

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ANÁLISE DO GENE *GBA1* EM PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO

RAÍSSA PEREIRA CALDEIRA

Orientadora: Profa. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Co-orientadora: Dra. Marina Siebert

Porto Alegre, maio de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ANÁLISE DO GENE *GBAI* EM PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO

RAÍSSA PEREIRA CALDEIRA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Porto Alegre, maio de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha mãe Irani Pereira Caldeira e meu pai Ivone Pinto Caldeira por sempre emanar amor da cabeça aos pés, por me darem o privilégio de existir e a força pra resistir. Dedico esta dissertação a vocês como uma forma singela de agradecimento por serem a personificação de Deus na Terra.

Agradeço aos meus irmãos Pedro Luiz e Carolina por serem essa extensão de mim, que me acolhem, ouvem, aconselham e sacodem quando está tudo pesado demais para dividir com nossos pais. O meu amor é de vocês, e dou-lhes mais uma vez.

Agradeço às minhas avós Raimunda Nonata e Nila por serem meus anjos da guarda, e ao meu avô Pedro pelo exemplo de força e resistência. Agradeço às (aos) tias(os) – principalmente Titia Neides – primas(os), padrinhos, madrinhas, e toda minha família de sangue e agregados que torceram por mim e me encheram de energia positiva.

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Ida Schwartz pela oportunidade única de trabalhar em um grupo tão plural – que tanto me engrandeceu –, e por me inspirar na luta e no papel das mulheres na pesquisa brasileira.

Agradeço à minha co-orientadora Dra. Marina Siebert por sempre estar do outro lado do corredor, do email ou do telefone para me guiar. Agradeço ao laboratório BRAIN – regido com maestria pela Dra. Fernanda Sperb-Ludwig –, ao grupo Gaucher – especialmente para Suelen Porto Basgalupp: minha maior parceira de pesquisa –, e claro, agradeço à Prof. Dra. Rosane Isabel Bittencourt e todo o pessoal da oncohematologia (Zona 11) por todas as contribuições ao longo desta jornada.

Agradeço a todos os membros e colegas do PPGBM por compartilharem graciosamente seus conhecimentos, e por me concederem uma experiência nível Capes 7. Deste ambiente surgiu a minha segunda família – amigos desbravadores do sul e amantes de polêmicas: Augusto dos Santos, Camila Gazolla, Renata Ruas e Yelena Perevalova. Obrigada por, *literalmente*, me carregarem na alegria e na tristeza por esses sinuosos 26 meses. Nosso poliamor fez tudo valer ainda mais a (dura) pena.

Agradeço aos meus velhos e melhores amigos de colégio, de graduação e de intercâmbio por se mostrarem sempre presentes mesmo na distância. Agradeço também aos novos amigos que ao conhecer me reconheci, onde me achei e me perdi na construção tanto do meu projeto profissional e pessoal. A todos, minha eterna gratidão!

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCEIRAS

Este trabalho foi realizado no Laboratório BRAIN (*Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences*) localizado no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com colaboração da Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP), do Serviço de Hematologia, do Serviço de Genética e do Centro de Pesquisa Clínica situados no HCPA.

Apoio financeiro ao projeto, registrado como 09-398, foi concedido pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE-HCPA).

Este trabalho segue às normas de ética em pesquisa humana e obtém certificado de apresentação para apreciação ética (CAAE) expedido pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) sob o número 47169215.0.0000.5327.

A aluna recebeu bolsa de mestrado concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por 24 meses, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) do Instituto de Biociências (IB) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

RESUMO

Introdução: O mieloma múltiplo (MM) é uma gamopatia maligna, ou seja, uma condição de produção anormal de imunoglobulina causada por um clone de célula B plasmocitária que prolifera descontroladamente. Esta doença representa 1% de todos os cânceres, e 10% dos casos de câncer hematológico. A incidência mundial ajustada pela idade varia de 2-6:100.000 habitantes. Modificações cromossômicas numéricas e estruturais são os principais iniciadores da transformação maligna nos plasmócitos. A maioria dos casos de MM envolve hiperdiploidia, e translocações no *locus* do gene *IGH* (cadeia pesada da imunoglobulina). Além destas alterações, diversas condições têm sido associadas ao desenvolvimento de MM, incluindo infecções, mudanças estromais e doenças de depósito. Nesta conjuntura, a doença de Gaucher (DG) emerge como um candidato promissor para investigação de MM. DG é uma doença de depósito lisossômico herdada de maneira autossômica recessiva, sendo causada pela presença de alterações patogênicas bialélicas no gene *GBA1* que codifica a enzima β -glicocerebrosidase (β -GCCase). A suspeita de DG é clínica e o método padrão-ouro de diagnóstico é a medida da atividade da β -GCCase. De maneira complementar, investigações de alterações em *GBA1* são feitas. As variantes patogênicas N370S e L444P são as mais frequentes, sendo detectadas em 90% dos genótipos de pacientes DG. **Justificativa:** Diversos estudos analisando disfunções hematológicas e DG concordam entre si ao apontarem maior ocorrência de gamopatias malignas ou pré-malignas nesse grupo. Este trabalho foi proposto por não haver ainda evidência de que heterozigotos para DG, suspeitos de também acumular esfingolípídeos patogênicos, possam ser mais susceptíveis ao MM. **Objetivo:** Investigar possíveis alterações genéticas e bioquímicas em β -GCCase associadas ao desenvolvimento de MM em pacientes da região sul do Brasil. **Metodologias:** Após consentimento livre esclarecido e coleta de sangue em tubo EDTA e papel-filtro de 67 pacientes, análises de β -GCCase e do controle interno β -Galactosidase (β -Gal) foram feitas por medida de atividade enzimática com substratos fluorescentes e análises das variantes N370S e L444P no DNA genômico foram feitos por sequenciamento de Sanger. **Resultados:** Obteve-se uma média de atividade de β -GCCase em pacientes com MM ($5,98 \pm 2,82$ nmol/h/mL) menor que a média encontrada na população normal ($p < 0,0001$). A média de atividade de β -Gal em pacientes com MM ($49,47 \pm 18,9$ nmol/h/mL) foi igual à população normal ($p = 0,213$). Apenas uma única paciente, sem ancestralidade judia alegada, apresentou heterozigose para N370S em

GBA1. **Conclusão:** Apesar de não haver associação direta entre heterozigose para variantes patogênicas comuns na DG e desenvolvimento de MM, a enzima β -GCase pode estar indiretamente associada ao processo, uma vez que sua atividade média está diminuída em pacientes diagnosticados com MM.

ABSTRACT

Introduction: Multiple Myeloma (MM) is a malignant gammopathy, i.e. a condition of abnormal immunoglobulin production caused by a clone of plasma B cells with uncontrolled proliferation. MM represents 1% of all cancers, and 10% of hematological cancer types. The age-adjusted global incidence varies between 2-6:100000. Chromosomal modifications are the main initiators of malignant transformation in plasmocytes. The majority of MM cases involves hyperdiploidy and translocations at the *IGH* gene (immunoglobulin heavy locus). Beside these alterations, various conditions have been associated with MM, including infections, stromal changes and storage diseases. On this scenario, Gaucher disease (GD) rises as a promising candidate to investigation. GD is a lysosomal storage disease inherited in an autosomal recessive manner, mainly caused by pathogenic biallelic alterations at *GBA1* -the gene that encodes β -glucocerebrosidase (β -GCCase). Measurement of β -GCCase is the gold-standard diagnosis method for suspected GD patients. Genetic analysis of *GBA1* is a complementary tool for diagnosis. Two missense variants – N370S and L444P – encompasses up to 90% of all genotypes in overall population. Numerous studies analyzing hematological dysfunctions and GD agrees among themselves in an increased occurrence of malignant and pre-malignant gammopathies.

Research justification: Lack of evidence of GD heterozygotes – believed to also accumulate pathogenic sphingolipids – susceptibility to MM. **Objective:** the aim of this study was to investigate whether genetic and biochemical alterations in β -GCCase are associated with MM development in patients from Southern Brazil. **Methodology:** After free informed consent and blood sampling in EDTA tubes and on filter paper (n=67), analysis of β -GCCase and the internal control β -Galactosidase (β -Gal) were performed by enzymatic measurement with fluorescent substrate while analysis of genomic DNA for N370S and L444P variants was done by Sanger sequencing. **Results:** It was found a mean β -GCCase activity (5.98 ± 2.82 nmol/h/mL) lower than the mean activity in overall population ($p < 0.0001$), while the mean β -Gal activity found in MM patients (49.47 ± 18.9 nmol/h/mL) remained unaltered ($p = 0.213$). Only one patient – without Jew Ashkenazi ancestry – presented N370S in heterozygosis. **Conclusion:** Despite no direct association between heterozygosis for common pathogenic GD variants and MM development was established, β -GCCase might be indirectly involved in the process since its overall activity was decreased in MM patients.

LISTA DE ABREVIATURAS

SH	sistema h epático
CTH	células-tronco h ematopoéticas
NK	<i>natural killer</i> (inglês – exterminadoras naturais)
CD	células d endríticas
IL	i nterleucinas
IFN γ	i nterferon γ
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (inglês – complexo principal de histocompatibilidade)
TCR	T cell receptor (inglês – receptor de célula T)
BCR	B cell receptor (inglês – receptor de célula B)
CT	células T
CB	células B
Ig	i munoglobulinas
MM	m ieloma m últiplo
CM	células de m ieloma
MGUS	<i>monoclonal gammopathy of undetermined significance</i> (inglês - gamopatia monoclonal de significância indeterminada)
SM	<i>smoldering</i> m ieloma
CNV	<i>copy number variation</i> (inglês – variação de número de cópias)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (inglês – polimorfismo de nucleotídeo único)
DG	d oença de G aucher
β -GCase	β - g licocerebrosidase
CG	células de G aucher
TRE	t erapia de r eposição e nzimática
TRS	t erapia de r edução de substrato
DP	d oença de P arkinson

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Resumo dos sistemas e critérios de estadiamento do mieloma múltiplo.

Tabela 2. Tipos e impacto das alterações genômicas envolvidas no desenvolvimento do mieloma múltiplo.

Tabela 3. Classificação sintomatológica dos tipos de doença de Gaucher.

Tabela 4. Estudos de série de casos publicados sobre a prevalência de mieloma múltiplo em pacientes com doença de Gaucher tipo I.

Figura 1. Organograma da conduta médica terapêutica em diferentes grupos de pacientes com mieloma múltiplo.

Figura 2. Biópsia de medula óssea de paciente com doença de Gaucher tipo I seguido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Figura 3. Prevalência do genótipo de *GBA1* na população mundial.

PREFÁCIO

De haploide a di. De n a $2n$, sendo n um número qualquer pré-estabelecido pela aleatória, embora seletiva, evolução da sopa fundamental que borbulhava à crosta. Dois completos se fundem para transcender a plenitude. Em uma lógica matemática não-óbvia onde divisões significam somas, e todos somados totalizam um, faz-se biologia. Registra-se a sua assinatura em átomos ordenados e, ainda assim, livres. Não se sabe onde é início e fim, onde a Letra Maiúscula começa e o ponto único finda. Se hierarquiza democraticamente. O universo do (di)sapiens é simultaneamente infinito e limitado. A mesma tinta, que escreve o tudo, escreve o nada. O independente esconde seu in por conveniência. E se não souber compilar todas as variáveis, mesmo que mutuamente exclusivas, jamais será inteiro - no que obviamente seria zero. Sua certeza já antecipa o quanto pode estar errado. Não se é isso ou aquilo, e sim issoeaquilo. Há germinativo no somático, e apesar do superficial isolamento que se pretende, é ocluído e incluído. Desumaniza-se humanos para produzir uma razão irracional. Se tu ensinas, será que aprendes? E se tu aprendes, será que ensinas? Como tu cuidas do outro, e ainda destrói a si? E ainda que indague, e ainda que ciente, e mesmo que descrente: ordenas linha, mas sou esfera. E mesmo científico sou literário. E vou criticar ao passo que sigo as normas. Sou molécula, célula, tecido, órgão, sistema ao passo que organismo. Meio que tudo é um.

- Raíssa Pereira Caldeira

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCEIRAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	vii
PREFÁCIO	viii
SUMÁRIO	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Sistemas Fisiológicos	1
1.1.1 Sistema Hematopoiético	1
1.1.2 Sistema Imune	2
1.2 Mieloma Múltiplo	4
1.2.1 Patogênese	5
1.2.2 Epidemiologia	5
1.2.3 Diagnóstico	6
1.2.4 Tratamento	8
1.2.5 Caracterização genética	9
1.3 Doença de Gaucher	13
1.3.1 Epidemiologia	13
1.3.2 Patogênese	13
1.3.3 Diagnóstico	15
1.3.4 Tratamento	15
1.3.5 Caracterização genética	16
1.4 Inter-relação da doença de Gaucher e do mieloma múltiplo	20
1.5 Justificativa	21
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. METODOLOGIA E RESULTADOS	23
3.1. Artigo científico	23
4. DISCUSSÃO GERAL	40

4.1. Quanto ao andamento da pesquisa	40
4.2. Quanto aos resultados obtidos	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
5.1 Conclusão	43
5.2 Perspectivas	43
6. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistemas Fisiológicos

Os órgãos, unidades funcionais de um sistema, são formados pela integração de diferentes tecidos, por sua vez estruturados por grupos de células – de mesmo material genético, porém distintamente programadas para assumir um perfil. A interação das partes, e não a supremacia de uma sobre a outra, governa a manutenção do equilíbrio fisiológico do organismo (Lebel et al. 2014).

1.1.1 Sistema Hematopoiético

O sistema hematopoiético (SH) proveniente de células mesodérmicas pós blastula-gastrula-neurulação, apresenta-se de forma transitória ou permanente como um grupo de células auto-renováveis variando hierarquicamente de multi- a uni-potentes (Seita e Weissman 2010). O SH simultaneamente integra, sobrepõe e/ou complementa outros sistemas orgânicos como o imune, o linfático e o circulatório, tornando difícil sua caracterização concreta por sítio anatômico. No entanto, considera-se a medula óssea como o principal órgão a hospedar esse sistema durante a vida adulta (Hoggatt et al. 2016).

Acredita-se que células-tronco hematopoiéticas (CTH) em sua pluralidade desmembram-se em unidades oligopotentes – linfóide, mielóide e eritróide – por meio de flutuações estocásticas do processo autônomo celular e sinalização do microambiente (Calvi e Link 2014; Carrelha et al. 2018). Os primeiros trabalhos que desvendaram a intrigante complexidade deste sistema começaram a ser publicados pelo grupo de Till e McCulloch (1961).

As células progenitoras linfóides são formadoras dos linfócitos B, T, e *natural-killers* (NK) (Alhaj Hussen et al. 2017), enquanto as células progenitoras mielóides formam tanto os eritrócitos e megacariócitos, quanto os granulócitos e os macrófagos (Pronk et al. 2007; Kawamoto et al. 2010). Ambas as linhagens podem dar origem às células dendríticas (CD), ou células apresentadoras de antígeno (Wu et al. 2001; Perić e Naik 2015). Estudos com animais imunodeficientes tornaram possível a elucidação da importância do nicho da medula óssea incluindo células estromais, estrutura óssea, fatores (ou ligantes), citocinas e vascularização na diferenciação das CTH (Russell e Bernstein

1968). O mecanismo de balanço na diferenciação e na quantidade destas variadas células durante a vida do organismo é conhecido como hematopoiese (Takizawa et al. 2012).

Pode-se agrupar estas células em dois importantes sistemas: o circulatório e o imune. A parte fluida (plasma e linfa, respectivamente) é similar quanto à composição aquosa e proteica nos dois sistemas (Yuan et al. 2013), enquanto que a composição celular circulante se sobrepõe à exceção do eritrócito e megacariócito, exclusivos do sistema circulatório.

1.1.2 Sistema Imune

O sistema imune compreende órgãos de armazenamento, passagem ou maturação das células imunes – que se agrupam de acordo com sua função de resposta a organismos estranhos ou elementos próprios, podendo ser inato ou adquirido. Apesar da categorização, os dois sub-sistemas são interdependentes para o funcionamento apropriado da defesa imediata ou permanente (Iwasaki e Medzhitov 2015). O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo, sendo suas respostas mantidas evolutivamente contra padrões moleculares associados a patógenos ou a danos (Kumar et al. 2011). A resposta tem um padrão de construção que vai de um nível basal de reconhecimento a um nível efetor, gerando uma memória curta (Quintin et al. 2014).

Os granulócitos – células com presença de vesículas granulares no citosol – foram originariamente descritos no final do século XIX por Ehrlich (1878), através do desenvolvimento de uma técnica para coloração celular com marcadores acidófilos. Previsivelmente, o século XX marcou grandes avanços na elucidação das variadas constituições de mediadores liberados pelos granulócitos para o meio extracelular diante um estímulo (Haneberg et al. 1984; Pecsvarady et al. 1992; Breedveld et al. 2017).

Podemos dividir os granulócitos em: neutrófilos – células circulantes abundantes, capazes de agir contra invasores por meio de fagocitose, degranulação e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Borregaard 2010); eosinófilos – combatem microrganismos maiores, como parasitas extracelulares, pela liberação de citotoxinas e interleucinas (IL) (Geering et al. 2013); mastócitos – células de mucosa e tecido conjuntivo que produzem IL-4, IL-13, histamina e heparina para modulação de respostas alérgicas (da Silva et al. 2014); basófilos – células circulantes menos comuns, com função similar aos mastócitos (Karasuyama e Yamanishi 2014).

Os fagócitos são caracterizados por seu potencial de englobar partículas e internalizá-las. Van Furth, fundamental nos primórdios da pesquisa sobre fagócitos, propôs este grupo como, basicamente, o conjunto de basicamente macrófagos transientes – derivados de monócitos – ou residentes (van Furth e Cohn 1968; van Furth et al. 1972; van Furth et al. 1985). Anos depois, os achados sobre as propriedades fagocíticas de células dendríticas derivadas de monócitos foram reconsiderados, e as CD foram incorporadas na mesma categoria (Koide et al. 1981). Dois principais caminhos de sinalização para as diferenças fenotípicas e funcionais dos macrófagos foram descritos. Uma delas é a tradicional, por via de sinalização de mTOR e Akt mediado por interferon- γ (IFN γ) (Covarrubias et al. 2015). A ativação alternativa, por sua vez, é principalmente dada por meio da IL-4 e IL-13, por via de sinalização de STAT-6 (Gordon e Martinez 2010).

As células NK são as únicas de origem linfóide a integrar o sistema inato. Isso se deve ao fato destas células possuírem mecanismos de ação tanto dependentes quanto independentes de patógenos (Keppel et al. 2013; Sun et al. 2014). As NK servem como ligação entre os dois sistemas, juntamente com as CD, e interagem por contato direto (célula-célula) com o sistema adaptativo (Patarroyo et al. 1990; Ribatti 2017).

O sistema imune adquirido, quando confrontado por um novo corpo estranho, responde com maior especificidade, afinidade e duração. A especificidade é devida à alta recombinação passível a ocorrer em genes de receptores de células B e T (BCR e TCR, respectivamente), gerando um grande repertório de reconhecimento (Schwartz and Hershberg 2013; Muraille 2014). A afinidade é potencializada pelo reconhecimento, processamento de antígeno (característica limitada às células B), maturação gênica e seleção de clones com receptores mais ávidos (Donermeyer et al. 2006; Eisen 2014). Assim, a ação deste sistema é mais lenta frente à primeira exposição ao corpo estranho, porém, ao final do processo, células especializadas com memória da resposta molecular desencadeada são selecionadas positivamente para rápida ação futura (Kaech 2014; Seifert and Küppers 2016).

As células T (CT) são produzidas na medula óssea, amadurecem no timo, circulam no organismo ainda quiescentes e se desenvolvem quando confrontada com patógenos. As CT virgens são ativadas em resposta à interação TCR, antígeno, complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major-histocompatibility complex*) e co-ligantes (Chang et al. 2014). Durante a fase efetora, as CT proliferam, crescem e se diferenciam

em: auxiliaadoras (CD4+) – que se subdividem em 4 grupos com funções e produção de citocinas específicas (tipo 1, tipo 2, tipo 17, e reguladoras); e citotóxicas (CD8+) secretoras de granzima B, perforina, IFN- γ , fator de necrose tumoral (TNF- α) que são essenciais para eliminação de patógenos (Park e Pan 2015). Depois da expansão, as CT passam pela fase de contração mediada por vias de morte celular programada e apenas uma parcela sobrevive para se tornar células de memória (Raeber et al. 2018).

As células B (CB) são produzidas na medula óssea, onde sofrem também processos de rearranjos que determinarão sua função. Rearranjos nos segmentos de cadeia pesada e cadeia leve do gene da imunoglobulina (Ig) geram um repertório capaz de reconhecer 5×10^{13} antígenos diferentes (Scholz e Cancro 2012; Wu et al. 2015). As CB imaturas deixam a medula óssea e migram para o baço, onde finalizam as etapas iniciais de desenvolvimento se diferenciando em virgens, foliculares ou marginais e formando, assim, os centros germinativos com diferentes zonas (Mauri e Bosma 2012). Circulando regularmente pelo corpo, as CB passam pelos órgãos linfóides secundários através da corrente sanguínea e linfa. A esfingosina-1-fosfato é um potente mediador lipídico produzido por plaquetas, eritrócitos e células endoteliais vasculares, capaz de atrair CB dos tecidos linfoides para o sangue e linfa (Schwab et al. 2005; Pieper et al. 2013).

Respostas humorais independentes de CT são montadas pelas CB nas zonas marginais dos centros germinativos encontrados no baço e nas mucosas. Durante os primeiros 3 dias de infecção, elas rapidamente se transformam em células plasmáticas extrafoliculares secretoras de IgM – que formam imuno-complexos com o patógeno (Kirchenbaum et al. 2014). As repostas humorais dependentes de CT induzidas por antígenos ocorrem nos centros germinativos do baço e linfonodos, levando à mudança de classe de Ig e ao desenvolvimento de CB plasmáticas (ou plasmócitos) de memória (Hua e Hou 2013). Os plasmócitos são células terminalmente diferenciadas e não parecem se dividir. Desta forma, são necessários sinais de sobrevivência (como a IL-6 e ligantes de CD44) para garantir sua permanência (Lechouane et al. 2013). Apesar dos vários estudos do papel de ligantes, receptores, componentes de sinalização e fatores de transcrição, os mecanismos que controlam por quanto tempo as células plasmáticas persistirão na medula óssea ainda não estão completamente esclarecidos (Pieper et al. 2013).

1.2 Mieloma Múltiplo

Dentro das doenças que acometem o sistema imune adaptativo estão diferentes condições envolvendo as células deste sistema. Os distúrbios plasmocitários compreendem o espectro de condições – malignas ou não – caracterizadas pela proliferação de células linfoplasmáticas na medula óssea, tipicamente, levando à produção de imunoglobulinas monoclonais detectáveis em eletroforese de proteína sérica (Glavey et al. 2013). Dentre estas condições estão a macroglobulinemia de Waldenstrom, a amiloidose primária, síndrome de POEMS e, com maior prevalência, o Mieloma Múltiplo (MM) (Boccardo e Pileri 1995; Amini et al. 2016).

1.2.1 Patogênese

O MM é um câncer hematológico que prolifera na medula óssea afetando diretamente a eritropoiese por inibição das CTH, a remodelação óssea por ativação dos osteoclastos e a filtração renal pela produção exacerbada de imunoglobulinas (Heher et al. 2013; Bouchnita et al. 2016; Terpos et al. 2018). O MM representa o extremo do espectro de neoplasias derivadas de CB, geradas a partir de clones de células de memória produtoras de imunoglobulinas terminalmente diferenciadas (Bianchi and Munshi 2015).

Apesar das células de mieloma terem origem linfóide, o MM é assim classificado não só por compreender alterações intrínsecas, mas por interferir em outros processos do SH. Quanto mais aumenta o número de células neoplásicas na medula óssea, menos células vermelhas, brancas e plaquetas são produzidas (Tzoran et al. 2013; Heher et al. 2013; Gozzetti et al. 2015). Igualmente, como o nome propriamente sugere, o MM interfere na função normal de múltiplos sistemas, seja direta ou indiretamente (Fonseca 2003).

1.2.2 Epidemiologia

Em diferentes populações, a faixa de idade média ao diagnóstico é de 60-70 anos (Kaya et al. 2012; El Husseiny et al. 2014). O MM representa 1% de todos os cânceres, enquanto que na categoria de câncer hematológico configura 10% dos casos. Gênero não aparece como fator de risco para a doença e, apesar do que se acreditava há até pouco tempo, indivíduos de origem étnica africana não possuem chances aumentadas de desenvolvê-la, mas sim de apresentar mais complicações no momento ou após o diagnóstico (Ailawadhi et al. 2018).

A qualidade dos estudos de incidência de MM é heterogênea em muitas populações, inclusive no Brasil (Ferlay et al. 2015). Alguns notáveis estudos ofereceram uma ideia do cenário epidemiológico no mundo, tendo uma alta magnitude na variação da incidência ajustada pela idade, estendendo-se de 2:100.000 no Irã (Rajabli et al. 2013) e em outros países subdesenvolvidos, a 5-6:100.000 em países europeus e nos Estados Unidos (Vélez et al. 2016; Costa et al. 2017; Andres et al. 2018). Acredita-se que discrepâncias como esta sejam atribuídas a fatores geodemográficos e sociais de cada população (Al-Hamadani et al. 2014).

1.2.3 Diagnóstico

Por apresentar sintomas inconclusivos e genéricos – como cansaço e dores ósseas, indivíduos com MM sofrem com o atraso no diagnóstico. Na Inglaterra, cerca de 40% dos pacientes são apenas diagnosticados em atendimentos de emergência (Shephard et al. 2015). Na tentativa de superar esta demora, políticas de saúde públicas têm sido propostas no intuito de aumentar o conhecimento dos profissionais da saúde básica quanto aos sintomas do MM (Howell et al. 2013).

O protocolo internacional atualizado com diretrizes sobre MM foi recentemente publicado por Rajkumar et al. (2014), e indica os dois maiores critérios a serem identificados no momento do diagnóstico: medulograma exibindo $\geq 10\%$ de plasmócitos ou plasmocitomas extramedulares; e ≥ 1 de fatores definidores de mieloma. Tais fatores são principalmente resumidos ao acrônimo inglês CRAB que corresponde aos sintomas de hipercalcemia (Ca > 11 mg/dL), insuficiência renal (creatinina sérica > 2 mg/dL ou filtração de creatinina < 40 mL/seg), anemia (hemoglobina < 10 g/dL) e lesões osteolíticas, ou em inglês *lytic bone lyses*. Biomarcadores altamente específicos, como presença de proteína monoclonal (M) sérica ≥ 3 g/dL e/ou proteinúria – medidos por eletroforese de proteínas – e relação de cadeias leves livres (FLC, do inglês *free light chain*) $\kappa/\lambda \geq 100$ também são considerados fatores definidores.

Apesar do exame morfológico de medula óssea, eletroforese de proteínas e raio-x convencionais permanecerem como padrão-ouro entre as técnicas de diagnóstico rápido, preciso e custo-efetivo, outras técnicas de citogenética, imunofenotipagem, ressonância magnética e tomografia computadorizada podem contribuir para melhor avaliação prognóstica e de eficácia de tratamento (San-Miguel et al. 2013).

Os tipos de proteína M são IgG em 50% dos casos, IgA em 20%, cadeias livres de imunoglobulinas também em 20%. Apesar das proteínas do tipo IgM, IgE e IgD serem bastante incomuns, somente as IgE e IgD estão relacionadas ao pior prognóstico e sobrevida (Wang et al. 2016; Castillo et al. 2017; Hejl et al. 2018). Cerca de 1-2% dos casos de MM não apresentam proteína M detectável, sendo assim considerados como não-secretores (Chawla et al. 2015; Corso e Mangiacavalli 2017).

Os pacientes podem ser classificados quanto ao prognóstico de diversas formas, sendo os escores D & S (Durie e Salmon 1975), *International Staging System - ISS* (Greipp et al. 2005) e mais recentemente, após revisão extensa, R-ISS (Palumbo et al. 2015) as mais importantes para definição do tratamento. Como exposto na Tabela 1, os 3 sistemas de escore pretendem definir o grau de desenvolvimento de MM a partir de dados laboratoriais e citogenéticos. Deste modo, quanto menor for o escore, mais favorável será o prognóstico do paciente.

Tabela 1. Resumo dos sistemas e critérios de estadiamento do mieloma múltiplo.

Escore	CrITÉrios Durie e Salmon (1975)	CrITÉrios ISS (Greipp et al. 2005)	CrITÉrios ISS revisado (Palumbo et al. 2015)
	Todos os seguintes:		Todos os seguintes:
I	<ul style="list-style-type: none"> - Hb > 10 g/dL - CaS normal <i>ou</i> ≤ 12 mg/dL - Ausência de danos ósseos <i>ou</i> plasmacitoma ósseo solitário - Baixa taxa de proteína M - IgG < 5 g/dL - IgA < 3 g/dL - Proteína B-J < 4 g/24 h 	<ul style="list-style-type: none"> - B2M sérica < 3,5 mg/L - Albumina sérica ≥ 3,5 g/dL 	<ul style="list-style-type: none"> - Critérios ISS I^e ausência de fatores citogenéticos de alto risco - LDH normal
II	Valores entre estágio I e III	Valores entre estágio I e III	Valores entre estágio I e III
	Um ou mais dos seguintes:		Um dos seguintes:
III	<ul style="list-style-type: none"> - Hb < 8,5 g/dL - CaS > 12 mg/dL - Lesões osteolíticas - Alta taxa de proteína M - IgG > 7g/dL - IgA > 5 g/dL - Proteína BJ > 12 g/24 h 	<ul style="list-style-type: none"> - B2M ≥ 5,5 mg/L 	<ul style="list-style-type: none"> - Critérios ISS III^e fatores citogenéticos de alto risco <i>t(4;14), t(14;16), del(17p)</i> - LDH elevado
A	<ul style="list-style-type: none"> - Função renal normal (CrS < 2 mg/dL) 		

B - Função renal anormal
(CrS \geq 2 mg/dL)

Hb – hemoglobina; CaS – cálcio sérico; CrS – creatinina sérica; BJ – Bence-Jones;
LDH – lactato desidrogenase; B2M - β -2-microglobulina

Por vezes, o MM é precedido de condições intermediárias classificadas como gamopatia monoclonal de significância indeterminada ou MGUS (inglês - *monoclonal gammopathy of undetermined significance*) e *Smoldering* Mieloma (SM). Estas condições não se manifestam com sintomas, mas sim com leves alterações em biomarcadores que imputam observação mais cautelosa sem necessitar estritamente de intervenção médica (Mateos e Landgren 2016).

1.2.4 Tratamento

A terapia inicial de MM varia em diferentes países dependendo da disponibilidade dos medicamentos. Os regimes mais comuns em pacientes recém-diagnosticados envolvem quimioterápicos (ciclofosfamida, doxorrubicina, talidomida), corticoides (dexametasona e prednisona) e inibidores de proteassomo (bortezomibe, carfilzomibe, daratumumabe, etc) (Cejalvo e de la Rubia 2017). Se a terapia de primeira-linha for bem sucedida, considera-se a realização de transplante de medula óssea autólogo (Kumar 2011).

Pacientes elegíveis ao transplante recebem aproximadamente quatro ciclos iniciais de terapia de indução com diferentes classes de medicamentos, seguidos por coleta de células tronco e transplante autólogo – considerada terapia de consolidação; enquanto que indivíduos inelegíveis recebem a terapia por 12-18 meses (Figura 1) (Rajkumar and Kumar 2016). A elegibilidade ao transplante autólogo de medula óssea – geralmente mais indicado que o heterólogo – considera questões como idade, desempenho físico e comorbidades dos pacientes (Gertz e Dingli 2014). A depender da resposta e da presença de características citogenéticas de alto risco, define-se a necessidade de terapia de manutenção por um determinado período (Shank et al. 2015).

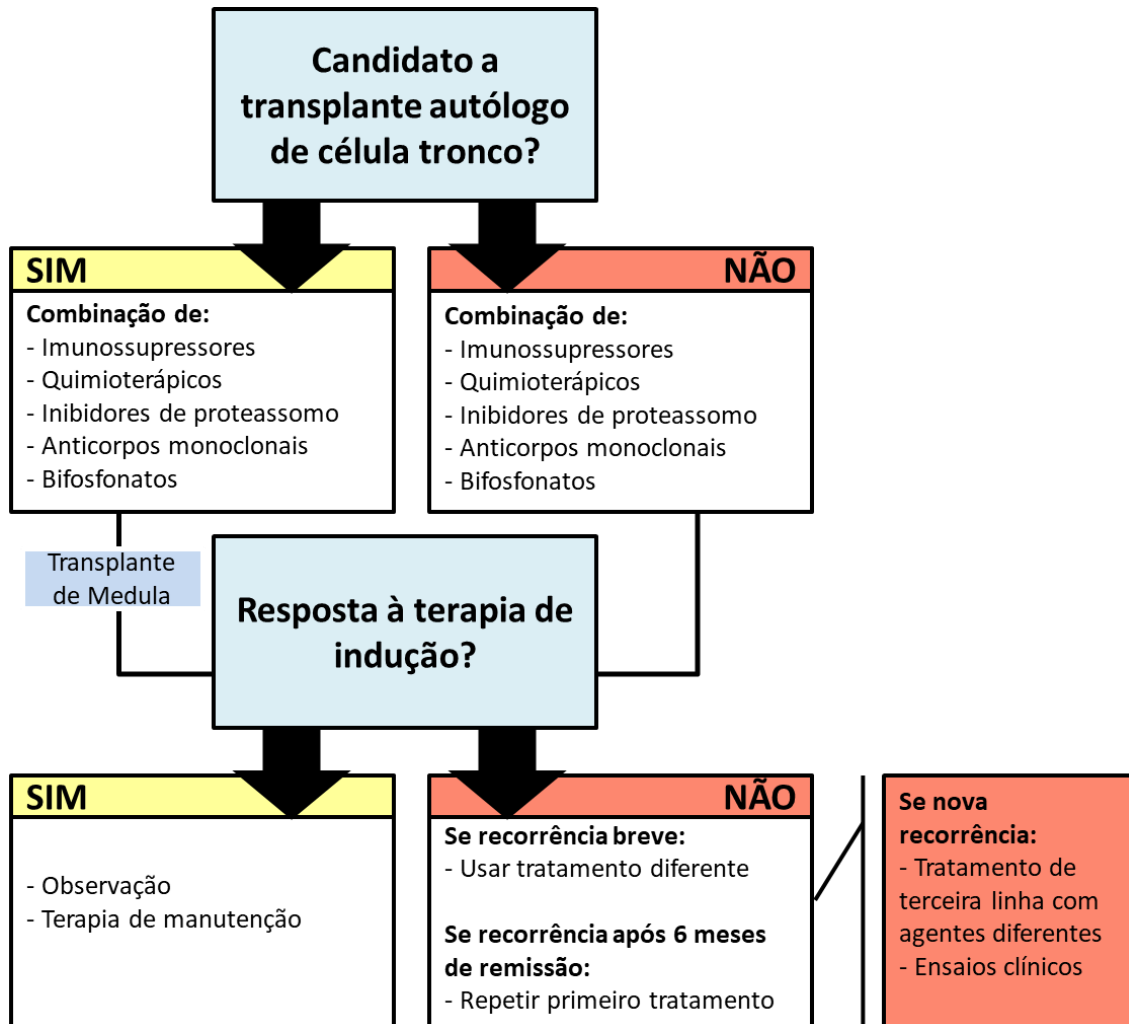


Figura 1. Organograma da conduta médica terapêutica em diferentes grupos de pacientes com mieloma múltiplo. Adaptado de *Multiple Myeloma Research Guide* (2014).

Apesar da introdução de novos agentes terapêuticos nas últimas duas décadas e da aparente hierarquização dos tratamentos, ainda não há uma abordagem comprovada para cura para esses pacientes. As maiores controvérsias são em relação às recomendações atuais de associações de agentes terapêuticos e de futuros ensaios (PDQ Adult Treatment Editorial Board 2002). As respostas são classificadas como completa, parcial muito boa, parcial ou ausente. A sobrevida média dos pacientes com MM é de 5-7 anos (Rajkumar and Kumar 2016).

1.2.5 Caracterização genética

Como a maioria dos tumores malignos, o MM é uma doença geneticamente complexa e heterogênea que se constrói, desenvolve e progride por meio de múltiplos eventos genômicos (De Mel et al. 2014). Um dos aspectos fundamentais do câncer é a sequência temporal em que as alterações genéticas acontecem. A estrutura peculiar e rara de apresentação clínica das etapas pré-malignas (MGU, SM) e maligna (MM) permite uma investigação apurada da hierarquia genômica deste espectro (Dhodapkar 2016). Essa sequência pode ser desencadeada por eventos germinativos primários que predisõem à doença, e/ou por alterações iniciadoras com a aquisição de alterações genômicas que, enfim, causam o aparecimento, a progressão e o desenlace do MM (Manier et al. 2017).

Modificações cromossômicas são os principais iniciadores da transformação maligna nos plasmócitos. A maioria dos casos de MM envolve hiperdiploidia, translocações no *locus* do gene *IGH* (cadeia pesada da imunoglobulina) e/ou variações do tipo variação no número de cópias (CNVs) (Bolli et al. 2017b).

Um evento unificador na patogênese do MM é a desregulação na expressão dos genes da ciclina D (*CCND*) – proteína responsável por ligar e ativar cinases da superfamília CDK (*cyclin-dependent kinase*) para fosforilação de proteínas celulares, levando assim a progressão do ciclo celular. A família de ciclinas D é composta pelos tipos D1, D2 e D3 que possuem alta similaridade e são expressas de forma redundante (Choi et al. 2012; Bustany et al. 2015). A desregulação de *CCND* pode ocorrer de forma *cis* por justaposição a um acentuador de expressão de *IGH*, ou de forma *trans* por expressão ectópica de fatores de transcrição da família *MAF* (*macrophage-activating factor*) que se ligam no promotor de *CCND2* (Chesi e Bergsagel 2013).

Outro gene envolvido neste processo é o *MMSET* (*multiple myeloma SET domain*) que codifica uma metil-transferase que atua em histonas H3K36, modulando a expressão de vários genes. *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*) codifica um receptor do fator FGF (*fibroblast growth factor*) que está envolvido em diversos processos celulares como proliferação, resistência a drogas e angiogênese (Kato e Nakagama 2014). Ambos genes estão na mesma região do cromossomo 4. Por esta razão, a justaposição de *MMSET-FGFR3-IGH* leva a desregulação simultânea destes genes (Xie and Chng 2014; Li et al. 2017). Apesar de expressarem níveis ligeiramente altos de ciclina D2, o mecanismo envolvido ainda não está muito bem elucidado (Våtsveen et al. 2009; Manier et al. 2017).

A desregulação da ciclina D também pode ser desencadeada por eventos hiperdiploides que induzem a expressão bialélica de ciclina D1 (Stella et al. 2015), tal como pela hiperatividade da via de sinalização mediada por *STAT3* (*signal transducers and activators of transcription 3*) (Di Martino et al. 2015); ou por eventos hipodiploides que aumentam a expressão de *CCND2* concomitante à diminuição de *CCND1* (Van Wier et al. 2013), reforçando a ideia de dependência entre desfechos clínicos e o tipo de *CCND*, sendo D2 o mais agressivo.

Mutações somáticas em outros genes aparecem de forma secundária e estão mais associadas à progressão do que à iniciação tumoral. *TP53* (*tumor protein p53*) é um gene supressor de tumor amplamente conhecido por seu papel na regulação da divisão celular. Alterações em *TP53* estão relacionadas à sobrevida mais curta e à doença mais agressiva (Chen et al. 2012; Soussi e Wiman 2015).

Analogamente, mutações em importantes fatores como *BRAF* – *B-Raf Proto-Oncogene*, que codifica uma proteína da família RAF (*rapid accelerated fibrosarcoma*) cinases, e *KRAS* – *Kirsten Rat Sarcoma Proto-Oncogene*, que codifica uma GTPase, promovem uma regulação positiva da via de sinalização MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) que controla a proliferação celular (Lionetti et al. 2015), enquanto que mutações ativadoras dos fatores NFκB (*nuclear factor kappa B*) conferem resistência às células de mieloma e evasão do sistema imunológico (Demchenko e Kuehl 2010). O gene *CKS1B* (*CDC28 Protein Kinase Regulatory Subunit 1B*), por sua vez, é essencial para regulação de CDKs necessária para transição celular do estado quiescente para proliferativo (Khattar e Thottassery 2013). Estes dados estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Tipos e impacto das alterações genômicas envolvidas no desenvolvimento do mieloma múltiplo. Adaptado de Manier et al. (2017).

Tipo de alteração (%)	Regiões envolvidas	Impacto
Aneuploidia (45)		
Hiperdiploidia (40)	Chr 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e/ou 21	Incerto.
Hipodiploidia (5)	Chr 14	Desfecho e progressão pior.
Não-aneuploidia (45)		
Desregulação direta	t(11;14)(q13;q32) <i>CCND1/IGH</i>	Associado aos tipos hipo-

da ciclina D (24)	t(6;14)(p21;q32) <i>CCND3/IGH</i> t(12;14)(p13;q32) <i>CCND2/IGH</i>	ou não-secretor, produção de cadeia leve λ . Evolução clínica heterogênea, porém favorável e prognóstico neutro.
Desregulação indireta da ciclina D (21)	t(14;16)(q32;q23) <i>IGH/c-MAF</i> t(14;20)(q32;q11) <i>IGH/MAFB</i> t(8;14)(q24.3;q32) <i>MAFA/IGH</i> t(4;14)(p16;q32) <i>FGFR3-MMSET/IGH</i>	Regulação positiva de ciclina, resistência a apoptose. Associado a sobrevida curta.
Outros genes (10)	<i>KRAS, BRAF, TP53, CKS1B, NFκB</i>	Variável.

Chr – Cromossomo

Embora valiosa informação genômica tenha sido derivada de estudos citogenéticos, a visão panorâmica sobre MM foi ampliada nos últimos anos com a introdução de estudos de sequenciamento exônico em grupos de pacientes (Manier et al. 2017). Extrapolando o racional de detecção de mutações somáticas envolvidas em etapas mais tardias, tem-se o enfoque em investigações de ordem germinativa. No entanto, a integração dos dois tipos de alterações, apesar de ser verdadeira, parece ainda estar extensamente desarmônica, porém sua melhor compreensão potencializará o desenvolvimento e a aplicação da medicina personalizada no câncer (Pujana 2014).

Eventos primitivos no processo de transformação maligna, no entanto, são mais difíceis de averiguar, posto que eventos alegadamente sutis podem potencialmente fomentar a aquisição de variações somáticas (Morgan et al. 2014). Um modelo-chave neste tipo de pesquisa é o estudo de casos familiares, que permite o rastreamento direcionado de padrões moleculares compartilhados por grupos mais susceptíveis (Samuel et al. 2014). Vários estudos têm permitido a associação de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) em novos genes que, interessantemente, estão em algum nível conectados às vias de sinalização, regulação e divisão vistas anteriormente (Mitchell et al. 2015; Bolli et al. 2017a).

Um modelo alternativo é a investigação alvo-específica delineada a partir de pressupostos da literatura científica. Uma gama de condições tem sido associada através dos anos ao MM, incluindo infecções, doenças sistêmicas, mudanças estromais e doenças de depósito (O'Malley et al. 2018). Nesta conjuntura, a doença de Gaucher emerge como um candidato promissor para esse modelo de investigação, uma vez que é uma doença de depósito lisossomal e compartilha moléculas derivadas de esfingolipídeos – potenciais agentes na progressão do câncer (Barth et al. 2013).

1.3 Doença de Gaucher

A doença de Gaucher (DG) foi primeiramente reportada na tese do francês Phillipe Gaucher em 1882, sendo o mecanismo enzimático elucidado somente oito décadas depois pelo bioquímico americano Roscoe Brady (1965) (Lunsjö et al. 1989; Ferreira e Gahl 2017). A condição é herdada de forma autossômica recessiva, sendo causada pela presença de alterações patogênicas bialélicas no gene *GBA1* que codifica a enzima β -glicocerebrosidase (β -GCase), situado no cromossomo 1q21.31 (Gerken et al. 1964; Sidransky 2012).

1.3.1 Epidemiologia

Dados de incidência/prevalência populacional da DG são escassos ou ausentes para a maioria das populações, incluindo para a população brasileira. Na revisão epidemiológica recente de Nalysnyk et al. (2017), viu-se que a prevalência da DG tipo I na população de judeus Ashkenazi é 118:100.000, sendo muito maior que a vista na população em geral (1 – 2:100.000). A incidência, por sua vez, mostrou-se bastante variável de acordo com a população analisada, sendo estimada entre 0.3:100.000 no Japão e Canadá (Applegarth et al. 2000) e 5.80:100.000 na Áustria (Mechtler et al. 2012). Além dos demais fatores convencionais intrínsecos à pesquisa epidemiológica, a desatualização destes dados também podem ter contribuído para tamanha variação.

1.3.2 Patogênese

A ausência e/ou a baixa atividade e instabilidade estrutural dessa enzima, que atua no metabolismo dos esfingolipídeos, conduz a um acúmulo crônico do substrato

glicocerebrosídeo nos lisossomos de células do sistema mononuclear fagocitário (Grabowski et al. 1990; Smith et al. 2017). Estes macrófagos residentes, conhecidos como células de Gaucher (CG) apresentam aparência de “papel amassado” à microscopia (Figura 2), e configuram a principal característica histológica da doença (Parkin e Brunning 1982; Markuszewska-Kuczynska et al. 2015).

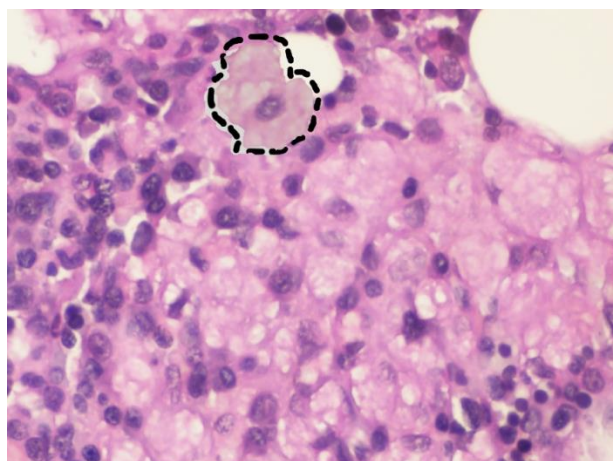


Figura 2. Biópsia de medula óssea de paciente com doença de Gaucher tipo I seguido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Aumento de 40X. Contorno tracejado evidenciando uma CG. Coloração eosina e hematoxilina.

Os sintomas clínicos da DG são bastante variáveis, sendo os fenótipos comumente subdivididos em três tipos (Tabela 3). O tipo I tem apresentação sistêmica não-neuronal e corresponde a mais de 90% dos casos (Zimran et al. 2018). Os demais tipos são agravados por manifestações neurológicas, sendo a forma mais grave, rara e letal da doença o tipo II – necessitando de manejo clínico desafiador – (Weiss et al. 2015), enquanto o tipo III se pronuncia de forma intermediária (Abdelwahab et al. 2017).

Tabela 3. Classificação sintomatológica dos tipos de doença de Gaucher.

	TIPO I (OMIM 230800)	TIPO II (OMIM 230900)	TIPO III (a, b, c) (OMIM 231000)
Principais manifestações clínicas	Hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, trombocitopenia, dor óssea, fadiga, retardo de crescimento, risco	Comprometimento neurológico agudo, envolvimento visceral rigoroso	Comprometimento neurológico crônico, comportamento ríspido, anemia, osteonecrose

	aumentado para Parkinsonismo		
Início dos sintomas	Infância à vida adulta	Perinatal à fase lactente	Infância
Expectativa de vida	Diminuída a normal	Até 2 anos	Algumas décadas

1.3.3 Diagnóstico

A suspeita de DG é clínica e o método padrão-ouro de diagnóstico é a medida da atividade da β -GCCase em qualquer célula nucleada, normalmente leucócitos obtidos da circulação periférica ou em amostras de sangue coletadas em papel-filtro (Sozmen e Sezer 2017). Essa medida pode ser realizada por plataforma microfluídica (Sista et al. 2013), ensaio fluorimétrico e/ou espectrometria de massa em tandem (Wolf et al. 2018). A atividade residual da enzima é cerca de 10-15% do valor normal (Neufeld 1991; Stirnemann et al. 2017).

Embora exista uma associação entre os tipos da doença e os níveis residuais de atividade da β -GCCase, tais medidas não são confiáveis para o estabelecimento do prognóstico da doença, havendo ainda extensa sobreposição de valores obtidos entre os 3 tipos de DG, e entre grupos de indivíduos normais e heterozigotos em diferentes idades (Michelin et al. 2005; Johnson et al. 2014). Assim, o diagnóstico bioquímico não tem precisão para detectar heterozigotos, mas a análise genética pode ser usada para esse fim. A detecção de variantes no gene *GBA1* oferece informação complementar ao exame enzimático com a vantagem de ter valor prognóstico aos pacientes, permitindo, muitas vezes, diferenciar os tipos neuropáticos dos não-neuropáticos de DG (Koprivica et al. 2000; Stirnemann et al. 2017).

1.3.4 Tratamento

As duas principais terapias utilizadas no tratamento da DG são a terapia de reposição enzimática (TRE) e a terapia de redução de substrato (TRS). Segundo dados do Ministério da Saúde (2017), existem em torno de 700 pacientes com DG em tratamento no Brasil, sendo que aproximadamente 96% fazem uso de TRE e 4% de TRS. A TRE é uma

terapia de alto-custo por, além de cobrir um restrito grupo de pacientes, empregar um medicamento biológico (enzima recombinante) produzido por sistemas de expressão de células vegetais ou de células de mamíferos (Grabowski et al. 2014). A aplicação é feita a cada duas semanas por meio de infusão de dose individualizada. Apesar de variável entre os pacientes, a resposta a parâmetros clínicos e laboratoriais podem ser vistos em poucos meses, sendo os pacientes do tipo I os mais beneficiados (Charrow e Scott 2015). O tempo de vida sem dano em órgãos e com maior qualidade de vida pode ser aumentado em, respectivamente, 13% e 6% neste grupo (Grabowski et al. 2014), como visto em estudos em uma coorte holandesa – reforçando assim a justificativa para seu emprego como tratamento de primeira-linha.

A TRS, por sua vez, emerge como um tratamento de segunda-linha considerado quando há intolerância ou falta de resposta à TRE. Esta terapia consiste na administração oral de pequenos compostos inibidores da síntese de substrato na via dos esfingolipídeos, que possuem o potencial de se difundir rapidamente em vários tecidos, incluindo ossos e sistema nervoso central (Smid et al. 2016; Wagner et al. 2018). Desse modo, os tipos II e III podem ser favorecidos com o uso da TRS no manejo de alguns sintomas – mesmo ultrapassando a barreira hematoencefálica, ainda não há certeza que a administração isolada da TRS impacte na prevenção ou reversão dos sintomas neurológicos (Ceravolo et al. 2017). Além disso, fortes efeitos adversos são comuns ao uso da TRS incluindo cefaleia, diarreia, artralgia, dor abdominal e perda de peso (Van Rossum e Holsopple 2016). O desenvolvimento de terapias alternativas surge como promessa para superação destas limitações, destacando-se a terapia gênica, o uso de chaperonas para estabilização da proteína e seu correto enovelamento e o transplante de células-tronco (Coutinho et al. 2016; Yilmazer et al. 2017; Somaraju e Tadepalli 2017).

1.3.5 Caracterização genética

O gene *GBA1* abrange 7,6 kb de DNA genômico e possui 11 éxons e 10 íntrons. Ele se encontra em um locus complexo no braço longo do cromossomo 1, que contém 7 genes e 2 pseudogenes. *GBAPI* é o pseudogene homólogo a *GBA1* que surgiu por eventos de duplicação que ocorreram provavelmente há 40 milhões de anos, antes mesmo da divergência dos grandes macacos do ramo que deu luz aos macacos do mundo velho (Winfield et al. 1997; Svobodová et al. 2011). *GBAPI* localizado a 16 kb a jusante de

GBA1, é expresso mas não traduzido, apresentando 96% de homologia à sequência de seu cognato normal (Zampieri et al. 2017). A alta homologia e a proximidade física destes genes permite que eventos de rearranjo (recíprocos, ou não) surjam. Esta característica elucidada a origem de alelos patogênicos em *GBA1*, ao passo que dificulta o diagnóstico molecular demandando aperfeiçoamento na amplificação e no sequenciamento para distinguir a região correta a ser analisada (Tayebi et al. 2003a).

Até o momento foram depositadas e descritas na base de dados *The Human Gene Mutation Database* (Stenson et al. 2014, HGMD 2018) 460 mutações patogênicas em *GBA1*. A maioria dessas mutações é rara e restrita a poucos indivíduos, sendo SNP o tipo mais representativo ($\approx 70\%$). Algumas alterações com troca de sentido são muito frequentes entre os pacientes com DG, dentre elas a c.1226A>G (N370S; p.Asn409Ser) e a c.1448T>C (L444P; p.Leu483Pro) (Grabowski 1997; Alfonso et al. 2013).

Como mostrado na Figura 2, homozigose para N370S é o genótipo mais prevalente na população em geral com DG, explicando aproximadamente 44% dos indivíduos com genótipo confirmado. Heterozigotos compostos que apresentam N370S totalizam quase 43% dessa população. Na população israelense, formada sobretudo por povos judeus Ashkenazi, as mutações N370S e L444P explicam 97% dos genótipos (Zimran et al. 2018). A frequência estimada de heterozigotos em judeus Ashkenazi é de 6% (Bronstein et al. 2014), enquanto que em populações não-judias acredita-se ser em torno de 1% – apesar de não haver dados oficiais publicados até o momento.

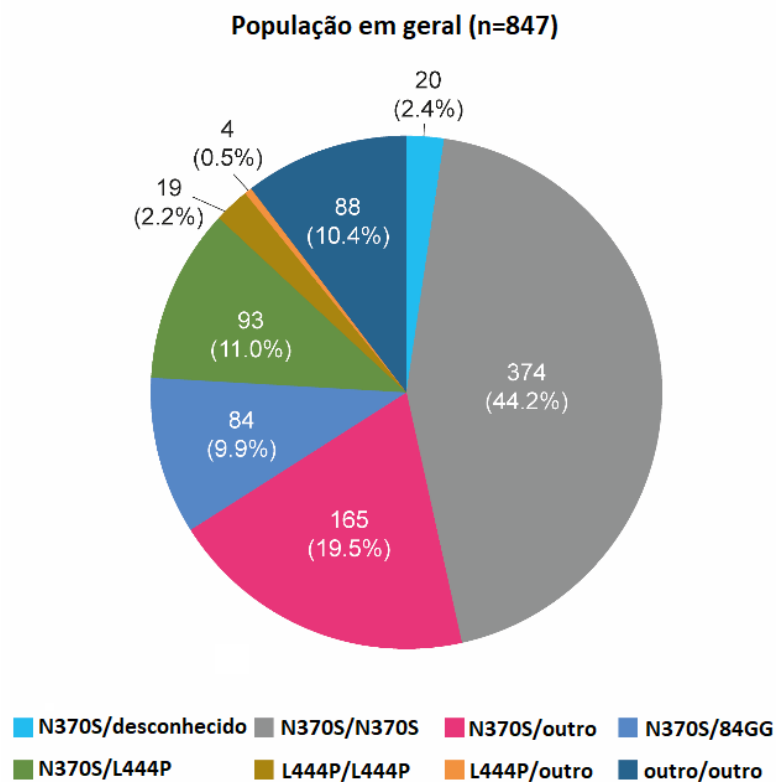


Figura 3. Prevalência do genótipo de *GBA1* na população mundial. Adaptado de Zimran et al. 2018.

A nível de proteína, a N370S causa substituição de aminoácido em uma alça próximo ao sítio catalítico afetando assim o pH ótimo da enzima e a afinidade pelo substrato. Esta mutação, porém, tem efeitos leves, sendo mais associada ao tipo I de DG. No entanto, apesar da L444P levar à substituição de aminoácido distante do sítio catalítico na cadeia polipeptídica da β -GCCase, esta alteração proporciona a desestabilização de sua estrutura seguida por degradação proteossômica (Montfort et al. 2004; Ben Bdira et al. 2017). A baixa presença/atividade residual da enzima leva a um efeito patológico grave, sendo atribuída aos tipos II e III, quando em homozigose ou em combinação com outros alelos patogênicos graves (Roshan Lal e Sidransky 2017).

Diversos genes modificadores, genes contíguos, proteínas transportadoras e fatores ambientais podem influenciar o fenótipo dos pacientes com DG. Dentre os fatores genéticos está a presença de mutações no gene *PSAP*, que codifica a proteína precursora prosaposina. Essa proteína é clivada e um dos produtos originados é a proteína saposina C (SAP-C), que é a proteína ativadora da β -GCCase (Tamargo et al. 2012). Indivíduos

homozigotos para mutações em *PSAP* podem também desenvolver a DG, e nestes casos estão mais relacionados aos tipos neuronopáticos (Vaccaro et al. 2010).

O gene *GBA2* codifica uma glicocerebrosidase não-lisossomal associada à membrana do retículo endoplasmático e ao complexo de Golgi, que é responsável pela hidrólise de O-glicosídeos e glicosilceramida (Körschen et al. 2013). Na DG, o aumento na expressão de *GBA2* surge como mecanismo de compensação pela ausência da β -GCCase. A ausência funcional concomitante de β -GCCase 1 e 2 parece ter um impacto maior no acúmulo de glicocerebrosídeo, dentro e fora dos lisossomos, em órgãos relevantes na DG, evidenciando uma ação modificadora plausível de *GBA2* na etiologia da DG (Burke et al. 2013; Yildiz et al. 2013).

Embora a maioria das enzimas lisossômicas alcance o seu destino final através de receptores de manose-6-fosfato, a β -GCCase é direcionada aos lisossomos por uma rota independente (Coutinho et al. 2015). Em 2007, a proteína LIMP-2 (*Lysosomal Integral Membrane Protein type 2*), a qual é codificada pelo gene *SCARB2*, foi identificada como responsável pela ligação e pelo direcionamento da enzima β -GCCase aos lisossomos (Reczek et al. 2007). A interação entre a β -GCCase e o LIMP-2 é pH-dependente, sendo favorecida em pH neutro no interior do retículo endoplasmático e interrompida ao alcançar o pH ácido no interior dos lisossomos (Zachos et al. 2012). Ao atingir o seu local de ação, a β -GCCase é liberada do seu receptor LIMP-2 e, conseqüentemente, torna-se disponível para degradação do seu substrato. A presença de mutações no gene *SCARB2* pode prejudicar o adequado transporte da β -GCCase aos lisossomos, estando também envolvidos nos tipos neuronopáticos da DG (Zigdon et al. 2017). Os mecanismos acima dispostos explicam parcialmente a ampla heterogeneidade clínica observada na DG, a qual também é influenciada pelo ambiente.

Outro fato ainda não claramente elucidado é a relação do desenvolvimento de doenças associadas à doença de base. No caso da DG, a doença de Parkinson (DP) e o MM lideram a extensa categoria de comorbidades (Cox et al. 2015; Utz et al. 2016). Sugerida no início do milênio por Tayebi et al. (2003b), não precisou mais do que 5 anos para a confirmação definitiva da associação entre DP e *GBA1* a partir de um grande estudo multicêntrico com 5691 pacientes com DP e 4898 controles (Sidransky et al. 2009). O estudo mostrou que mutações em *GBA1* eram significativamente prevalentes em uma população heterogênea de pacientes com DP com risco de chance (*odds ratio*) de 5.43. A

chance aumentada da DP, vista tanto em homozigotos quanto em heterozigotos de DG, parece envolver o mal-enovelamento da β -GCase na agregação de α -sinucleína em neurônios dopaminérgicos (Balestrino e Schapira 2018).

Notadamente, a última década foi permeada de pesquisas neste campo. Enquanto isso, a associação da DG e das fases maligna e pré-maligna de MM, primeiramente vista por Goldfarb et al. (1950) e posteriormente descrita por dois grupos independentes (Pinkhas et al. 1965; Pratt et al. 1968), ainda permanece menos explorada em homozigotos e, principalmente, heterozigotos de DG.

1.4 Inter-relação da doença de Gaucher e do mieloma múltiplo

Diversos estudos analisando disfunções hematológicas e DG concordam entre si ao apontarem uma maior ocorrência de gamopatias nesse grupo. Condições pré-malignas como MGUS e SM são as mais relatadas e revisadas (Arends et al. 2013; Ayto and Hughes 2013; Rodic et al. 2013). Estudos de gamopatia maligna são menos frequentes, e aparecem listadas na Tabela 4.

Tabela 4. Estudos de série de casos publicados sobre a prevalência de mieloma múltiplo em pacientes com doença de Gaucher tipo I.

Referência	N (DG)	N (MM)	Risco relativo para MM
Lee (1982)	239	5 (2%)	NA
Shiran et al. (1993)	48	2 (4%)	NA
Zimran et al. (2005)	505	2	NA
Rosenbloom et al. (2005)	2510	10	5,9 (95% IC: 2,8-10,8)
de Fost et al. (2008)	131	2	51,1 (95% IC: 6,2-184)
Landgren et al. (2007)	1525	2	1,29 (95% IC:0,32-5,16)
Taddei et al. (2009)	403	9	25 (95% IC: 9,17-54,4)

NA – Não avaliado; IC – Intervalo de confiança; N – número;

Dados sobre a liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias (especialmente IL-6 e IL-10) por CG, forneceram uma possível ligação entre DG e distúrbios linfoproliferativos (Allen et al. 1997; Pastores and Hughes 2017). De fato, a proposta feita por Costello et al. (2006), de que o estímulo crônico do sistema imunológico desencadeia a secreção de imunoglobulinas (diretamente por IL-6) juntamente com o acúmulo de

glicocerebrosídeo possa ser a explicação para esta associação, precedeu diversas investigações na área. Análises de subprodutos metabólicos no plasma de pacientes com DG mostraram aumento de circulação de glicoesfingolípídeo e outros subprodutos antigênicos (Dekker et al 2011) que estimulam a longo prazo os plasmócitos, promovendo instabilidade genômica.

Depois de um período de estagnação devido à limitação de técnicas existentes, uma nova era iniciou quando os primeiros modelos animais de DG, com características similares às vistas em pacientes, se tornaram disponíveis (Farfel-Becker et al. 2011). Como inflamação crônica, incluindo ativação de CB, é comumente vista em doenças do metabolismo de lipídeos, houve um crescente interesse em estudar estes mecanismos celulares também em DG (Pastores e Hughes 2017). Estudo em linhagem de ratos com deficiência de β -GCCase em células hematopoéticas apresentou alta frequência de alterações malignas e letais em CB (Pavlova et al. 2013). A indução positiva de centros germinais de CB e produção de anticorpos coordenados por subprodutos do metabolismo deficiente em DG foi vista tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Mais recentemente, viu-se que Ig monoclonais específicas para esfingo e lisolípídeos estavam presentes em 33% dos pacientes com DG e gamopatas esporádicas (Nair et al. 2015; Nair et al. 2016). Esses modelos permitiram forte evidência do papel de esfingolípídeos bioativos no controle da proliferação de CB e na patogênese de distúrbios oriundos dessas células.

1.5 Justificativa

Apesar da importância dos resultados dos estudos mencionados, ainda não há evidência que heterozigotos para alterações em *GBA1*, que parecem também acumular esfingolípídeos patogênicos, tenham algum risco aumentado de MGUS e MM (Weinreb et al. 2018). Até o momento, somente o estudo de Rosenbloom et al. (2009) explorou esta hipótese. Em tal estudo, 95 pacientes com MM (18 descendentes de judeus Ashkenazi) tiveram *GBA1* sequenciado. A variante N370S em heterozigose foi encontrada em dois pacientes (ambos judeus Ashkenazi), porém nenhuma correlação clínica relevante foi realizada. O trabalho aqui proposto se justifica, então, pelo potencial de explorar novos aspectos na possível associação das duas doenças e fornecer, pela primeira vez, informações moleculares quanto à heterozigose de *GBA1* em um grupo de pacientes brasileiros com MM.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar se possíveis alterações no principal gene envolvido na doença de Gaucher (*GBAI*) estão associadas ao desenvolvimento de mieloma múltiplo em pacientes diagnosticados na região sul do Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a atividade enzimática de β -glicocerebrosidase em amostras de sangue de pacientes com mieloma múltiplo recrutados no ambulatório de hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- Verificar a existência de pacientes heterozigotos para as variantes patogênicas mais comuns de *GBAI* – N370S e L444P;

3. METODOLOGIA E RESULTADOS

Os resultados obtidos serão apresentados sob forma de artigo em língua inglesa que será submetido à publicação pela aluna e primeira autora Raíssa Pereira Caldeira e pelos pesquisadores que contribuíram na co-autoria do manuscrito.

3.1. Artigo científico

O título proposto para publicação é “ β -GLUCOCEREBROSIDASE ACTIVITY AND *GBA1* VARIANTS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA”.

Os autores do artigo e suas respectivas afiliações são as seguintes: Raíssa Pereira Caldeira^{1,4}, Suelen Porto Basgalupp^{2,4}, Fernanda Sperb-Ludwig^{1,4}, Tatiéle Nalin^{2,4}, Rosane Isabel Bittencourt⁵, Kristiane Michelin-Tirelli^{6,7}, Filippo Vairo⁷, Marina Siebert^{3,4,8}, Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{1,2,4,7}

1. Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Genetics Department, Bioscience Institute, UFRGS, Porto Alegre, Brazil;
2. Postgraduate Program in Medical Sciences, Faculty of Medicine, UFRGS, Porto Alegre, Brazil;
3. Postgraduate Program in Gastroenterology and Hepatology, Faculty of Medicine, UFRGS, Porto Alegre, Brazil;
4. Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences (BRAIN) Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, Brazil;
5. Department of Hematology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, Brazil;
6. Inborn Errors of Metabolism Laboratory (LEIM), Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, Brazil;
7. Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, Porto Alegre, Brazil;
8. Molecular and Protein Analysis Unit, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, Brazil.

Segue o conteúdo do artigo em preparo:

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is the second most common hematological, presenting incidence up to 6:100000. MM is a plasmocytes neoplasia characterized by aberrant clonal growth within bone marrow alongside abnormal production of M-protein in abnormal levels. MM pathogenesis mainly involves somatic translocations of regions within the immunoglobulin heavy (IGH) locus. Due high risk of MM development in Gaucher disease (GD), the association of both disease has been speculated for a long time. GD is an autosomal recessive inborn error of sphingolipid metabolism. In this condition, substrate storage is caused by reduced activity of lysosomal β -glucocerebrosidase (GCCase). Gold-standard diagnosis consists of GCCase measurement, as genetic analysis of *GBAI* is a complementary tool. Both N370S and L444P encompasses up to 90% of all genotypes in overall population. The aim of this study was to investigate the metabolic activity of GCCase in MM patients, as well as screen for GD heterozygotes. Main methods included GCCase measurement on dried-blood spots and Sanger sequencing of *GBAI* exons 9 and 10. As a result, the average value (5.98 ± 2.82 nmol/h/mL) was found to be lower in MM patients compared to normal individuals. Genetic analysis yielded the identification of only one patient with N370S variant in heterozygosis. In conclusion, although alterations in *GBAI* might not explain enzyme dysfunction, further investigation on other genetic and biochemical events may strengthen our finding on GCCase lowered function.

KEYWORDS: Gaucher disease, multiple myeloma, β -glucocerebrosidase, *GBAI*

INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is the second most common hematological cancer, accounting for 1% of all cancer types¹. Malignant plasmocytes present aberrant growth within bone marrow alongside production of paraprotein in abnormal levels. Clinical presentation encloses the CRAB criteria²: increased serum calcium (>11 mg/dL), renal damage (serum creatinine >2mg/dL), anemia (hemoglobin <10 g/dL) and bone osteolysis. MM incidence varies among countries ranging 2-6:100.000 and affecting mostly elderly people³⁻⁵.

The main events in MM pathogenesis are somatic translocations involving regions within the immunoglobulin heavy (IGH) locus and genes within the cyclin D expression regulation pathway⁶. Continuous investigations allow for a constantly changing landscape of possible interactants in MM molecular etiology^{7,8}. One novel candidate proposed by recent studies is the sphingosine molecules and its analogues^{9,10}. These publications might be plausible to further support the speculation of a connection between MM and Gaucher disease (GD)¹¹, where glucosylsphingosine is an auxiliary biomarker of the latter¹².

GD is an autosomal recessive inborn error of metabolism named after its first describer, the Frenchman Phillipe Gaucher¹³. Sphingolipid metabolic pathway is impaired in this condition due to reduced activity of lysosomal β -glucocerebrosidase (GCCase). Phenotypes are classified in three types depending on the existence of neurological symptoms, time of onset and severity¹⁴. In consequence, the substrate glucocerebroside accumulate within tissue-resident phagocytes impairing its normal function¹⁵. From Gaucher cells arise biomarkers as ferritin, glucosylsphingosine and chitotriosidase¹⁶⁻¹⁸ – all detectable in plasma. Gold-standard diagnosis consists of GCCase measurement, as genetic analysis is a complementary tool^{19,20}. Currently, hundreds of pathogenic variants are described as pathogenic on GCCase gene (*GBA1*). Interestingly, two missense variants – N370S and L444P – encompasses up to 90% of all genotypes in overall population and 97% in Ashkenazi Jew (AJ)²¹. GD global incidence²² varies from 1:40000-60000, being 75 times higher in AJ. Brazil is the third country with the highest number of GD patients²³.

Interestingly, there are several records of MM relative risk ranging from 1.29 to 51.1 in GD patients compared to general population²⁴⁻²⁶. Chronic immune activation and antigenic stimulation have been thought to explain the link MM-DG^{27,28}. The aim of our

study was to investigate the metabolic cellular status of GCase in MM patients, as well as screen for GD heterozygotes to corroborate with biochemical findings.

METHODOLOGY

This cross-sectional study was approved by local committee of ethics in research (CEP) under the certificate of presentation for ethical appreciation (CAAE) number 47169215.0.0000.5327. A NGS pilot study involved 10 patients, while other analyses were performed for the entire sample.

Sample collection

Minimum sample size of 60 MM patients was determined to obtain data with statistical significance. Calculation considered MM incidence, as well as frequency of *GBA1* heterozygotes and homozygotes in general population. Convenience sampling was performed during patient's regular visit to the hematology outpatient clinic at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All enrolled patients (n=67) were ≥ 18 years old (y.o.). Informed consent from patients or responsible family member was required for enrollment. Peripheral blood was collected in both EDTA and sodium heparin tubes, as well as in filter paper. Medical and laboratorial records were checked as assented.

Measurement of GCase enzyme activity

Patient's dried-blood spots in filter paper were utilized for measuring GCase and β -galactosidase (β -Gal) activity, with the latter serving as an endogenous quality control measure. Substrates 4-methylumbelliferyl β -D-glucopyranoside and 4-methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside from Sigma were employed in the reaction. Adapted assay protocols^{29,30} were used. Information concerning enzyme activity for both GCase and β -Gal in healthy individuals was extracted from Uribe & Giugliani (2013). GCase activity in obligate heterozygotes of Gaucher disease was retrieved from Michelin *et al.* (2005)³¹.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using Easy-DNA Purification kit (ThermoFisher Scientific) according manufacturer's protocol. Sample quantification was performed with NanoDrop 1000 spectrophotometer and QubitTM fluorimeter using QubitTM dsDNA HS Assay Kit, both also from ThermoFisher Scientific.

NGS and Sanger Sequencing

To screen for any variants involved in GD, Next-Generation Sequencing (NGS) was performed as a pilot study in 10 patients with low GCase activity. Ion Torrent Personal Genome Machine™ platform, after Multiplex PCR amplification of a validated Ion Ampliseq™ customized panel containing *GBAI* were used. Variants were categorized and analyzed in Enlis Genome Research (LLC) and Ion Reporter (ThermoFisher Scientific) software.

To screen for N370S and L444P variants, adapted³² PCR for *GBAI* exons 9 and 10 followed by Sanger automated sequencing were performed for all patients. Patients from the pilot study were also included for technique validation purpose. Amplicons were purified using a PEG-based protocol (20% PEG; 2.5M NaCl). Sanger automated sequencing was performed using BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit, according to the manufacturer's instructions, in a 3500 Series Genetic Analyzer, both from ThermoFisher Scientific. Sequences analyses were run on Bioeditv.7.0.5 software (Ibis Therapeutics). Reference genome and transcript were GRCh37 e NM_001005742.2, respectively. Variant frequencies from ExAC³³, gnomAD³³, ABraOM³⁴ were used as reference population databases.

Statistical analysis

GraphPad v5.0 software was used for statistical analysis. Epidemiological, clinical and enzymatic mean values were compared using standard t-test. Pearson correlation calculations were assessed for enzyme activity and blood variables. Enzyme activity among different groups was analyzed by one-way ANOVA with post-hoc Tukey test. Meanwhile, allele frequencies comparison was performed by one-way ANOVA with post-hoc Bonferroni's test. A p-value ≤ 0.05 was considered significant.

RESULTS

In this study, the mean age of MM patients at diagnosis was 57.7 ± 11.7 ranging from 29 to 88 years (n=67). Mean age at enrollment was 62.3 ± 11 (n=67), while mean age at stem-cell transplantation was 53.0 ± 9.8 (n=33). MM occurrence was equally common between both genders. None patient declared Jewish ancestry. The most common

monoclonal gammaglobulin types were IgG, followed by light chain, and IgA. Only one patient presented biclonal gammaglobulins. Detailed data is shown in Table 1.

The mean value and standard deviation for staging and laboratorial parameters at the time of diagnosis is shown in Table 2. Median staging level of II was seen for both ISS (n=55) and D&S systems (n=59).

The mean activity for GCase was 5.98 ± 2.82 nmol/h/mL, while the β -Gal was 49.47 ± 18.9 nmol/h/mL in MM patients. Internal reference values for GCase and β -Gal are, respectively, 2.2-16.6 and 35-126 nmol/h/mL. As shown on Figure 1, an outstanding decrease was seen in GCase ($p < 0.0001$), but not in β -Gal activity ($p = 0.213$) of MM patients when cross-analyzing to a large control study of Uribe and Giugliani (2013) (n=715; n=2354, respectively).

Using Michelin et al. (2005) study as a parameter, either healthy individuals, MM patients, GD patients and GD heterozygotes the average of GCase activity displayed a mean GCase activity significantly different from each other ($p < 0.0001$). The GCase activity in MM patients showed to be smaller than in GD heterozygotes ($p = 0.0012$). Pearson correlation was insignificant comparing GCase and β -Gal enzyme activity with hemoglobin concentration ($r = 0.10$, $p = 0.4$; $r = -0.01$, $p = 0.9$, respectively). On the other hand, mild correlation was seen between both enzymes and leukocyte count (GCase $r = 0.5$, $p < 0.000$, $R = 0.24$; β -Gal $r = 0.5$, $p < 0.000$, $R = 0.25$). Considering only patient under MM treatment (n=46), correlation remains unchanged.

No pathogenic variants spanning *GBAI* coding and non-coding adjacent regions were detected in NGS analysis of patients with low GCase activity. Sanger sequencing of critical *GBAI* region bearing common pathogenic variants yielded the detection of one N370S heterozygous patient. Also, intronic variants of unknown clinical significance rs1800473 (c.1388+141A>G) and rs2974924 (c.1389-68T>C) were detected in 34/114 and 5/114 alleles, respectively. Allele frequency in MM patients showed no significant difference ($p = 0.58$) between population frequencies from controls.

DISCUSSION

In this study, mean age at diagnosis was 57.7 years. The average value and standard deviation of GCase in MM patients was 5.98 ± 2.82 nmol/h/mL. Mild correlation ($r = 0.5$) was seen between leukocyte count and GCase activity. Variant analysis yielded the identification of one patient with N370S allele in heterozygosis.

Concerning the epidemiological data, it is valid to point out that diagnosis tended to occur earlier in our patients than in larger populations³⁶. It might be explained due to medical accessibility, health care providers awareness, life expectancy and exposure to risk factors disparities among developed and developing countries. Aside of this difference, gender and m-protein type percentages fairly agreed with some data described in the literature^{37,38}. Nevertheless, there is still no general consensus as both parameters have shown controversial reports^{39,40}. Clinical findings showed that MM patients tend to be diagnosed during mild cancer activity, normally being classified at the stage II. Serum B₂-microglobulin had the largest standard deviation, which should be overcome in favor of maintaining reliable prognostic value^{41,42}.

Studies with both normal and GD-affected individuals, using identical methodologies as described in this investigation, were reviewed^{35,43-45}, with GCase activity showing a statistically significant decrease in patients of MM. To be specific, activity was shown to be similar to levels previously demonstrated in obligate heterozygotes of GD³⁸. This indicates that the cellular metabolism is altered in an enzyme-specific manner. The lower activity might be explained by age, and leukocytes count as they are mildly correlated. As immunosuppressors are largely employed in MM treatment, which was the case for almost 70% of patients, it could intrinsically reduce leukocyte count^{46,47} and consequently enzyme dosage. On the other hand, the sphingolipids metabolism could be lessened due to genetic alteration.

Regarding inherited genetic contribution, the most common pathogenic variants in *GBA1* were screened. N370S and L444P frequencies showed to be in equilibrium with other populations, thus it is unlikely that they play any role in MM pathogenesis. This result was consistent with Rosenbloom et al. (2009) investigation in 95 MM patients from Iraq with and without Jewish Ashkenazi ancestry, which yielded no significant evidence on clinical association of MM and GD⁴⁹. Interestingly, one patient, a 58 year old female, was identified in this study as a heterozygote of the N370S variant, which, in accordance with previous literature, could increase her risk of developing Parkinson's disease⁵⁰. Unfortunately, further attempts to elucidate the exact effect this mutation had on the pathophysiology of this patient were unsuccessful as follow-up calls went unanswered so far, however our investigation shows that her levels of GCase activity were within normal range, and close to the overall average demonstrated in MM patients.

It should be noted that not every possible variant within *GBAI* was analyzed for a possible connection to GCCase activity, leaving the possibility of a much rarer variant influencing this enzymatic profile. In an attempt to identify such rare variants, a pilot of NGS analysis was conducted on 10 patients with abnormally low levels of GCCase activity, with zero clinically significant results. Due to the high cost of this procedure and the in-existent discovery rate, we do not find NGS to be a viable cost-effective strategy in elucidating the molecular cause of GCCase deficiency in patients of MM.

Our study, which is the first of its kind, into the GCCase enzymatic profile in MM patients reveals a statistically lower level of enzyme activity in MM patients. However we were unable to find a viable genetic link between GD and this molecular deficiency, leading us to suspect that an alternative molecular pathway must be involved in this symptomology of MM. In conclusion, although alterations in *GBAI* might not explain enzyme dysfunction, further investigation on other genetic and biochemical events may strengthen our finding on GCCase lowered function.

DECLARATION OF INTEREST: none to declare

ACKNOWLEDGMENT

Financial support for this study was granted by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) research scholarship and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA, Brazil, project # 09-398).

BIBLIOGRAPHY

- 1 Becker N. Epidemiology of Multiple Myeloma. In: *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*. 2011, pp 25–35.
- 2 Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV *et al*. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014; **15**: e538–e548.
- 3 Rajabli N, Naeimi-Tabeie M, Jahangirrad A, Sedaghat S-M, Semnani S, Roshandel G. Epidemiology of leukemia and multiple myeloma in Golestan, Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; **14**: 2333–6.
- 4 Vélez R, Turesson I, Landgren O, Kristinsson SY, Cuzick J. Incidence of multiple myeloma in Great Britain, Sweden, and Malmö, Sweden: The impact of differences in case ascertainment on observed incidence trends. *BMJ Open* 2016; **6**: e009584.
- 5 Costa LJ, Brill IK, Omel J, Godby K, Kumar SK, Brown EE. Recent trends in multiple myeloma incidence and survival by age, race, and ethnicity in the United States. *Blood Adv* 2017; **1**: 282–287.
- 6 Chesi M, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: Basic and clinical updates. *Int J Hematol* 2013; **97**: 313–323.
- 7 Corre J, Munshi N, Avet-Loiseau H. Genetics of multiple myeloma: Another heterogeneity level? *Blood*. 2015; **125**: 1870–1876.
- 8 Bergsagel PL. Where We Were, Where We Are, Where We Are Going: Progress in Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ B* 2014; **34**: 199–203.
- 9 Pyne S, Pyne NJ. New Perspectives on the Role of Sphingosine 1-Phosphate in Cancer. In: *Handbook of experimental pharmacology*. 2013, pp 55–71.
- 10 García-Bernal D, Redondo-Muñoz J, Dios-Esponera A, Chèvre R, Bailón E, Garayoa M *et al*. Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving $\alpha 4\beta 1$ integrin function. *J Pathol* 2013; **229**: 36–48.
- 11 Ayto R, Hughes DA. Gaucher disease and myeloma. *Crit Rev Oncog* 2013; **18**: 247–268.
- 12 Murugesan V, Chuang WL, Liu J, Lischuk A, Kacena K, Lin H *et al*. Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease. *Am J Hematol* 2016;

- 91**: 1082–1089.
- 13 Lunsjö K, Ceder L, Strömqvist B. Phillippe Gaucher. The man behind the rare enzyme deficiency. *Lakartidningen* 1989; **86**: 3915–8.
 - 14 Grabowski GA, Zimran A, Ida H. Gaucher disease types 1 and 3: Phenotypic characterization of large populations from the ICGG Gaucher Registry. *Am. J. Hematol.* 2015; **90**: S12–S18.
 - 15 Smith L, Mullin S, Schapira AHV. Insights into the structural biology of Gaucher disease. *Exp Neurol* 2017; **298**: 180–190.
 - 16 Medrano-Engay B, Irun P, Gervas-Arruga J, Andrade-Campos M, Andreu V, Alfonso P *et al.* Iron homeostasis and inflammatory biomarker analysis in patients with type 1 gaucher disease. *Blood Cells, Mol Dis* 2014; **53**: 171–175.
 - 17 Elmonem MA, Van Den Heuvel LP, Levchenko EN. Immunomodulatory Effects of Chitotriosidase Enzyme. *Enzyme Res.* 2016; **2016**: 2682680.
 - 18 Ferraz MJ, Marques ARA, Appelman MD, Verhoek M, Strijland A, Mirzaian M *et al.* Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: Formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. *FEBS Lett* 2016; **590**: 716–725.
 - 19 Raghavan SS, Topol J, Kolodny EH. Leukocyte beta-glucosidase in homozygotes and heterozygotes for Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 1980; **32**: 158–73.
 - 20 Johnson BA, Dajnoki A, Bodamer O. Diagnosis of lysosomal storage disorders: Gaucher disease. *Curr Protoc Hum Genet* 2014; **2014**: 17.15.1-17.15.6.
 - 21 Zimran A, Belmatoug N, Bembi B, Deegan P, Elstein D, Fernandez-Sasso D *et al.* Demographics and patient characteristics of 1209 patients with Gaucher disease: Descriptive analysis from the Gaucher Outcome Survey (GOS). *Am J Hematol* 2018; **93**: 205–212.
 - 22 Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C *et al.* A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int J Mol Sci* 2017; **18**: 441.
 - 23 Drelichman G, Linares A, Villalobos J, Cabello JF, Kerstenetzky M, Kohan RM *et al.* [Gaucher disease in Latin America. A report from the Gaucher Disease International Registry and the Latin American Group for Gaucher Disease]. *Medicina (B Aires)* 2012; **72**: 273–82.

- 24 de Fost M, Out TA, de Wilde FA, Tjin EPM, Pals ST, van Oers MHJ *et al.* Immunoglobulin and free light chain abnormalities in Gaucher disease type I: data from an adult cohort of 63 patients and review of the literature. *Ann Hematol* 2008; **87**: 439–49.
- 25 Taddei TH, Kacena KA, Yang M, Yang R, Malhotra A, Boxer M *et al.* The underrecognized progressive nature of N370S Gaucher disease and assessment of cancer risk in 403 patients. *Am J Hematol* 2009; **84**: 208–214.
- 26 Arends M, van Dussen L, Biegstraaten M, Hollak CEM. Malignancies and monoclonal gammopathy in Gaucher disease; a systematic review of the literature. *Br J Haematol* 2013; **161**: 832–842.
- 27 Pavlova E V., Archer J, Wang SZ, Dekker N, Aerts JMFG, Karlsson S *et al.* Inhibition of UDP-glucosylceramide synthase in mice prevents Gaucher disease-associated B-cell malignancy. *J Pathol* 2015; **235**: 113–124.
- 28 Nair S, Boddupalli CS, Verma R, Liu J, Yang R, Pastores GM *et al.* Type II NKT-TFH cells against Gaucher lipids regulate B-cell immunity and inflammation. *Blood* 2015; **125**: 1256–1271.
- 29 Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, Casentini. Gaucher and Niemann-Pick diseases-enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn screening cards. *Clin Chim Acta* 2002; **317**: 191–197.
- 30 Camelier M, De Mari J, Burin M, Civallero G, Giugliani R. Extended use of dried-leukocytes impregnated in filter paper samples for detection of Pompe, Gaucher, and Morquio A diseases. *Clin Chim Acta* 2015; **446**: 218–220.
- 31 Michelin K, Wajner A, Bock H, Fachel Â, Rosenberg R, Flores Pires R *et al.* Biochemical properties of β -glucosidase in leukocytes from patients and obligate heterozygotes for Gaucher disease carriers. *Clin Chim Acta* 2005; **362**: 101–109.
- 32 Koprivica V, Stone DL, Park JK, Callahan M, Frisch A, Cohen IJ *et al.* Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 2000; **66**: 1777–86.
- 33 Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V., Samocha KE, Banks E, Fennell T *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016; **536**: 285–291.
- 34 Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N

- et al.* Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat* 2017; **38**: 751–763.
- 35 Uribe A, Giugliani R. Selective Screening for Lysosomal Storage Diseases with Dried Blood Spots Collected on Filter Paper in 4,700 High-Risk Colombian Subjects. In: *JIMD reports*. Springer, 2013, pp 107–116.
- 36 Kaya H, Peressini B, Jawed I, Martincic D, Elaimy AL, Lamoreaux WT *et al.* Impact of age, race and decade of treatment on overall survival in a critical population analysis of 40,000 multiple myeloma patients. *Int J Hematol* 2012; **95**: 64–70.
- 37 Rosenberg PS, Barker KA, Anderson WF. Future distribution of multiple myeloma in the United States by sex, age, and race/ethnicity. *Blood* 2015; **125**: 410–2.
- 38 Yadav P, Merz M, Mai EK, Försti A, Jauch A, Goldschmidt H *et al.* Cytogenetic aberrations in multiple myeloma are associated with shifts in serum immunoglobulin isotypes distribution and levels. *Haematologica* 2018; **103**: e162–e164.
- 39 Sharma M, Zhang MJ, Zhong X, Abidi MH, Akpek G, Bacher U *et al.* Older Patients with Myeloma Derive Similar Benefit from Autologous Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; **20**: 1796–1803.
- 40 Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, Dagrada G, Konn ZJ, Tapper WJ *et al.* Gender Disparities in the Tumor Genetics and Clinical Outcome of Multiple Myeloma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; **20**: 1703–1707.
- 41 Durie B, Stock-Novack D, Salmon S, Finley P, Beckord J, Crowley J *et al.* Prognostic value of pretreatment serum beta 2 microglobulin in myeloma: a Southwest Oncology Group Study [see comments]. *Blood* 1990; **75**.<http://www.bloodjournal.org/content/75/4/823.long?sso-checked=true> (accessed 11 Apr2018).
- 42 Rossi D, Fangazio M, De Paoli L, Puma A, Riccomagno P, Pinto V *et al.* Beta-2-microglobulin is an independent predictor of progression in asymptomatic multiple myeloma. *Cancer* 2010; **116**: 2188–2200.
- 43 Civallero G, Michelin K, de Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho JC *et al.* Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta* 2006; **372**: 98–102.

- 44 Müller KB, Rodrigues MD, Pereira VG, Martins AM, D’Almeida V. Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience. *Diagn Pathol* 2010; **5**: 65.
- 45 Verma J, Thomas DC, Kasper DC, Sharma S, Puri RD, Bijarnia-Mahay S *et al.* Inherited Metabolic Disorders: Efficacy of Enzyme Assays on Dried Blood Spots for the Diagnosis of Lysosomal Storage Disorders. *JIMD Rep* 2017; **31**: 15–27.
- 46 Huang SY, Tang JL, Yao M, Ko BS, Hong RL, Tsai W *et al.* Reduction of leukocyte count is associated with thalidomide response in treatment of multiple myeloma. *Ann Hematol* 2003; **82**: 558–564.
- 47 Palumbo A, Bladé J, Boccadoro M, Palladino C, Davies F, Dimopoulos M *et al.* How to manage neutropenia in multiple myeloma. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* 2012; **12**: 5–11.
- 48 Rosenbloom BE, Becker P, Weinreb N. Multiple myeloma and Gaucher genes. *Genet. Med.* 2009; **11**: 134.
- 49 Weinreb NJ, Mistry PK, Rosenbloom BE, Dhodapkar M V. MGUS, lymphoplasmacytic malignancies and Gaucher disease: the significance of the clinical association. *Blood* 2018; : blood-2018-02-834689.
- 50 García-Sanz P, Orgaz L, Bueno-Gil G, Espadas I, Rodríguez-Traver E, Kulisevsky J *et al.* N370S-GBA1 mutation causes lysosomal cholesterol accumulation in Parkinson’s disease. *Mov Disord* 2017; **32**: 1409–1422.

Table 1. Sample characterization of multiple myeloma patients enrolled.

FEATURES	N
Gender (female; male)	32; 35
Monoclonal	66
- IgG	7
- IgG kappa	28
- IgG lambda	7
- IgA	2
- IgA kappa	4
- IgA lambda	1
- Light kappa chain	13
- Light lambda chain	4
Biclonal	1
Stem cell transplantation (yes; no)	33; 34
Under treatment (yes; no)	46; 21

Table 2. Mean value of laboratorial findings at diagnosis.

FEATURES	N	MEAN (\pmSD)
Hemoglobin (g/dL)	58	10.5 \pm 2.4
Corrected serum calcium (mg/dL)	50	10.0 \pm 1
Serum creatinine (mg/dL)	56	1.5 \pm 0.7
Albumin (g/dL)	51	3.6 \pm 0.5
Serum B ₂ -microglobulin (ng/mL)	52	6.0 \pm 5.4

N- Number of individuals; SD- Standard deviation

FIGURES

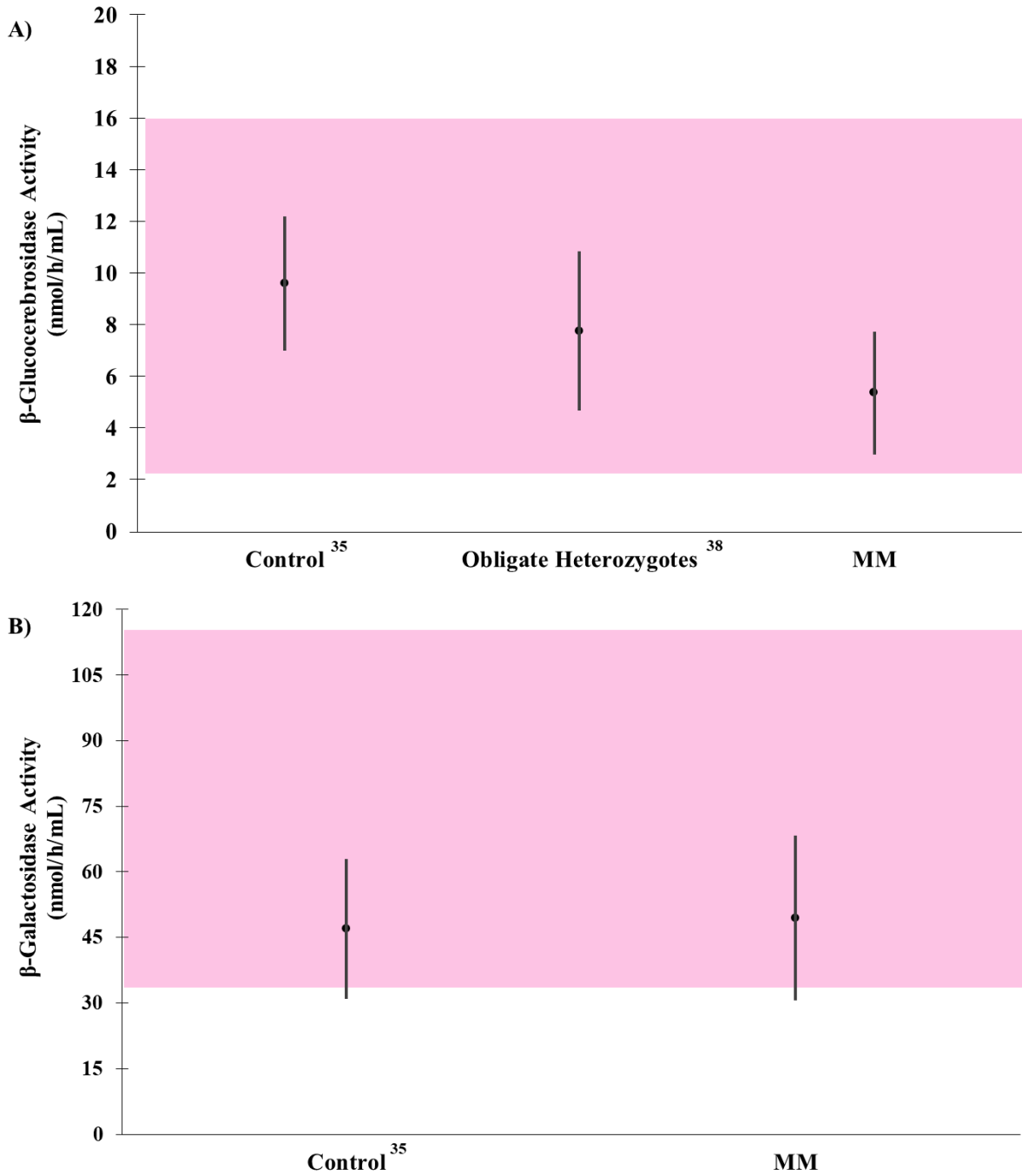


Figure 1. A) GCase activity measured in patients of MM and plotted with previously reported levels in healthy controls³⁵ and obligate heterozygotes³⁸. B) β -Gal activity distribution in previously reported healthy controls³⁵ and MM patients. Pink boxes represent normal reference range of each enzyme activity.

4. DISCUSSÃO GERAL

4.1. Quanto ao andamento da pesquisa

Durante o período de um ano (março/2017 – fevereiro/2018), os pacientes em consulta pré- e pós-transplante ou atendimento de rotina de tratamento foram convidados a participar da pesquisa – etapa mais desafiadora uma vez que o banco de amostras precisaria ser construído desde a fundação. Apesar do treinamento e do planejamento inicial para aplicação do termo de consentimento, pequenos ajustes foram feitos para otimização da abordagem e da coleta. Adesão à pesquisa foi aumentada quando médico residente e/ou médica coordenadora mencionavam, ao final da consulta, sobre o recrutamento. De forma quase unânime, os pacientes demonstraram confiança nos profissionais dos diversos setores e contentamento com a missão de excelência em atendimento e valores da instituição. A maioria dos pacientes envolvidos teve autonomia na decisão de participar da pesquisa e simpatizaram com a contribuição e engajamento na pesquisa proposta. Em situações de debilidade severa, os familiares em primeiro grau – irmãos ou filhos – assentiam o envolvimento do paciente na pesquisa. A taxa de rejeição foi baixíssima (<5%), e envolvia questões emocionais e psicológicas ligadas à negação da condição. A integração da coleta no Centro de Pesquisa Clínica com o serviço de coleta da zona 14 mostrou ser extremamente eficiente em ofertar assistência e pesquisa, especialmente para pacientes com limitações de esforço físico e deslocamento.

Por se tratar de um centro de referência em transplante de medula óssea, os pacientes eram encaminhados por unidades de saúde do interior do estado do Rio Grande do Sul para consulta na capital. Pessoas de baixa renda recebiam auxílio do município de origem para o deslocamento, enquanto pessoas mais favorecidas financeiramente optavam por conduções particulares pela maior facilidade e liberdade de trânsito. Pacientes atendidos em outros hospitais da capital eram encaminhados ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre para consulta de elegibilidade ao transplante. O atendimento era realizado por médicos residentes em hematologia, auxiliados pela médica supervisora do ambulatório, nas terças e quartas-feiras no período de 8:00 até 12:00 horas. Normalmente, o atendimento se estendia até o início da tarde em favor da alta demanda. Apesar da sobrecarga de trabalho, a equipe estava preparada para lidar com a longa jornada de trabalho e com as adversidades que surgiam. Mesmo sendo bem estruturado, fica claro que

o serviço se beneficiaria da expansão dos espaços físicos e recursos humanos para atender os pacientes, ao mesmo tempo em que preservaria a saúde dos trabalhadores. Felizmente, os laboratórios experimentais do HCPA apresentaram profissionais, recursos financeiros e espaços físicos compatíveis com a carga de projetos em fase de desenvolvimento – o que não é a realidade de muitas instituições públicas de pesquisa no Brasil.

4.2. Quanto aos resultados obtidos

Complementarmente aos dados discutidos no artigo a ser publicado, importantes informações epidemiológicas exclusivas de MM, normalmente escassas na literatura brasileira, floresceram dessa pesquisa. Idade ao diagnóstico mostrou ser estatisticamente menor ($p < 0,001$) quando comparada ao estudo de (Kaya et al. 2012) com mais de 40.000 pacientes com MM com idade média de 68,3. A diferença encontrada parece se repetir para pacientes de diferentes regiões do Brasil, com a idade média variando de 55-60 anos (Hungria et al. 2008; Segges et al. 2016; Cardoso et al. 2016; Dias et al. 2018). Apesar do diagnóstico ser feito em uma idade relativamente mais precoce, a taxa de transplante autólogo de medula óssea como tratamento cobriu apenas 50% dos pacientes. Essa tendência é alarmante, pois o tempo de sobrevida é comprovadamente maior em paciente < 65 anos do que em pacientes mais velhos (Ozaki e Shimizu 2014; Sharma et al. 2014; Shah et al. 2015).

A comunidade de cuidadores de MM é carente de dados nacionais para planejamento de estratégias de “mineração” de pacientes em quantidade condizente com a incidência real no país. Mesmo instituições de impacto nacional, como o INCA (Instituto Nacional do Câncer), tem se mostrado falhar na compilação de tais informações. Os dados gerados neste trabalho podem contribuir para o manejo local de pacientes com MM.

Todos os parâmetros essenciais para conclusão diagnóstica e acompanhamento da evolução do paciente eram constantemente acessados. No entanto, é válido notar que a análise citogenética associada ao medulograma – parâmetro de impacto prognóstico – era ausente para praticamente toda a população de MM. Futuros investimentos na oferta de testes citogenéticos mostram-se necessários e recomendáveis já que, como visto em países desenvolvidos, esta análise é parte da rotina médica dos hematologistas há longos tempos (Tiedemann et al. 2008). Considerando que, no Brasil, o acesso às novas terapias que dispensariam o uso de informações citogenéticas é bastante limitado, a preocupação na

escolha de terapias tradicionais baseadas em estratificações de risco (como por perfil de translocações) permanece sendo um problema de saúde pública. Como maneira de superar tal deficiência orçamentária, a integração de pesquisa e assistência parece fornecer uma opção temporária viável (Segges et al. 2016).

Analisando os genes *SCARB2*, *PSAP*, *GBA1* e *GBA2*, também contidos no painel utilizado no sequenciamento de nova geração, foi possível identificar diferentes variantes. Nas regiões intrônicas apenas variantes polimórficas foram detectadas. Duas variantes exônicas sinônimas foram encontradas em heterozigose (rs72857097 em *SCARB2* e rs34312177 em *GBA2*). A variante exônica rs2228380 também foi detectada em *SCARB2*, porém, mesmo provocando troca de sentido e alteração de aminoácido nesta posição, foram classificadas como benignas por ferramentas preditoras de patogenicidade. Pela ausência de achados importantes, a pesquisa seguiu com foco na análise de N370S e L444P em *GBA1*.

Além dos genes relacionados à DG, o painel usado incluía também 16 genes envolvidos no metabolismo do ferro. Por questões de curiosidade científica, análises adicionais foram feitas nesses genes. Dados parciais mostraram presença de variantes patogênicas, tanto em hetero- quanto em homozigose, em importantes genes como o da hemocromatose (*HFE*). O ferro apresenta grande importância no mieloma, estando intimamente ligado à anemia – um dos sintomas fundamentais na doença. Acredita-se que tanto a superpopulação da medula óssea, como o grande influxo de ferro pelas células de mieloma sejam as principais causas (VanderWall et al. 2013). Estudos recentes também indicaram que a desregulação do metabolismo do ferro nestes pacientes pode ocorrer devido o aumento, mediado por citocinas, da expressão de hepcidina – peptídeo regulador da absorção do ferro no duodeno (Gu et al. 2015; Ibricevic-Balic et al. 2016). Correções por ausência ou presença de mutações, podem servir como um dado auxiliar na interpretação do diagnóstico e evolução dos pacientes.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 Conclusão

- A média de atividade de β -glicocerebrosidase em amostras de sangue de pacientes com mieloma múltiplo atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre é menor que a média encontrada na população normal e próxima à média de atividade em indivíduos heterozigotos para doença de Gaucher;
- Uma única paciente, sem ancestralidade judia alegada, apresentou heterozigose para N370S em *GBA1*;

Conclui-se então, que apesar de não haver associação direta entre heterozigose para variantes patogênicas comuns na doença de Gaucher e desenvolvimento de mieloma múltiplo, a enzima β -glicocerebrosidase pode estar indiretamente associada ao processo, uma vez que apresenta atividade compatível com os heterozigotos de DG.

5.2 Perspectivas

No intuito de melhor esclarecer os dados gerados, sugere-se fortemente a continuidade da investigação. Propomos, então:

- análise mais ampla da atividade de enzimas e sub-produtos do metabolismo dos esfingolipídeos a partir da co-cultura de células de mieloma (não-aderente) e macrófagos (aderentes) provenientes de indivíduos heterozigotos para DG e indivíduos normais;
- formulação de projeto de pesquisa visando a extrapolação da análise de genes do metabolismo do ferro por sequenciamento de nova geração para todos os pacientes com MM do banco de amostras gerado a partir deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

- Abdelwahab M, Potegal M, Shapiro EG and Nestrasil I (2017) Previously unrecognized behavioral phenotype in Gaucher disease type 3. *Neurol Genet* 3:e158. doi: 10.1212/NXG.0000000000000158
- Ailawadhi S, Frank RD, Sharma M, Menghani R, Temkit M, Paulus S, Khera N, Hashmi S, Advani P, Swaika A et al. (2018) Trends in multiple myeloma presentation, management, cost of care, and outcomes in the Medicare population: A comprehensive look at racial disparities. *Cancer*. doi: 10.1002/cncr.31237
- Al-Hamadani M, Hashmi SK and Go RS (2014) Use of autologous hematopoietic cell transplantation as initial therapy in multiple myeloma and the impact of socio-geodemographic factors in the era of novel agents. *Am J Hematol* 89:825–830. doi: 10.1002/ajh.23753
- Alfonso P, Navascués J, Navarro S, Medina P, Bolado-Carrancio A, Andreu V, Irún P, Rodríguez-Rey JC, Pocoví M, España F et al. (2013) Characterization of variants in the glucosylceramide synthase gene and their association with Type 1 gaucher disease severity. *Hum Mutat* 34:1396–1403. doi: 10.1002/humu.22381
- Alhaj Hussen K, Vu Manh TP, Guimiot F, Nelson E, Chabaane E, Delord M, Barbier M, Berthault C, Dulphy N, Alberdi AJ et al. (2017) Molecular and Functional Characterization of Lymphoid Progenitor Subsets Reveals a Bipartite Architecture of Human Lymphopoiesis. *Immunity* 47:680–696.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2017.09.009
- Allen MJ, Myer BJ, Khokher AM, Rushton N and Cox TM (1997) Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *QJM* 90:19–25.
- Amini B, Yellapragada S, Shah S, Rohren E and Vikram R (2016) State-of-the-Art Imaging and Staging of Plasma Cell Dyscrasias. *Radiol Clin North Am* 54:581–596. doi: 10.1016/j.rcl.2015.12.008
- Andres M, Feller A and Arndt V (2018) Trends of incidence, mortality, and survival of multiple myeloma in Switzerland between 1994 and 2013. *Cancer Epidemiol* 53:105–110. doi: 10.1016/j.canep.2018.01.015
- Applegarth DA, Toone JR and Lowry R {s. a. RB (2000) Incidence of Inborn Errors of Metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics* 105:e10–e10. doi: 10.1542/peds.105.1.e10
- Arends M, van Dussen L, Biegstraaten M and Hollak CEM (2013) Malignancies and monoclonal gammopathy in Gaucher disease; a systematic review of the literature. *Br J Haematol* 161:832–842. doi: 10.1111/bjh.12335
- Ayto R and Hughes DA (2013) Gaucher Disease and Myeloma. *18:247–268*.
- Balestrino R and Schapira AH V. (2018) Glucocerebrosidase and Parkinson Disease: Molecular, Clinical, and Therapeutic Implications. *Neurosci* 107385841774887. doi: 10.1177/1073858417748875

Barth BM, Shanmugavelandy SS, Tacelosky DM, Kester M, Morad SAF and Cabot MC (2013) Gaucher's disease and cancer: a sphingolipid perspective. *Crit Rev Oncog* 18:221–34. doi: 10.1615/CritRevOncog.2013005814

Ben Bdira F, Kallemeijn WW, Oussoren S V, Scheij S, Bleijlevens B, Florea BI, van Roomen CPAA, Ottenhoff R, van Kooten MJFM, Walvoort MTC et al. (2017) Stabilization of Glucocerebrosidase by Active Site Occupancy. *ACS Chem Biol* 12:1830–1841. doi: 10.1021/acscchembio.7b00276

Bianchi G and Munshi NC (2015) Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood* 125:3049–3058. doi: 10.1182/blood-2014-11-568881

Boccardo M and Pileri A (1995) Plasma cell dyscrasias: classification, clinical and laboratory characteristics, and differential diagnosis. *Baillieres Clin Haematol* 8:705–719. doi: 10.1016/S0950-3536(05)80255-0

Bolli N, Barcella M, Salvi E, D'Avila F, Vendramin A, De Philippis C, Munshi NC, Avet-Loiseau H, Campbell PJ, Mussetti A et al. (2017a) Next-generation sequencing of a family with a high penetrance of monoclonal gammopathies for the identification of candidate risk alleles. *Cancer* 123:3701–3708. doi: 10.1002/cncr.30777

Bolli N, Biancon G, Moarii M, Gimondi S, Li Y, de Philippis C, Maura F, Sathiaselan V, Tai Y-T, Mudie L et al. (2017b) Analysis of the genomic landscape of multiple myeloma highlights novel prognostic markers and disease subgroups. *Leukemia*. doi: 10.1038/leu.2017.344

Borregaard N (2010) Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33:657–670. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2010.11.011

Bouchnita A, Eymard N, Moyo TK, Koury MJ and Volpert V (2016) Bone marrow infiltration by multiple myeloma causes anemia by reversible disruption of erythropoiesis. *Am J Hematol* 91:371–378. doi: 10.1002/ajh.24291

Brady RO, Kanfer JN and Shapiro D (1965) Metabolism of glucocerebrosides II. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 18:221–225. doi: 10.1016/0006-291X(65)90743-6

Breedveld A, Groot Kormelink T, van Egmond M and de Jong EC (2017) Granulocytes as modulators of dendritic cell function. *J Leukoc Biol* 102:jlb.4MR0217-048RR. doi: 10.1189/jlb.4MR0217-048RR

Bronstein S, Karpati M and Peleg L (2014) An update of gaucher mutations distribution in the Ashkenazi Jewish population: Prevalence and country of origin of the mutation R496H. *Isr Med Assoc J* 16:683–685.

Burke DG, Rahim AA, Waddington SN, Karlsson S, Enquist I, Bhatia K, Mehta A, Vellodi A and Heales S (2013) Increased glucocerebrosidase (GBA) 2 activity in GBA1 deficient mice brains and in Gaucher leucocytes. *J Inherit Metab Dis* 36:869–872. doi: 10.1007/s10545-012-9561-3

Bustany S, Cahu J, Guardiola P and Sola B (2015) Cyclin D1 sensitizes myeloma cells to

endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis by activating the unfolded protein response pathway. *BMC Cancer* 15:262. doi: 10.1186/s12885-015-1240-y

Calvi LM and Link DC (2014) Cellular complexity of the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Calcif Tissue Int* 94:112–124. doi: 10.1007/s00223-013-9805-8. Cellular

Cardoso CC, de Moraes ACR, Del Moral JAG and Santos-Silva MC (2016) Mature B cell neoplasms: Retrospective analysis of 93 cases diagnosed between 2011 and 2014 in a University Hospital in southern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 38:121–127. doi: 10.1016/j.bjhh.2016.02.003

Carrelha J, Meng Y, Kettyle LM, Luis TC, Norfo R, Alcolea V, Boukarabila H, Grasso F, Gambardella A, Grover A et al. (2018) Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. *Nature* 554:106–111. doi: 10.1038/nature25455

Castillo JJ, Jurczynski A, Brozova L, Crusoe E, Czepiel J, Davila J, Dispenzieri A, Eveillard M, Fiala MA, Ghobrial IM et al. (2017) IgM myeloma: A multicenter retrospective study of 134 patients. *Am J Hematol* 92:746–751. doi: 10.1002/ajh.24753

Cejalvo MJ and de la Rubia J (2017) Which therapies will move to the front line for multiple myeloma? *Expert Rev Hematol* 10:383–392. doi: 10.1080/17474086.2017.1317589

Ceravolo F, Grisolia M, Sestito S, Falvo F, Moricca MT and Concolino D (2017) Combination therapy in a patient with chronic neuronopathic Gaucher disease: a case report. *J Med Case Rep* 11:1–5. doi: 10.1186/s13256-016-1147-5

Chang JT, Wherry EJ and Goldrath AW (2014) Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat Immunol* 15:1104–1115. doi: 10.1038/ni.3031

Charrow J and Scott CR (2015) Long-term treatment outcomes in Gaucher disease. *Am J Hematol* 90:S19–S24. doi: 10.1002/ajh.24056

Chawla SS, Kumar SK, Dispenzieri A, Greenberg AJ, Larson DR, Kyle RA, Lacy MQ, Gertz MA and Rajkumar SV (2015) Clinical course and prognosis of non-secretory multiple myeloma. *Eur J Haematol* 95:57–64. doi: 10.1111/ejh.12478

Chen M-H, Qi CXY, Saha MN and Chang H (2012) P53 Nuclear Expression Correlates With Hemizygous TP53 Deletion and Predicts an Adverse Outcome for Patients With Relapsed/Refractory Multiple Myeloma Treated With Lenalidomide. *Am J Clin Pathol* 137:208–212. doi: 10.1309/AJCPHC85DGAXZDBE

Chesi M and Bergsagel PL (2013) Molecular pathogenesis of multiple myeloma: Basic and clinical updates. *Int J Hematol* 97:313–323. doi: 10.1007/s12185-013-1291-2

Choi YJ, Li X, Hydbring P, Sanda T, Stefano J, Christie AL, Signoretti S, Look AT, Kung AL, von Boehmer H et al. (2012) The Requirement for Cyclin D Function in Tumor Maintenance. *Cancer Cell* 22:438–451. doi: 10.1016/j.ccr.2012.09.015

Corso A and Mangiacavalli S (2017) Non-secretory myeloma: Ready for a new definition? *Mediterr J Hematol Infect Dis* 9:e2017053. doi: 10.4084/MJHID.2017.053

- Costa LJ, Brill IK, Omel J, Godby K, Kumar SK and Brown EE (2017) Recent trends in multiple myeloma incidence and survival by age, race, and ethnicity in the United States. *Blood Adv* 1:282–287. doi: 10.1182/bloodadvances.2016002493
- Costello R, O’Callaghan T and Sébahoun G (2006) Gaucher disease and multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 47:1365–1368. doi: 10.1080/10428190600565453
- Coutinho M, Santos J, Matos L and Alves S (2016) Genetic Substrate Reduction Therapy: A Promising Approach for Lysosomal Storage Disorders. *Diseases* 4:33. doi: 10.3390/diseases4040033
- Coutinho MF, Lacerda L, Pinto E, Ribeiro H, Macedo-Ribeiro S, Castro L, Prata MJ and da Conceição Alves SC (2015) Molecular and computational analyses of genes involved in mannose 6-phosphate independent trafficking. *Clin Genet* 88:190–194. doi: 10.1111/cge.12469
- Covarrubias AJ, Aksoylar HI and Horng T (2015) Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. *Semin Immunol* 27:286–96. doi: 10.1016/j.smim.2015.08.001
- Cox TM, Rosenbloom BE and Barker RA (2015) Gaucher disease and comorbidities: B-cell malignancy and parkinsonism. *Am J Hematol* 90:S25–S28. doi: 10.1002/ajh.24057
- da Silva EZM, Jamur MC and Oliver C (2014) Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell. *J Histochem Cytochem*. doi: 10.1369/0022155414545334
- de Fost M, Out TA, de Wilde FA, Tjin EPM, Pals ST, van Oers MHJ, Boot RG, Aerts JFMG, Maas M, Vom Dahl S et al. (2008) Immunoglobulin and free light chain abnormalities in Gaucher disease type I: data from an adult cohort of 63 patients and review of the literature. *Ann Hematol* 87:439–49. doi: 10.1007/s00277-008-0441-8
- De Mel S, Lim SH, Tung ML and Chng WJ (2014) Implications of heterogeneity in multiple myeloma. *Biomed Res Int* 2014:232546. doi: 10.1155/2014/232546
- Dekker N, Van Dussen L, Hollak CEM, Overkleeft H, Scheij S, Ghauharali K, Van Breemen MJ, Ferraz MJ, Groener JEM, Maas M et al. (2011) Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: Relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood* 118:e118-27. doi: 10.1182/blood-2011-05-352971
- Demchenko YN and Kuehl WM (2010) A critical role for the NFκB pathway in multiple myeloma. *Oncotarget* 1:59–68. doi: 10.18632/oncotarget.109
- Dhodapkar M V. (2016) MGUS to myeloma: A mysterious gammopathy of underexplored significance. *Blood* 128:2599–2606. doi: 10.1182/blood-2016-09-692954
- Di Martino MT, Guzzi PH, Caracciolo D, Agnelli L, Neri A, Walker BA, Morgan GJ, Cannataro M, Tassone P and Tagliaferri P (2015) Integrated analysis of microRNAs, transcription factors and target genes expression discloses a specific molecular architecture of hyperdiploid multiple myeloma. *Oncotarget* 6:19132–47. doi: 10.18632/oncotarget.4302
- Dias ALMS, Higashi F, Peres ALM, Cury P, Crusóé E de Q and Hungria VT de M (2018) Multiple myeloma and central nervous system involvement: experience of a Brazilian

center. *Hematol Transfus Cell Ther* 40:30–36. doi: 10.1016/j.bjhh.2017.09.004

Donermeyer DL, Weber KS, Kranz DM and Allen PM (2006) The Study of High-Affinity TCRs Reveals Duality in T Cell Recognition of Antigen: Specificity and Degeneracy. *J Immunol* 177:6911–6919. doi: 10.4049/jimmunol.177.10.6911

Durie BGM and Salmon SE (1975) A clinical staging system for multiple myeloma correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 36:842–854. doi: 10.1002/1097-0142(197509)36:3<842::AID-CNCR2820360303>3.0.CO;2-U

Ehrlich P (1878) *Beitrage zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. I. Teil: Die chemische Auffassung der Färbung. II. Teil: Die Anilinfarben in chemischer.*

Eisen HN (2014) Affinity Enhancement of Antibodies: How Low-Affinity Antibodies Produced Early in Immune Responses Are Followed by High-Affinity Antibodies Later and in Memory B-Cell Responses. *Cancer Immunol Res* 2:381–392. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0029

El Husseiny NM, Kasem N, El Azeem HA and Mattar MW (2014) Multiple myeloma: A descriptive study of 217 Egyptian patients. *Ann Hematol* 93:141–145. doi: 10.1007/s00277-013-1849-3

Farfel-Becker T, Vitner EB and Futerman AH (2011) Animal models for Gaucher disease research. *Dis Model Mech* 4:746–752. doi: 10.1242/dmm.008185

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D and Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359–E386. doi: 10.1002/ijc.29210

Ferreira CR and Gahl WA (2017) Lysosomal storage diseases. *Transl Sci rare Dis* 2:1–71. doi: 10.3233/TRD-160005

Fonseca R (2003) Many and multiple myeloma(s). *Leukemia* 17:1943–1944. doi: 10.1038/sj.leu.2403090

Geering B, Stoeckle C, Conus S and Simon HU (2013) Living and dying for inflammation: Neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol* 34:398–409. doi: 10.1016/j.it.2013.04.002

Gerken H, Graucob E and Wiedemann HR (1964) INHERITANCE IN GAUCHER'S DISEASE. *Br Med J* 2:1594.

Gertz MA and Dingli D (2014) How we manage autologous stem cell transplantation for patients with multiple myeloma. *Blood* 124:882–890. doi: 10.1182/blood-2014-03-544759

Glavey S, Manier S, Sacco A, Rossi G, Ghobrial IM and Roccaro AM (2013) The Role of miRNAs in Plasma Cell Dyscrasias. *MicroRNA* 2:165–173. doi: 10.2174/2211536602666131126002144

Goldfarb AR, Atlas DH and Gaberman P (1950) Electrophoretic studies in Gaucher's disease. *Am J Clin Pathol* 20:963–5.

- Gordon S and Martinez FO (2010) Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* 32:593–604. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007
- Gozzetti A, Cerase A and Bocchia M (2015) Central nervous system multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 15:e133. doi: 10.1016/j.clml.2014.10.004
- Grabowski GA (1997) Gaucher disease: gene frequencies and genotype/phenotype correlations. *Genet Test* 1:5–12. doi: 10.1089/gte.1997.1.5
- Grabowski GA, Gaft S, Horowitz M and Kolodny EH (1990) Acid β -Glucosidase: Enzymology and Molecular Biology of Gaucher Diseases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 25:385–414. doi: 10.3109/10409239009090616
- Grabowski GA, Golembo M and Shaaltiel Y (2014) Taliglucerase alfa: An enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Mol Genet Metab* 112:1–8. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.02.011
- Greipp PR, Miguel JS, Dune BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Harousseau JL, Kyle RA et al. (2005) International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23:3412–3420. doi: 10.1200/JCO.2005.04.242
- Gu Z, Wang H, Xia J, Yang Y, Jin Z, Xu H, Shi J, De Domenico I, Tricot G and Zhan F (2015) Decreased ferroportin promotes myeloma cell growth and osteoclast differentiation. *Cancer Res* 75:2211–2221. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3804
- Haneberg B, Glette J, Talstad I, Sornes S and Solberg CO (1984) In vitro release of lysozyme from monocytes and granulocytes. *J Leukoc Biol* 35:573–582.
- Heher EC, Rennke HG, Laubach JP and Richardson PG (2013) Kidney disease and multiple myeloma. *Clin J Am Soc Nephrol* 8:2007–2017. doi: 10.2215/CJN.12231212
- Hejl C, Mestiri R, Carmoi T, Bugier S, Chianea D, Renard C and Vest P (2018) IgE monoclonal gammopathy: A case report and literature review. *Clin Biochem* 51:103–109. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.09.015
- Hoggatt J, Kfoury Y and Scadden DT (2016) Hematopoietic Stem Cell Niche in Health and Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 11:555–581. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044414
- Howell DA, Smith AG, Jack A, Patmore R, Macleod U, Mironska E and Roman E (2013) Time-to-diagnosis and symptoms of myeloma, lymphomas and leukaemias: A report from the Haematological malignancy Research Network. *BMC Hematol* 13:9. doi: 10.1186/2052-1839-13-9
- Hua Z and Hou B (2013) TLR signaling in B-cell development and activation. *Cell Mol Immunol* 10:103–106. doi: 10.1038/cmi.2012.61
- Hungria VTM, Maiolino A, Martinez G, Colleoni GWB, Coelho ÉODM, Rocha L, Nunes R, Bittencourt R, Oliveira LCO, Faria RMO et al. (2008) Confirmation of the utility of the International Staging System and identification of a unique pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. *Haematologica* 93:791–792. doi: 10.3324/haematol.11637

Ibricevic-Balic L, Icindic-Nakas E, Hasic S, Kiseljakovic E, Sofu-Hafizovic A and Balic S (2016) Dilemma: Correlation Between Serum Level of Hcpidin and IL-6 in Anemic Myeloma Patients. *Med Arch (Sarajevo, Bosnia Herzegovina)* 70:429–432. doi: 10.5455/medarh.2016.70.429-432

Iwasaki A and Medzhitov R (2015) Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 16:343–353. doi: 10.1038/ni.3123

Johnson BA, Dajnoki A and Bodamer O (2014) Diagnosis of lysosomal storage disorders: Gaucher disease. *Curr Protoc Hum Genet* 2014:17.15.1-17.15.6. doi: 10.1002/0471142905.hg1715s82

Kaech SM (2014) Celebrating Diversity in Memory T Cells. *J Immunol* 192:837–839. doi: 10.4049/jimmunol.1303268

Karasuyama H and Yamanishi Y (2014) Basophils have emerged as a key player in immunity. *Curr Opin Immunol* 31:1–7. doi: 10.1016/j.coi.2014.07.004

Katoh M and Nakagama H (2014) FGF Receptors: Cancer Biology and Therapeutics. *Med Res Rev* 34:280–300. doi: 10.1002/med.21288

Kawamoto H, Ikawa T, Masuda K, Wada H and Katsura Y (2010) A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: The essence of the myeloid-based model. *Immunol Rev* 238:23–36. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00959.x

Kaya H, Peressini B, Jawed I, Martincic D, Elaimy AL, Lamoreaux WT, Fairbanks RK, Weeks KA and Lee CM (2012) Impact of age, race and decade of treatment on overall survival in a critical population analysis of 40,000 multiple myeloma patients. *Int J Hematol* 95:64–70. doi: 10.1007/s12185-011-0971-z

Keppel MP, Yang L and Cooper MA (2013) Murine NK Cell Intrinsic Cytokine-Induced Memory-like Responses Are Maintained following Homeostatic Proliferation. *J Immunol* 190:4754–4762. doi: 10.4049/jimmunol.1201742

Khattar V and Thottassery J V (2013) Cks1: Structure, Emerging Roles and Implications in Multiple Cancers. *J Cancer Ther* 4:1341–1354. doi: 10.4236/jct.2013.48159

Kirchenbaum GA, St. Clair JB, Detanico T, Aviszus K and Wsocki LJ (2014) Functionally responsive self-reactive B cells of low affinity express reduced levels of surface IgM. *Eur J Immunol* 44:970–982. doi: 10.1002/eji.201344276

Koide Y, Awashima F, Akaza T and Yoshida TO (1981) Human antigen-presenting cells: characterization of the cells in the T-lymphocytes proliferative response. *Microbiol Immunol* 25:489–503.

Koprivica V, Stone DL, Park JK, Callahan M, Frisch A, Cohen IJ, Tayebi N and Sidransky E (2000) Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 66:1777–86. doi: 10.1086/302925

Körschen HG, Yildiz Y, Raju DN, Schonauer S, Bönigk W, Jansen V, Kremmer E, Kaupp UB and Wachten D (2013) The non-lysosomal β -glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi. *J Biol Chem*

288:3381–93. doi: 10.1074/jbc.M112.414714

Kumar H, Kawai T and Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30:16–34. doi: 10.3109/08830185.2010.529976

Kumar S (2011) Treatment of newly diagnosed multiple myeloma in transplant-eligible patients. *Curr Hematol Malig Rep* 6:104–112. doi: 10.1007/s11899-011-0083-0

Landgren O, Turesson I, Gridley G and Caporaso NE (2007) Risk of malignant disease among 1525 adult male US veterans with Gaucher disease. *Arch Intern Med* 167:1189–1194. doi: 10.1001/archinte.167.11.1189

Lebel V, Alderson M and Aita M (2014) Physiological stability: A concept analysis. *J Adv Nurs* 70:1995–2004. doi: 10.1111/jan.12391

Lechouane F, Bonaud A, Delpy L, Casola S, Oruc Z, Chemin G, Cogné M and Sirac C (2013) B-cell receptor signal strength influences terminal differentiation. *Eur J Immunol* 43:619–628. doi: 10.1002/eji.201242912

Lee RE (1982) The Pathology of Gaucher Disease. *Gauch Dis A century Delin Res* 95:177–217.

Li F, Zhai Y-P, Lai T, Zhao Q, Zhang H and Tang Y-M (2017) MB4-2 / MB4-3 transcripts of IGH-MMSET fusion gene in t(4; 14) pos multiple myeloma indicate poor prognosis. *Oncotarget* 3:1–13. doi: 10.18632/oncotarget.18209

Lionetti M, Barbieri M, Todoerti K, Agnelli L, Marzorati S, Fabris S, Ciceri G, Galletti S, Milesi G, Manzoni M et al. (2015) Molecular spectrum of BRAF, NRAS and KRAS gene mutations in plasma cell dyscrasias: implication for MEK-ERK pathway activation. *Oncotarget* 6:24205–24217. doi: 10.18632/oncotarget.4434

Lunsjö K, Ceder L and Strömqvist B (1989) Phillippe Gaucher. The man behind the rare enzyme deficiency. *Lakartidningen* 86:3915–8.

Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G and Ghobrial IM (2017) Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 14:100–113. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.122

Markuszevska-Kuczynska A, Klimkowska M, Regenthal S, Bulanda A, Kämpe Björkvall C and Machaczka M (2015) Atypical cytomorphology of Gaucher cells is frequently seen in bone marrow smears from untreated patients with Gaucher disease type 1. *Folia Histochem Cytobiol* 53:62–69. doi: 10.5603/FHC.a2015.0003

Mateos MV and Landgren O (2016) MGUS and smoldering multiple myeloma: Diagnosis and epidemiology. *Cancer Treatment and Research*. pp 3–12

Mauri C and Bosma A (2012) Immune Regulatory Function of B Cells. *Annu Rev Immunol* 30:221–241. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074934

Mechtler TP, Stary S, Metz TF, De Jesús VR, Greber-Platzer S, Pollak A, Herkner KR, Streubel B and Kasper DC (2012) Neonatal screening for lysosomal storage disorders: Feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. *Lancet* 379:335–341. doi:

10.1016/S0140-6736(11)61266-X

Michelin K, Wajner A, Bock H, Fachel Â, Rosenberg R, Flores Pires R, Saraiva Pereira ML, Giugliani R and Coelho JC (2005) Biochemical properties of β -glucosidase in leukocytes from patients and obligated heterozygotes for Gaucher disease carriers. *Clin Chim Acta* 362:101–109. doi: 10.1016/j.cccn.2005.06.010

Ministério da Saúde (2017) Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas na Doença de Gaucher. In: *Diário Of. da União*.
http://conitec.gov.br/imagens/Protocolos/PCDT___Doenca_de_Gaucher.pdf. Accessed 21 Mar 2018

Mitchell JS, Johnson DC, Litchfield K, Broderick P, Weinhold N, Davies FE, Gregory WA, Jackson GH, Kaiser M, Morgan GJ et al. (2015) Implementation of genome-wide complex trait analysis to quantify the heritability in multiple myeloma. *Sci Rep* 5:12473. doi: 10.1038/srep12473

Montfort M, Chabás A, Vilageliu L and Grinberg D (2004) Functional analysis of 13 *GBA* mutant alleles identified in Gaucher disease patients: Pathogenic changes and “modifier” polymorphisms. *Hum Mutat* 23:567–575. doi: 10.1002/humu.20043

Morgan GJ, Johnson DC, Weinhold N, Goldschmidt H, Landgren O, Lynch HT, Hemminki K and Houlston RS (2014) Inherited genetic susceptibility to multiple myeloma. *Leukemia* 28:518–524. doi: 10.1038/leu.2013.344

Muraille E (2014) Generation of individual diversity: A too neglected fundamental property of adaptive immune system. *Front Immunol* 5:208. doi: 10.3389/fimmu.2014.00208

Nair S, Boddupalli CS, Verma R, Liu J, Yang R, Pastores GM, Mistry PK and Dhodapkar M V. (2015) Type II NKT-TFH cells against Gaucher lipids regulate B-cell immunity and inflammation. *Blood* 125:1256–1271. doi: 10.1182/blood-2014-09-600270

Nair S, Branagan AR, Liu J, Boddupalli CS, Mistry PK and Dhodapkar M V. (2016) Clonal Immunoglobulin against Lysolipids in the Origin of Myeloma. *N Engl J Med* 374:555–561. doi: 10.1056/NEJMoa1508808

Nalysnyk L, Rotella P, Simeone JC, Hamed A and Weinreb N (2017) Gaucher disease epidemiology and natural history: a comprehensive review of the literature. *Hematology* 22:65–73. doi: 10.1080/10245332.2016.1240391

Neufeld EF (1991) Lysosomal Storage Diseases. *Annu Rev Biochem* 60:257–280. doi: 10.1146/annurev.bi.60.070191.001353

O’Malley DP, Smith L and Fedoriw Y (2018) 6 – Benign Causes of Bone Marrow Abnormalities Including Infections, Storage Diseases, Systemic Disorders, and Stromal Changes. *Hematopathology* 184–209.e1. doi: 10.1016/B978-0-323-47913-4.00006-9

Ozaki S and Shimizu K (2014) Autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma: past, present, and future. *Biomed Res Int* 2014:394792. doi: 10.1155/2014/394792

- Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, Richardson P, Caltagirone S, Lahuerta JJ, Facon T et al. (2015) Revised international staging system for multiple myeloma: A report from international myeloma working group. *J Clin Oncol* 33:2863–2869. doi: 10.1200/JCO.2015.61.2267
- Park B V and Pan F (2015) Metabolic regulation of T cell differentiation and function. *Mol Immunol* 68:497–506. doi: 10.1016/j.molimm.2015.07.027
- Parkin JL and Brunning RD (1982) Pathology of the Gaucher cell. *Prog Clin Biol Res* 95:151–75.
- Pastores G and Hughes D (2017) Lysosomal Storage Disorders and Malignancy. *Diseases* 5:8. doi: 10.3390/diseases5010008
- Patarroyo M, Prieto J, Rincon J, Timonen T, Lundberg C, Lindbom L, Asjo B and Gahmbekg CG (1990) Leukocyte-Cell Adhesion: A Molecular Process Fundamental in Leukocyte Physiology. *Immunol Rev* 114:67–108. doi: 10.1111/j.1600-065X.1990.tb00562.x
- Pavlova E V., Wang SZ, Archer J, Dekker N, Aerts JMFG, Karlsson S and Cox TM (2013) B cell lymphoma and myeloma in murine Gaucher's disease. *J Pathol* 231:88–97. doi: 10.1002/path.4227
- PDQ Adult Treatment Editorial Board PATE (2002) Plasma Cell Neoplasms (Including Multiple Myeloma) Treatment (PDQ®): Health Professional Version. National Cancer Institute (US)
- Pecsvarady Z, Fisher TC, Fabok A, Coates TD and Meiselman HJ (1992) Kinetics of granulocyte deformability following exposure to chemotactic stimuli. *Blood Cells* 18:333–352.
- Perié L and Naik SH (2015) Toward defining a “lineage” - The case for dendritic cells. *Semin Cell Dev Biol* 41:38. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.004
- Pieper K, Grimbacher B and Eibel H (2013) B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 131:959–971. doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.046
- Pinkhas J, Djaldetti M and Yaron M (1965) Coincidence of multiple myeloma with Gaucher's disease. *Isr J Med Sci* 1:537–40.
- Pratt P, Kochwa S and Estren S (1968) Immunoglobulin abnormalities in Gaucher's disease. Report of 16 cases. *Blood* 31:633–40.
- Pronk CJH, Rossi DJ, Månsson R, Attema JL, Norddahl GL, Chan CKF, Sigvardsson M, Weissman IL and Bryder D (2007) Elucidation of the Phenotypic, Functional, and Molecular Topography of a Myeloerythroid Progenitor Cell Hierarchy. *Cell Stem Cell* 1:428–442. doi: 10.1016/j.stem.2007.07.005
- Pujana MA (2014) Integrating germline and somatic data towards a personalized cancer medicine. *Trends Mol Med* 20:413–415. doi: 10.1016/j.molmed.2014.05.004
- Quintin J, Cheng SC, van der Meer JWM and Netea MG (2014) Innate immune memory:

Towards a better understanding of host defense mechanisms. *Curr Opin Immunol* 29:1–7. doi: 10.1016/j.coi.2014.02.006

Raeber ME, Zurbuchen Y, Impellizzieri D and Boyman O (2018) The role of cytokines in T-cell memory in health and disease. *Immunol Rev* 283:176–193. doi: 10.1111/imr.12644

Rajabli N, Naeimi-Tabeie M, Jahangirrad A, Sedaghat S-M, Semnani S and Roshandel G (2013) Epidemiology of leukemia and multiple myeloma in Golestan, Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 14:2333–6.

Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, Kumar S, Hillengass J, Kastritis E, Richardson P et al. (2014) International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 15:e538–e548. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5

Rajkumar SV and Kumar S (2016) Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc* 91:101–119. doi: 10.1016/j.mayocp.2015.11.007

Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds T and Saftig P (2007) LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase. *Cell* 131:770–783. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.018

Ribatti D (2017) Historical overview on the morphological characterization of large granular lymphocytes/natural killer cells. *Immunol Lett* 190:58–63. doi: 10.1016/j.imlet.2017.07.014

Rodic P, Pavlovic S, Kostic T, Suvajdzic Vukovic N, Djordjevic M, Sumarac Z, Dajak M, Bonaci Nikolic B and Janic D (2013) Gammopathy and B lymphocyte clonality in patients with Gaucher type I disease. *Blood Cells, Mol Dis* 50:222–225. doi: 10.1016/j.bcmd.2012.11.012

Rosenbloom BE, Becker P and Weinreb N (2009) Multiple myeloma and Gaucher genes. *Genet Med* 11:134. doi: 10.1097/GIM.0b013e318195e2b6

Rosenbloom BE, Weinreb NJ, Zimran A, Kacena KA, Charrow J and Ward E (2005) Gaucher disease and cancer incidence: A study from the Gaucher Registry. *Blood* 105:4569–4572. doi: 10.1182/blood-2004-12-4672

Roshan Lal T and Sidransky E (2017) The Spectrum of Neurological Manifestations Associated with Gaucher Disease. *Diseases* 5:10. doi: 10.3390/diseases5010010

Russell ES and Bernstein SE (1968) Proof of whole-cell implant in therapy of W-series anemia. *Arch Biochem Biophys* 125:594–597. doi: 10.1016/0003-9861(68)90617-6

Samuel N, Villani A, Fernandez C V. and Malkin D (2014) Management of familial cancer: Sequencing, surveillance and society. *Nat Rev Clin Oncol* 11:723–731. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.169

San-Miguel JF, Paiva B and Gutiérrez NC (2013) New Tools for Diagnosis and Monitoring of Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ B* 33:e313–e318. doi: 10.1200/EdBook_AM.2013.33.e313

- Scholz JL and Cancro MP (2012) Resolve, revise, and relax: The 3 Rs of B cell repertoire adjustment. *Immunol Lett* 143:2–8. doi: 10.1016/j.imlet.2012.01.014
- Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y and Cyster JG (2005) Immunology: Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* (80-) 309:1735–1739. doi: 10.1126/science.1113640
- Schwartz GW and Hershberg U (2013) Conserved variation: identifying patterns of stability and variability in BCR and TCR V genes with different diversity and richness metrics. *Phys Biol* 10:35005. doi: 10.1088/1478-3975/10/3/035005
- Segges P, Braggio E, Minnicelli C, Hassan R, Zalberg IR and Maiolino A (2016) Genetic aberrations in multiple myeloma characterized by cIg-FISH: A Brazilian context. *Brazilian J Med Biol Res* 49:e5034. doi: 10.1590/1414-431X20155034
- Seifert M and Küppers R (2016) Human memory B cells. *Leukemia* 30:2283–2292. doi: 10.1038/leu.2016.226
- Seita J and Weissman IL (2010) Hematopoietic stem cell: Self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2:640–653. doi: 10.1002/wsbm.86
- Shah GL, Winn AN, Lin PJ, Klein A, Sprague KA, Smith HP, Buchsbaum R, Cohen JT, Miller KB, Comenzo R et al. (2015) Cost-Effectiveness of Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Elderly Patients with Multiple Myeloma using the Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare Database. *Biol Blood Marrow Transplant* 21:1823–1829. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.05.013
- Shank BR, Brown VT and Schwartz RN (2015) Multiple myeloma maintenance therapy: A review of the pharmacologic treatment. *J Oncol Pharm Pract* 21:36–51. doi: 10.1177/1078155213514468
- Sharma M, Zhang MJ, Zhong X, Abidi MH, Akpek G, Bacher U, Callander NS, Dispenzieri A, Freytes CO, Fung HC et al. (2014) Older Patients with Myeloma Derive Similar Benefit from Autologous Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 20:1796–1803. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.07.013
- Shephard EA, Neal RD, Rose P, Walter FM, Litt EJ and Hamilton WT (2015) Quantifying the risk of multiple myeloma from symptoms reported in primary care patients: a large case-control study using electronic records. *Br J Gen Pract* 65:e106-13. doi: 10.3399/bjgp15X683545
- Shiran A, Brenner B, Laor A and Tatarsky I (1993) Increased risk of cancer in patients with Gaucher disease. *Cancer* 72:219–24.
- Sidransky E (2012) Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder. *Discov Med* 14:273–81.
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, Bar-Shira A, Berg D, Bras J, Brice A et al. (2009) Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease. *N Engl J Med* 361:1651–1661. doi: 10.1056/NEJMoa0901281

- Sista RS, Wang T, Wu N, Graham C, Eckhardt A, Winger T, Srinivasan V, Bali D, Millington DS and Pamula VK (2013) Multiplex newborn screening for Pompe, Fabry, Hunter, Gaucher, and Hurler diseases using a digital microfluidic platform. *Clin Chim Acta* 424:12–18. doi: 10.1016/j.cca.2013.05.001
- Smid BE, Ferraz MJ, Verhoek M, Mirzaian M, Wisse P, Overkleeft HS, Hollak CE and Aerts JM (2016) Biochemical response to substrate reduction therapy versus enzyme replacement therapy in Gaucher disease type 1 patients. *Orphanet J Rare Dis* 11:28. doi: 10.1186/s13023-016-0413-3
- Smith L, Mullin S and Schapira AHV (2017) Insights into the structural biology of Gaucher disease. *Exp Neurol* 298:180–190. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.09.010
- Somaraju UR and Tadepalli K (2017) Hematopoietic stem cell transplantation for Gaucher disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2017:CD006974. doi: 10.1002/14651858.CD006974.pub4
- Soussi T and Wiman KG (2015) TP53: An oncogene in disguise. *Cell Death Differ* 22:1239–1249. doi: 10.1038/cdd.2015.53
- Sozmen EY and Sezer ED (2017) Methods for determination of α -glycosidase, β -glycosidase, and α -galactosidase activities in dried blood spot samples. *Methods in Molecular Biology*. pp 255–264
- Stella F, Pedrazzini E, Agazzoni M, Ballester O and Slavutsky I (2015) Cytogenetic alterations in multiple myeloma: Prognostic significance and the choice of frontline therapy. *Cancer Invest* 33:496–504. doi: 10.3109/07357907.2015.1080833
- Stenson PD, Mort M, Ball E V., Shaw K, Phillips AD and Cooper DN (2014) The Human Gene Mutation Database: Building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet* 133:1–9. doi: 10.1007/s00439-013-1358-4
- Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, Levade T, Astudillo L, Serratrice J, Brassier A et al. (2017) A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int J Mol Sci* 18:441. doi: 10.3390/ijms18020441
- Sun JC, Ugolini S and Vivier E (2014) Immunological memory within the innate immune system Introduction—a brief history of immunological memory. *EMBO J* 33:1295–1303. doi: 10.1002/embj
- Svobodová E, Mrázová L, Lukšan O, Elstein D, Zimran A, Stolnaya L, Minks J, Eberová J, Dvořáková L, Jirsa M et al. (2011) Glucocerebrosidase gene has an alternative upstream promoter, which has features and expression characteristic of housekeeping genes. *Blood Cells, Mol Dis* 46:239–245. doi: 10.1016/j.bcmd.2010.12.011
- Taddei TH, Kacena KA, Yang M, Yang R, Malhotra A, Boxer M, Aleck KA, Rennert G, Pastores GM and Mistry PK (2009) The underrecognized progressive nature of N370S Gaucher disease and assessment of cancer risk in 403 patients. *Am J Hematol* 84:208–214. doi: 10.1002/ajh.21362

- Takizawa H, Boettcher S and Manz MG (2012) Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. *Blood* 119:2991–3002. doi: 10.1182/blood-2011-12-380113
- Tamargo RJ, Velayati A, Goldin E and Sidransky E (2012) The role of saposin C in Gaucher disease. *Mol Genet Metab* 106:257–263. doi: 10.1016/j.ymgme.2012.04.024
- Tayebi N, Stubblefield BK, Park JK, Orvisky E, Walker JM, LaMarca ME and Sidransky E (2003a) Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implications for complexity in Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 72:519–534. doi: 10.1086/367850
- Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, Orvisky E, LaMarca ME, Wong K, Rosenbaum H, Schiffmann R, Bembi B and Sidransky E (2003b) Gaucher disease with parkinsonian manifestations: Does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? *Mol Genet Metab* 79:104–109. doi: 10.1016/S1096-7192(03)00071-4
- Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M and Dimopoulos MA (2018) Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: From bench to bedside. *Blood Cancer J* 8:7. doi: 10.1038/s41408-017-0037-4
- Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Kyle RA, Santana-Davila R, Price-Troska T, Van Wier SA, Chng WJ, Ketterling RP, Gertz MA, Henderson K et al. (2008) Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia* 22:1044–1052. doi: 10.1038/leu.2008.4
- Till JE and McCulloch EA (1961) A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiat Res* 14:213. doi: 10.2307/3570892
- Tzoran I, Brenner B and Hoffman R (2013) Myeloma and thrombotic complications. *Minerva Med* 104:155–160.
- Utz J, Whitley CB, van Giersbergen PLM and Kolb SA (2016) Comorbidities and pharmacotherapies in patients with Gaucher disease type 1: The potential for drug-drug interactions. *Mol Genet Metab* 117:172–178. doi: 10.1016/j.ymgme.2015.12.001
- Vaccaro AM, Motta M, Tatti M, Scarpa S, Masuelli L, Bhat M, Vanier MT, Tylki-Szymanska A and Salviole R (2010) Saposin C mutations in Gaucher disease patients resulting in lysosomal lipid accumulation, saposin C deficiency, but normal prosaposin processing and sorting. *Hum Mol Genet* 19:2987–2997. doi: 10.1093/hmg/ddq204
- van Furth R and Cohn ZA (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128:415–35.
- van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG and Langevoort HL (1972) The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 46:845–52.
- van Furth R, van Schadewijk-Nieuwstad M, Elzenga-Claasen I, Cornelisse C and Nibbering P (1985) Morphological, cytochemical, functional, and proliferative characteristics of four murine macrophage-like cell lines. *Cell Immunol* 90:339–357. doi: 10.1016/0008-8749(85)90199-6

- Van Rossum A and Holsopple M (2016) Enzyme Replacement or Substrate Reduction? A Review of Gaucher Disease Treatment Options. *Hosp Pharm* 51:553–563. doi: 10.1310/hpj5107-553
- Van Wier S, Braggio E, Baker A, Ahmann G, Levy J, Carpten JD and Fonseca R (2013) Hypodiploid multiple myeloma is characterized by more aggressive molecular markers than non-hyperdiploid multiple myeloma. *Haematologica* 98:1586–1592. doi: 10.3324/haematol.2012.081083
- VanderWall K, Daniels-Wells TR, Penichet M and Lichtenstein A (2013) Iron in multiple myeloma. *Crit Rev Oncog* 18:449–61. doi: 10.1615/CritRevOncog.2013007934
- Våtsveen TK, Brenne AT, Dai HY, Waage A, Sundan A and Børset M (2009) FGFR3 is expressed and is important for survival in INA-6, a human myeloma cell line without a t(4;14). *Eur J Haematol* 83:471–476. doi: 10.1111/j.1600-0609.2009.01312.x
- Vélez R, Turesson I, Landgren O, Kristinsson SY and Cuzick J (2016) Incidence of multiple myeloma in Great Britain, Sweden, and Malmö, Sweden: The impact of differences in case ascertainment on observed incidence trends. *BMJ Open* 6:e009584. doi: 10.1136/bmjopen-2015-009584
- Wagner VF, Northrup H, Hashmi SS, Nguyen JM, Koenig MK and Davis JM (2018) Attitudes of Individuals with Gaucher Disease toward Substrate Reduction Therapies. *J Genet Couns* 27:169–176. doi: 10.1007/s10897-017-0137-0
- Wang GR, Sun WJ, Chen WM, Huang ZX, Zhang JJ, An N, Shen M and Li X (2016) Immunoglobulin D Multiple Myeloma: Disease Profile, Therapeutic Response, and Survival. *Acta Haematol* 136:140–146. doi: 10.1159/000446599
- Weinreb NJ, Mistry PK, Rosenbloom BE and Dhodapkar M V (2018) MGUS, lymphoplasmacytic malignancies and Gaucher disease: the significance of the clinical association. *Blood* blood-2018-02-834689. doi: 10.1182/blood-2018-02-834689
- Weiss K, Gonzalez A, Lopez G, Pedoeim L, Groden C and Sidransky E (2015) The clinical management of Type 2 Gaucher disease. *Mol Genet Metabol* 114:110–122. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.11.008
- Winfield SL, Tayebi N, Martin BM, Ginns EI and Sidransky E (1997) Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: Implications for Gaucher disease. *Genome Res* 7:1020–1026. doi: 10.1101/gr.7.10.1020
- Wolf P, Alcalay RN, Liong C, Cullen E, Pauciulo MW, Nichols WC, Gan-Or Z, Chung WK, Faulkner T, Bents C et al. (2018) Tandem mass spectrometry assay of β -glucocerebrosidase activity in dried blood spots eliminates false positives detected in fluorescence assay. *Mol Genet Metab* 123:135–139. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.10.011
- Wu L, Vandenabeele S and Georgopoulos K (2001) Derivation of dendritic cells from myeloid and lymphoid precursors. *Int Rev Immunol* 20:117–135. doi: 10.3109/08830180109056726
- Wu Y-C, Kipling D and Dunn-Walters D (2015) Assessment of B Cell Repertoire in

Humans. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). pp 199–218

Xie Z and Chng WJ (2014) MMSET: Role and therapeutic opportunities in multiple myeloma. *Biomed Res Int* 2014:1–5. doi: 10.1155/2014/636514

Yildiz Y, Hoffmann P, vom Dahl S, Breiden B, Sandhoff R, Niederau C, Horwitz M, Karlsson S, Filocamo M, Elstein D et al. (2013) Functional and genetic characterization of the non-lysosomal glucosylceramidase 2 as a modifier for Gaucher disease. *Orphanet J Rare Dis* 8:151. doi: 10.1186/1750-1172-8-151

Yilmazer B, Yagci ZB, Bakar E, Ozden B, Ulgen K and Ozkirimli E (2017) Investigation of novel pharmacological chaperones for Gaucher Disease. *J Mol Graph Model* 76:364–378. doi: 10.1016/j.jmgm.2017.07.014

Yuan KC, Fang JF, Hsieh SY and Shih HN (2013) Comparative proteomic analysis of rodent plasma and mesenteric lymph. *Chin J Physiol* 56:163–173. doi: 10.4077/CJP.2013.BAB116

Zachos C, Blanz J, Saftig P and Schwake M (2012) A Critical Histidine Residue Within LIMP-2 Mediates pH Sensitive Binding to Its Ligand β -Glucocerebrosidase. *Traffic* 13:1113–1123. doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01372.x

Zampieri S, Cattarossi S, Bembi B and Dardis A (2017) GBA Analysis in Next-Generation Era: Pitfalls, Challenges, and Possible Solutions. *J Mol Diagnostics* 19:733–741. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.05.005

Zigdon H, Meshcheriakova A, Farfel-Becker T, Volpert G, Sabanay H and Futerman AH (2017) Altered lysosome distribution is an early neuropathological event in neurological forms of Gaucher disease. *FEBS Lett* 591:774–783. doi: 10.1002/1873-3468.12591

Zimran A, Belmatoug N, Bembi B, Deegan P, Elstein D, Fernandez-Sasso D, Giraldo P, Goker-Alpan O, Lau H, Lukina E et al. (2018) Demographics and patient characteristics of 1209 patients with Gaucher disease: Descriptive analysis from the Gaucher Outcome Survey (GOS). *Am J Hematol* 93:205–212. doi: 10.1002/ajh.24957

Zimran A, Liphshitz I, Barchana M, Abrahamov A and Elstein D (2005) Incidence of malignancies among patients with type I Gaucher disease from a single referral clinic. *Blood Cells, Mol Dis* 34:197–200. doi: 10.1016/j.bcmd.2005.03.004