

Nome do Pesquisador Principal (PI)	ANGELO MAIOLINO
E-Mail do Pesquisador Principal (PI)	angelomaiolino@gmail.com
Instituição de vínculo do Pesquisador	⊗ Americas Centro de Oncologia Integrado

# Projeto

Record ID	42
Registro do Edital	422023
Título do Projeto	
USO DA CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DO MICROAMBIENTE TUMORAL NO MIELOMA MÚLTIPLO	
Área de conhecimento:	Hematologia
Instituição pública parceira de ensino e pesquisa:	Universidade Federal do Rio de Janeiro
Qual o perfil do participante de pesquisa?	<input checked="" type="checkbox"/> ambulatorial e internados
Tipo de estudo	<input checked="" type="checkbox"/> Observacional
Este projeto já possui financiamento ?	<input checked="" type="checkbox"/> sim
Qual a fonte de financiamento do estudo ?	<input checked="" type="checkbox"/> Fundos de amparo
Informe o nome da financiadora	FAPERJ
Valor do financiamento (R\$)	215000 (APENAS NÚMEROS)
Valor solicitado (R\$ - Até R\$ 50.000,00)	50000 (APENAS NÚMEROS)
Valor total do projeto (R\$)	265000 (Valor financiado + Valor solicitado)
O estudo será randomizado?	<input checked="" type="checkbox"/> não se aplica
O estudo será multicentrico?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim
O estudo é internacional?	<input checked="" type="checkbox"/> Não
Quantos centros no País?	6

---

## Introdução

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação de plasmócitos clonais primariamente na medula óssea. Apesar dos avanços terapêuticos obtidos nas últimas duas décadas, o MM continua sendo uma doença incurável. Os pacientes tratados podem atingir e manter uma remissão completa (incluindo doença residual mínima negativa), porém com heterogeneidade nos desfechos clínicos.

De maneira geral, existe a hipótese de que seria necessário um "solo fértil" para que o câncer se desenvolva. No MM, estudos mostraram que as células de sustentação na MO são críticas para o estabelecimento de um nicho que suporte o crescimento, disseminação por neovascularização e evolução clonal da doença.

Evidências importantes apontam que o sistema imune dos pacientes com MM ao diagnóstico apresenta uma variedade de alterações imunológicas compatíveis com um microambiente tumoral imunossupressor. As MSC (mesenchymal stem cells) possuem um papel crítico na fisiopatologia do MM de forma a promover o crescimento de células tumorais, disseminação, sobrevivência e evasão do sistema imunológico. Além disso, há um aumento da angiogênese, com a formação de uma estrutura anormal de vasos sanguíneos ao longo da progressão tumoral que aumenta progressivamente desde o estágio pré-maligno até o MM ativo.

A recuperação ideal das células efectoras do sistema imune pode contribuir não apenas para diminuir as complicações infecciosas da deficiência imune no MM, mas também para a recuperação da capacidade antitumoral do sistema imunológico dos pacientes e para erradicar plasmócitos malignos residuais. Essas células influenciam negativamente no MM, e muitas já são utilizadas como alvos terapêuticos, mas não se conhece ao certo a composição da MO na presença da doença. Portanto, o estudo da interação entre as células tumorais do MM e seu microambiente deve contribuir para a escolha de melhores terapias, com potencial controle da doença.

Nosso objetivo é promover um seguimento a longo prazo de pacientes recém diagnosticados com MM e acompanhá-los durante o tratamento, para determinar os mecanismos de reversão do microambiente medular imunossupressor promovido pelas terapias alvo, utilizando como ferramenta a citometria de fluxo multiparamétrica.

---

## Justificativa do estudo

O MM cursa com imunodeficiência celular e humoral, indicando que a evolução da doença a partir de um precursor pré-maligno, está associado a um ambiente que facilita o crescimento tumoral. Atualmente, a maioria dos estudos na área de oncologia são voltados para conhecer a célula tumoral. Entretanto, existe a hipótese de que seria necessário um "solo fértil" para que o câncer se desenvolva. Assim, nos propomos a estudar a composição e as características desse "solo fértil" que é o microambiente onde o tumor se desenvolve, com especial atenção as células do sistema imune e células de sustentação (estroma) na medula óssea.

Para isso, nos propomos realizar uma avaliação da distribuição das células do microambiente tumoral - estromais e células imune efectoras (T, B, NK DC e monócitos / macrófagos) em pacientes com MM ao diagnóstico e no seguimento após terapia, simultâneo ao monitoramento da doença residual mínima (DRM).

---

## Hipótese Principal do Estudo

Nossa hipótese principal é que a distribuição das células do microambiente tumoral podem ser afetadas pelo momento de tratamento no qual é feita a sua avaliação e que tal perfil de distribuição pode influenciar a qualidade e o padrão de resposta à terapia, com possível impacto prognóstico no MM.

---

## Objetivos gerais e específicos

- 1) Avaliar a composição das células estromais e células imune efectoras na medula óssea e sangue periférico em pacientes com mieloma múltiplo no diagnóstico e no seguimento após a terapia, simultâneo ao monitoramento da doença residual mínima (DRM)
- 2) Explorar a associação entre o perfil da distribuição dessas células do microambiente tumoral com a profundidade de resposta obtida pós terapia, o status da DRM e o impacto no prognóstico do paciente.

## Metodologia

Desenho do estudo: Estudo longitudinal de coorte.

População alvo e amostras: 50 pacientes com diagnóstico de MM sintomático. Para cada paciente, as amostras pareadas de medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) serão estudadas no diagnóstico e no seguimento pós-terapia - total de 300 amostras (Figura 1) (50).

Instituição Coordenadora do Estudo: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF- UFRJ).

Ética: Este estudo foi aprovado em 2017 pelo Comitê de Ética em Pesquisa, HUCFF / UFRJ, número 63221816.2.0000.5257.

Critérios de inclusão: Pacientes com diagnóstico de MM, cadastrados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF- UFRJ).

Critérios de exclusão: i) pacientes com processo infeccioso ativo no momento da coleta das amostras. ii) Pacientes com história de 2ª malignidade. iii) pacientes sem registro ou dados de histórico da doença.

Nota: Amostras inadequadas (por exemplo, coágulo); ou material insuficiente para o estudo; ou coletado sem MO e SP pareados, serão considerados como amostras de perda.

Monitoramento de DRM e qualidade da amostra: As amostras de MO e SP serão aspiradas e coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA e serão processadas com uma solução de cloreto de amônio para lise maciça de hemácias (protocolo Bulk-Lysis), seguindo os protocolos e procedimentos operacionais padrão do consórcio EuroFlow (www.euroflow.org) (51,52). Após a lise, a suspensão de células obtida passará por um processo de marcação de membrana e citoplasmática utilizando o painel EuroFlow NGF MM DRM (32). O painel possui uma combinação de 10 anticorpos organizados em 2 tubos (8 cores) padronizados e validados para detecção de DRM em amostras de MO e SP (32,41,42): i) tubo 1: CD138 / CD27 / CD38 / CD56 / CD45 / CD19 / CD117 / CD81 e tubo 2: mesma combinação, mais cadeias leves de imunoglobulinas (Ig) citoplasmáticas (cyIg Kappa e cyIg Lambda). Após marcação com a combinação de anticorpos, as suspensões de células serão adquiridas;  $\geq 10$  milhões de células por amostra, usando o equipamento de citometria FACS Canto II (BD Bioscience®, São José, CA). O software Infinicyt® (versão 2.0, Cytognos®, Salamanca, Espanha) será usado para análise de dados obtidos. A estratégia de dois tubos permite a detecção da DRM, com a confirmação específica de fenótipo aberrante do plasmócito clonal (clonalidade de cadeia leve), identificado por subexpressão de antígeno (CD19 / CD27 / CD38 / CD45 / CD81) ou superexpressão (CD56 / CD117 / CD138) em comparação com células plasmáticas normais. Além disso, o painel de anticorpos NGF MM DRM permite a discriminação de amostras com a presença de hemodiluição pela porcentagem de mastócitos CD117hi  $\geq 0,002\%$  (32).

Estudos imunofenotípicos por CFM para avaliar as células do microambiente imune: A configuração do painel de anticorpos EuroFlow NGF MM DRM permite, a identificação de células residuais e normais em amostras de MO (ou seja, mastócitos, glóbulos vermelhos nucleados, precursores mielóides / eritróides), compartimento de células B residuais e normais em diferentes estádios de maturação (precursores B, transicionais/naive, memória e plasmócitos), além de células do microambiente medular, como células estromais não-hematopoiéticas com alta expressão de CD81hi. A quantificação das células residuais e normais na MO pode fornecer informações adicionais, sobre a qualidade da amostra, uma vez que o percentual dessas células é alterado em casos de hemodiluição. Em amostras de SP, o painel EuroFlow NGF MM DRM (32,41,42) permite identificar, além de células plasmáticas tumorais circulantes, também as populações de células residuais e normais (isto é, células B maduras, plasmócitos, células mielóides, células T/NK).

Alíquotas de cada amostra, serão utilizadas para o estudo das células do microambiente, caracterizado por células de sustentação da MO não-hematopoiéticas (estromais) e células imune efectoras (T, NK, DC, monócitos/macrófagos) presentes na MO e SP, utilizando as seguintes combinações de anticorpos:

- 1) CD27 / CD4 / CD45RO / CD197 / CD28 / TCRgd / CD3 / CD8 - para subconjuntos de células T;
- 2) CD4 / CD45 / CD45RA / CD127 / CD8 / CD25 / CD56 / CD3; para subconjuntos de células T e a identificação de células T reguladoras;
- 3) HLADR / CD45 / CD16 / CD33 / CD4 / CD56 / CD123 / CD14; para a identificação de células apresentadoras de antígeno (macrófagos/monócitos e células dendríticas) e células NK;
- 4) CD271 / CD45 / MSCA1 / CD34 / CD19 / CD90 / CD10 / CD81; células estromais (isto é, células mesenquimais e endoteliais).

Desenho do estudo: Estudo longitudinal de coorte.

População alvo e amostras: 50 pacientes com diagnóstico de MM sintomático. Para cada paciente, as amostras pareadas de medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) serão estudadas no diagnóstico e no seguimento pós-terapia - total de 300 amostras .

Ética: Este estudo foi aprovado em 2017 pelo Comitê de Ética em Pesquisa, HUCFF / UFRJ, número 63221816.2.0000.5257.

Critérios de inclusão: Pacientes recém diagnosticados com mieloma múltiplo (MM)

Critérios de exclusão: i) pacientes com processo infeccioso ativo no momento da coleta das amostras. ii) Pacientes com história de 2ª malignidade. iii) pacientes sem registro ou dados de histórico da doença.

Nota: Amostras inadequadas (por exemplo, coágulo); ou material insuficiente para o estudo; ou coletado sem MO e SP pareados, serão considerados como amostras de perda.

Monitoramento de DRM e qualidade da amostra: As amostras de MO e SP serão aspiradas e coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA e serão processadas com uma solução de cloreto de amônio para lise maciça de

hemácias (protocolo Bulk-Lysis), seguindo os protocolos e procedimentos operacionais padrão do consórcio EuroFlow (www.euroflow.org) (51,52). Após a lise, a suspensão de células obtida passará por um processo de marcação de membrana e citoplasmática utilizando o painel EuroFlow NGF MM DRM (32). O painel possui uma combinação de 10 anticorpos organizados em 2 tubos (8 cores) padronizados e validados para detecção de DRM em amostras de MO e SP (32,41,42): i) tubo 1: CD138 / CD27 / CD38 / CD56 / CD45 / CD19 / CD117 / CD81 e tubo 2: mesma combinação, mais cadeias leves de imunoglobulinas (Ig) citoplasmáticas (cyIg Kappa e cyIg Lambda). Após marcação com a combinação de anticorpos, as suspensões de células serão adquiridas;  $\geq 10$  milhões de células por amostra, usando o equipamento de citometria FACS Canto II (BD Bioscience®, São José, CA). O software Infinicyt® (versão 2.0, Cytognos®, Salamanca, Espanha) será usado para análise de dados obtidos. A estratégia de dois tubos permite a detecção da DRM, com a confirmação específica de fenótipo aberrante do plasmócito clonal (clonalidade de cadeia leve), identificado por subexpressão de antígeno (CD19 / CD27 / CD38 / CD45 / CD81) ou superexpressão (CD56 / CD117 / CD138) em comparação com células plasmáticas normais. Além disso, o painel de anticorpos NGF MM DRM permite a discriminação de amostras com a presença de hemodiluição pela porcentagem de mastócitos CD117hi  $\geq 0,002\%$  (32).

Estudos imunofenotípicos por CFM para avaliar as células do microambiente imune: A configuração do painel de anticorpos EuroFlow NGF MM DRM permite a identificação de células residuais e normais em amostras de MO (ou seja, mastócitos, glóbulos vermelhos nucleados, precursores mielóides / eritróides), compartimento de células B residuais e normais em diferentes estádios de maturação (precursores B, transitórios/naive, memória e plasmócitos), além de células do microambiente medular, como células estromais não-hematopoiéticas com alta expressão de CD81hi. A quantificação das células residuais e normais na MO pode fornecer informações adicionais, sobre a qualidade da amostra, uma vez que o percentual dessas células é alterado em casos de hemodiluição. Em amostras de SP, o painel EuroFlow NGF MM DRM (32,41,42) permite identificar, além de células plasmáticas tumorais circulantes, também as populações de células residuais e normais (isto é, células B maduras, plasmócitos, células mielóides, células T/NK).

Alíquotas de cada amostra, serão utilizadas para o estudo das células do microambiente, caracterizado por células de sustentação da MO não-hematopoiéticas (estromais) e células imune efectoras (T, NK, DC, monócitos/macrófagos) presentes na MO e SP, utilizando as seguintes combinações de anticorpos:

- 1) CD27 / CD4 / CD45RO / CD197 / CD28 / TCRgd / CD3 / CD8 - para subconjuntos de células T;
- 2) CD4 / CD45 / CD45RA / CD127 / CD8 / CD25 / CD56 / CD3; para subconjuntos de células T e a identificação de células T reguladoras;
- 3) HLADR / CD45 / CD16 / CD33 / CD4 / CD56 / CD123 / CD14; para a identificação de células apresentadoras de antígeno (macrófagos/monócitos e células dendríticas) e células NK;
- 4) CD271 / CD45 / MSCA1 / CD34 / CD19 / CD90 / CD10 / CD81; células estromais (isto é, células mesenquimais e endoteliais).

---

#### Critérios de elegibilidade

Critérios de inclusão: Pacientes recém diagnosticados com mieloma múltiplo (MM)

Critérios de exclusão: i) pacientes com processo infeccioso ativo no momento da coleta das amostras. ii) Pacientes com história de 2ª malignidade. iii) pacientes sem registro ou dados de histórico da doença.

Nota: Amostras inadequadas (por exemplo, coágulo); ou material insuficiente para o estudo; ou coletado sem MO e SP pareados, serão considerados como amostras de perda.

---

#### Visitas e Procedimentos do estudo (caso não se aplique, escrever N/A)

N/A

---

#### Tamanho da amostra

50 pacientes com mieloma múltiplo recém diagnosticados

---

#### Análise estatística

Para todas as análises estatísticas, o software SPSS (versão 21; IBM. Chicago, IL, EUA) será usado. O teste não paramétrico Mann-Whitney U será utilizado para estabelecer a significância estatística das diferenças observadas entre os grupos para variáveis contínuas não pareadas. O teste qui-quadrado será aplicado para comparações entre dois grupos para variáveis categóricas. O método Kaplan-Meier será usado para plotar as curvas de sobrevida, e o teste log-rank (bilateral) será empregado para comparar as curvas de sobrevida livre de progressão (PFS) e sobrevida global(OS). PFS e OS são definidos como o lapso de tempo desde o diagnóstico até a progressão da doença ou morte por qualquer causa ou até a última consulta de acompanhamento. Para análises multivariadas, o modelo de regressão de Cox será usado para identificar variáveis com impacto prognóstico independente na PFS. Valores de  $p < 0,05$  serão considerados estatisticamente significativos.

---

## Cronograma

Inclusão de pacientes: julho de 2023 a junho de 2024

Análise automática dos arquivos FCS de NGF: julho de 2023 a agosto de 2024

Coleta de dados clínicos e laboratoriais complementares: julho de 2024 a setembro de 2024

Formação de Banco de Dados: julho de 2024 a setembro de 2024

Interpretação dos resultados e análises estatísticas: setembro de 2024 a outubro de 2024

Redação do artigo: novembro de 2024

Submissão do artigo: dezembro de 2024

---

Veja aqui o anexo II do EDITAL 01-2023-02 antes de preencher o Orçamento

[Attachment: "Anexo II Instituto Americas Edital 012023-02.pdf"]

---

## Orçamento

1. Anticorpos Monoclonais: as combinações de anticorpos e fluorocromos serão utilizadas para detecção de doença residual mínima (DRM) e a avaliação das células estromais do microambiente medular em pacientes com Mieloma Múltiplo. Custo estimado: R\$ 245.000,00

2. Materiais descartáveis (agulhas de aspirado, tubos e ponteiras). Custo estimado: R\$ 17.335,00

. Kit de controle de qualidade e soluções necessárias para o funcionamento do citômetro de fluxo. Custo estimado: R\$ 3.800,00

Orçamento total do projeto: R\$265.000,00

Solicitação de financiamento no presente Edital: R\$ 50.000,00

O projeto já está sendo financiado em parte com recursos das verbas de bancada do CNPq e FAPERJ e do Edital FAPERJ de Medicina de Precisão que foi liderado pelo proponente

---

Data da Solicitação

30-06-2023