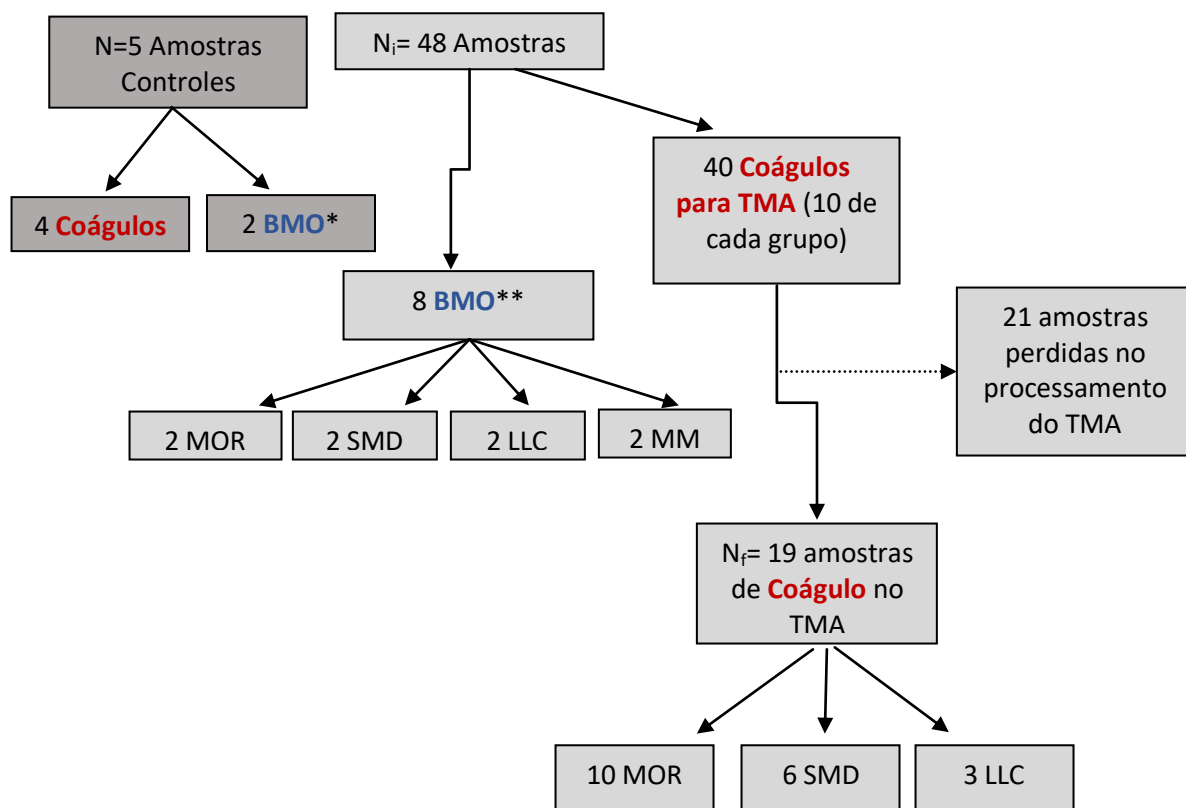
11. Comitê de Ética em Pesquisa

O presente estudo foi submetido ao comitê de ética em pesquisa da faculdade, e aprovado com o CAAE 66707517.3.0000.5411.

Resultados

Dos 40 casos clínicos (correspondendo a 48 amostras) incluídas no estudo, foram analisados dados clínicos e perfil epidemiológico (Tabela 2). Na leitura das amostras do TMA, observou-se que 21 cores descolaram: 10 do grupo de MM, 7 do grupo LLC e 4 do grupo SMD, resultando em 19 cores. A casuística efetivamente estudada, com dados clínicos, morfológicos e estudo IMH, foi: MM (n=0 no TMA e n=2 BMO), LLC (n=3 no TMA e n=2 BMO), SMD (n=6 no TMA e n=2 BMO), MOR (n=10 no TMA e n=2 BMO) e mais um grupo controle com coágulos n=4 e BMO com n=2. A Figura 1 apresenta a distribuição das amostras iniciais e as amostras finais analisadas. Na Tabela 2 observa-se o perfil epidemiológico, dados clínicos e morfologia da MO dos pacientes, cujos coágulos de aspirado de medula óssea estavam contidos inicialmente no TMA. A Tabela 3 demonstra os mesmos dados relativos ao n final (n_f) contido no TMA somados aos resultados dos pacientes, cuja análise foi realizada nas BMO.

Figura 2 – Distribuição dos grupos.



* Uma amostra de biópsia de medula óssea corresponde a um coágulo.

** Duas amostras de biópsia de medula óssea, correspondem a dois coágulos do TMA (tanto no grupo SMD, quanto no grupo MOR)

Tabela 2 – Perfil epidemiológico, clínico-evolutivo e morfológico dos pacientes com medula óssea neoplásica, reacional e controle (N_i).

	Grupos estudados				
	MM (n=10)	LLC (n=10)	SMD (n=10)	MOR (n=10)	Controle (n=5)
	n	N	n	n	n
Dados epidemiológicos					
Sexo feminino	5/10	2/10	2/10	4/10	2/5
Sexo masculino	5/10	8/10	8/10	6/10	3/5
Idade acima de 60 anos	7/10	8/10	8/10	5/10	3/5
Padrão morfológico					
Celularidade global					
<i>Aumentada para a idade</i>	5/10	8/10	9/10	9/10	0/5
<i>Normal para a idade</i>	3/10	0/10	0/10	0/10	5/5
<i>Diminuída para a idade</i>	2/10	1/10	0/10	1/10	0/5
Tratamento e prognóstico					
Quimioterapia/Radioterapia	7/10	5/10	9/10	0/10	3/5
Transplante de medula óssea	1/10	0/10	0/10	0/10	0/5
Óbito	8/10	5/10	7/10	1/10	2/5
Remissão com recidiva	0/10	0/10	0/10	0/10	0/5

No grupo controle, há três pacientes que fizeram tratamento com quimioterapia, pois esses pacientes foram diagnosticados com LNH, porém sem infiltração neoplásica na MO (por isso, puderam ser incluídos no estudo). Existem também, dois pacientes que foram a óbito, sendo um deles, um dos pacientes com LNH, e o outro foi a óbito devido um câncer de pulmão não tratado.

Para o grupo controle, selecionamos 5 pacientes para serem

estudados, que resultaram em 6 amostras divididas em 4 amostras para coágulo e 2 amostras para BMO. Um das amostras de coágulo não continha material suficiente para a análise, por isso foi descartada. Uma das amostras de BMO corresponde a um coágulo.

Tabela 3 – Perfil epidemiológico, clínico-evolutivo e morfológico dos pacientes com medula óssea neoplásica, reacional e controle (N_i) dos casos de TMA.

	Grupos estudados TMA			
	LLC (n=3)	SMD (n=6)	MOR (n=10)	Controle (n=4)
	n	n	n	n
Dados epidemiológicos				
Sexo feminino	1/3	1/6	4/10	1/4
Sexo masculino	2/3	5/6	6/10	3/4
Idade acima de 60 anos	3/3	5/6	5/10	3/4
Padrão morfológico				
Celularidade global				
<i>Aumentada para a idade</i>	1/3	6/6	9/10	0/4
<i>Normal para a idade</i>	0/3	0/6	0/10	5/4
<i>Diminuída para a idade</i>	2/3	0/6	1/10	0/4
Tratamento e prognóstico				
Quimioterapia/Radioterapia	2/3	5/6	0/10	3/4
Transplante de medula óssea	0/3	0/6	0/10	0/4
Óbito	2/3	4/6	1/10	2/4
Remissão com recidiva	1/3	0/6	0/10	0/4

Como dito, a Tabela 2 representa o perfil epidemiológico, clínico-evolutivo e morfológico do n inicial; a tabela 3 demonstra os mesmos

dados, mas do n final; e na tabela 5, estão descritos os mesmos dados, porém apenas nos casos de BMO.

O perfil epidemiológico dos pacientes enquadrados em todos os grupos foi caracterizado com base na idade e no sexo. Para o grupo controle, dos cinco pacientes, dois são do sexo feminino e três do sexo masculino, e também, três deles tem idade superior a 60 anos. Para o grupo com LLC, tinha-se um total de três pacientes, sendo eles dois homens e uma mulher, e os três com mais de 60 anos. Para o grupo com MM, foram incluídos apenas dois pacientes, sendo um do sexo feminino, um do sexo masculino, e ambos com idade superior a 60 anos. Para o grupo com SMD, com um total de seis pacientes, eram cinco do sexo masculino e um do sexo feminino, e cinco deles tinham idade superior a 60 anos. O grupo de MOR foi o único com os dez pacientes iniciais, destes, eram seis do sexo masculino e quatro do sexo feminino, e sete deles com idade superior a 60 anos.

O perfil clínico-evolutivo incluiu os seguintes itens: sinais e sintomas, comorbidades neoplásicas e não neoplásicas associadas e tempo de sobrevida, descritos na tabela 4.

Tabela 4 – Perfil clínico-evolutivo dos grupos estudados

Perfil clínico-evolutivo				
	Sinais e sintomas	Comorbidades neoplásicas	Comorbidades não neoplásicas	Tempo de sobrevida (média)
Grupo com LLC	Linfocitose, adenomegalia e hepatoesplenomegalia		Cirrose hepática, AVC e cálculo renal	17,5 meses
Grupo com MM	Insuficiência renal aguda e fratura patológica/dor óssea	Neoplasia de bexiga	Insuficiência renal e AVC	1,5 meses
Grupo com SMD	Neutropenia, plaquetopenia fraqueza		DPOC, cardiopatia e síndrome convulsiva	31,75 meses
Grupo com MOR	Náuseas e vômitos, febre de origem indeterminada, sintomas B, bicitopenias e linfonodos palpáveis	Câncer de mama	Lúpus eritomatoso sistêmico, choque séptico, anemia auto-imune	Apenas 1 paciente foi a óbito, 4 dias após o diagnóstico, devido tromboembolia

Tabela 5 - Perfil epidemiológico, clínico-evolutivo e morfológico dos pacientes com medula óssea neoplásica, reacional e controle (N_r) dos casos de BMO.

Grupos estudados - BMO					
	MM (n=2)	LLC (n=2)	SMD (n=2)	MOR (n=2)	Controle (n=2)
	n	N	n	n	n
Dados epidemiológicos					
Sexo feminino	1/2	0/2	0/2	1/2	1/2
Sexo masculino	1/2	2/2	2/2	1/2	1/2
Idade acima de 60 anos	2/2	1/2	2/2	1/2	1/2
Padrão morfológico					
Celularidade global					
<i>Aumentada para a idade</i>	1/2	2/2	2/2	2/2	0/2
<i>Normal para a idade</i>	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2
<i>Diminuída para a idade</i>	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Tratamento e prognóstico					
Quimioterapia/Radioterapia	1/2	1/2	1/2	0/2	1/2
Transplante de medula óssea	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Óbito	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2
Remissão com recidiva	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

Tabela 6 - Resultados do estudo imuno-histoquímico no grupo controle (BMO e Coágulo).

Grupo controle – Coágulo (n=4)									
	Amostras com marcação positiva					Nicho			
	<1%	1% - 5%	6% - 10%	>11%	Total	1	2	3	2 e 3
CD44	1	3	0	0	4	0	4	0	0
CD34	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD31	0	3	0	0	3	0	1	0	2
CD117	0	1	0	0	1	0	0	0	1
Grupo controle – BMO (n=2)									
	Amostras com marcação positiva					Nicho			
	<1%	1% - 5%	6% - 10%	>11%	Total	1	2	3	2 e 3
CD44	0	1	0	0	1	0	0	0	1
CD34	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD31	0	2	0	0	2	0	0	1	1
CD117	0	1	0	0	1	0	0	0	1

Os resultados observados no grupo controle foram: marcação positiva para o CD44, com a porcentagem variando entre 1% e 2%, presentes no nicho 2; o CD34 foi negativo no grupo controle; CD31, se mostrou positivo em três das quatro amostras, principalmente no nicho 2; CD117, foi positivo em uma amostra, com marcação localizada nos nichos 2 e 3.

Tabela 7 – Resultados do estudo imuno-histoquímico no grupo com LLC
(BMO e Coágulo TMA).

Grupo com LLC – Coágulo/TMA (n=3)									
	Amostras com marcação positiva					Nicho			
	<1%	1% - 5%	6% - 10%	>11%	Total	1	2	3	2 e 3
CD44	0	1	0	0	1	0	0	0	1
CD34	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD31	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD117	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo com LLC – BMO (n=2)									
	Amostras com marcação positiva					Nicho			
	<1%	1% - 5%	6% - 10%	>11%	Total	1	2	3	2 e 3
CD44	0	0	1	0	1	0	0	0	1
CD34	0	1	0	0	1	0	0	0	1
CD31	0	2	0	0	2	0	1	0	1
CD117	0	0	0	0	0	0	0	0	0

No grupo estudado com LLC, duas amostras apresentaram células positivas para CD44 (uma amostra de coágulo no TMA e uma BMO), as células estavam dispostas principalmente no nicho 2 e 3. Salienta-se que o paciente, cuja amostra corresponde ao coágulo do TMA, apresentou baixa sobrevida (seis meses após o diagnóstico) e apresentava CD44 positivo, em 4% das células dos nichos 2 e 3, e a marcação para reticulina desse paciente foi de grau II difuso e grau III nos agregados (Figura 3). Nas amostras de coágulo de medula óssea, os demais marcadores foram negativos. Interessante observar que em duas amostras de BMO, observou-se positividade para CD31 principalmente no nicho 2, e uma amostra positiva para o CD34 nos nichos 2 e 3 (onde no controle essa marcação foi negativa), no entanto o CD117 foi negativo. As amostras de BMO não correspondiam aos mesmos pacientes das amostras de coágulos no TMA.

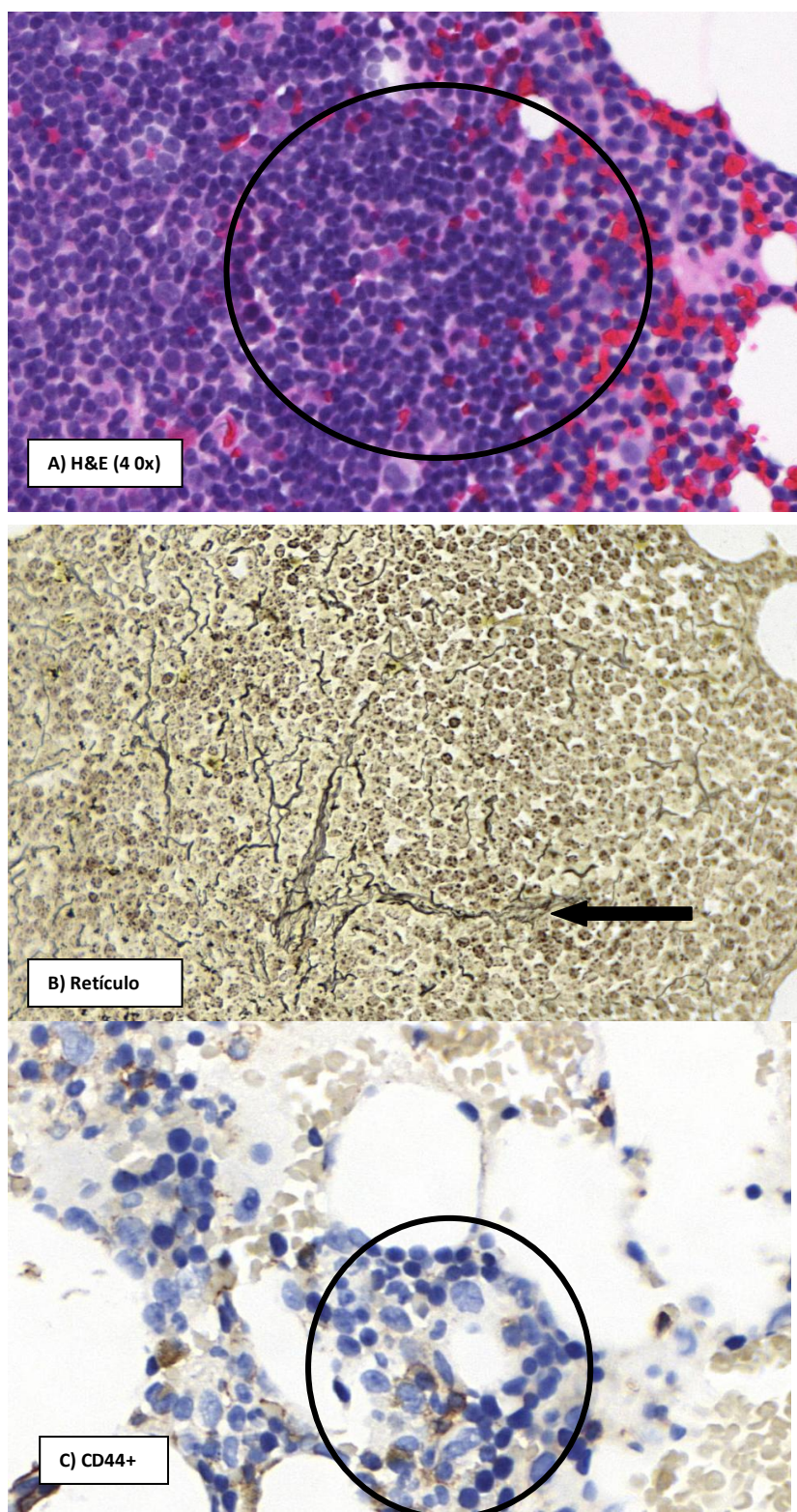


Figura 3 – A) LLC, infiltração de medula óssea, padrão nodular. HE, 40X. B)

Arcabouço reticulínico aumentado (Grau II Difuso). Impregnação Argêntica, 40X. C) Imunomarcação para CD44 positiva no nicho 2. IMH, 60X.

Tabela 8 – Resultados do estudo imuno-histoquímico no grupo com MM (BMO).

	Grupo com MM – BMO (n=2)									
	Amostras com marcação positiva					Nicho				
	<1%	1% - 5%	6% - 10%	>11%	Total	1	2	3	2 e 3	
CD44	0	0	0	2	2	0	0	1	1	
CD34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CD31	0	2	0	0	2	0	0	0	2	
CD117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

As amostras, com infiltração por MM, foram as que mais descolaram durante a reação de IMH, reduzindo drasticamente o número de amostras avaliadas. No TMA, 100% dos *cores*, representativos da doença, foram perdidos. Duas BMO se mantiveram intactas e puderam fornecer informações. Nesse grupo, as marcações para CD34 e CD117, foram todas negativas, mantendo-se iguais ao controle. Na análise do CD44, observou-se marcação, em 30%-40% de células localizadas principalmente no nicho 3, sugerindo que essas células migrem de microambiente por conta da doença (Figura 4). Os dois pacientes, foram a óbito em um tempo médio de 1 mês e meio após o diagnóstico.

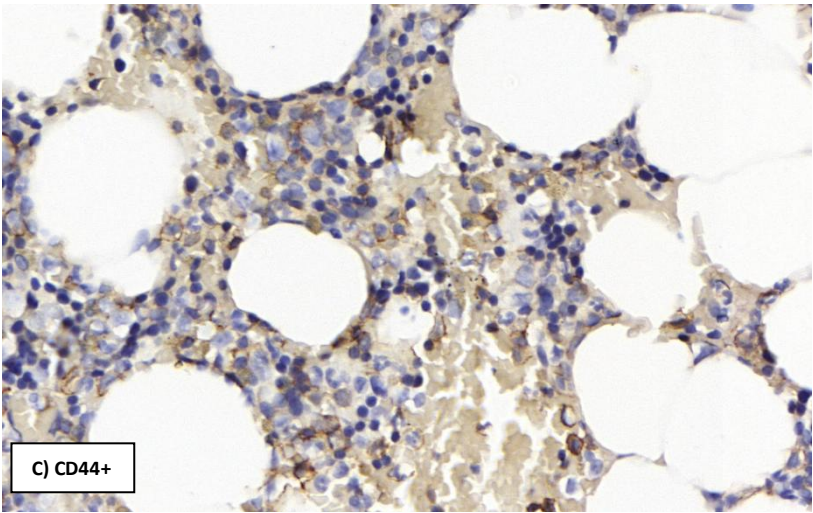
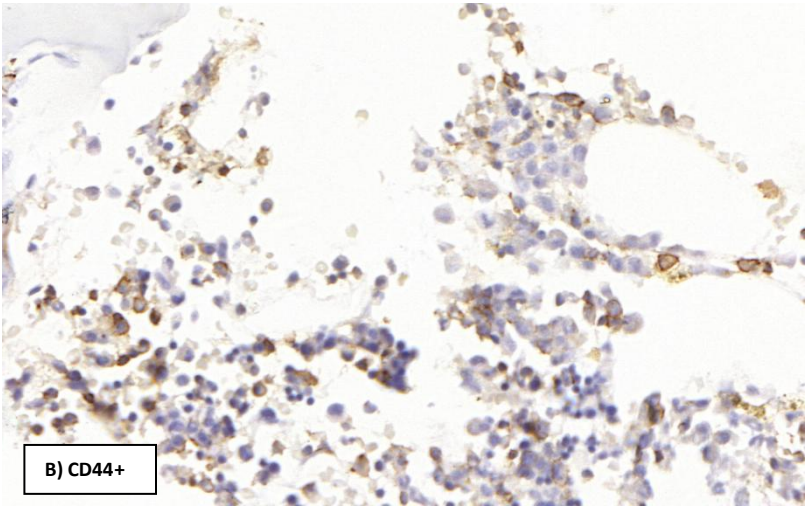
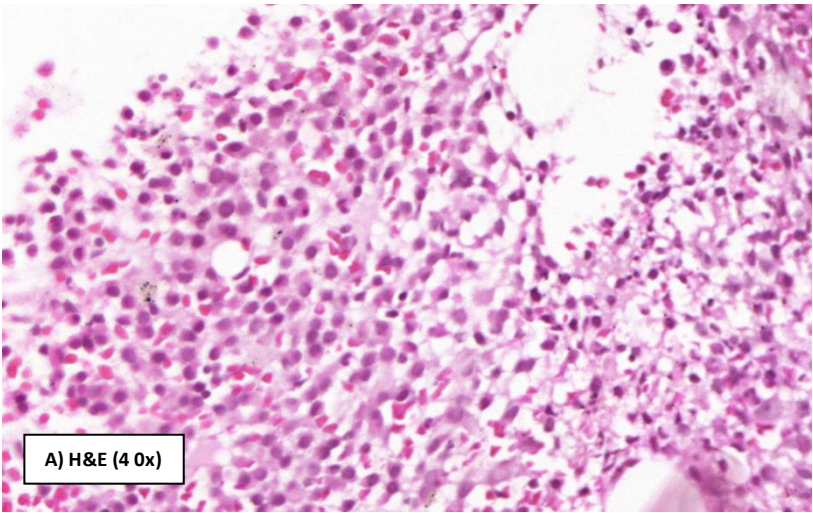


Figura 4 – A) Mieloma Múltiplo, infiltração difusa na medula óssea. HE, 40X. B) MM com CD44 positivo, cerca de 20% das células dos nichos 2 e 3. IMH, 40X. C) Grupo controle, marcação para CD44, em 5% das células, nichos 2 e 3. IMH, 40X.

Tabela 9 – Resultado do estudo imuno-histoquímico no grupo com SMD (BMO e Coágulo/TMA).

Grupo com SMD – Coágulo/TMA (n=6)									
	Amostras com marcação positiva					Nicho			
	<1%	1% - 5%	6% - 10%	>11%	Total	1	2	3	2 e 3
CD44	0	3	1	1	5	0	0	0	5
CD34	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD31	0	2	0	0	2	0	0	0	2
CD117	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo com SMD – BMO (n=2)									
	Amostras com marcação positiva					Nicho			
	<1%	1% - 5%	6% - 10%	>11%	Total	1	2	3	2 e 3
CD44	0	0	1	1	2	0	0	1	1
CD34	0	0	0	1	1	0	0	0	1
CD31	0	0	0	2	2	0	0	0	2
CD117	1	0	0	0	1	0	1	0	0

A análise das amostras de medulas ósseas acometidas por SMD foram restringidas a seis coágulos e duas BMO. A imunomarcagem para CD34, CD31, CD117 foram semelhantes ao grupo controle, somente o CD44 teve uma marcação expressiva no coágulo/TMA e BMO, de 10%-50% em células presentes no nicho 3, sendo uma marcação aberrante e novamente no nicho diferente ao habitual. A presença desses marcadores, principalmente no nicho 3, sugere um pior prognóstico desses pacientes, já que dos cinco que obtiveram marcação positiva, três deles foram a óbito em um tempo médio de dois anos, até o momento da coleta de dados. Nesse grupo, as amostras de BMO correspondiam à amostras de coágulo/TMA, concordando as marcações.

Tabela 10 – Resultado do estudo imuno-histoquímico no grupo com MOR (BMO e Coágulo/TMA).

Grupo com MOR – Coágulo/TMA (n=10)									
	Amostras com marcação positiva					Nicho			
	<1%	1% - 5%	6% - 10%	>11%	Total	1	2	3	2 e 3
CD44	1	2	3	2	7	0	2	0	5
CD34	2	2	0	0	4	0	4	0	0
CD31	0	3	2	1	6	0	2	2	2
CD117	0	1	0	0	1	0	0	1	0
Grupo com MOR – BMO (n=2)									
	Amostras com marcação positiva					Nicho			
	<1%	1% - 5%	6% - 10%	>11%	Total	1	2	3	2 e 3
CD44	0	0	1	1	2	0	0	0	2
CD34	0	1	0	0	1	0	0	0	1
CD31	0	2	0	0	2	0	1	0	1
CD117	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Na análise do grupo de MO reacional, observou-se que não houve perdas de amostras no processamento, Esse grupo foi o que mais se assemelhou ao perfil IMH e de nichos correspondentes do grupo controle, com um diferencial para o CD34, onde todos foram negativos no controle, e no grupo de reacional, houve quatro marcações positivas para esse marcador, no nicho 2.

Não houve diferença significativa nos resultados obtidos, devido à redução da amostra durante o processamento. Optou-se por uma análise descritiva, na tentativa de encontrar relevância clínica e na patogenia das doenças estudadas.

Tabela 11 – Análise estatística, com os valores de *p*, nos diferentes grupos de doenças estudadas e a positividade dos marcadores IMH.

	Controle	LLC	<i>p</i>	MM	<i>p</i>	SMD	<i>p</i>	MOR	<i>p</i>
CD44	5/5 pos	6/10 pos	0,302	6/6 pos	-	8/9 pos	1,0	7/10 pos	0,4936
CD34	5/5 neg	6/8 neg	0,6705	5/6 neg	1,0	8/8 neg	-	6/10 neg	0,3020
CD31	4/5 pos	1/5 pos	0,2059	2/3 pos	1,0	2/7 pos	0,1727	6/10 pos	0,8465
CD117	2/5 pos	0/6 pos	0,3536	2/7 pos	1,0	0/9 pos	0,2104	1/10 pos	0,4936

Discussão

Hematopoese é o processo onde todas as células sanguíneas são maturadas, produzindo eritrócitos, granulócitos, monócitos, linfócitos e plaquetas, e tal processo depende de células tronco hematopoéticas (CTH), que são células multipotentes e com poder de diferenciação e autorrenovação ⁽¹⁾. A diferenciação de CTH necessita de suas capacidades de autorrenovação e quiescência para que o fornecimento ideal de células sanguíneas ao longo da vida, seja mantido ⁽⁸⁾. Algumas alterações que desregulem esse fornecimento, pode dar origem a falha da MO ou distúrbios hematológicos, como por exemplo, uma alteração no microambiente (nicho) causado pela deficiência do receptor do ácido retinóico, pode induzir uma síndrome mielodisplásica (SMD); ou a deleção da proteína do retinoblastoma em células mielóides e no compartimento estromal, simultaneamente, pode acarretar em doenças mieloproliferativas; ou também, a deleção de DICER1 em osteoprogenitores, com exceção de osteoblastos maduros, pode promover uma SMD ou leucemia mielóide aguda (LMA). Isso indica que alterações em populações específicas de células estromais, ou nichos específicos, podem resultar em uma malignidade hematopoética ^(8, 12).

Durante o desenvolvimento e maturação das células hematopoéticas, as CTH migram para microambientes específicos, sendo controlada por fatores intrínsecos e extrínsecos. O CD44, é uma molécula

de adesão que age extrinsecamente nessa migração das CTH, sendo muito importante na regulação dessas células na MO adulta ⁽²⁴⁾.

Cao e colaboradores (2016) descrevem o CD44 como uma molécula de adesão codificada por um gene, com mais de 20 isoformas produzidas por processamento alternativo de mRNA ⁽²⁴⁾. A isoforma abundantemente expressa na maioria das células de mamíferos, é o CD44 padrão (CD44s), que está envolvido no *homing* e apresentação de células estaminais adultas, e também na captação e degradação de hialuronano (HA), angiogênese e cicatrização de feridas. Já as isoformas variantes do CD44 (CD44v), estão diretamente ligadas na regulação de neoplasias e estão envolvidas também, em metástases e agressão tumoral ⁽²⁴⁾.

A LLC é uma doença maligna incurável dos linfócitos B maduros, que é caracterizada por um acúmulo desses linfócitos no sangue periférico, na MO e nos gânglios linfáticos, e a fisiopatologia dessa doença está diretamente ligada ao comportamento do microambiente tumoral ^(25, 26). Os linfócitos saudáveis em repouso, expressam CD44s, onde as isoformas alternativas ou variantes, só são induzidas por uma ativação celular ⁽²⁶⁾. Já os linfócitos neoplásicos da LLC, em repouso expressam níveis baixos de CD44v, mas quando há uma estimulação com CD40L, essas variantes, principalmente CD44v3 e CD44v6, são transcritas, onde, segundo os autores do estudo, Girbl et. al, esse fato altera a afinidade de

ligação do CD44 e seu principal ligante HA, resultando em uma capacidade adesiva maior dos linfócitos neoplásicos com células estromais ⁽²⁵⁾.

Já um estudo mais recente (2018) do mesmo grupo, propôs que a variante CD44v6 de MAP quinase regulada por NF- κ B em células B neoplásicas com alta afinidade para HA, ao invés da isoforma padrão com baixa afinidade para HA, promove a progressão da LLC ⁽²⁶⁾.

Um outro estudo realizado por Kriston e colaboradores (2018), discute que outra molécula de adesão, CD49d e CXCR4 são principais determinantes das interações entre as células neoplásicas da LLC e o microambiente tumoral, e nesse estudo, o grupo buscou investigar os efeitos da expressão do CD49d e CXCR4 na sobrevida dessas células neoplásicas/leucêmicas. Para isso, o grupo cultivou as células leucêmicas com CD49d, VCAM-1, ou células estromais da MO, analisando após, a apoptose e imunofenótipo das células. Como resultados, viram que o tratamento com VCAM-1 não induziu uma proteção contra a apoptose ou alteração de imunofenótipo das células leucêmicas que expressavam CD49d; e que a proteção da apoptose induzida por células estromais da MO foi independente da expressão de CD49d pelas células leucêmicas, por isso, o grupo sugere que o CD49d contribua para aumentar a sobrevida das células neoplásicas da LLC, medindo a migração para um microambiente protetor, e não por uma proteção direta à apoptose ⁽²⁷⁾.

Por essas evidências já descobertas, sabe-se que as células leucêmicas da LLC infiltram os órgãos linfoides primários e secundários, podendo resultar em linfadenopatias, esplenomegalia e hiper celularidade na MO, e autores acreditam que essa infiltração se caracteriza por um processo ativo que contribui para a manutenção e progressão da doença, onde o *homing* e invasão das células neoplásicas nas estruturas linfoides modifiquem a fisiologia normal desses tecidos ⁽²⁸⁾.

Tal infiltração de células leucêmicas da MO, pode resultar em superpopulação e produção de fatores que modificam ou prejudicam o microambiente hematopóico normal, como por exemplo, o CXCL12 que é a principal quimiocina responsável pela manutenção de células hematopoéticas na MO, e na LLC, as células leucêmicas expressam níveis elevados de CXCR4, que é o receptor do CXCL12, permitindo assim, que as células leucêmicas migrem e sobrevivam na MO. Esse fato, também pode afetar a produção de granulócitos, megacariócitos e eritrócitos na MO, pois as CTH CD34+ normais precisam competir com as células leucêmicas por CXCL12, e como consequência, o paciente com LLC pode ter um número reduzido de células CD34+ ⁽²⁸⁾.

Nos resultados que encontramos, houveram 3 pacientes no grupo de LLC, destes, um obteve uma marcação positiva para CD44, superior à marcação do controle, e presente também no nicho 3, além do nicho 2, mas além desses dados encontrados e já discutidos, a coloração para

arcabouço reticulínico foi de grau II difuso e grau III nos agregados. Esse paciente foi a óbito apenas 6 meses após o diagnóstico anatomopatológico. Lembrando que a impregnação argêntica evidencia o colágeno III da matriz que constitui a medula óssea, pode-se aventar a hipótese que na LLC, em alguns pacientes, a CTH passa a expressar o CD44, evidenciando uma ativação de sua diferenciação, induzindo uma matriz rica em colágeno III, que facilitaria a migração das células tumorais para outros órgãos, além da disseminação dentro do microambiente da medula óssea. Um estudo feito por um grupo Israelita (2013), analisou o impacto prognóstico da fibrose reticulina na MO de pacientes com LLC não tratada. Para isso, o grupo analisou o banco de dados local durante 1982 a 2012, e classificaram as biópsias de MO para fibrose de reticulina usando um padrão de scores, com base no consenso europeu contendo 4 notas (0-3). Nesse estudo, os graus 2-3 foi considerado fibrose avançada de reticulina, e estava associado com trombocitopenia, anemia e elevada microglobulina, sugerindo, portanto, uma correlação significativa entre a baixa sobrevida e o grau de fibrose da reticulina na MO ⁽²⁹⁾. Agora, precisamos entender a correlação biológica entre a produção do colágeno III e o aumento do número de células CD44 na LLC, que ocupam tanto o nicho peritrabecular como intertrabecular.

O Mieloma Múltiplo (MM) trata-se de uma das neoplasias malignas mais comuns entre os cânceres hematológicos, representando 13% dessas doenças, acometendo principalmente idosos, homens e

negros ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Tal malignidade se caracteriza por uma proliferação de plasmócitos neoplásicos, que produzem proteínas M em excesso, causando insuficiência renal, anemia e fraturas ósseas, onde o paciente pode ter uma sobrevida que varia de alguns meses até mais de 10 anos pós-diagnóstico ^(18, 30).

Segundo Guo e colaboradores (2015), no momento do diagnóstico do MM, quatro marcadores podem estar diretamente relacionados com o prognóstico, sendo eles CD44, CD45, CD28 e CD117. Sobre o CD117 (C-kit), sabe-se que se trata de um receptor importantíssimo do fator de crescimento hematopoético, sendo ausente em células plasmáticas, mas presente em 22% dos paciente com MM ⁽³⁰⁾, porém, no nosso estudo, os dois pacientes incluídos no grupo de MM obtiveram uma marcação negativa para esse marcador, e segundo os mesmos autores, pacientes com MM sem expressão do CD117, apresentam mais aberrações genéticas, como por exemplo +1q21, del (17p) e translocação de IgH ⁽³⁰⁾.

Para o marcador CD44 no grupo de MM, os dois pacientes obtiveram uma marcação positiva em uma porcentagem bem mais alta do que no grupo controle (30 e 40%), e os dois pacientes foram a óbito em uma média de 1,5 mês após o diagnóstico, e além disso, os nichos também eram diferentes do grupo controle, estando presentes principalmente no nicho 3. Segundo o mesmo trabalho de Guo e colaboradores (2015), o CD44 se trata de um biomarcador que está relacionado com resultados ruins em tumores sólidos de colón e também

em neoplasia hematológicas como o MM e Linfoma não-Hodgkin (LNH), e no estudo citado, o grupo descobriu que a expressão de CD44 estava relacionada a um prognóstico adverso e uma sobrevida mais curta ⁽³⁰⁾.

A Síndrome Mielodisplásica (SMD), é doença caracterizada por um conjunto heterogêneo de neoplasias mielóides ou distúrbios hematopoéticos clonais que resultam em uma hematopoese ineficaz, citopenias periféricas e um risco de evolução para Leucemia Mielóide Aguda (LMA) ^(31,32). Sobre a SMD, um grupo de estudos de Nova Iorque, identificou em seus pacientes uma estágios de diferenciação específicos de hematopoese displásica, onde os níveis de CD44 e outros marcadores eram aberrantes ⁽³²⁾, o que corrobora em partes com nossos achados, pois um paciente obteve marcação de 30% para esse marcador, e outro 10%, nos nichos 2 e 3.

No grupo de MO Reacional, a maioria dos sintomas dos pacientes, era febre indeterminada, porém uma das pacientes tem Lúpus Eritomatoso Sistêmico (LES) em tratamento, e suas marcações foram 7% nos nichos 2 e 3 para CD44, menos de 1% no nicho 2 para o CD34, 2% no nicho 2 para CD31 e negativo para CD117. Como o LES é uma doença que se dá devido a anormalidades nas CTH, um grupo chinês objetivou estudar as características fenotípicas das células CD34+ da MO de pacientes com LES e a sua relação com a atividade da doença. Através de citometria de fluxo, o grupo pôde observar que nos pacientes com

doença ativa, a porcentagem de células CD34+ foi significativamente menor do que o controle, e que nos pacientes com a doença inativa, não houve diferença, o que indica que realmente existam anormalidades nas CTH no LES ⁽³³⁾.

Para a realização do estudo imunohistoquímico, nosso grupo precisou realizar uma técnica histológica conhecida como *Tissue Microarray* (TMA), porém, durante a realização do procedimento, 21 cores foram perdidos, representando 52,5% da amostra. Em um estudo realizado por um grupo Alemão, o objetivo foi validar o uso de TMA em biópsias de MO de pacientes com neoplasias mieloproliferativas, onde os resultados foram tecnicamente positivos, com uma perda de 10% das amostras, o que conclui que a realização do TMA em biópsias de MO de doenças mieloproliferativas é confiável ⁽³⁴⁾.

Conclusão

A partir dos resultados observados, conclui-se que de todos os marcadores estudados, o CD44 é o que tem maior importância e impacto no funcionamento das CTH de pacientes com alguma neoplasia hematológica, e isso pode ser muito importante para facilitar o diagnóstico dessas doenças e fortalecer a linha de estudo em fármacos inibidores dessa molécula de adesão.

Além disso, no grupo controle, esse marcador estava presente somente no nicho 2, e nos grupos doentes observou-se que essas células também estavam presentes no nicho 3 sugerindo uma ativação e migração dessas células para outro nicho, o que segundo estudos discutidos, está relacionado à manutenção do microambiente tumoral e desenvolvimento da doença.

Algumas limitações do estudo precisam ser consideradas: 1) primeiro a opção em realizar o TMA, pois não seria possível a realização da imunohistoquímica lâmina a lâmina; 2) segundo que o tamanho da amostra inicial já era pequeno em relação à quantia de casos de neoplasias hematológicas existentes, e após a realização do TMA esse tamanho de amostra foi reduzido ainda mais.

Vale ressaltar, que por conta das amostras perdidas, novos estudos com grupos amostrais maiores e técnicas mais avançadas são importantes para validação desses resultados.

Referências bibliográficas

1. Anthony B, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol.* 2014;35(1):32-7.
2. Al-Drees MA, Yeo JH, Boumelhem BB, Antas VI, Brigden KWL, Colonne CK, et al. Making blood: the haematopoietic niche throughout ontogeny. *Stem Cell Internacional.* 2015:1-14. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/571893>.
3. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haematopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4(1-2):7-25.
4. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature.* 2014;505(7483):327-34.
5. Calvi LM, Link DC. The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood.* 2015;126(22):2443-51.
6. Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood.* 2008;112(3):470-8.
7. Bowers M, Zhang B, Ho Y, Agarwal P, Chen CC, Bhatia R. Osteoblast ablation reduces normal long-term hematopoietic stem cell self-renewal but accelerates leukemia development. *Blood.* 2015;125(17):2678-88.
8. Seshadri M, Qu CK. microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells and its implications in leukemogenesis. *Curr Opin Hematol.* 2016;23(4):339-45.
9. Zhao M, Linheng L. Osteoblast ablation burns out functional stem cell. *Blood.* 2015;125(17):2590-1.
10. Kfoury Y, Scadden DT. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2015;6(3):239-53.
11. Tagliarini JV, Montovani JC, Nakajuna V, Castilho EC, Domingues MAC. Carcinoma de nasofaringe: análise da importância prognóstica da imunoexpressão da galectina-3 e proteínas de matriz. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço.* 2011;40(3):125-32.
12. Boulais PE, Frenette P. Making sense of hematopoietic stem cell.

Blood. 2015;125(17):2621-9.

13. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(9):573-90.
14. Schepers K, Campbell TB, Passegué E. Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):254-67.
15. Colombo M, Galletti S, Bulfamante G, Falleni M, Tosi D, Todoerti K, et al. Multiple myeloma-derived Jagged ligands increases autocrine and paracrine interleukin-6 expression in bone marrow niche. *Oncotarget*. 2016;7(35):56013-29.
16. Fairfield H, Falank, C, Avery L, Reagan MR. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1364(1):32-51.
17. Wennekers AB, Azara MPM, Sahun VD, Liberal BB, Laiglesia JER, Perna PV, et al. Trece tratamientos de la insuficiencia renal aguda secundaria a mieloma múltiple com filtros de high cut off. *Nefrologia*. 2016;36(4):333-464.
18. Nakagawa Y, Ashihara E, Yao H, Yokota A, Toda Y, Miura Y, et al. Multiple myeloma cells adapted to long-exposure of hypoxia exhibit stem cell characters with TGF- β /Smad pathway activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;496(2):490-6.
19. Blimark C, Holmberg E, Mellqvist UH, Landgren O, Björkholm M, Hultcrantz M, et al. Multiple myeloma and infections: a population-based study on 9253 multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2015;100(1):107-13.
20. Rai KR, Jain P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) – Then and now. *Am J Hematol*. 2016;91(3):330-40.
21. Rowsell-Turner RB, Barr PM. Treatment of chronic lymphocytic leukemia in older adults. *J Geriatr Oncol*. 2017; 8(5):315-9.
22. Walenda T, Stiehl T, Braun H, Fröbel J, Ho AD, Schrolder T, et al. Feedback signals in myelodysplastic syndromes: increased self-renewal of the malignant clone suppresses normal hematopoiesis. *PLOS Comput Biol*. 2014;10(4):e1003599.
23. Chaudhary AK, Chaudhary S, Gosh K, Shanmukaiah C, Nadkarni

- AH. Secretion and expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 from bone marrow mononuclear cells in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(3):1519-29.
24. Cao H, Heazlewood SY, Williams B, Cardozo D, Nigro J, Oteiza A, et al. The role of CD44 in fetal and adult hematopoietic stem cell regulation. *Haematologica*. 2016;101(1):26-37.
 25. Girbl T, Hinterseer E, Grössinger EM, Asslaber D, Oberascher K, Weiss L, et al. CD40-mediates activation of chronic lymphocytic leukemia cells promotes their CD44-dependent adhesion to hyaluronan and restricts CCL21-Induced motility. *Cancer Res*. 2013;73(2):561-70.
 26. Gutjahr JC, Szenes E, Ischech L, Asslaber D, Schlederer M, Roos S, et al. Microenvironment-induced CD44v6 promotes early disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood J*. 2018;131(12):1337-49.
 27. Kriston C, Plander M, Márk A, Sebestyén A, Bugyik E, Matolcsy A, et al. In contrast to high CD49d, low CXCR4 expression indicates the dependency of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells on the microenvironment. *Ann Hematol*. 2018; 97(11):2145-52.
 28. Fecteau JF, Kipps TJ. Structure and function of the hematopoietic cancer niche: focus on chronic lymphocytic leukemia. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012;4:61-73. Review.
 29. Tadmor T, Shvidel L, Aviv A, Rouchlemer R, Bairey O, Yuklea M, et al. Significance of bone marrow reticulin fibrosis in chronic lymphocytic leukemia as diagnosis. a study of 176 patients with prognostic implications. *Cancer*. 2013;119(10):1853-9.
 30. Guo J, Jiying S, Qi H, Xiao L, Youshan Z, Gu S, et al. The prognostic impact of multiparameter flow cytometry immunophenotyping and cytogenetic aberrancies in patients with multiple myeloma. *Hematology*. 2015;21(3):152-61.
 31. Loeffler-Ragg J, Germing U, Sperr WR, Herrmann H, Zwierzina H, Valent P, et al. Serum CD44 levels predict survival in patients with low-risk myelodysplastic syndromes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;78(2):150-61.
 32. Ostendorf BN, Flenner E, Flörcken A, Westermann J. Phenotypic

characterization of aberrant stem and progenitor cell populations in myelodysplastic syndromes. PLoS ONE. 2018;13(5):1-12.

33. Sun L, Zhou K, Feng X, Zhang H, Ding X, Jin O, et al. Abnormal surface markers expression on bone marrow CD34+ cells and correlation with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol. 2007;26(12):2073-79.
34. Limberger KA, Bogatyreva L, Todorova R, Herde B, Hauschke D, Pahl HL, et al. Tissue microarray technique is applicable to bone marrow biopsies of myeloproliferative neoplasms. Histochem Cell Biol. 2016;147(1):75-82.