



**Instituto Politécnico de Coimbra**  
**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de  
Coimbra**  
**Departamento de Análises Clínicas e Saúde  
Pública**



## **QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS EM GAMAPATIAS MONOCLONAIS**

**RUI MIGUEL DE JESUS LEITE**

**Coimbra**

**2013**





**Instituto Politécnico de Coimbra**

**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de  
Coimbra**

**Departamento de Análises Clínicas e Saúde  
Pública**



## **QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS EM GAMAPATIAS MONOCLONAIS**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Paiva, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e co-orientação do Doutor Armando José Cerejo Caseiro, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.



**Agradecimentos** Agradeço ao meu orientador, Doutor Artur Paiva, por todo o apoio teórico e prático prestado durante a execução deste estudo.

Agradeço ao meu co-orientador, Doutor Armando Cerejo Caseiro, pelo apoio prestado na elaboração desta dissertação.

Agradeço ao Doutor Bruno Paiva, por todo o apoio prestado ao nível da análise de dados e transmissão de conhecimento científico fundamentais para a execução deste estudo.

Agradeço ao Mestre Tiago Carvalheiro, pela preciosa ajuda ao nível do processamento de amostras e também na organização dos dados recolhidos.

Agradeço à Mestre Andreia Ribeiro pela ajuda dada e pela transmissão de conhecimentos numa fase inicial do trabalho prático que constituiu uma base fundamental para a elaboração deste estudo.

Agradeço a Dra. Paula Rocha, Dra. Helena Vitória, Dra. Maria Amélia Pereira, Dra. Catarina Geraldes, Dra. Sofia Ramos e Dra. Adriana Teixeira pelo fornecimento de dados clínicos dos utentes estudados.



## **Júri**

**Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública António José dos Santos Gabriel**

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

**Doutora Julia Almeida Parra**

Professora Associada da Universidade de Salamanca

**Doutor Artur Augusto Paiva**

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

**Doutor Armando José Cerejo Caseiro**

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra



## Resumo

A interação entre células plasmáticas (CP) clonais e as células do estroma da medula óssea (MO) desempenha um papel crucial no mieloma múltiplo (MM), contribuindo para um desequilíbrio na remodelação óssea e na ativação de várias cascatas de sinalização que promovem resistência à quimioterapia. Interessantemente, as células mesenquimais (MSC) – precursoras das células do estroma – têm sido pouco investigadas e a maioria dos estudos realizados até ao momento têm por base a expansão *ex vivo* a partir de amostras de doentes com MM ativo.

Neste estudo usámos a citometria de fluxo multidimensional para identificar, quantificar e caracterizar as MSC da MO em indivíduos com gamapatia monoclonal.

Para este estudo foram utilizadas amostras de um total de 60 indivíduos com diagnóstico *de novo* de discrasia de plasmócitos, 32 com gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), 5 com *smouldering multiple myeloma* (SMM) e 24 com MM sintomático. Dez indivíduos sem patologia, equiparados etariamente foram usados como controlos. As MSC foram caracterizadas por citometria de fluxo usando um total de 11 antigénios.

A frequência média de MSC na MO apresentou-se semelhante entre indivíduos normais (0,03%) *versus* indivíduos com MGUS (0,03%) e SMM (0,02%) ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, foram encontrados números significativamente aumentados de MSC na MO de indivíduos com MM sintomático (0,14%) quando comparados com os indivíduos com MGUS

( $p=0,03$ ), verificando-se uma tendência no mesmo sentido quando se comparou com os casos de SMM ( $p=0,05$ ). Além desse facto, verificou-se uma correlação negativa entre a percentagem de MSC na MO e valores de hemoglobina ( $r=0,51$ ,  $p=0,006$ ); da mesma forma, verificou-se uma correlação positiva entre a frequência de MSC na MO e a quantidade de plasmócitos na medula óssea ( $r=0,51$ ;  $p=0,008$ ). Ao investigar as características fenotípicas das CP Clonais influenciariam de algum modo a frequência de MSC na MO verificamos que indivíduos caracterizados por uma expressão de CD56 positiva apresentavam números significativamente inferiores de MSC em comparação com os casos negativos (0,03% vs. 0,18%;  $p=0,007$ ). Quando se comparou o perfil fenotípico específico das MSC de indivíduos com MM *versus* MGUS ou SMM verificou-se que os primeiros apresentavam uma maior expressão das moléculas de adesão CD90 ( $p=.049$ ) e CD49e ( $p=.059$ ), enquanto que nestes mesmos indivíduos se verificou uma diminuição na expressão de CD73 ( $p=.001$ ).

Com este estudo, ficou demonstrado que as MSC encontram-se em maior número na medula óssea de indivíduos com MM, especialmente em indivíduos com estádios ISS mais avançados. Também se demonstrou que estas MSC apresentavam alterações fenotípicas ao nível da expressão de moléculas de superfície celular como CD90, CD49e e CD73, que podem ter um papel importante na manutenção e progressão da doença na medula óssea. Também se verificou uma correlação entre a frequência de MSC na MO e a expressão aberrante de CD56 pelas células plasmáticas.

**Palavras-chave** Células mesenquimais, Gamapatias monoclonais, Mieloma Múltiplo, CD73, CD90, CD56

## Abstract

The interaction between clonal plasma cells (PCs) and bone marrow (BM) stromal cells plays a crucial role in multiple myeloma (MM), accounting for unbalanced bone remodeling and activation of pleiotropic signaling cascades which promote chemoresistance. Interestingly though, the mesenchymal stem cell (MSC) - the precursor of stromal cells - has only been modestly investigated, after ex vivo expansion and mostly in active MM.

We used sensitive multidimensional flow cytometry (MFC) to identify, quantify and characterize the minor BM compartment of MSC in patients with MGUS and MM.

A total of 61 newly diagnosed patients with a PC dyscrasia are the focus of this study, 32 being diagnosed as MGUS, 5 as smoldering and 24 as symptomatic MM. Ten age-matched normal individuals were used as control. MSC were characterized by MFC using a total of 11 antigens.

The mean frequency of BM MSC was found to be similar between normal individuals (0.03%) *versus* MGUS (0.03%) and SMM (0.02%) patients ( $p>.05$ ). By contrast, significantly increased numbers of BM MSC (0.14%) were noted in symptomatic MM patients as compared to MGUS patients ( $p=.0024$ ), with a trend also recorded *versus* SMM cases ( $p=.019$ ). Moreover, a significantly inverse correlation between the percentage of BM MSC and hemoglobin values was noted ( $r=0.51$ ;  $p=.006$ ); conversely, increasing numbers of MSC were followed by higher BM plasmacytosis ( $r=0.54$ ;  $p=.008$ ). We next investigated if the phenotypic characteristics of

clonal PCs influenced the frequency of BM MSC. Our results show that patients characterized by CD56 positive expression showed significantly inferior numbers of MSC as compared to negative cases (0.03% vs. 0.18%;  $p=.003$ ). We then compared the specific phenotypic profile of MSC from patients with the benign (MGUS and SMM) versus malignant (MM) form of the disease. Accordingly, MSC from patients with MM showed significantly superior MFI for the adhesion molecules CD90 ( $p=.049$ ) and CD49e ( $p=.059$ ), whereas CD73 was found to be decreased ( $p=.001$ ). With this study we have shown that MSC are found in higher number in the bone marrow of patients with symptomatic Multiple Myeloma, especially in patients with higher ISS stages. We also found that these MSC have altered expression of surface molecules such as CD90, CD49e and CD73, that could contribute to the maintenance and progression of the disease in the bone marrow. We also found that higher numbers of MSC were correlated with the expression of CD56 in the clonal PCs.

**Keywords**

Mesenchymal stem cells, monoclonal gamopathies, multiple myeloma, CD73, CD90, CD56

## Índice de Abreviaturas

| <b>Abreviatura</b> | <b>Designação</b>   |
|--------------------|---|
| ANGPLT-4           | Angiopietina tipo 4   |
| APC                | Células Apresentadoras de Antígeno  |
| APN                | Aminopectidase  |
| AREG               | Anfirregulina   |
| bcl-XL             | B-cell lymphoma-extra large   |
| bFGF               | Basic Fibroblast Growth Factor  |
| CCL1               | Chemokine Ligand 1  |
| CD                 | Cluster Designator  |
| CFU-F              | Fibroblastos Formadores de Colónia  |
| CP                 | Células Plasmáticas/Plasmócitos   |
| CXCR4              | Chemokine Receptor Type 4   |
| DKK-1              | Dickkopf-related protein 1  |
| DNA                | Ácido Desoxirribonucleico   |
| EGF                | Epidermal Growth Factor   |
| FGF-2              | Fibroblast Growth Factor 2  |
| GDF15              | Growth Differentiator Factor 15   |
| HGF                | Hepatocyte Growth Factor  |
| Hh                 | Hedgehog  |
| HLA                | Human leucocyte Antigen   |
| ICAM-1             | Intercellular Adhesion Molecule 1   |
| IGF                | Insulin Growth Factor   |
| IL                 | Interleucina  |
| LCA                | Antígeno Leucocitário Comum   |
| LFA-1              | Leukocyte Function Associated Antigen 1   |
| LNGFR              | Low Affinity Nerve Growth Factor  |
| MAC-1              | Macrophage 1 Antigen  |
| MDSC               | Células Supressoras Derivadas da Linha Mielóide   |
| MGUS               | Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (Monoclonal Gamopathy of Indetermined Significance) |
| MHC                | Complexo Major de Histocompatibilidade  |
| MIP-1 $\alpha$     | Macrophage Inflammatory Protein 1 $\alpha$  |
| MM                 | Mieloma Múltiplo  |

|                |  |
|----------------|--|
| MO             | Medula Óssea   |
| MPC-1          | Monocyte Chemotatic Protein 1                                  |
| MSC            | Células Mesenquimais (Mesenchymal Stem Cells)                  |
| NCAM           | Neural Cell Adhesion Molecule                                  |
| NF- $\kappa$ B | Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells |
| OPG            | Osteoprotegrina  |
| PAI-1          | Inibidor do Ativador do Plasminogénio-1                        |
| pRB            | Proteína do Retinoblastoma                                     |
| RHAMM          | Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility                      |
| SCF            | Stem Cell Factor   |
| SCG2           | Secretogramina 2   |
| SDF-1          | Stromal Derived Factor-1                                       |
| SMM            | Smouldering Multiple Myeloma (Mieloma Indolente)               |
| TGF- $\beta$   | Tumor Growth Factor $\beta$                                    |
| TNF- $\alpha$  | Tumor Necrosis Factor- $\alpha$                                |
| VCAM-1         | Vascular Adhesion Molecule-1                                   |
| VEGF           | Vascular Endothelial Growth Factor                             |
| VLA-4          | Very Late Antigen 4  |
| WISP-1         | WNT1-inducible-signaling pathway protein 1                     |

# Índice

|  |    |
|--|----|
| Introdução.....  | 1  |
| 1.1 Gamapatias Monoclonais _____   | 1  |
| 1.2 Patogénese_____  | 2  |
| 1.3 O Microambiente Medular_____   | 4  |
| 1.4 As Células Mesenquimais (MSC) _____  | 6  |
| 1.5 Caracterização das Células Mesenquimais _____  | 7  |
| 1.6 Abordagem Prática Para Caracterização Fenotípica de MSC por Citometria de Fluxo_____ | 9  |
| 1.7 As Células Mesenquimais no Mieloma Múltiplo _____                                    | 11 |
| 1.8 Alterações das Células Mesenquimais no Mieloma Múltiplo _____                        | 14 |
| 1.8.1 Fenótipo .....   | 14 |
| 1.8.2 Produção e secreção de fatores solúveis .....                                      | 15 |
| 1.8.3 Expressão de proteínas da matriz extracelular .....                                | 15 |
| 1.8.4 Perfil genético.....   | 15 |
| 1.8.5 Capacidade de proliferação e imunomodulação .....                                  | 17 |
| 2 Objetivos .....  | 19 |
| 3 Material e Métodos.....  | 21 |
| 3.1 População em estudo_____   | 21 |
| 3.2 Imunofenotipagem das MSC por citometria de fluxo _____                               | 22 |
| 3.3 Imunofenotipagem de células plasmáticas_____   | 22 |
| 3.4 Análise do estado de ploidia dos plasmócitos _____                                   | 24 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.5   | Análise por Hibridização in situ fluorescente (FISH)   | 24 |
| 3.6   | Análise Estatística  | 25 |
| 4     | Resultados   | 27 |
| 4.1   | Quantificação de células mesenquimais de medula óssea  | 27 |
| 4.2   | Correlação entre as células mesenquimais e o estadiamento da doença  | 29 |
| 4.3   | Fenótipo das células mesenquimais  | 31 |
| 4.4   | Relação com populações precursoras hematopoiéticas presentes na medula óssea                                 | 35 |
| 4.5   | Correlação entre a percentagem de células mesenquimais e o fenótipo de plasmócitos em mieloma múltiplo       | 37 |
| 4.6   | Correlação entre a frequência de células mesenquimais e alterações genéticas recorrentes em Mieloma Múltiplo | 39 |
| 5     | Discussão dos Resultados   | 41 |
| 5.1   | Quantificação de células mesenquimais de medula óssea  | 41 |
| 5.2   | Correlação entre as células mesenquimais e o estadiamento da doença  | 42 |
| 5.3   | Fenótipo das células mesenquimais  | 42 |
| 5.3.1 | CD73   | 42 |
| 5.3.2 | CD90   | 43 |
| 5.3.3 | CD49e  | 44 |
| 5.3.4 | CD271  | 44 |
| 5.4   | Relação com populações precursoras hematopoiéticas presentes na medula óssea                                 | 45 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 5.5 | Correlação entre a percentagem de células mesenquimais e o fenótipo de plasmócitos em mieloma múltiplo       | 45 |
| 5.6 | Correlação entre a frequência de células mesenquimais e alterações genéticas recorrentes em Mieloma Múltiplo | 46 |
| 5.7 | Questões relacionadas com a abordagem técnica neste trabalho científico e perspectivas de futuro             | 46 |
| 6   | Conclusão  | 49 |
| 7   | Referências Bibliográficas   | 51 |



## Introdução

### 1.1 Gamapatias Monoclonais

As Gamapatias Monoclonais constituem um grupo de patologias caracterizadas pela proliferação monoclonal de plasmócitos. Neste deste grupo podem incluir-se várias patologias sendo as mais frequentes a Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS), o Mieloma Indolente (SMM de *Smouldering Multiple Myeloma*) e o Mieloma Múltiplo (MM). Outras patologias menos frequentes mas que também se podem incluir neste grupo são o Plasmacitoma e o Mieloma Não Secretor. Encontrando-se o âmbito deste estudo nas patologias mais comuns anteriormente mencionadas, o foco da seguinte exposição teórica estará direcionado para o modelo de doença do MM, como patologia evolutiva desde as fase inicial de MGUS, passando por SMM até atingir a fase mais avançada de MM.

O MM é o protótipo de um tumor clonal de células B diferenciadas, mais concretamente de plasmócitos com uma baixa taxa proliferativa [1]. É uma doença que corresponde a 1% de todas as doenças neoplásicas e 13% das doenças hematológicas. Com uma idade média ao diagnóstico de 62 anos para o sexo masculino e de 61 anos para o sexo feminino, o MM é uma doença de indivíduos mais velhos, com apenas 2% dos diagnósticos a serem realizados antes dos 40 anos de idade [2]. O mieloma múltiplo tem a medula óssea com o principal local de desenvolvimento da doença [3]. A base fisiopatológica para o desenvolvimento de MM é a acumulação de células plasmáticas (CP) clonais, principalmente na MO, responsáveis pela produção de imunoglobulinas monoclonais. [4]. A base etiológica do MM permanece desconhecida, no entanto, vários estudos apontam para uma maior prevalência de doença em indivíduos expostos a radiação ionizante, trabalhadores da indústria nuclear e em trabalhadores de indústrias metalúrgicas e fundições. Contudo, a existência destas relações ainda não se encontra bem definida [1].

O MM é caracterizado por um excesso de plasmócitos na medula óssea, de proteínas monoclonais, lesões ósseas osteolíticas, doença renal e imunodeficiência [2]. Modelos de progressão da doença sugerem que MGUS pode dar origem a um SMM, e este, por sua vez daria origem a MM intramedular sintomático e MM extramedular, ou até mesmo a uma leucemia de plasmócitos [2, 5-8]. Assim, de acordo com o Consenso do *International Myeloma Working Group* (IMWG) a classificação destas diversas patologias que aparentam estar interrelacionadas é efetuada obrigatoriamente com base em três parâmetros principais: a concentração de proteína monoclonal, a quantidade de CP

clonais presentes na medula óssea e a existência de lesões/disfunção de órgãos resultante da ação de plasmócitos, sendo que neste último parâmetro a avaliação pode ser feita recorrendo à avaliação de outros fatores tais como a concentração sérica de cálcio, a presença de amiloidose ou de doença de deposição de cadeias leves e a avaliação da presença de lesões ósseas por radiografia [8]. Tendo em conta estes parâmetros essenciais para a classificação da patologia, uma MGUS é caracterizada por ter uma concentração de proteína monoclonal inferior a 3 g por 100mL, menos de 10% de plasmócitos na medula óssea e por não haver evidência de lesões orgânicas atribuíveis a plasmócitos. Por sua vez, um SMM é definido por ter uma concentração de proteína monoclonal de concentração igual ou superior a 3g por 100mL, mais de 10% de plasmócitos na medula óssea, contudo, sem apresentar sinais de lesões orgânicas derivadas da ação de plasmócitos. O Mieloma múltiplo sintomático que constitui uma fase mais avançada da doença apresenta uma concentração de proteína monoclonal sérica superior a 3g por 100mL podendo esta também estar presente na urina. Em relação aos plasmócitos, estes estão presentes na medula óssea num número superior a 10% da celularidade total da mesma. Por outro lado, neste estágio da patologia já se encontram sinais de disfunção orgânica atribuível aos plasmócitos [8] Independentemente das características clinico-laboratoriais referidas o diagnóstico de MM sintomático baseia-se na presença de lesão de órgão alvo, independentemente da percentagem de plasmócitos ou do tamanho do pico monoclonal.

## **1.2 Patogénese**

A origem dos plasmócitos de MM permanece desconhecida [1]. O desenvolvimento normal de plasmócitos passa por três fases: formação de células B imunocompetentes maduras (maturação), ativação das células B maduras quando interagem com antigénios (ativação) e diferenciação de células B ativadas em plasmócitos ou células B de memória (diferenciação) [9]. As várias fases do desenvolvimento de células B ocorrem numa primeira fase na medula óssea e posteriormente nos tecidos linfóides. A fase de diferenciação ocorre na medula óssea onde os precursores hematopoiéticos dão origem à primeira célula comprometida com a linhagem de células B: a célula pró-B. Após o rearranjo dos genes das cadeias pesadas das imunoglobulinas, esta célula passa a ser designada por célula pré-B que se caracteriza pela presença de cadeias  $\mu$  citoplasmáticas [1]. Este processo de maturação é dependente do ambiente do estroma medular. Assim sendo, as células do estroma desempenham duas funções essenciais: contacto direto com as células pró-B e pré-B; e a secreção de várias citocinas, nomeadamente a Interleucina-7 (IL-7) que é fundamental para este processo de

desenvolvimento [9]. O rearranjo posterior dos genes das cadeias leves faz com que estas células passem a expressar IgM, sendo estas células denominadas por células B imaturas. De seguida, estas células abandonam a medula óssea e passam para o sangue periférico onde, paradas na fase G0 do ciclo celular começam a expressar IgD à superfície, passando a ser células B *naïve*. [1]. Ao entrarem no tecido linfóide, estas células B *naïve* vão interagir com células apresentadoras de antigénio (APC) dando início à fase de ativação celular. Na ausência de ativação celular por interação com antigénio, as células B *naïve* têm uma vida curta, morrendo poucas semanas após a sua formação por apoptose [9]. A ativação celular promove a transição das células B *naïve* na fase G0 do ciclo celular para a fase G1 e posteriormente para a fase S onde há replicação de DNA para depois entrar na fase G2 e finalmente entrar em mitose. Estas células depois de ativadas podem diferenciar-se em células plasmáticas de baixa afinidade ou em células B de memória. Estas últimas deslocam-se então da área extrafolicular do gânglio linfático para os folículos primários onde entram em contacto com o antigénio apresentado pelas células dendríticas foliculares, dando origem a uma resposta secundária [1]. Nesta fase, os folículos primários passam a folículos secundários com centros germinais. A ativação das células B por ação dos antigénios leva à diferenciação destas em centroblastos levando à mudança isotópica de cadeias de imunoglobulinas, e a alterações somáticas nas zonas variáveis das cadeias de imunoglobulinas o que vai permitir a produção de anticorpos de alta afinidade. Os centroblastos transformam-se em centrócitos passando a expressar novamente imunoglobulinas à superfície celular. Por sua vez, estas células podem diferenciar-se em células B de memória ou em plasmablastos que vão migrar da periferia para a medula óssea, onde se vão diferenciar em plasmócitos secretores de imunoglobulinas. Estas células são responsáveis pela maior parte das imunoglobulinas séricas e têm um tempo de vida de aproximadamente um mês [1, 9].

Tal como mencionado anteriormente, a origem dos plasmócitos de mieloma múltiplo permanece desconhecida. Muito embora, a célula maligna predominante no MM é o plasmócito, várias evidências sugerem que existem outros tipos celulares linfóides envolvidos no processo maligno da doença [1]. Existe a evidência de que um número significativo de linfócitos no sangue periférico possuem o mesmo subtipo de paraproteína bem como os mesmos rearranjos genéticos das cadeias de imunoglobulinas que os plasmócitos da medula óssea. Estes dados sugerem que possa existir um compartimento que contenha a célula maligna de MM. Foi sugerido que o possível precursor da célula maligna de MM seria uma célula stem CD138<sup>-</sup> e CD20<sup>+</sup> [10]. Sabendo que o plasmócito

de MM não tem capacidade de se diferenciar e que possui uma grande taxa de mutação somática ao nível dos genes das cadeias de imunoglobulinas sem variação intraclonal, fica a noção que a doença surge de um compartimento celular pós-centro germinal. Alguns estudos sobre células clonotípicas circulantes revelaram que as células que dão origem ao mieloma múltiplo expressam CD19 e CD27, estando próximas fenotipicamente de uma célula B de memória [11]. As células de mieloma múltiplo, depois do seu processo de diferenciação vão expressar células moléculas de adesão que as vão levar ao local predominante do desenvolvimento da doença, a medula óssea. A migração destas células para a medula é feita à custa da expressão à sua superfície de CXCR4. O ligando de CXCR4 é o CXCL12 ou Stromal Derived Factor - 1 (SDF-1). As células de mieloma também são atraídas por CCL1 que é produzido por este mesmo tipo celular, o que explica o motivo pelo qual estas células formam agregados celulares [1].

### **1.3 O Microambiente Medular**

Para o desenvolvimento e manutenção da doença é extremamente importante o papel do microambiente medular. A natureza complexa do microambiente da medula óssea permite a interação de vários tipos celulares. A relação das células plasmáticas com os vários componentes medulares vai influenciar o comportamento e função das mesmas. A adesão das células plasmáticas à matriz extracelular e às células mesenquimais da medula óssea é feita através de várias moléculas de adesão nomeadamente o CD44, Leukocyte Function Associated antigen-1 (LFA-1), CD56, CD138 e Monocyte Chemotactic Protein-1 (MPC-1), sendo que estas moléculas vão desempenhar um papel vital na patogénese e progressão da doença [3]. A matriz extracelular corresponde ao maior componente acelular da medula óssea. É constituída principalmente por fibronectina, colagénio dos tipos I e IV, laminina e glicosaminoglicanos: sulfato de heparina, sulfato de condroitina e ácido hialurónico [4]. A adesão das células de mieloma múltiplo à fibronectina é feita através da expressão de VLA-4 ( $\beta$ 1-integrina) que aumenta à medida que estas células migram para a medula óssea em resposta aos sinais quimiotáticos enviados pela medula óssea via SDF-1 [3, 4, 12]. Este processo de adesão, para além de aumentar a capacidade de ligação destas células ao ambiente medular, vai constituir uma vantagem para estas células ao nível de resistência a drogas citotóxicas, devido à ativação da via de sinalização NF- $\kappa$ B [2, 4]. A ligação das células de MM à fibronectina também assume um papel fundamental na progressão e manutenção da doença, uma vez, vai fazer com que estas células fiquem bloqueadas na fase G1 do ciclo celular e também vai promover a inibição da apoptose mediada por FAS (CD95) [4]. A ligação das células de mieloma múltiplo ao ácido hialurónico é feita através da molécula

de adesão CD44 e do recetor para a motilidade mediada por ácido hialurónico (RHAMM) em conjunto com outros recetores que se ligam ao ácido hialurónico. Está descrito que a presença de ácido hialurónico no microambiente medular das células de MM aumenta o seu potencial de sobrevivência e de proliferação [4]. No entanto, estas potencialidades não são derivadas de contacto direto entre o ácido hialurónico e os seus recetores à superfície dos plasmócitos de mieloma múltiplo, mas sim devido à compartimentação promovida por esta molécula o que potencia a ligação de vários fatores de crescimento e citocinas e a sua apresentação aos seus recetores. Uma das citocinas que está associada a este fenómeno é a interleucina 6 (IL-6), um dos fatores de crescimento mais associado ao mieloma múltiplo, não só pelo seu papel no desenvolvimento das células tumorais, mas também pelo seu envolvimento ao nível do desenvolvimento de osteoclastos. O aumento da concentração de IL-6 no microambiente medular não está associado a um aumento da expressão génica de IL-6, o que vai no sentido da teoria que o ácido hialurónico tem a capacidade de ligação e retenção desta molécula [3, 4, 13]. Por outro lado, a ligação a outro componente da matriz extracelular da medula óssea, o colagénio é efetuada pela ligação de CD138. Esta é uma molécula que além de ser expressa à superfície de células plasmáticas, é também libertada da superfície celular, ficando retida na matriz extracelular e nas zonas de fibróticas da medula óssea [3, 4]. O papel do CD138 na patogénese do MM e doenças associadas parece ser bastante semelhante ao papel desempenhado pelo ácido hialurónico, ligando várias moléculas bioativas que são potentes fatores de crescimento no MM (por exemplo: IL-6, IL-7, IL-8, Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF), Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)). Por outro lado, o CD138 é capaz de ligar e degradar osteoprotegrina (OPG), uma molécula conhecida pelas suas propriedades de inibição de osteoclastos, o que vai aumentar o potencial osteolítico da doença [4]. Tendo em conta os vários mecanismos de ligação de células plasmáticas de mieloma à matriz extracelular e todos os efeitos que essas ligações vão promover ao nível da progressão da doença e da sua manutenção, parece bastante provável que os mecanismos de adesão à matriz extracelular sejam suficientes para proporcionar às células de mieloma uma proteção contra drogas usadas no tratamento da doença, promovendo assim a manutenção da doença e a acumulação de mais resistências a drogas, tornando deste modo as células plasmáticas de mieloma múltiplo bastante resistentes [4]. Além da matriz extracelular à qual as células de MM se ligam, também existem componentes celulares no microambiente medular que têm um papel extremamente importante na ligação e manutenção das células malignas no seu ambiente ideal, a medula óssea.

#### 1.4 As Células Mesenquimais (MSC)

Entre os vários tipos celulares que interagem com as células de MM encontram-se osteoblastos, osteoclastos, células T, células NK e NKT, células dendríticas, células supressoras derivadas de linha mielóide (MDSCs), adipócitos e células mesenquimais (MSC), também conhecidas por células estromais da medula óssea [3, 14]. As células mesenquimais são células *stem* adultas multipotentes com capacidade de autorrenovação que conseguem dar origem a estroma da medula óssea, osso, cartilagem, gordura e, pelo menos em ratos, a músculo esquelético [15]. Estas células são os maiores produtores de elementos estruturais do microambiente medular tais como proteínas da matriz extracelular e algumas proteínas da membrana basal. São células que têm a capacidade de regular o equilíbrio entre os vários componentes do nicho medular, através do seu papel de apoio na regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular ao nível da hematopoiese [4]. Inicialmente julgava-se que as MSC apenas podiam ser isoladas a partir da medula óssea. Contudo, já foi possível identificar células com características de células mesenquimais noutros tecidos como por exemplo, no cordão umbilical, tecido adiposo, glândulas salivares e noutros órgãos humanos como por exemplo o intestino [14]. Apesar da designação usualmente aplicada para denominar este tipo celular, ainda se levantam questões sobre a verdadeira capacidade das células mesenquimais para poderem ser consideradas verdadeiras células *stem* [14, 16]. Apesar de todo o interesse demonstrado nos últimos anos na investigação sobre células mesenquimais e nas suas possíveis aplicações clínicas, o conhecimento da biologia das MSC continua a ser bastante escasso. Presentemente, as características fisiológicas das MSC *in vivo* não são completamente claras, uma vez que a maior parte das observações foram recolhidas por observação indireta, através de estudos *in vitro* feitos em culturas celulares de MSC. Historicamente, a primeira vez que se descreveram percursoros não-hematopoiéticos derivados da medula óssea foi na década de 1970 por *Friedenstein et al.* [17, 18]. Este grupo de investigadores isolou medula óssea, que foi posteriormente sujeita a uma incubação numa atmosfera húmida, usando frascos de plástico para fazer a cultura celular. Após alguns dias observaram uma população heterogénea de células aderentes ao plástico. Durante os primeiros dias de incubação foram surgindo pequenas colónias de células fibroblastóides, rodeadas por outras células mononucleares. Essas células fibroblastóides foram denominadas na altura por fibroblastos formadores de colónias (CFU-F). Inicialmente pensava-se que o impacto destas células seria apenas ao nível da hematopoiese. Vários anos mais tarde, Owen sugeriu que poderia existir um grupo de células *stem* estromais, residentes no seu nicho próprio. Estas células teriam a

capacidade de autorrenovação e de dar origem a outras células estromais maduras. Estas células produziram proteínas constituintes da matriz celular e outras moléculas solúveis fundamentais para a hematopoiese [14]. Baseado nos estudos anteriores, no início dos anos 1990, *Caplan* descreveu o processo mesengénico de diferenciação celular a partir de células progenitoras imaturas (em vez de *stem*), em múltiplos tipos de células maduras das linhas mesodermiais (por exemplo: adipócitos, osteoblastos, condrócitos). *Caplan* introduziu assim o termo célula *stem* mesenquimal para classificar estas células progenitoras [19, 20]. O mesênquima é denominado como o tecido conectivo laxo embrionário que deriva da mesoderma e que vai diferenciar-se em tecido hematopoiético e conectivo.

As células mesenquimais apresentam assim duas funções principais: uma função trófica e outra imunomodulatória [21].

### **1.5 Caracterização das Células Mesenquimais**

Ao longo dos anos tem sido feito um esforço para determinar um fenótipo que permita identificar corretamente células mesenquimais por imunofenotipagem, a capacidade de diferenciação nas três vias clássicas (adipócito, condrócito e osteoblasto) de linhagem mesodermal continua a ser o único critério fundamental para a definição deste tipo celular [14]. No entanto, e apesar do carácter heterogéneo desta população celular, já existe uma variedade de marcadores celulares que permitem uma classificação imunofenotípica destas células. A classificação das células mesenquimais pode ser feita através de Citometria de fluxo recorrendo a uma combinação de marcadores de superfície que no seu todo consigam caracterizar o fenótipo destas células. Nos últimos anos, o perfil de marcadores de superfície células das MSC tem sido alvo de estudo para muitos grupos de investigação. Apesar dos esforços efetuados nesse sentido, até hoje ainda não foi identificado qualquer marcador específico das MSC que permita definir inequivocamente estas células. Assim sendo, para caracterizar adequadamente as MSC, é necessário recorrer à sua capacidade de diferenciação, para além da sua capacidade de aderência ao plástico. A nível fenotípico a abordagem a seguir passa pela utilização de painéis de marcadores que através dos seus critérios de positividade ou negatividade levem à identificação das células mesenquimais [14]. De acordo com o *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* da Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT) as MSC devem ser positivas para CD105, CD90, CD73 e negativas para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e para o HLA-DR do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) [22]. Contudo, nenhum destes marcadores ou combinação de marcadores parece constituir um parâmetro fiável da capacidade *stem* das várias populações de MSC

estudadas nem garantir um elevado grau de pureza na seleção de MSC. Quando os estudos em MSC são efetuados a partir de cultura celular, as condições experimentais parecem assumir um papel importante no padrão de expressão de marcadores superficiais nestas células, podendo inclusive causar um certo grau de heterogeneidade. Assim sendo, culturas celulares que utilizem diferentes processos de isolamento das MSC podem levar à expressão de padrões de marcadores de superfície semelhantes, mas não necessariamente iguais. Deste modo, a comparabilidade dos vários estudos torna-se difícil de avaliar e conclusões a serem tiradas devem ser cuidadosamente avaliadas [14]. Além dos marcadores referidos pelo *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee*, outros têm sido mencionados para tentar caracterizar fenotipicamente as MSC. Desse modo, nas MSC também podem ser encontrados à sua superfície marcadores como CD49b, CD105, CD73, CD200, CD271. No entanto, e à semelhança de outros marcadores referidos anteriormente, nenhum destes é exclusivo das MSC, sendo expressos noutros tipos celulares. Mais uma vez, estes dados apontam no sentido de um perfil para identificação das MSC baseado na positividade ou negatividade de um grande número de marcadores. Dos vários marcadores referidos até ao momento, o CD271 (também designado por LNGFR – Low affinity nerve growth receptor) aparenta ser um dos melhores para o isolamento de células mesenquimais a partir de células mononucleares da medula óssea [14, 23, 24]. Esta proteína embora seja expressa principalmente em células do sistema nervoso, também já foi detetada noutras células como melanócitos, monócitos e linfócitos. As células que expressam CD271 são capazes de se diferenciar em várias linhagens de células mesenquimais [14]. Este marcador é altamente expresso nas MSC *in vivo*. Utilizado em associação com outros marcadores como por exemplo o CD45 (marcador hematopoiético), é possível isolar e identificar células mesenquimais multipotentes. Assim sendo, o CD271 pode tornar-se num marcador que garanta um grau de especificidade e seletividade para a purificação de MSC nativas [25]. Tendo em conta uma revisão feita por *Lindner* o perfil de expressão de marcadores de superfície nas MSC é o que se encontra descrito na Tabela 1.

**Tabela 1 – Marcadores de superfície expresso em MSC humanas derivadas de medula óssea. Adaptado de Lindner et al (Tranfus Med Hemother 2010;37:75-83)**

| CD (cluster of differentiation) | Molécula                     | MSCs |
|---------------------------------|------------------------------|------|
| 11a                             | integrin $\alpha$ L chain    | –    |
| 11b                             | integrin $\alpha$ M chain    | –    |
| 13                              | aminopeptidase N             | +    |
| 14                              |                              | –    |
| 19                              |                              | –    |
| 29                              | integrin $\beta$ 1 chain     | +    |
| 34                              |                              | –    |
| 44                              | hyaluronan recetor           | +    |
| 45                              |                              | –    |
| 49a                             | integrin $\alpha$ 1 chain    | +    |
| 49b                             | integrin $\alpha$ 2 chain    | +    |
| 49c                             | integrin $\alpha$ 3 chain    | +    |
| 49d                             | integrin $\alpha$ 4 chain    | +    |
| 49e                             | integrin $\alpha$ 5 chain    | +    |
| 51                              | integrin $\alpha$ v chain    | +    |
| 54                              | ICAM-1                       | +    |
| 58                              | LFA-3                        | +    |
| 61                              | integrin $\beta$ 3 chain     | +    |
| 62L                             | L-selectin                   | +    |
| 71                              | transferrin recetor          | +    |
| 73                              | ecto-5'-nucleotidase         | +    |
| 79a                             |                              | –    |
| 90                              | Thy-1                        | +    |
| 102                             | ICAM-2                       | +    |
| 104                             | integrin $\beta$ 4 chain     | +    |
| 105*                            | endoglin: TGF- $\beta$ R III | +    |
| 106                             | VCAM-1                       | +/-  |
| 109                             |                              | +    |
| 117                             | c-KIT / SCFR                 | –    |
| 120a                            | TNF IR                       | +    |
| 120b                            | TNF IIR                      | +    |
| 121a                            | IL-1R                        | +    |
| 123                             | IL-3R $\alpha$               | +    |
| 124                             | IL-4R                        | +    |
| 126                             | IL-6R                        | +    |
| 127                             | IL-7R                        | +    |
| 133                             | AC133                        | –    |
| 140a                            | PDGF-R / PDGFR $\alpha$      | +    |
| 140b                            | PDGFR $\beta$                | –    |
| 146                             | MUC18, S-endo                | +    |
| 271                             | NGFR                         | -/+  |

### 1.6 Abordagem Prática para Caracterização Fenotípica de MSC por Citometria de Fluxo

Tendo em conta a enorme quantidade de moléculas que podem ser associadas para avaliar as MSC, foi elaborado um painel para a execução do trabalho prático que deu origem a esta tese. Assim sendo serão abordados os marcadores utilizados para a caracterização das células mesenquimais. O CD11b é a cadeia  $\alpha$  da cadeia da integrina

MAC-1 e é um marcador que as MSC não expressam. A sua função está associada a mediação das interações entre os neutrófilos e monócitos com o endotélio estimulado e à fagocitose de partículas revestidas pelo componente iC3b do sistema complemento ou IgG [9]. O CD13 é uma aminopeptidase N (APN) e é expresso em grande quantidade pelas MSC. Também é fortemente expresso nos progenitores de neutrófilos e monócitos, neutrófilos e monócitos maduros e osteoclastos [9]. A sua função não é bem conhecida, sendo que a sua ação como proteína processadora de antígenos na endocitose e como molécula sinalizadora já foi associada a vários processos complexos incluindo a migração celular, sobrevivência celular e angiogénese [26]. O CD24 é uma molécula expressa por células de linhagem B, não sendo expressa por plasmócitos. Nas MSC não existe expressão de CD24 [9]. O CD29 constitui a cadeia  $\beta 1$  da integrina VLA-1. As MSC expressam CD29 à superfície. Sendo uma integrina, o papel do CD29 estará relacionado com fenómenos de adesão e de migração celular [27]. O CD34 é uma glicoproteína que está envolvida em fenómenos de adesão célula-célula. É expresso em células-tronco hematopoiéticas primárias e progenitoras, células endoteliais dos pequenos vasos, fibroblastos embrionários e tecido nervoso adulto, no entanto, não é expresso por células mesenquimais [9]. O CD45 que também pode ser conhecido por antígeno leucocitário comum (LCA) é uma molécula que é encontrada em todas as células de linhagem leucocitária, sendo que as suas diversas isoformas podem ser características de determinados grupos celulares. Trata-se de uma molécula que não é expressa pelas MSC. A nível funcional, assume um papel essencial na ativação celular mediada pelos recetores de antígeno das células B e T [9]. Quanto ao CD49e, trata-se da cadeia  $\alpha$  da integrina VLA-5. É uma integrina que se associa ao CD29, ligando-se à fibronectina e à invasina. Desta forma, a sua função principal estará relacionada com processos de adesão celular, mas como outras integrinas também poderá desempenhar um papel a nível da sinalização celular [9]. O CD73 é uma molécula que também pode ser designada por Ecto-5'-nucleotidase. É expresso pelas MSC, mas também por subpopulações das células B e T, células dendríticas foliculares, células endoteliais e células epiteliais. É uma molécula que promove a conversão de nucleótidos extracelulares nos seus respetivos nucleosídeos permeáveis para as membranas celulares. De facto a produção de adenosina extracelular, é capaz de inibir a atividade das células T quer em fases de ativação ou em fases efectoras, assim como a atividade imune das células NK [28]. Para além desta função o CD73 aparenta estar envolvido em fenómenos de migração das MSC, já que *Ode et al.* demonstraram que a estimulação biomecânica das MSC reduzia a expressão de CD73 e a mobilidade celular [27]. O CD90, também conhecido por Thy-1 é

uma molécula que é expressa em vários grupos celulares nomeadamente em células tronco-hematopoiéticas e células T periféricas. Nas MSC a expressão de CD90 é muito intensa. A nível funcional, o CD90 aparenta estar envolvido na co-estimulação de linfócitos e também na possível inibição da proliferação e diferenciação das células tronco hematopoiéticas [9]. Desta forma contribuiria para a função reguladora das MSC ao nível do microambiente medular. O CD106 ou Vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) é uma molécula de adesão que é um ligando para a integrina VLA-4. É expresso essencialmente em células endoteliais, mas também é expresso com fraca intensidade nas células mesenquimais [14, 29]. O CD106 exerce funções ligadas a fenómenos de adesão celular ao nível do endotélio que permitem a fixação e extravasamento de células efectoras para os tecidos com processos inflamatórios decorrentes. Por outro lado, é uma molécula importante ao nível da maturação de linfócitos B, uma vez que a sua expressão por MSC permite a adesão das células pro-B a partir da integrina VL4 expressa por estas células. Este contacto vai permitir a interação entre o c-Kit (CD117) à superfície das células pro-B com o SCF nas células mesenquimais. Esta interação vai ativar um sinal que leva à expressão de recetores de IL-7 na célula pro-B. Quando estes ligam IL-7 proveniente das MSC, fazem com que a célula pro-B mature e passe para o estágio pré-B [9]. Esta função do CD106 realça o carácter de regulação do microambiente medular das MSC. As propriedades do CD271 (LNGFR) já foram mencionadas anteriormente, sendo de reforçar a ideia que este provavelmente seja o melhor marcador para caracterizar células mesenquimais da medula óssea frescas. Após cultura *in vitro* as MSC deixam de expressar CD271 [14]. A avaliação das funções dos vários marcadores que caracterizam as MSC permite ter uma noção mais clara do potencial funcional destas células.

### **1.7 As Células Mesenquimais no Mieloma Múltiplo**

Tal como mencionado anteriormente as células mesenquimais constituem uma população dinâmica de células com capacidade de autorrenovação, diferenciação, imunomodulação e também com efeitos curativos em tumores e lesões. As MSC são capazes de exercer uma função anti tumoral, mas também são capazes de exercer um papel que favoreça o desenvolvimento do tumor e a progressão da doença [30]. No caso do mieloma múltiplo, a maioria dos estudos apontam para que as MSC tenham um efeito pro-tumoral nos plasmócitos de MM [3, 4, 12, 31]. Neste contexto, a complexa rede de interações que constitui o microambiente medular pode ter efeitos modeladores no desenvolvimento da doença. As MSC aparentam desempenhar um papel fundamental neste processo. As MSC aumentam a adesão das células de MM à medula óssea,

protegendo-as da quimioterapia e ajudando a sua acumulação junto ao osso. Esta adesão é mediada por várias moléculas já referidas anteriormente como são os casos do CD44, das integrinas VLA-4 e VLA-5, do LFA-1, CD138, *Neural Cell Adesion Molecule* (NCAM), *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM1) e MCP1. A ligação de CD40 nas células de mieloma ao CD40L nas MSC pode aumentar ainda mais a expressão de moléculas de adesão como VLA-4 e LFA1. Subsequentemente, o aumento da adesão celular, vai ter um efeito estimulante nas MSC fazendo-as secretar citocinas como a IL-6 e VEGF. Este processo vai criar um mecanismo de *feedback* positivo cuja ação vai potenciar o crescimento tumoral [12]. O desenvolvimento das MSC no mieloma múltiplo não é claro, e as suas características fenotípicas e genotípicas ainda não estão totalmente estabelecidas. Alguns resultados sugerem que as MSC no MM são inerentemente anormais e assim permanecerão, mesmo que removidas do microambiente do mieloma, enquanto que outros sugerem que as alterações que as MSC apresentam são derivadas da interação com as células de MM [12]. Há ainda outra teoria referente à origem das MSC de MM que sugere que as MSC e a célula tumoral de MM têm um progenitor comum. No entanto, esta teoria apresenta-se como altamente improvável, uma vez que alterações cromossómicas detetadas nas células de MM não são encontradas nas MSC desses mesmos indivíduos [12]. O desenvolvimento de MSC de MM será provavelmente a consequência de múltiplos fatores, sendo que as alterações verificadas podem variar com o tipo de lesão verificada, entre indivíduos e dentro das várias populações de MSC. Em condições normais, as MSC da medula óssea têm um papel de apoio muito importante para os plasmócitos normais. Supõe-se que a longevidade dos plasmócitos está relacionada com o papel que as MSC desempenham na medula óssea, uma vez que células mesenquimais de outros tecidos como os nódulos linfáticos e o baço não são tão eficazes nessa função [4]. Similarmente, as interações entre as MSC e os plasmócitos de MM são fundamentais para a proliferação e sobrevivência destes últimos. A ação desenvolvida pelas MSC nas células de MM pode ser executada quer pela indução da produção de fatores solúveis de adesão, quer por moléculas de superfície expressas pelas MSC. A interação entre as células mesenquimais da medula óssea e as células de MM parece ser iniciada por uma estimulação bidirecional estabelecida durante as fases iniciais do processo de adesão celular. Isto parece então ativar uma série de cascatas de sinalização que vão levar à expressão de moléculas de membrana e à produção de várias moléculas estimuladoras do desenvolvimento de MM [4]. A migração dos plasmócitos para a medula óssea é facilitada pela produção de CXCL12 no estroma medular, que por sua vez vai-se ligar ao

CXCR4 expresso pelos plasmócitos. Após a chegada à medula óssea, começam a dar-se os primeiros fenómenos de adesão celular que vão promover a síntese de moléculas pro-MM. A ativação da via de NF- $\kappa$ B mediada por estes processos de adesão vai levar a um aumento substancial da produção de IL-6. Consequentemente, a IL-6 estimula a proliferação de células de MM e vai aumentar a expressão de CD44 por essas células o que vai promover o efeito de adesão das células plasmáticas às MSC. Assim sendo, gera-se um efeito de cadeia entre a produção de IL-6 e o aumento da expressão de CD44 que vai aumentar exponencialmente os sinais estimulantes pro-tumorais [4, 12]. A secreção de IL-6 pelas MSC também pode ser ativada por mecanismos independentes de adesão celular, nomeadamente pela secreção de alguns fatores solúveis pelos plasmócitos de MM como por exemplo: *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), e VEGF [4]. A IL-6 é uma das moléculas com maior influência no desenvolvimento do MM. Exerce diversos efeitos nos plasmócitos, estando envolvida na maturação de plasmablastos em plasmócitos na medula óssea. É também um importante fator de crescimento das células de MM, tanto *in vivo* como *in vitro*. Os níveis séricos de IL-6 estão aumentados em indivíduos com mieloma múltiplo ativo e têm uma associação direta com a severidade da doença. A IL-6 também já foi descrita como sendo um forte fator de reabsorção de osso, contribuindo desta forma para a progressão da doença. O mecanismo pelo qual a IL-6 exerce a sua ação favorecendo o crescimento de células de MM, está relacionado com o facto de esta molécula conseguir inibir a apoptose das células tumorais. Outros mecanismos de ação propostos para a promoção do crescimento do MM pela IL-6 são o aumento da expressão da proteína bcl-XL e a fosforilação promovida por esta interleucina na proteína do retinoblastoma (pRB) [32]. Apesar da importante ação anti-apoptótica da IL-6 e proliferativa, existem outras moléculas secretadas pelas MSC que exercem efeito semelhante à IL-6. Nessas moléculas podem incluir-se o *Stem Cell Factor* (SCF), *Stromal Cell-derived Factor 1* (SDF-1), *Macrophage Inflammatory Protein 1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ ), IL-21, *Insulin-like Growth Factor* (IGF), VEGF e *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) [4].

Entre os fatores que são conhecidos por atuar de uma forma parácrina entre as MSC e as células de MM, encontram-se as vias de sinalização hedgehog (Hh), Notch e Wnt. Foi demonstrado que a via Hh é fundamental para manter uma fração de células progenitoras do MM – as “células MM *stem*” [33]. Estas células constituem uma fração celular muito resistente à quimioterapia e, como tal, supõe-se que as MSC exerçam um papel fundamental na sobrevivência e manutenção destas células, contribuindo dessa forma para o carácter incurável da doença. É expectável que o mecanismo por trás deste

processo seja um mecanismo de feedback positivo em que as células tumorais produzem bastantes ligandos para os componentes da via Hh que vão ativar as MSC. Por seu lado, estas células vão produzir vários fatores de crescimento que vão ser fundamentais na sobrevivência das células tumorais [34]. Muito embora, proteínas da via Hh sejam expressas em todos os órgãos linfóides (Sonic Hh nos gânglios linfáticos e no baço), apenas as MSC expressam Indian Hh, o que pode constituir um fator limitante na localização e desenvolvimento do MM ao microambiente medular [35].

A via de sinalização Notch encontra-se ativada tanto nas células de MM como nas MSC. Ambos os tipos celulares expressam recetores e ligandos da via Notch, o que vai resultar numa ativação desta via. Como consequência, as MSC começam a secretar vários fatores de crescimento promotores do MM nomeadamente IL-6, VEGF e IGF-1 [4].

A via de sinalização Wnt desempenha um papel importante ao induzir a adesão celular entre as células de MM e as MSC. A maioria das células de MM expressa o fator Wnt3 que vai ativar a via Wnt3/RhoA/ROCK nas MSC [4]. Quando esta via é ativada, as  $\beta$ -cateninas atuam no núcleo da célula, levando à transcrição de alguns genes envolvidos em vários processos que vão desde a motilidade, a proliferação e a manutenção de células *stem* [34] exercendo desta forma uma ação anti apoptótica nas células de MM.

## **1.8 Alterações das Células Mesenquimais no Mieloma Múltiplo**

Como foi abordado até agora, no mieloma múltiplo, existem uma série de alterações no microambiente da medula óssea que promovem a proliferação e a sobrevivência das células tumorais. Simultaneamente, existem cada vez mais evidências que apontam para que além dessas alterações, as MSC da medula óssea apresentam alterações funcionais independentes da doença que potenciam a progressão da mesma. Já estão descritos alguns defeitos nas várias áreas de ação das MSC quando na presença de MM.

### **1.8.1 Fenótipo**

Fenotipicamente, tem sido documentado que as MSC apresentam um fenótipo normal no MM, ou seja, apresentam um fenótipo semelhante às MSC de dadores sem doença quando se está a referir à expressão de marcadores de superfície nomeadamente ao nível de HLA-DR, CD34, CD45, CD90, CD13, CD73, CD49e, CD44, CD29, CD105, CD133 e CD166 [36-38]. No entanto, existem outros marcadores de superfície que apresentam alterações. Tal é o caso de algumas moléculas de adesão celular que se encontram sobre expressas nas MSC de MM comparando com as MSC de dadores normais. Está descrito que o ICAM-1 (CD54) e o VCAM-1 (CD106) são expressos em maior quantidade pelas MSC no MM do que na ausência da doença. Tal como referido anteriormente, estas

moléculas estão diretamente ligadas a fenômenos de adesão com as células de MM, contribuindo assim para uma maior fixação das células malignas no microambiente medular. As integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 2$  também podem estar aumentadas nas MSC de MM mas esses dados têm de ser confirmados [12]. Outra alteração fenotípica das MSC em MM é a menor expressão de FasL, diminuindo desta forma a apoptose mediada por Fas ao nível das células T [38].

### **1.8.2 Produção e secreção de fatores solúveis**

Várias moléculas produzidas e secretadas pelas MSC encontram-se alteradas no MM. Moléculas estimuladoras do crescimento do MM como o SCF, VEGF, e IL-6 são secretadas em maiores quantidades pelas MSC de MM do que pelas MSC de doadores normais. Moléculas que podem inibir o crescimento e desenvolvimento de células progenitoras como são o caso de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  também são secretadas em maiores quantidades no pelas MSC de MM que nos doadores normais [12].

### **1.8.3 Expressão de proteínas da matriz extracelular**

As células mesenquimais de mieloma múltiplo produzem muito mais fibronectina e colagénio IV que as suas equivalentes em doadores normais. Trata-se de proteínas que fornecem um *feedback* positivo para as células de mieloma múltiplo, favorecendo o efeito de resistência a fármacos por aumento da adesão celular. Similarmente, este efeito de resistência a fármacos também é potenciado por outras moléculas que são sobreproduzidas nas MSC de MM como é o caso do ácido hialurónico e da osteopontina [12].

### **1.8.4 Perfil genético**

Têm sido feitos vários estudos para avaliar o perfil genético das células mesenquimais, de forma a compreender melhor o modo de funcionamento destas células. Alguns estudos mais generalistas mostraram que as MSC apresentavam diferentes perfis genéticos dependendo do tipo de diferenciação que sofriam [39]. Para avaliar o perfil de expressão genética em mieloma múltiplo já têm sido feitos estudos em *microarrays* para determinar quais os genes que são mais expressos nos plasmócitos de MM, dando dessa forma um maior esclarecimento em relação à patofisiologia do MM e corroborando alguns dados já conhecidos [40, 41]. Tendo em conta todo o microambiente característico do MM seria expectável que as MSC tivessem um perfil genético distinto nesta patologia. Foram feitos estudos especificamente para avaliar possíveis alterações no perfil genético das MSC e

efetivamente foram determinadas várias alterações ao nível da expressão génica. Tal como documentado anteriormente, há um aumento significativo na expressão génica de IL-6 nas MSC de MM comparado com as MSC de dadores normais. Outros fatores como a IL-1 $\beta$ , IL17D e Anfirregulina (AREG) membro da família *Epidermal Growth Factor* (EGF) que potenciam a produção de IL-6 também têm a sua expressão génica aumentada nas MSC de MM. Curiosamente, o IGF-1 que é conhecido por ser um importante fator de crescimento em mieloma múltiplo tem uma menor expressão génica nas MSC de MM do que nas MSC de dadores normais. Estes dados apontam para que a produção deste fator de crescimento seja feita por outro tipo celular. O mesmo também se aplica ao SDF-1 que se encontra igualmente menos expresso nas MSC de MM [42]. Outra molécula que é mais expressa nas MSC de MM que nas MSC de dadores normais é o DKK-1 [12, 36, 42]. Trata-se de uma proteína inibidora da via de sinalização Wnt. Está associado a um bloqueio na diferenciação de osteoblastos e a sua secreção está relacionada com lesões ósseas iniciais no MM [36, 42]. Outras moléculas que estão associadas à diferenciação osteoblástica como o WISP-1 e o EDG2 também têm a sua expressão génica diminuída nas MSC de MM comparado com as MSC de dadores normais. Outros fatores pro-tumorais também estão sobre expressos nas MSC de MM. É o caso de algumas moléculas pro-angiogénicas como é o caso de angiopoietina tipo 4 (ANGPT-4), o inibidor do ativador de plasminogénio (PAI-1), e a secretogranina II (SCG2). Por fim, tanto a nível de expressão génica como a nível da concentração proteica, o nível de GDF15 é mais elevado nas MSC de MM do que nas normais. O GDF15 pertence à superfamília de TGF $\beta$  e é um fator de crescimento recentemente associado ao MM. Em indivíduos normais é altamente expresso na placenta e a sua concentração sérica aumenta substancialmente durante a gravidez. A sua concentração também aumenta consideravelmente em vários tipos de cancro, e tem sido apontado como um dos melhores biomarcadores em vários tipos de cancro. *In vitro*, induz a apoptose em alguns tipos celulares e noutros casos pode induzir a apoptose e inibir a proliferação de várias linhas celulares tumorais [21]. Como tal, todas estas alterações levam a dizer que as MSC de MM apresentam um perfil de expressão génica bastante distinto das suas homólogas normais. No estudo de Corre et al. em que foram avaliados os perfis de expressão génica de MSC de medula óssea de indivíduos com MM de estágio III, indivíduos com MGUS e indivíduos normais com o uso de *microarrays* foi possível determinar

grande parte das diferenças atrás mencionada, mas também, foi possível agrupar claramente as MSC normais e as MSC de MM em *clusters* diferentes. Quando se teve em conta as amostras de MGUS (n=5), as amostras ficaram divididas entre os dois *clusters* anteriormente mencionados. Curiosamente, as duas amostras de MGUS que ficaram associadas ao grupo de MSC de MM, expressam duas vezes mais GDF15 que as amostras que ficaram no *cluster* das MSC de dadores normais [42]. Faltam mais estudos deste tipo para averiguar se os indivíduos das amostras de MGUS que se integram no *cluster* das MSC de MM têm um maior risco de desenvolver MM ou se essa evolução é mais rápida que nos outros indivíduos com MGUS.

#### **1.8.5 Capacidade de proliferação e imunomodulação**

Existem diferenças significativas entre as MSC de MM e as MSC de dadores normais no que se refere à sua capacidade de imunomodulação. Através de estudos de proliferação celular foi determinado que as MSC de MM têm uma menor capacidade de bloquear os linfócitos T na fase G0/G1 em comparação com as suas homólogas normais. Por outro lado, as MSC de MM apresentam uma menor capacidade de bloqueio da ativação celular nos linfócitos T, como foi possível observar pela análise da expressão de CD25 e CD69 nestas células. Além destas anomalias no funcionamento das MSC de MM, também a sua capacidade de induzir apoptose nas células T aparenta estar afetada [38].

Em relação à capacidade proliferativa das MSC de MM, ela também está afetada. A taxa de proliferação e diferenciação osteogénica é bastante mais lenta, em parte devido a uma reduzida expressão de recetores de fatores de crescimento e a um aumento da expressão de citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$  comparando com as suas homólogas de dadores normais. Outro fator que aponta nesta direção é o facto de as MSC de MM expressarem consideravelmente mais DKK1 que as MSC normais [12, 36].

Tendo em conta toda a complexidade do microambiente medular, e todas as interações existentes entre as MSC e as células plasmáticas de mieloma múltiplo seria interessante verificar se existe uma correlação entre as alterações cromossómicas recorrentes nas células de plasmáticas de MGUS e mieloma múltiplo (nomeadamente del(13q14) del(17p13) t(4;14), t(11;14), t(14;16) ou del17p) [43] e algum tipo de perfil genético das MSC que seja favorável para a manutenção e/ou progressão da doença. Outro fator que tem sido associado a alterações maturativas em várias linhas celulares em gamapatias é

a expressão de CD117 (c-Kit) [44]. Tendo em conta a importância das MSC na maturação e proliferação de alguns tipos celulares, e uma vez que não existem dados sobre este facto, seria interessante verificar se há correlação entre a expressão deste marcador e algum fenótipo predominante.

## 2 Objetivos

Estudar quantitativamente e qualitativamente a população de células mesenquimais da medula óssea de indivíduos com Gamapatias Monoclonais e a sua possível correlação com outros dados clínico-laboratoriais de interesse, executando mais concretamente os seguintes pontos:

- Quantificar por citometria de fluxo as células mesenquimais de medula óssea de indivíduos com mieloma múltiplo, MGUS e em medulas ósseas normais.
- Estudar a expressão dos diversos marcadores de superfície utilizados para caracterizar e identificar as células mesenquimais por citometria de fluxo.
- Avaliar se existe uma relação entre alterações genéticas recorrentes em mieloma múltiplo e os resultados obtidos para as células mesenquimais.
- Avaliar a relação entre aberrações cromossômicas determinadas por estudos de hibridização *in situ* e os resultados obtidos para as células mesenquimais.



### 3 Material e Métodos

#### 3.1 População em estudo

Para a realização deste estudo, a população escolhida foi constituída por 60 indivíduos, com gamopatias monoclonais provenientes do Departamento de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar de Tondela-Viseu, do Departamento de Medicina do Hospital Distrital da Figueira da Foz e do Departamento de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Demograficamente a população foi constituída por 26 indivíduos do sexo masculino e 34 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 27 e os 87 anos. Clinicamente, após a consulta de diagnóstico os constituintes da população em estudo foram agrupados de acordo com o estágio da doença em que se encontravam naquele momento em: gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), mieloma indolente ou *smouldering multiple myeloma* (SMM) e mieloma múltiplo sintomático (MM). Para o estudo foram colhidas amostras de medula óssea e conservadas em tubos de colheita com EDTA. Clínico-laboratorialmente, a população em estudo caracterizava-se da seguinte forma:

**Tabela 2 – Características laboratoriais da população em estudo.**

| <i>Parâmetro</i>            | <i>Valor médio</i>        |
|-----------------------------|---------------------------|
| Hemoglobina                 | 10,19 g/dL                |
| Leucócitos                  | 6,11x10 <sup>9</sup> /L   |
| Linfócitos                  | 57,98%                    |
| Células Polimorfonucleares  | 30,53%                    |
| Plaquetas                   | 221,33x10 <sup>9</sup> /L |
| Velocidade de sedimentação  | 76,24 mm/hr               |
| Lactato desidrogenase (LDH) | 234,33 UI/L               |
| Cálcio                      | 9,09 mg/dL                |
| Fosfatase Alcalina          | 77,50 UI/L                |
| Creatinina                  | 1,54 mg/mL                |
| Proteínas totais            | 8,45 g/L                  |
| Albumina                    | 3,46 g/dL                 |
| Beta 2 Microglobulina       | 8,17 g/mL                 |
| IgG                         | 27,66 g/L                 |
| IgA                         | 13,65 g/L                 |
| IgM                         | 0,28 g/L                  |

Como população de controlo foram selecionados 10 indivíduos (6 do sexo masculino e 4 do sexo feminino) na mesma faixa etária dos indivíduos em estudo sem sinais clínicos e laboratoriais de gamapatia monoclonal ou de outra patologia hematológica ou imunológica nem de processo inflamatório ativo.

### 3.2 Imunofenotipagem das MSC por citometria de fluxo

A análise multiparamétrica dos antígenos de superfície de células mesenquimais foi executada usando um citómetro de fluxo FACS Canto II equipado com o *software* FACS Diva (Becton Dickinson Biosciences (BD), San José, CA, Estados Unidos da América) e utilizando a seguinte combinação de anticorpos monoclonais:

**Tabela 3 – Combinação de anticorpos monoclonais utilizada na caracterização imunofenotípica das células mesenquimais.**

|               |       |      |      |      |      |      |       |      |
|---------------|-------|------|------|------|------|------|-------|------|
| <b>Tubo 1</b> | CD49e | CD73 | CD34 | CD13 | CD90 | CD29 | CD11b | CD45 |
| <b>Tubo 2</b> | CD106 | NGFR | CD24 | CD13 | CD90 | CD29 | CD11b | CD45 |

Os anticorpos monoclonais utilizados foram: anti-CD11b conjugado com PB (ICRF44, BD Pharmingen, Franklin Lakes, Estados Unidos da América), anti-CD13 conjugado com PeCy7 (Immu103.44, Beckman Coulter, Roissy en France, França), anti-CD24 conjugado com PerCPcy5.5 (ALB9, Beckman Coulter, Roissy en France, França), anti-CD29 conjugado com APC-H7 (TS2/16, Biolegend, San Diego, CA, Estados Unidos da América), anti-CD34 conjugado com PerCPcy5.5 (8G12, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, Ca, Estados Unidos da América) anti-CD45 conjugado com PO (HI30, Invitrogen, Paisley, Reino Unido), anti-CD49e conjugado com FITC (SAM1, Beckman Coulter, Roissy en France, França), anti-CD73 conjugado com PE (AD2, BD Pharmingen, Franklin Lakes, Estados Unidos da América), anti-CD90 conjugado com APC (5E10, BD Pharmingen, Franklin Lakes, Estados Unidos da América), anti-CD106 conjugado com FITC (51-10C9, BD Pharmingen, Franklin Lakes, Estados Unidos da América) e anti-CD271 conjugado com PE (C40-1457, BD Pharmingen, Franklin Lakes, Estados Unidos da América).

A identificação das células mesenquimais foi efetuada recorrendo ao seguinte perfil de expressão fenotípica: CD90<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> e CD11b<sup>-</sup>.

### 3.3 Imunofenotipagem de células plasmáticas

Para a avaliação de marcadores de superfície celular nos plasmócitos a análise multiparamétrica foi executada usando um citómetro de fluxo FACS Canto II equipado

com o *software* FACS Diva (Becton Dickinson Biosciences (BD), San José, CA, Estados Unidos da América), recorrendo à seguinte combinação de anticorpos monoclonais:

**Tabela 4 - Combinação de anticorpos monoclonais utilizada na caracterização imunofenotípica de células plasmáticas.**

|               |      |          |         |       |       |      |      |
|---------------|------|----------|---------|-------|-------|------|------|
| <b>Tubo 1</b> | CD19 | cyLambda | cyKappa | CD138 | CD56  | CD28 | CD45 |
| <b>Tubo 2</b> | CD19 | CD27     | CD28    | CD138 | CD117 | CD38 | CD45 |

Os anticorpos monoclonais utilizados foram: anti-CD19 conjugado com PB (Beckman Coulter, Roissy en France, França), anti-CD27 conjugado com FITC (BD Pharmingen, Franklin Lakes, Estados Unidos da América), anti-CD28 conjugado com PE (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos da América), anti-CD38 conjugado com APC (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos da América), anti-CD45 conjugado com APCH7 (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos da América), anti-CD56 conjugado com PEcy7 (Beckman Coulter, Roissy en France, França), anti-CD117 conjugado com PEcy7 (Beckman Coulter, Roissy en France, França) e anti-CD138 conjugado com PerCPcy5.5 (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos da América).

A solução de lise celular utilizada no processo de marcação dos antígenos de superfície celular foi BD FACS Lysing Solution (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos da América). O PBS utilizado na lavagem e suspensão final das células foi PBS, 10X, pH7.2 diluído da Gibco (Gibco, Paisley, Reino Unido).

O protocolo de marcação celular para análise de imunofenotipagem de células mesenquimais e células plasmáticas em medula óssea por Citometria de fluxo seguido foi o seguinte: em primeiro lugar pipetar 100µL de amostra para cada um dos tubos. De seguida, pipetar os anticorpos monoclonais para cada tubo de acordo com o perfil descrito anteriormente, levando a incubar posteriormente durante 10 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação, lisar com 2mL de FACS Lysing 1X, agitar no vórtex e incubar 10 minutos ao abrigo da luz, levando a centrifugar durante 5 minutos a 1500rpm no fim da incubação. No fim da centrifugação, decantar e adicionar 2mL de PBS 1x, agitar no vórtex e centrifugar durante 5 minutos a 1500rpm. De seguida, decantar e ressuspender em 250µL de PBS 1x. Por fim, passar no FACS Canto II em total até esgotar a amostra.

### 3.4 Análise do estado de ploidia dos plasmócitos

Para fazer a análise do estado de ploidia dos plasmócitos das amostras de mieloma múltiplo, utilizou-se o *kit* de reagentes Cycloscope MM (Cytognos, Salamanca, Espanha), tendo-se seguido o procedimento indicado pelo fabricante do *kit*. A aquisição de dados foi efetuada num citómetro BD FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences (BD), San José, CA, Estados Unidos da América) e a análise dos dados foi feita no *software* ModFit LT (Verity Software House, Topsham, Estados Unidos da América).

### 3.5 Análise por Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A análise de FISH em interfase foi executada em plasmócitos anormais previamente separados por “*cell sorting*” por citometria de fluxo num “*cell sorter*” FACSAria II (Becton Dickinson Biosciences (BD), San José, CA, Estados Unidos da América). Os plasmócitos anormais foram distinguidos dos seus homólogos normais baseando-se no seu perfil de expressão de marcadores aberrantes para plasmócitos: CD19-, CD38<sup>débil</sup>, CD45-, CD56+, CD117+, e/ou expressão monotípica de cadeias citoplasmáticas de imunoglobulina. As sondas utilizadas nesta técnica foram:

- Sondas LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Vysis, Downers Grove, IL, Estados Unidos da América) para análise de translocações no gene IGH na zona cromossómica 14q32 bem como ganhos e deleções nessa mesma região.
- Sondas LSI 13 (RB1) 13q14 SpectrumOrange Probe (Vysis, Downers Grove, IL, Estados Unidos da América).
- Sondas LSI TP53 SpectrumOrange Probe (Vysis, Downers Grove, IL, Estados Unidos da América).
- Sondas LSI FGFR3 SpectrumOrange (Vysis, Downers Grove, IL, Estados Unidos da América).
- Sondas LSI MAF SpectrumOrange (Vysis, Downers Grove, IL, Estados Unidos da América).
- Sondas IGH/CCND1 XT DF FISH Probe Kit (Vysis, Downers Grove, IL, Estados Unidos da América).

Para fazer a análise de FISH foi seguido o seguinte protocolo:

#### Tratamento enzimático e fixação celular:

Incubar com pepsina a 0.005% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) durante 15 minutos a 37°C fazendo a seguinte mistura de reação (1mL de CIH 1N + 99mL Água + 75 µL pepsina). De seguida, lavar duas vezes em PBS (1X) durante 5

minutos à temperatura ambiente (NaCl+Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) (Merck, Darmstadt, Alemanha). A seguir, incubar com formaldeído a 1% em PBS durante 10 min à temperatura ambiente, obedecendo à seguinte mistura de reação (Formaldeído 1%: 92,4mL PBS + 5mL CIMg 1M (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) + 2,6 mL formaldeído a 37% (Panreac S.L.U., Barcelona, Espanha)). Depois da incubação, lavar duas vezes em PBS (1X) durante 5 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se três passos de desidratação com uma duração de 5 minutos em etanol (Panreac S.L.U., Barcelona, Espanha) com concentrações crescentes: 70%, 90%, 100%. A seguir, deixar secar.

#### Desnaturação/Hibridização

Diluir as Sondas 1:50, juntando 49 µL de cDenHyb2 (Insitus, Albuquerque, Estados Unidos da América) mais de 1 µL de sonda. De seguida, colocar 5 µL da sonda diluída na lâmina e aplicar uma lamela de 25X25 e cobrir com *Parafilm* (Pechinney Plastic Packaging Company, Chicago, Estados Unidos da América). A seguir, levar ao termohibridizador: (Abbott, Abbott Park, IL, Estados Unidos da América) utilizando o seguinte programa térmico: desnaturar 6 min a 82°C e hibridizar a 38°C durante a noite.

#### Revelação

Retirar a lamela e o Parafilm que recobre a lâmina de imediato fazer uma lavagem pós-hibridização em 0,4XSSC (Vysis, Downers Grove, IL, Estados Unidos da América) com 0,4% NP-40 (Vysis, Downers Grove, IL, Estados Unidos da América) durante 2 minutos a 72°C, seguida de uma lavagem em 2XSSC com 0,1% NP-40 com a solução de contracoloração DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) durante 1 minuto à temperatura ambiente, preparando a solução de acordo com as seguintes quantidades (70 mL 2XSSC com 0.1% NP-40 + 70 µL de DAPI (0,1 ng/mL)). A seguir, colocar 10 µL de Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos da América), cobrir com uma lamela 24X50 e guardar a -20° C. Por fim, ler no microscópio de fluorescência (Nikon Instruments, Inc, Melville, NY, Estados Unidos da América).

### **3.6 Análise Estatística**

Foi feita uma análise de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade da distribuição dos vários parâmetros quantitativos em estudo. Posteriormente, a análise estatística dos dados fenotípicos das células mesenquimais foi feita recorrendo ao teste não paramétrico de Mann-Whitney para testar a probabilidade de diferenças estatisticamente significativas entre os vários grupos em estudo. Foi efetuada uma análise comparativa entre os quatro grupos em estudo recorrendo a três análises: casos de MGUS vs. MM; SMM vs. MM; casos de MGUS vs. casos Normais e MM vs. casos Normais. Um valor de  $p < 0,05$  foi

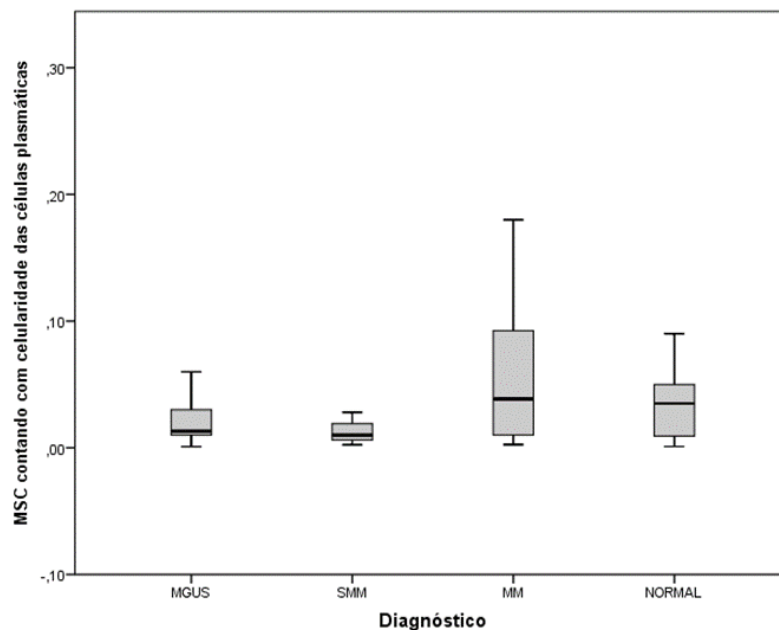
usado para definir significado estatístico. Para estabelecer a possível existência de correlações entre os vários parâmetros estudados, foram efetuadas correlações de Pearson. Um valor de  $p < 0,05$  foi usado para definir significado estatístico.

A análise estatística foi efetuada recorrendo ao *software* de análise estatística IBM SPSS (Versão 20.0, Chicago, IL, Estados Unidos da América).

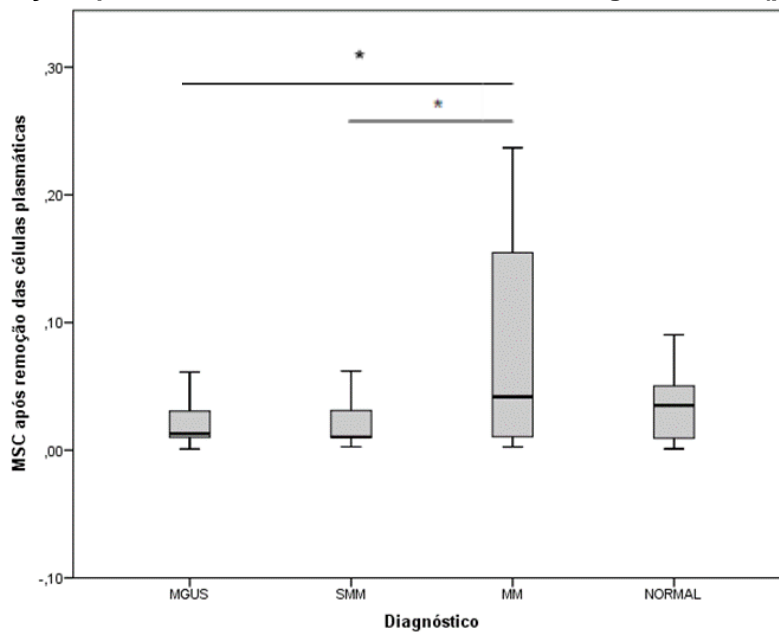
## 4 Resultados

### 4.1 Quantificação de células mesenquimais de medula óssea

A análise estatística da quantificação de células mesenquimais na medula óssea por citometria de fluxo demonstrou a existência de variações significativas na percentagem de MSC na medula óssea de indivíduos com MGUS, SMM, MM e em indivíduos normais. Os resultados obtidos indicam que há uma maior frequência de células mesenquimais na medula óssea de indivíduos com MM quando comparado com os restantes grupos. Para fazer esta análise foi tido em linha de conta o possível efeito que a infiltração da medula óssea por plasmócitos poderia ter na quantificação das MSC. Assim a análise foi feita de duas formas: diretamente, contando com a celularidade total da medula óssea; e após a subtração da percentagem de plasmócitos na medula óssea. Os resultados obtidos após remoção das células plasmáticas da análise evidenciam a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos MGUS e MM ( $p=0,024$ ) e entre os grupos SMM e MM ( $p=0,019$ ), demonstrando assim a existência de uma maior percentagem de células mesenquimais na medula óssea dos indivíduos com doença sintomática em relação aos indivíduos com estádios menos avançados da doença. Por outro lado, não se verificou a existência de qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos MGUS e SMM e os indivíduos sem patologia. Da mesma forma, quando se fez o mesmo tipo de análise tendo em conta a celularidade total da medula óssea. Os resultados obtidos apresentam-se semelhantes, no entanto, o efeito da infiltração da medula óssea por células plasmáticas fez com que essas diferenças não se apresentassem como sendo estatisticamente significativas. Os dados da quantificação de MSC nos vários grupos estudados estão representados esquematicamente nas Figuras 1 e 2.



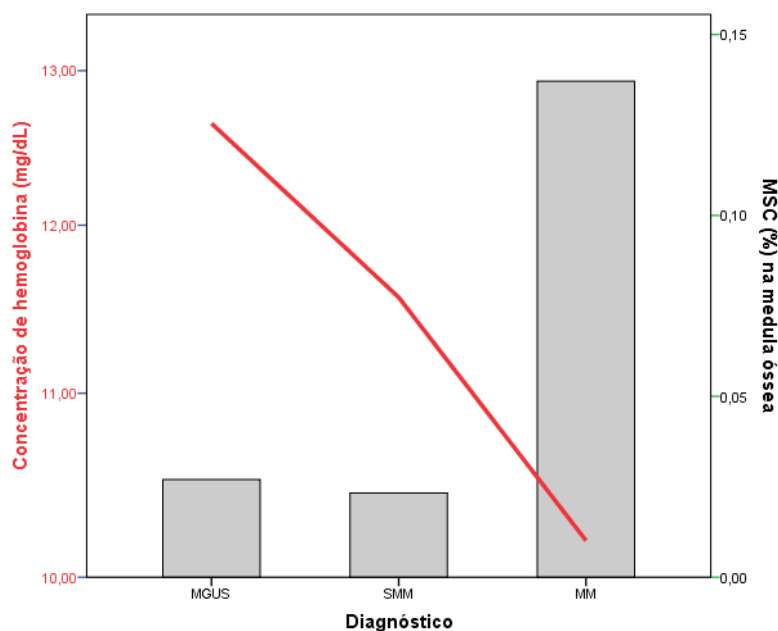
**Figura 1 -** Quantificação em percentagem de células mesenquimais (MSC) na medula óssea de indivíduos com MGUS, SMM, MM e Normais em relação à celularidade total da medula óssea. Os dados representados evidenciam a existência de uma maior percentagem de MSC na medula óssea de indivíduos com MM em relação a todos os outros grupos. As diferenças apresentadas não são estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 2 -** Quantificação em percentagem de células mesenquimais (MSC) na medula óssea de indivíduos com MGUS, SMM, MM e Normais, após remoção da celularidade correspondente à infiltração medular por células plasmáticas. Os dados representados indicam que os indivíduos com MM apresentam uma maior percentagem de MSC na medula óssea que os indivíduos com MGUS e SMM.  $*p < 0,05$ .

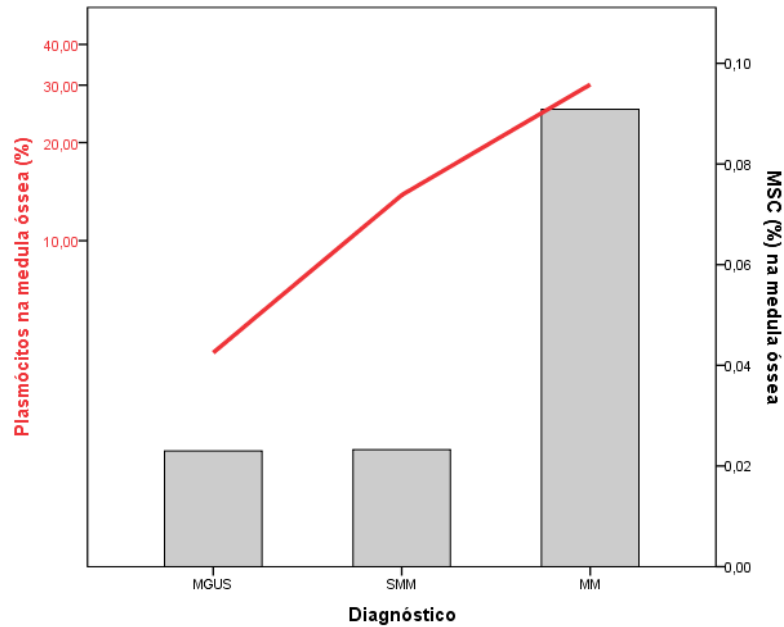
#### 4.2 Correlação entre a frequência de células mesenquimais e parâmetros clínico-laboratoriais caracterizadores da patologia

Após a quantificação das células mesenquimais (MSC) na medula óssea dos indivíduos com doença verificou-se a existência de uma correlação negativa ( $r=0,51$ ;  $p=0,006$ ) com a concentração de hemoglobina. Maiores percentagens de células mesenquimais estão associadas a menores concentrações de hemoglobina no sangue periférico dos indivíduos com gamapatia monoclonal. Esta correlação encontra-se representada graficamente na Figura 3.



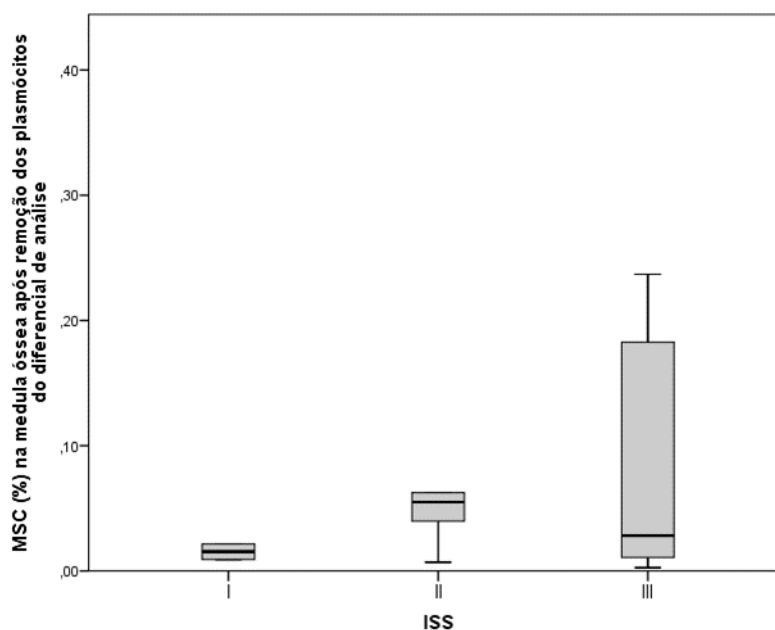
**Figura 3 - Representação gráfica da correlação negativa entre a percentagem de células mesenquimais na medula óssea de indivíduos com gamopatias monoclonais e a concentração de hemoglobina no sangue periférico desses indivíduos. Esta correlação apresentou-se como estatisticamente significativa ( $r=0,51$ ;  $p=0,006$ ).**

Por outro lado, verificou-se uma correlação positiva entre a percentagem de células mesenquimais na medula óssea dos indivíduos estudados e a quantidade de plasmócitos na medula óssea desses mesmos indivíduos. Esta correlação também apresentou um forte significado estatístico com um  $r=0,54$  e  $p=0,008$  e está representada na Figura 4.



**Figura 4 - Representação gráfica da correlação positiva entre a porcentagem de células mesenquimais na medula óssea de indivíduos com gamopatias monoclonais e a frequência de plasmócitos na medula óssea desses indivíduos. Esta correlação apresentou-se como estatisticamente significativa ( $r=0,54$ ;  $p=0,008$ ).**

Tendo em conta a classificação do *International Staging System* dos doentes com mieloma múltiplo, verificou-se que nos doentes que se encontravam classificados havia uma clara tendência para existir uma maior percentagem de células mesenquimais na medula óssea dos mesmos quando estes tinham um estágio de classificação mais elevado. Esta análise foi efetuada após a remoção dos plasmócitos da medula óssea do diferencial de análise. Assim sendo, a média de MSC na medula óssea nos indivíduos classificados como pertencendo ao ISS I foi de 0,01%, nos indivíduos classificados como ISS II foi de 0,07% e nos indivíduos com ISS III foi de 0,23%, como representado na Figura 5.



**Figura 5 - Representação do incremento na percentagem de células mesenquimais na medula óssea com o aumento do estadiamento do *International Staging System*.**

#### 4.3 Fenótipo das células mesenquimais

Os resultados da expressão dos diferentes recetores de superfície nas células mesenquimais, demonstrou que à semelhança de outros estudos efetuados (muito embora esses estudos fossem feitos em células mesenquimais provenientes de cultura celular), o fenótipo das células mesenquimais não difere muito entre os diferentes grupos estudados [31, 37]. Para a maioria dos marcadores de superfície celulares característicos de MSC, não se observou qualquer diferença estatisticamente significativa. No entanto, e contrariamente ao publicado por *Arnulf et al.*, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ao nível da expressão de CD73 (dada pela MIF) quando se comparou o grupo de MM com os grupos MGUS e Normal. Os valores da MIF de CD73 no grupo de MM apresentaram um valor médio de 2958 ( $\sigma=2912$ ), enquanto o grupo de MGUS apresentou uma média de 8922 ( $\sigma=8069$ ) e o grupo de amostras Normais apresentou uma média de 5980 ( $\sigma=2599$ ). Quando se aplicou o teste de Mann-Whitney para comparar os grupos de MGUS e MM, obteve-se um valor de  $p<0,001$ . Ao aplicar-se o mesmo teste para comparar os grupos MM e Normais, obteve-se um valor de  $p<0,004$ . Ao comparar estatisticamente os grupos MM e SMM, verificou-se a existência de uma tendência semelhante à existente nas comparações anteriormente referidas. Assim sendo, verificou-se que o grupo SMM apresentava uma média de MIF de CD73 de 5517 ( $\sigma=3052$ ). O valor obtido no teste de Mann-Whitney foi  $p=0,051$ . Desta forma constatou-

se que nos indivíduos com MM na sua forma ativa, as células mesenquimais da medula óssea expressavam cerca de um 3 vezes menos moléculas de CD73 na membrana do que os indivíduos com MGUS. Por outro lado, as células mesenquimais de indivíduos do grupo MM expressavam cerca de metade de moléculas de CD73 que as suas congêneres dos indivíduos com SMM ou sem patologia. Os dados relativos à expressão de CD73 encontram-se representados na Figura 6-A.

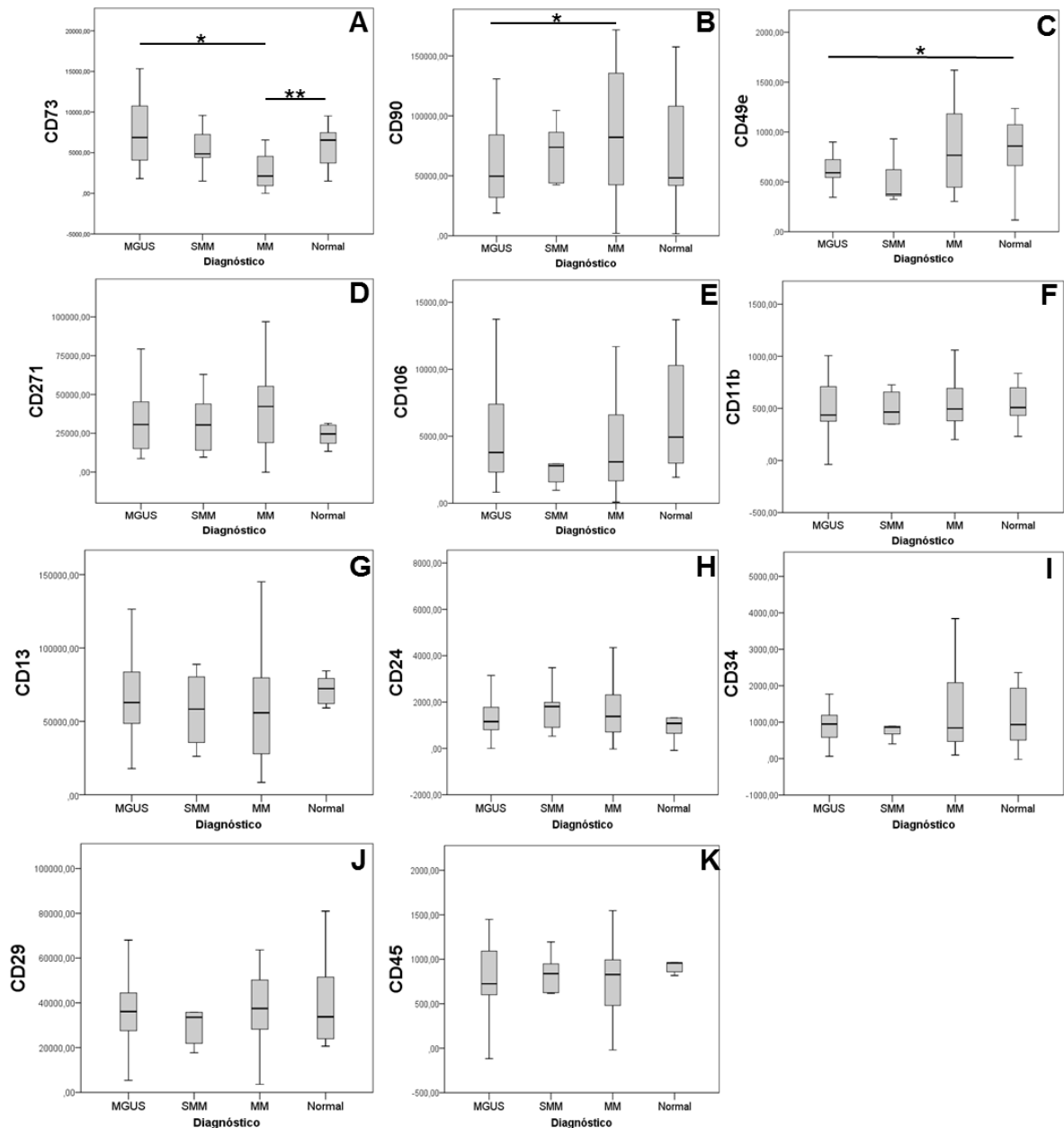
Também se observaram alterações na expressão de CD90 pelas MSC na medula óssea. O valor médio da MIF de CD90 nas MSC de MM foi de 85852 ( $\sigma=51937$ ), enquanto que no grupo de MGUS, o valor obtido foi 58753 ( $\sigma=34120$ ), no grupo de SMM o valor obtido foi de 70223 ( $\sigma=26932$ ) e no grupo dos indivíduos normais o valor médio foi de 67504 ( $\sigma=52721$ ). Aplicando o teste de Mann-Whitney para comparar os grupos em estudo, verificou-se que existia uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo de MGUS com o de MM obtendo-se um valor de  $p=0.049$ . O mesmo não se verificou quando se compararam os grupos MM e SMM ( $p=0,644$ ), MM e Normal ( $p=0,616$ ) e MGUS e Normal ( $p=0,326$ ). Efetivamente, verificou-se que as MSC de indivíduos com MM expressam mais CD90 que todos os outros grupos em estudo. A maior diferença verificou-se quando se comparou o grupo MM com o grupo MGUS, evidenciando uma expressão de CD90 sensivelmente superior em 1,5 vezes no grupo MM. Igualmente, verificou-se que existe um incremento na expressão de CD90 desde o grupo MGUS, passando pelo grupo SMM até ao grupo MM. Os dados relativos à expressão de CD90 encontram-se representados na Figura 6-B.

Outro resultado com significado estatístico foi ao nível da expressão de CD49e, verificando-se que os grupos MGUS e SMM expressavam menos CD49e que o grupo MM e que o grupo de indivíduos sem patologia. Estatisticamente verificou-se uma diferença significativa quando se comparou o grupo MGUS com o grupo Normal, tendo-se obtido um valor de  $p=0,048$ . Outra comparação que evidenciou uma diferença considerável entre grupos, ainda que sem significado estatístico claro ( $p=0,059$ ) foi a efetuada entre o grupo MM e o grupo SMM. Desta forma verificou-se que as células mesenquimais do primeiro grupo expressavam cerca de 1,5 vezes mais moléculas de CD49e que as do segundo grupo. Por outro lado, ao comparar o grupo MM com indivíduos normais, não se encontraram diferenças com significado estatístico. Os dados relativos à expressão de CD49e encontram-se representados na Figura 6-C.

Verificou-se também, embora sem diferenças estatisticamente significativas, aquilo que parece ser uma tendência para as MSC de medula óssea adquirirem uma maior expressão de CD271 com o evoluir da doença, uma vez que a MIF deste marcador apresentou um valor médio de 26802 ( $\sigma=13558$ ) no grupo normal, 32584 ( $\sigma=19318$ ) no grupo de MGUS e 41856 ( $\sigma=28616$ ) no grupo de MM. Em relação ao grupo SMM o valor de MIF detetado foi bastante semelhante ao obtido no grupo MGUS, sendo de 32181 ( $\sigma=21924$ ). Desta forma, os resultados obtidos neste estudo apontam para uma expressão de CD271 pelas MSC de indivíduos com MM aumentada em relação às MSC de indivíduos sem patologia. Já nos indivíduos com MGUS, a diferença não é tão exuberante. Os dados relativos à expressão de CD271 encontram-se representados na Figura 6-D.

Por outro lado verificou-se uma possível tendência para as MSC alterarem a expressão de CD106 diminuindo ao longo da progressão da doença. O valor médio da MIF de CD106 foi de 6613 ( $\sigma=4440$ ) no grupo normal, 5149 ( $\sigma=3846$ ) no grupo de MGUS e 4054 ( $\sigma=3310$ ). Os dados relativos à expressão de CD73 encontram-se representados na Figura 6-E.

Em relação aos outros marcadores de superfície celular estudados nas MSC não se verificou a existência de qualquer diferença significativa entre os vários grupos. Os dados relativos a esses marcadores encontram-se representados na Figura 6 (F-K).



**Figura 6 – Expressão dos vários marcadores celulares pelas células mesenquimais da medula óssea nas várias populações estudadas. (A) Os resultados demonstram uma menor expressão de CD73 pelas MSC de indivíduos com MM em relação a todos os outros grupos estudados. Verifica-se uma tendência para a diminuição da expressão de CD73 pelas MSC da medula óssea, à medida que a doença vai progredindo. (B) Os dados representados demonstram uma maior expressão de CD90 pelas MSC da medula óssea de MM em relação ao grupo MGUS e SMM. (C) Os dados representados demonstram uma maior expressão de CD49e pelas MSC da medula óssea de MM em relação ao grupo MGUS e SMM. (D) Os dados representados indicam uma maior expressão de CD271 pelas MSC da medula óssea de indivíduos com MM, ainda que as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas. (E) Os resultados apresentados demonstram uma ligeira diminuição da expressão de CD106 pelas MSC em MM. As diferenças verificadas não são estatisticamente significativas. (F-K) Representação de dados para os marcadores CD11b, CD13, CD24, CD29, CD34 e CD45. Os valores apresentados correspondem aos valores médios de fluorescência detetados. (\* p<0,05; \*\*p<0,001).**

#### **4.4 Relação com populações precursoras hematopoiéticas presentes na medula óssea**

Após a análise estatística verificou-se que praticamente não existiam diferenças estatisticamente significativas na quantidade de células mesenquimais entre os vários grupos estudados no que diz respeito aos vários grupos celulares de precursores hematopoiéticos estudados após remoção dos plasmócitos da medula óssea do diferencial de análise: células CD34+, precursores CD117+, precursores CD117+ com diferenciação a neutrófilo, precursores CD117+ com diferenciação a linha eritróide, precursores linfóides B e hematogonias. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa ao nível das células CD34+, quando se comparou os grupos de MGUS e MM. Estatisticamente, o valor médio da percentagem de células CD34+ no grupo de MGUS foi de 0,5543 ( $\sigma=0,269$ ), enquanto que no grupo de MM o valor médio foi consideravelmente mais baixo ficando por 0,3826 ( $\sigma=0,364$ ). No teste de Mann Whitney obteve-se um valor de  $p=0,005$ . Quando se comparou a percentagem de células CD34+ na medula óssea de indivíduos com MM e indivíduos normais não se encontrou diferença estatisticamente significativa, no entanto, este valor encontrava-se mais elevado no grupo normal apresentando uma média de 0,4841 ( $\sigma=0,206$ ). Também se encontrou uma diferença significativa ao nível dos precursores CD117+ entre os grupos SMM e Normal. Assim sendo no grupo SMM havia uma maior frequência destes precursores na MO em comparação com os indivíduos com patologia. O valor percentual médio de precursores CD117+ na MO dos indivíduos com SMM foi de 1,580 ( $\sigma=0,455$ ) enquanto que no grupo Normal o valor médio foi de 0,825 ( $\sigma=0,257$ ). Desta forma verificou-se que existe quase o dobro da quantidade destes precursores na MO dos indivíduos com SMM em comparação com os indivíduos sem patologia. A mesma análise não revelou qualquer diferença ainda que estatisticamente não significativa para os restantes parâmetros estudados. De notar que não foi estabelecida qualquer correlação entre a frequência de células mesenquimais na medula óssea dos indivíduos estudados e a frequência de qualquer uma das populações de precursores hematopoiéticos estudados. Os resultados da análise aos vários componentes precursores hematopoiéticos estão representados nas tabelas 3 e 4.

**Tabela 3 - Valores percentuais (com desvio padrão) das várias populações de precursores hematopoiéticos estudadas por citometria de fluxo.**

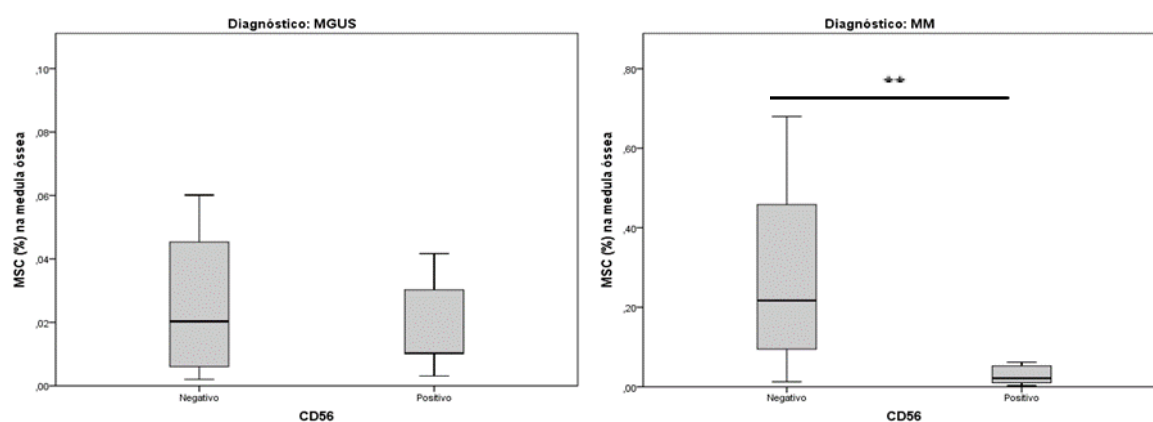
| <i>Diagnóstico</i> | <i>Células CD34+</i> | <i>Precursores CD117+</i> | <i>Precursores CD117+ c/ diferenciação a neutrófilo</i> | <i>Precursores CD117+ c/ diferenciação a linha eritróide</i> | <i>Precursores linfóides B</i> | <i>Hematogónias</i> |
|--------------------|----------------------|---------------------------|---|--|--------------------------------|---------------------|
| MGUS               | 0,5543±              | 1,633±                    | 34,84±  | 22,64±   | 0,4046±                        | 0,0986±             |
|                    | 0,269                | 2,876                     | 14,94   | 12,09  | 0,6726                         | 0,2431              |
| SMM                | 0,3350±              | 1,580±                    | 39,75±  | 15,5±  | 0,1324±                        | 0,0280±             |
|                    | 0,195                | 0,455                     | 26,17   | 5,45   | 0,2153                         | 0,0409              |
| MM                 | 0,3826±              | 1,089±                    | 36,55±  | 17,73±   | 0,3040±                        | 0,0724±             |
|                    | 0,364                | 1,106                     | 17,73   | 9,67   | 0,5529                         | 0,1215              |
| Normal             | 0,4841±              | 0,825±                    | 33,38±  | 14,13±   | 0,3495±                        | 0,0753±             |
|                    | 0,206                | 0,257                     | 8,75  | 6,62   | 0,5437                         | 0,1015              |

**Tabela 4 - Valores de p obtidos no teste de Mann Whitney. (\* p<0,05)**

| <i>Grupos de análise</i> | <i>Células CD34+</i> | <i>Precursores CD117+</i> | <i>Precursores CD117+ c/ diferenciação a neutrófilo</i> | <i>Precursores CD117+ c/ diferenciação a linha eritróide</i> | <i>Precursores linfóides B</i> | <i>Hematogónias</i> |
|--------------------------|----------------------|---------------------------|---|--|--------------------------------|---------------------|
| MGUS vs. MM              | 0,005*               | 0,406                     | 0,646   | 0,169  | 0,875                          | 0,704               |
| SMM vs. MM               | 0,818                | 0,112                     | 0,706   | 0,869  | 0,380                          | 0,684               |
| MGUS vs. Normal          | 0,582                | 0,236                     | 0,726   | 0,074  | 0,764                          | 0,912               |
| MM vs. Normal            | 0,131                | 0,696                     | 0,765   | 0,368  | 0,550                          | 0,802               |
| MGUS vs. SMM             | 0,087                | 0,195                     | 0,800   | 0,392  | 0,408                          | 0,404               |
| SMM vs. Normal           | 0,257                | 0,017*                    | 0,932   | 0,668  | 0,219                          | 0,497               |

#### 4.5 Correlação entre a percentagem de células mesenquimais e marcadores fenotípicos de prognóstico em plasmócitos em mieloma múltiplo

Verificou-se a existência de uma diferença estatisticamente significativa ao nível da percentagem de MSC na medula óssea dos indivíduos com MM quando o grupo foi estratificado em relação à expressão do marcador de superfície celular CD56. Assim sendo, verificou-se que nos indivíduos em que se observou a expressão aberrante de CD56 pelas células plasmáticas existia uma menor percentagem de células mesenquimais na medula óssea, em comparação aos indivíduos cujas células plasmáticas não expressavam CD56 ( $p=0,003$ ). Os dados referentes à expressão plasmocitária de CD56 encontram-se representados na Figura 7.

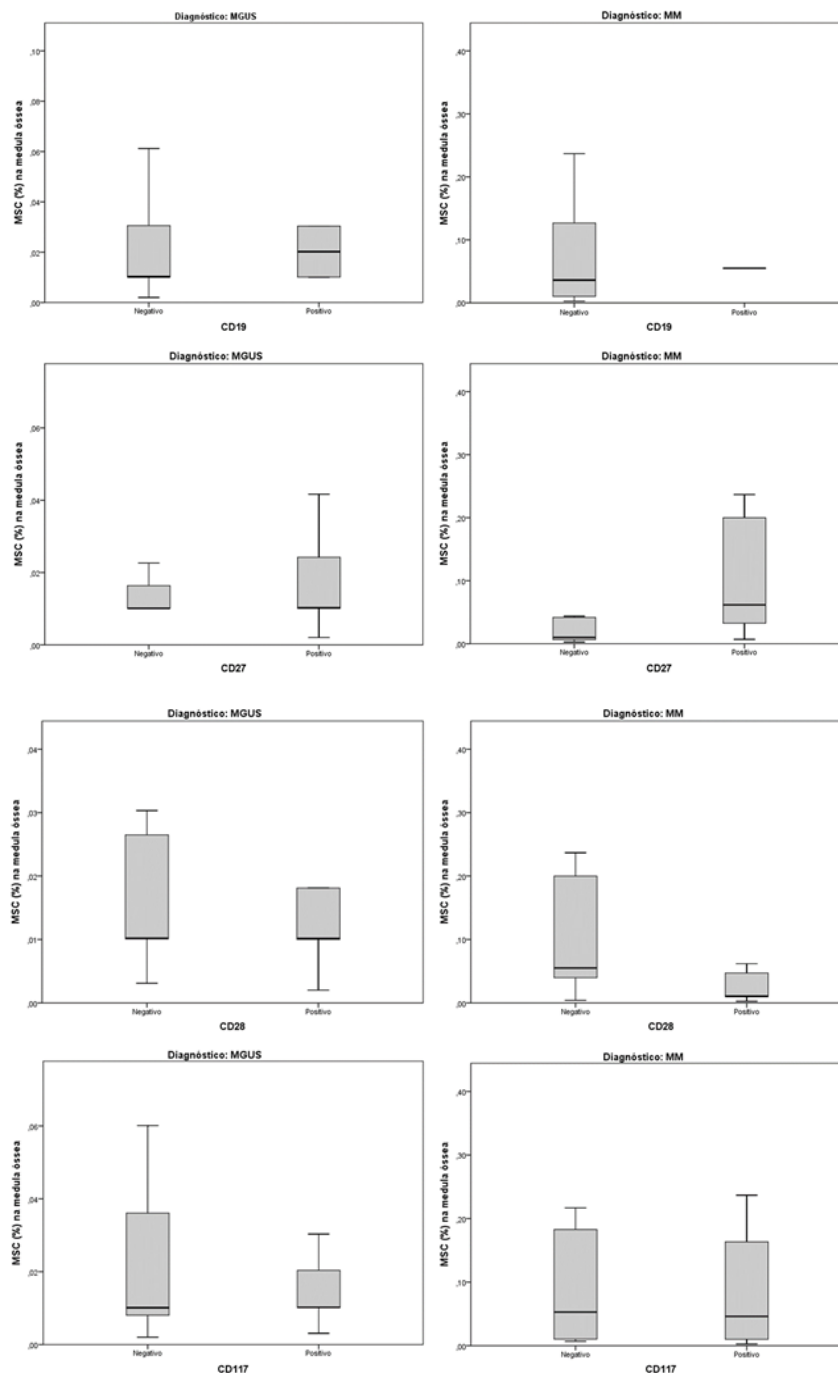


**Figura 7 - Relação entre a frequência de células mesenquimais na medula óssea e a expressão de CD56 pelas células plasmáticas em MGUS e MM. No caso de MM verifica-se uma frequência bastante diminuída de MSC nos indivíduos com expressão positiva de CD56. (\*\*  $p<0,01$ ).**

Quando se fez o mesmo tipo de análise para os outros marcadores aberrantes de célula plasmática (CD19, CD27, CD28 e CD117) não se verificou qualquer diferença significativa ao nível de mieloma múltiplo. Em relação ao grupo de indivíduos com MGUS não se encontrou qualquer diferença em relação às células mesenquimais associadas aos marcadores fenotípicos aberrantes de célula plasmática. Os resultados encontram-se representados na tabela 6 e na Figura 13.

Tabela 5 - Frequências de expressão dos diversos marcadores de prognóstico em MM e valor de  $p$  do teste estatístico de Mann-Whitney executado para verificar a possível associação entre a percentagem de células mesenquimais na medula óssea e a expressão de vários marcadores de prognóstico nos plasmócitos. (\*\*  $p < 0,01$ ).

| <i>Marcador</i> | <i>MGUS</i>   | <i>Valor de p</i> | <i>MM</i>     | <i>Valor de p</i> |
|-----------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|
| CD19            | Positivo (2)  | 1,000             | Positivo (22) | 0,651             |
|                 | Negativo (22) |                   | Negativo (1)  |                   |
| CD27            | Positivo (15) | 0,859             | Positivo (13) | 0,063             |
|                 | Negativo (3)  |                   | Negativo (7)  |                   |
| CD28            | Positivo (10) | 0,657             | Positivo (7)  | 0,143             |
|                 | Negativo (8)  |                   | Negativo (13) |                   |
| CD56            | Positivo (20) | 0,877             | Positivo (24) | 0,003**           |
|                 | Negativo (4)  |                   | Negativo (7)  |                   |
| CD117           | Positivo (11) | 0,892             | Positivo (17) | 0,792             |
|                 | Negativo (7)  |                   | Negativo (7)  |                   |



**Figura 8 - Representação gráfica da frequência de células mesenquimais em relação à expressão aberrante de alguns marcadores pelas células plasmáticas em MGUS e MM.**

#### **4.6 Correlação entre a frequência de células mesenquimais e alterações genéticas recorrentes em Mieloma Múltiplo**

Havendo uma grande quantidade de alterações genéticas descritas e analisadas em mieloma múltiplo decidiu-se agrupar as várias alterações genéticas de acordo com o seu valor prognóstico tendo em conta publicações científicas Sawyer [45] e de Liebsh et al. [46].

As alterações genéticas consideradas de bom prognóstico foram: CCND1 t(11;14) e ganhos de material genético. As alterações de pior prognóstico foram: del13q, del p53, cMAF t(14;16), FGFR3 t(4;14), assim como perdas de material genético. Assim sendo, as amostras de mieloma múltiplo às quais foram efetuadas análise de hibridização *in situ* para pesquisa de alterações genéticas foram estratificadas tendo em conta a(s) alterações genéticas presentes nos plasmócitos da medula óssea em: bom prognóstico, mau prognóstico e “misto” quando foram encontradas alterações genéticas associadas a melhor prognóstico e outras alterações associadas a pior prognóstico. Desta forma, após a análise estatística não se encontrou qualquer diferença significativa na frequência de células mesenquimais na medula óssea entre os vários grupos estudados (Tabela 6). Seria interessante fazer no futuro estudos com um número significativamente superior de amostras para avaliar melhor a possível existência de uma possível relação entre alguma alteração genética e uma maior frequência de células mesenquimais na medula óssea. Por outro lado não se encontrou qualquer relação entre a frequência de MSC na MO e o estado de ploidia das CP clonais.

**Tabela 6 – Frequência de células mesenquimais na medula óssea de indivíduos com mieloma múltiplo. Dados estratificados em relação ao valor prognóstico das alterações genéticas presentes nas células plasmáticas recolhidas da medula óssea. Resultados sobre células mesenquimais representados na forma de percentagem e desvio padrão. Dados acompanhados do valor estatístico do teste Mann Whitney.**

| <i>Prognóstico</i> | <i>MSC na MO (%)</i> | <i>Bom vs. Mau</i> | <i>Bom vs. Misto</i> | <i>Mau vs. Misto</i> |
|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| Bom (n=7)          | 0,0842±0,0996        |                    |                      |                      |
| Mau (n=7)          | 0,1009±0,069         | <i>p</i> =0,406    | <i>p</i> =0,138      | <i>p</i> =0,210      |
| Misto (n=3)        | 0,6413±0,5791        |                    |                      |                      |

## 5 Discussão

### 5.1 Quantificação de células mesenquimais de medula óssea

Tal como referido anteriormente, verificou-se a existência de uma maior frequência de células MSC na medula óssea de indivíduos com MM em relação a indivíduos sem patologia e também em relação a MGUS e SMM. Esta diferença verificada apoia a ideia de que as MSC desempenham um papel de suporte muito importante na manutenção e progressão da doença. Desta forma se justifica que em fases mais avançadas deste modelo de progressão da doença, se encontre uma maior percentagem de MSC na medula óssea dos indivíduos estudados. Assim, a acumulação destas células na MO pode ser associada à transformação da doença de formas mais ligeiras a formas mais severas. A nível imunológico, tendo em conta as alterações características das MSC em MM, este aumento da frequência destas células na MO vai levar a um agravamento da doença. Este facto deve-se à produção de numerosas moléculas por estas células que vão contribuir de uma forma decisiva para a progressão da doença. Como descrito por *Basak et al.*, a produção elevada de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) pelas MSC de MM é responsável pelo desenvolvimento do MM [4]. Da mesma forma, o desenvolvimento da doença tem como consequência um aumento da produção de moléculas que irão atuar nas MSC, estimulando-as, o que se manifesta num mecanismo de feedback positivo entre as células plasmáticas clonais e as MSC. Este mecanismo poderá ser responsável pelo aumento progressivo da frequência de MSC na MO à medida que a doença progride. Por outro lado, o contacto direto entre as MSC de MM e as células plasmáticas clonais, vai levar a que as últimas aumentem a expressão de Bcl-2 e também a atividade da via sinalização NF- $\kappa$ B, o que de acordo com *Reagan et al.* leva a uma maior resistência aos efeitos da quimioterapia. Estes efeitos de resistência à quimioterapia também são potenciados pelo aumento da produção de várias moléculas da matriz extracelular. Por outro lado, *Reagan et al.* descrevem que as MSC também têm diminuídas as suas capacidades imunossupressoras nos linfócitos T, o que terá repercussões pró-inflamatórias na MO. Estes efeitos serão fundamentais na manutenção de um nicho imunológico na MO com características ideais para o desenvolvimento da doença. Tendo em conta a abordagem técnica seguida neste estudo, estes resultados não encontram termo de comparação ao nível bibliográfico, uma vez que os estudos de MSC em MM têm sido executados essencialmente após expansão *ex vivo* o que não permite o tipo de quantificação feita neste estudo. Seria interessante ver dados apresentados por outros grupos de investigação que utilizem metodologias semelhantes.

## **5.2 Correlação entre as células mesenquimais e o estadiamento da doença**

Tal como mencionado anteriormente, os dados obtidos apontam para um aumento na percentagem de células mesenquimais na medula óssea de indivíduos com gamapatias monoclonais à medida que a doença vai progredindo, esta correlação com o valor médio de hemoglobina também se aplica a este modelo de progressão de doença. Pode-se dizer desta forma que à medida que os valores de hemoglobina vão caindo com o evoluir da doença em consequência da infiltração medular por células plasmáticas, também se verifica um aumento na percentagem de MSC na medula óssea. Tendo em conta as correlações verificadas entre a percentagem de MSC na medula óssea dos indivíduos com gamapatias monoclonais e os valores de hemoglobina e de plasmocitose, assim como o aumento dessa mesma percentagem nos indivíduos com estádios ISS mais elevados, verifica-se que quantidades mais elevadas de MSC estão associadas a características da doença com pior valor prognóstico para os portadores da mesma. Estes dados em associação com a constatação da existência de uma maior percentagem destas células na medula óssea em casos de MM em comparação com MGUS e SMM assim como em indivíduos normais, sugere que as MSC provavelmente estarão envolvidas diretamente na transformação maligna da doença. A forma desta participação não está bem definida, mas tal como referido por *Basak et al.* as MSC na medula óssea em MM têm vários efeitos ao nível da progressão tumoral e osteoclastogénese, estando assim também associadas a piores prognósticos [4].

## **5.3 Fenótipo das células mesenquimais**

### **5.3.1 CD73**

Os resultados descritos anteriormente, demonstram que em MM há uma diminuição da expressão de CD73 pelas MSC na MO em relação aos grupos de MGUS e SMM, tendo-se verificado uma tendência para a diminuição da expressão desta molécula à medida que a doença evolui. Resultados até certo ponto semelhantes a estes já foram descritos por *Ode et al.* [27], ainda que numa abordagem laboratorial completamente diferente da que foi usada no neste estudo. *Ode et al.*, demonstraram que após estimulação mecânica, as células mesenquimais apresentavam uma diminuição de expressão de CD73. Tendo em conta que estas células têm um papel muito importante ao nível da regeneração óssea, característica importantíssima em doenças associadas a destruição óssea como o Mieloma múltiplo, este grupo de investigação demonstrou que após estimulação mecânica, as MSC diminuíam significativamente a expressão de CD73 e CD29, o que lhes confere uma menor capacidade migratória dado que estes dois marcadores estão associados ao fenómeno de migração destas células. Desta forma, os

resultados apresentados previamente levam a sugerir que a diminuição da expressão de CD73 pelas MSC ao longo dos vários estádios da doença pode estar associada a uma menor capacidade migratória e a uma conseqüente maior capacidade de fixação ao nicho da medula óssea, o que pode ter vários efeitos ao nível da patofisiologia da doença: se por um lado, as células estariam mais próximas de lesões ósseas causadas por plasmócitos, estando assim mais capazes de intervir no processo de regeneração óssea, por outro, o facto de estarem mais “fixas” ao local onde a doença se está a desenvolver vai permitir-lhes continuar a exercer a sua ação de suporte e desenvolvimento à doença [12, 31], contribuindo para a manutenção ou até mesmo progressão da mesma. Contudo, há que ter em conta a complexidade da função do CD73, visto que *Wang et al.* [28] descreveram que esta molécula pode exercer efeitos ao nível da imunidade anti tumoral contribuindo para o crescimento tumoral. Desta forma, seria interessante aprofundar estudos ao nível da expressão de CD73 em vários tipos celulares ligados à doença e à resposta imunitária à mesma com o intuito de tentar compreender a diminuição de expressão de CD73 verificada no caso de Mieloma Múltiplo.

### 5.3.2 CD90

Em relação à expressão de CD90, verificou-se um incremento na expressão desta molécula pelas MSC desde o grupo MGUS até ao grupo MM, sendo que a diferença verificada entre estes dois grupos se apresentou como estatisticamente significativa. Estes resultados apresentam-se diferentes dos apresentados por *Arnulf et al.* que reportaram o facto de não haverem diferenças significativas na expressão de CD90 pelas MSC de indivíduos com MM e indivíduos normais [37]. Tendo em conta o modelo de progressão da doença atualmente usado, os dados obtidos apontam para que haja um aumento na expressão de CD90, à medida que a doença vai evoluindo. O aumento da expressão de CD90 pelas MSC da medula óssea em MM pode estar associado a um aumento da adesão destas células a outros tipos celulares ou até mesmo à matriz extracelular, garantindo desta forma uma melhor fixação das MSC aos locais de desenvolvimento da doença. Os resultados obtidos são discordantes em relação a outros estudos publicados nomeadamente ao de *Campioni et al.* [47] que indicavam a existência de uma menor frequência de MSC CD90<sup>+</sup> e que esse facto estaria associado a uma maior taxa de angiogénese em doenças hematológicas malignas. Tendo em conta o aumento de expressão de fatores associados a angiogénese em MM está associado à progressão da doença [48], o facto de se ter verificado uma maior expressão de CD90 em MM, ou seja, numa em indivíduos numa fase mais adiantada da doença, acaba por ser contraditório em relação aos dados publicados por *Campioni et al.*. No entanto é

necessário ter em conta que os dados publicados por esse grupo não particularizam em casos de Mieloma Múltiplo, nem apresentam casos de MGUS ou SMM. Por outro lado a abordagem laboratorial deles é feita através de estudos de cultura celular, pelo que os resultados podem não ser diretamente comparáveis. Ainda em relação ao CD90, *Wiesmann et al.* [49], descrevem que esta molécula vê a sua expressão reduzida em MSC que se diferenciam em células tipo-osteoblasto. Desta forma, se as MSC estudadas neste estudo apresentavam uma maior expressão de CD90 em MM em comparação com os outros grupos estudados, então poderá colocar-se a hipótese de haver uma menor diferenciação destas células em direção a células osteoblásticas o que poderá ter uma influência negativa ao nível da reparação de lesões ósseas, situação essa que poderá agravar-se ao longo da evolução da doença. No entanto, esta hipótese terá de ser sempre confirmada por estudos de cultura celular *ex vivo*, para avaliar a capacidade proliferativa das MSC em gamapatias monoclonais.

### **5.3.3 CD49e**

Ao nível da expressão de CD49e, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa quando se comparou o grupo MGUS com o grupo Normal Este facto está de acordo com o reportado por *Arnulf et al.* [37]. Seria interessante verificar futuramente se a diminuição na expressão de CD49e pelas células mesenquimais em MGUS terá alguma relação com o aparecimento da doença. Por outro lado é compreensível que as MSC passem a expressar mais CD49e em fases mais avançadas da doença, uma vez que se trata de uma molécula de adesão que facilitará a sua fixação nos locais de doença ativa na medula óssea.

### **5.3.4 CD271**

Os resultados obtidos neste estudo apontam para uma expressão de CD271 pelas MSC de indivíduos com MM aumentada em relação às MSC de indivíduos sem patologia. Já nos indivíduos com MGUS, a diferença não é tão exuberante. Tendo em conta o desenho laboratorial deste trabalho de investigação, constituindo-se como uma abordagem diferente dos habituais estudos de cultura celular para o estudo de células mesenquimais, este dado apresenta-se como uma novidade uma vez que tal como mencionado por *Lindner et al.* [14], as MSC após cultura celular deixam de expressar este marcador de superfície. Estes dados devem ser confirmados com estudos em que envolvam mais doentes em todos os grupos, principalmente no grupo SMM para verificar se existe uma verdadeira tendência para o aumento da expressão de CD271 pelas MSC ao longo da evolução da doença, visto que *Mikami et al.* [50] descreveram que o aumento da expressão de CD271 pelas MSC inibe a sua proliferação para as linhas osteogénica,

adipogénica, miogénica e condrogénica. Desta forma, é possível que hajam alterações na capacidade de diferenciação destas células que se tornem mais evidentes com a progressão da doença desde MGUS até ao estágio de MM.

#### **5.4 Relação com populações precursoras hematopoiéticas presentes na medula óssea**

Os resultados obtidos com este estudo não evidenciaram qualquer relação entre as frequências de MSC e vários grupos de precursores celulares hematopoiéticos na medula óssea, muito embora se tenham verificado diferenças estatisticamente significativas na frequência de alguns precursores hematopoiéticos entre os vários grupos estudados. Seria interessante fazer estudos envolvendo cultura celular que permitissem avaliar a capacidade das MSC de interferir na diferenciação de vários tipos celulares, com o intuito de averiguar se estas sofrem alterações funcionais relacionadas com estes processos em gamapatias monoclonais.

#### **5.5 Correlação entre a percentagem de células mesenquimais e o fenótipo de plasmócitos em mieloma múltiplo**

Os dados obtidos neste trabalho apontam para uma maior frequência de MSC na MO de indivíduos com MM em que as CP clonais apresentam expressão negativa de CD56. Este facto acaba por vir em contracorrente com outros dados que foram aqui apresentados anteriormente, uma vez que até agora os resultados apresentados demonstravam que a existência de uma maior percentagem de células mesenquimais na medula óssea estava associada a estádios mais avançados da doença ou a maior valor de plasmocitose, ou até mesmo a menores concentrações de hemoglobina. Todos estes fatores estão associados a um pior prognóstico e conseqüentemente a menor tempo de sobrevivência à doença. No caso da expressão de CD56, a expressão desta molécula de adesão tem estado associada a piores prognósticos e a uma menor taxa de sobrevivência à doença [51, 52]. O facto de haver uma menor frequência de MSC na medula óssea dos indivíduos com expressão positiva de CD56 acaba por ser um contraponto em relação ao que é conhecido dos efeitos pró tumorais destas células no mieloma múltiplo. No entanto, trata-se de um dado que não foi previamente descrito, daí que deva ser confirmado em estudos futuros. Por outro lado, vem confirmar a complexa rede de interações e funções das células mesenquimais, colocando o ênfase na necessidade de se fazerem mais estudos que permitam conhecer cada vez melhor as características biológicas e as interações que estas células podem estabelecer. Por outro lado, se tal como *Cho et al.* [51] associarmos a expressão de CD56 com a expressão de CD27 pelas células plasmáticas e estratificarmos a nossa população em dois grupos: o primeiro com células

plasmáticas CD56<sup>+</sup> e CD27<sup>-</sup> que representa um pior prognóstico e o segundo com as células plasmáticas CD56<sup>-</sup> e CD27<sup>+</sup> com melhor prognóstico verificamos que a frequência de células mesenquimais na medula óssea é menor no grupo de pior prognóstico (n=6, 0,0183%) em relação ao grupo de melhor prognóstico (n=4, 0,4291%). Desta forma se consegue fortalecer a relação entre a menor frequência de células mesenquimais na medula óssea em MM e fenótipos de células plasmáticas de maior risco prognóstico. No entanto, outros dados bibliográficos apontam para que a falta de expressão de CD56 pelas CP clonais esteja associada a piores prognósticos [53]. Este facto pode estar associado ao facto de diminuição de expressão de CD56 pelas CP clonais as tornar mais suscetíveis de migrar para fora da medula óssea, deslocalizando o foco da doença e podendo levar à transformação da doença numa leucemia de plasmócitos. Se tivermos em conta estes dados, então a maior frequência de MSC associada à falta de expressão de CD56 pelas CP clonais, está de acordo com outros dados apresentados que apontam para uma associação entre uma maior frequência de MSC na MO de indivíduos com gamapatia monoclonal e condições de pior prognóstico para os mesmos. Quando se fez o mesmo tipo de análise para os outros marcadores aberrantes de célula plasmática (CD19, CD27, CD28 e CD117) não se verificou qualquer diferença significativa ao nível de mieloma múltiplo. Em relação ao grupo de indivíduos com MGUS não se encontrou qualquer diferença em relação às células mesenquimais associadas aos marcadores fenotípicos aberrantes de célula plasmática.

#### **5.6 Correlação entre a frequência de células mesenquimais e alterações genéticas recorrentes em Mieloma Múltiplo**

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os vários grupos estudados no que concerne às alterações genéticas recorrentes em MM. Seria interessante fazer no futuro estudos com um número significativamente superior de amostras para avaliar melhor a possível existência de uma possível relação entre alguma alteração genética e uma maior frequência de células mesenquimais na medula óssea.

#### **5.7 Questões relacionadas com a abordagem técnica neste trabalho científico e perspectivas de futuro**

É fundamental referir a abordagem laboratorial feita no desenvolvimento deste estudo. Na literatura publicada existem vários estudos sobre células mesenquimais em mieloma múltiplo, no entanto, a quase totalidade deles baseia-se em dados obtidos após expansão celular *ex vivo* dessas células. Tendo utilizado uma abordagem que consistiu na análise destas células imediatamente após a colheita de medula óssea, obteve-se uma maior aproximação ao que serão as características *in vivo* destas células, uma vez

que não passaram por transformações fenotípicas características dos processos de cultura celular. Por outro lado, este tipo de trabalho permitiu uma quantificação relativa destas células em relação à celularidade da medula óssea, o que não seria possível através de estudos de cultura celular. O facto de se ter optado por uma metodologia diferente da utilizada comumente em estudos de células mesenquimais permitiu a observação de resultados diferentes dos publicados por outros autores, no entanto, devido às diferenças entre os vários estudos torna-se difícil estabelecer paralelismos entre os vários resultados. Será fundamental a execução de mais estudos deste cariz no futuro para que os resultados obtidos possam ser confirmados. Por outro lado, também será fundamental estabelecer o perfil de expressão génica destas células e avaliar a produção de fatores solúveis que estão associados a vários mecanismos da doença pelas mesmas para completar cada vez mais o mapa de interações destas células nestas doenças. Em estudos futuros será pertinente a inclusão de maiores números de doentes e também tentar incluir amostras de alguns indivíduos com leucemia de plasmócitos para avaliar a possível existência de alterações específicas deste tipo de doença nestes indivíduos. Ao tentar estabelecer um cenário cada vez mais completo de todos os processos e interações fisiológicas no contexto das gamopatias monoclonais com a inclusão do fator chave que são as células mesenquimais, poderemos caminhar no sentido do estabelecimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento da doença. Embora estes resultados em conjunto com outros previamente publicados sejam encorajadores ao apontar para alterações das células neste grupo de doenças, há que ter sempre em conta o grande leque de funções desempenhado por estas células uma vez que o acolhimento de medidas terapêuticas cujo alvo sejam as células mesenquimais poderá interferir noutros processos regulados por elas ou nos quais elas sejam intervenientes de uma forma direta ou indireta.



## **6 Conclusão**

Com este estudo pode-se concluir que a frequência de células mesenquimais na medula óssea de indivíduos com gamapatia monoclonal encontra-se alterada, verificando-se uma tendência para um incremento na percentagem deste tipo celular à medida que a doença vai progredindo. Por outro lado este aumento da frequência de MSC está associado a vários fatores de pior prognóstico para os indivíduos com esta patologia tal como estádios do ISS mais avançados, valores mais baixos de hemoglobina ou a falta de expressão de CD56 pelas células plasmáticas clonais. Igualmente, verificou-se que estas células também apresentam alterações fenotípicas significativas ao nível de CD73, CD90 e CD49e, que poderão assumir um papel fundamental na patofisiologia da doença.



## 7 Referências Bibliográficas

1. Ronald Hoffman, B.F., Edward J. Benz, Jr., Philip McGlave, Leslie E. Silberstein and Sanford J. Shattil, *Hematology: basic principles and practice*. 5th Edition ed. 2009: Churchill Livingstone.
2. Raab, M., K. Podar, and I. Breitkreutz, [首页 > NSTL 期刊 > The Lancet](#). *The Lancet*, 2009. **374**(9686).
3. Noonan, K. and I. Borrello, *The Immune Microenvironment of Myeloma*. *Cancer Microenvironment*, 2011: p. 1-11.
4. Basak, G.W., et al., *Multiple myeloma bone marrow niche*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2009. **10**(3): p. 335-346.
5. Kyle, R.A., et al., *A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance*. *New England Journal of Medicine*, 2002. **346**(8): p. 564-569.
6. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma*. *Current hematologic malignancy reports*, 2010. **5**(2): p. 62-69.
7. Drew Provan, J.G., *Molecular Hematology*. 3rd Edition ed. 2010: Wiley-Blackwell.
8. Dimopoulos, M., et al., *International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma*. *Leukemia*, 2009. **23**(9): p. 1545-1556.
9. Kindt, G., Osborne, *Kuby Immunology*. 6th Edition ed. 2006: Freeman and Company.
10. Matsui, W., et al., *Characterization of clonogenic multiple myeloma cells*. *Blood*, 2004. **103**(6): p. 2332-2336.
11. Ghosh, N. and W. Matsui, *Cancer stem cells in multiple myeloma*. *Cancer letters*, 2009. **277**(1): p. 1-7.

12. Reagan, M.R. and I.M. Ghobrial, *Multiple Myeloma Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Origin, and Tumor-Promoting Effects*. *Clinical Cancer Research*, 2012. **18**(2): p. 342-349.
13. Vincent, T., et al., *Hyaluronic acid induces survival and proliferation of human myeloma cells through an interleukin-6-mediated pathway involving the phosphorylation of retinoblastoma protein*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(18): p. 14728-14736.
14. Lindner, U., et al., *Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology?* *Transfus Med Hemother*, 2010. **37**(2): p. 75-83.
15. Bunting, K.D. and R.G. Hawley, *Integrative molecular and developmental biology of adult stem cells*. *Biology of the Cell*, 2003. **95**(9): p. 563-578.
16. Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons, *Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays*. *Cell stem cell*, 2008. **2**(4): p. 313-319.
17. Friedenstein, A., R. Chailakhjan, and K. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. *Cell Proliferation*, 1970. **3**(4): p. 393-403.
18. Friedenstein, A.J., J. Gorskaja, and N. Kulagina, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. *Experimental hematology*, 1976. **4**(5): p. 267.
19. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. *Journal of Orthopaedic Research*, 1991. **9**(5): p. 641-650.
20. Caplan, A.I., *The mesengenic process*. *Clinics in plastic surgery*, 1994. **21**(3): p. 429.
21. Caplan, A.I. and D. Correa, *The MSC: an injury drugstore*. *Cell stem cell*, 2011. **9**(1): p. 11-15.
22. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-317.

23. Jones, E.A., et al., *Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow*. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2006. **70**(6): p. 391-399.
24. Jones, E. and D. McGonagle, *Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo*. *Rheumatology*, 2008. **47**(2): p. 126-131.
25. Jarocha, D., E. Lukasiewicz, and M. Majka, *Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells*. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2008. **46**(3): p. 307-314.
26. Guzman-Rojas, L., et al., *Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(5): p. 1637-1642.
27. Ode, A., et al., *CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells*. *European Cells and Materials*, 2011. **22**: p. 26-42.
28. Wang, L., et al., *CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011. **121**(6): p. 2371.
29. Mödder, U.I., et al., *Characterization of mesenchymal progenitor cells isolated from human bone marrow by negative selection*. *Bone*, 2011.
30. Goldstein, R.H., et al., *Human Bone Marrow-Derived MSCs Can Home to Orthotopic Breast Cancer Tumors and Promote Bone Metastasis*. *Cancer research*, 2010. **70**(24): p. 10044-10050.
31. Wallace, S.R., et al., *Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients*. *Cancer*, 2001. **91**(7): p. 1219-1230.
32. Lauta, V.M., *A review of the cytokine network in multiple myeloma*. *Cancer*, 2003. **97**(10): p. 2440-2452.

33. Peacock, C.D., et al., *Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(10): p. 4048.
34. Maugeri-Saccà, M., A. Zeuner, and R. De Maria, *Therapeutic targeting of cancer stem cells*. Frontiers in Oncology, 2011. **1**.
35. Dierks, C., et al., *Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies*. Nature medicine, 2007. **13**(8): p. 944-951.
36. Garderet, L., et al., *Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma*. Leukemia & lymphoma, 2007. **48**(10): p. 2032-2041.
37. Arnulf, B., et al., *Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma*. Leukemia, 2006. **21**(1): p. 158-163.
38. Li, B., et al., *Impairment in Immunomodulatory Function of Mesenchymal Stem Cells from Multiple Myeloma Patients*. Archives of medical research, 2010. **41**(8): p. 623-633.
39. Menicanin, D., et al., *Genomic profiling of mesenchymal stem cells*. Stem Cell Reviews and Reports, 2009. **5**(1): p. 36-50.
40. Mahtouk, K., et al., *Input of DNA microarrays to identify novel mechanisms in multiple myeloma biology and therapeutic applications*. Clinical Cancer Research, 2007. **13**(24): p. 7289-7295.
41. Mahtouk, K., et al., *Growth factors in multiple myeloma: a comprehensive analysis of their expression in tumor cells and bone marrow environment using Affymetrix microarrays*. 2010, BioMed Central.
42. Corre, J., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma*. Leukemia, 2007. **21**(5): p. 1079-1088.
43. Schmidt-Hieber, M., et al., *Cytogenetic profiles in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a study in highly purified aberrant plasma cells*. Haematologica, 2012.

44. Schmidt-Hieber, M., et al., *CD117 expression in gammopathies is associated with an altered maturation of the myeloid and lymphoid hematopoietic cell compartments and favorable disease features*. *Haematologica*, 2010: p. haematol. 2010.031872 v2.
45. Sawyer, J.R., *The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma*. *Cancer Genetics*, 2011. **204**(1): p. 3-12.
46. Liebisch, P. and H. Döhner, *Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma*. *European journal of cancer*, 2006. **42**(11): p. 1520-1529.
47. Campioni, D., et al., *Immunophenotypic heterogeneity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with hematologic disorders: correlation with bone marrow microenvironment*. *Haematologica*, 2006. **91**(3): p. 364-368.
48. Pappa, C.A., et al., *Emerging roles of endoglin/CD105 and angiogenic cytokines for disease development and progression in multiple myeloma patients*. *Hematological Oncology*, 2013: p. n/a-n/a.
49. Wiesmann, A., et al., *Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation*. *Head Face Med*, 2006. **2**(8).
50. Mikami, Y., et al., *CD271/p75NTR inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages*. *Stem Cells and Development*, 2010. **20**(5): p. 901-913.
51. Cho, Y.-U., et al., *Immunophenotypic Characterization and Quantification of Neoplastic Bone Marrow Plasma Cells by Multiparametric Flow Cytometry and Its Clinical Significance in Korean Myeloma Patients*. *Journal of Korean medical science*, 2013. **28**(4): p. 542-549.
52. Gressier, M., et al. *Utility of 8-colours multiparameter flow cytometry immunophenotyping of plasma cells for the management of monoclonal gammopathy*. in *Annales de biologie clinique*. 2013.
53. Johnsen, H.E., et al., *Multiparametric flow cytometry profiling of neoplastic plasma cells in multiple myeloma*. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2010. **78**(5): p. 338-347.

