

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**AVALIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS EM *ABCA1*, *CYP2C19*, *PKNOX1*
e *SERPINB2* E ASSOCIAÇÃO COM NEUROPATIA PERIFÉRICA NO
TRATAMENTO COM TALIDOMIDA E/OU BORTEZOMIBE EM PACIENTES
COM MIELOMA MÚLTIPLO**

Patrícia Boni de Paula

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

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna

Porto Alegre, agosto de 2020

Este trabalho foi realizado no laboratório de Genética Médica e Evolução do Departamento de Genética da UFRGS e no laboratório de Medicina Genômica do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo CNPq, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS (PPGBM/UFRGS).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha orientadora Fernanda por todos os ensinamentos e acolhimento desde o início dessa jornada e por ser um exemplo de profissional por sua dedicação e responsabilidade em tudo o que faz.

Obrigada a Clévia pelo auxílio em todas as etapas desse processo, por todos os conselhos, pelo exemplo de profissional e por estar sempre disponível para o que fosse necessário.

Aos colegas do Laboratório de Medicina Genômica pelo acolhimento e pelos ensinamentos e aos colegas do Laboratório 113 pelo carinho, ensinamentos e companheirismo.

Um agradecimento especial à Dra. Rosane e a equipe de hematologia pela atenção e auxílio com o trabalho e a todos os pacientes que depositaram a sua confiança no grupo e aceitaram participar desse estudo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos os colegas e professores do PPGBM que contribuíram com suas experiências e conhecimentos.

Ao Elmo pelo acolhimento e competência na condução dos problemas e ao Gabriel por também sempre estar disponível para resolver os imprevistos.

A Thayne especialmente pela amizade, pelos conselhos e por toda a colaboração com o trabalho.

A Laura e a Mariléa pela amizade e por todo o apoio nesse trabalho.

A Miriã por todo o carinho, amizade, compreensão e suporte emocional em todo esse período.

Obrigada a minha amiga Bruna que sempre esteve disposta a me ouvir, aconselhar, incentivar, torcer por mim e dar apoio emocional.

A Jéssica que sempre esteve disponível para me escutar, apoiar e incentivar, sempre torcendo por mim.

Ao Matheus, meu namorado, que acompanhou de perto todas as alegrias e angústias nesse período, entendeu minha ausência e sempre me aconselhou e me motivou.

A toda a minha família e aos amigos que sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso.

Por fim, agradeço aos meus pais Hugo e Luiza e ao meu irmão Rodrigo por todo o apoio desde o início dessa jornada, pelo incentivo diário, por comemorarem a cada conquista minha e por serem inspiração e exemplos para mim.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	7
Lista de Figuras.....	10
Lista de Tabelas.....	11
Resumo.....	12
Abstract.....	14
Capítulo I.....	16
1.Introdução.....	17
1.1 Mieloma Múltiplo.....	17
1.2 Epidemiologia.....	19
1.3 Caracterização clínica.....	22
1.4 Diagnóstico.....	24
1.5 Estadiamento.....	27
1.6 Tratamento.....	29
1.6.1 Talidomida.....	33
1.6.2 Bortezomibe.....	35
1.7 Eventos adversos no MM.....	37
1.7.1 Neuropatia Periférica.....	38
1.8 Influência genética na resposta ao tratamento.....	40
1.8.1 Genes e variantes alvo para farmacogenética do MM.....	40
1.8.1.1 <i>ABCA1</i>	41
1.8.1.2 <i>CYP2C19</i>	42
1.8.1.3 <i>PKNOX1</i>	43
1.8.1.4 <i>SERPINB2</i>	44
Capítulo II.....	46
2.Justificativa.....	47
Capítulo III.....	48
3.Objetivos.....	49
3.1 Objetivo principal.....	49
3.2 Objetivos específicos.....	49
Capítulo IV.....	50
Abstract.....	52
1.Introduction.....	53

2. Patients and Methods.....	54
3. Results and Discussion.....	55
Clinical Characteristics and Treatment.....	55
Genetic variants.....	61
Genetic variants and Peripheral Neuropathy.....	63
Final Remarks.....	66
4. References.....	67
Supplementary Information 1 (S1). Real Time PCR (RT-PCR) technique conditions.....	75
Supplementary Figure 1 (S2). Flow chart for choosing the variants.....	76
Supplementary Table 1 (S3). Study patients and PN occurrence data according to time, drug dose and genetic variant.....	77
Capítulo V.....	79
4. Outros Resultados.....	80
Capítulo VI.....	86
5. Discussão.....	87
Capítulo VII.....	92
6. Conclusões e Perspectivas	93
Capítulo VIII.....	96
7. Referências Bibliográficas	97
Capítulo IX.....	105
Anexo I. Dados do DATASUS a respeito dos casos de MM por ano do diagnóstico para os estados do Brasil no período de 2013 a 2018.	106
Anexo II. Dados do DATASUS a respeito dos casos de MM por sexo para os estados do Brasil no período de 2013 a 2018.	107
Anexo III. Dados do DATASUS a respeito dos casos de MM por faixa etária para os estados do Brasil no período de 2013 a 2018.....	108
Anexo IV. Fluxograma de definição do tratamento para pacientes com MM.....	109

Lista de Abreviaturas

ABCA1	<i>ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1</i>
apoA-1	Apolipoproteína A-1
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> – Adenosina Trifosfato
CBS	<i>Cystathionine Beta-Synthase</i> - Cistationina Beta-Sintase
Células NK	<i>Células Natural Killer</i>
CRAB	<i>Calcium, Renal, Anemia, Bones</i> – Cálcio, Renal, Anemia, Ossos
CRBN	Cereblon
CYP2C19	<i>Cytochrome P450 2C19</i> – Citocromo P450 2C19
D&S	<i>Durie & Salmon System</i> - Sistema Durie & Salmon
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i> – Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência
FLC	<i>Free Light Chain</i> – Cadeia leve livre
FLCs	<i>Serum Free Light Chain</i> – Cadeia leve livre sérica
FSHβ	Hormônio folículo estimulante beta
Hb	Hemoglobina
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> – Lipoproteína de Alta Densidade
Igs	Imunoglobulinas
IKZF1	<i>Ikaros Family Zinc Finger 1</i>
IKZF3	<i>Ikaros Family Zinc Finger 3</i>
IL-3	<i>Interleukin-3</i> – Interleucina-3
IMF	<i>International Myeloma Foundation</i>

IMiDs	<i>Immunomodulatory Drugs</i> – Fármacos Imunomodulatórios
IP	<i>Proteasome inhibitor</i> - Inibidores de Proteassoma
ISS	<i>International Staging System</i> – Sistema de Estadiamento Internacional
LDH	<i>Lactate Dehydrogenase</i> - Lactato Desidrogenase
MGUS	<i>Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance</i> – Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado
MM	<i>Multiple Myeloma</i> - Mieloma Múltiplo
NCI-CTC	<i>National Cancer Institute – Common Toxicity Criteria</i>
NIH	<i>National Cancer Institute</i>
NP	Neuropatia Periférica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI-2	<i>Plasminogen activator inhibitor-2</i>
PBX1	<i>Pre-B-cell Leukemia Homeobox 1</i>
PET/CT	<i>Positron Emission Tomography – Computed Tomography</i> - Tomografia por Emissão de Póstrons - Tomografia Computadorizada
PKNOX1	<i>Pbx/knotted 1 Homeobox 1</i>
PREP1	<i>Pbx-regulating protein-1</i>
SERPINB2	<i>Serpin Family B Member 2</i>
SLAMF7	<i>SLAM Family Member 7</i>
SMM	<i>Smouldering Multiple Myeloma</i> – Mieloma Múltiplo Latente
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TACTH	Transplante Autólogo de Células-Tronco Hematopoiéticas
TALE	<i>Three-Amino Acid Loop Extension</i>

TC	Tomografia Computadorizada
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
tPA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
UEF-3	<i>uPA enhancer fator 3</i>
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
HPO	<i>Human Phenotype Ontology</i>
CTD	<i>Comparative Toxicogenomics Database</i>
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>

Lista de Figuras

Figura 1. Ativação e proliferação de células B para produção de plasmócitos e células B de memória (adaptado de Abbas 8 ^a ed.).	17
Figura 2. Evolução das gamopatias monoclonais	18
Figura 3. Mapa dos dados da OMS sobre as taxas de incidência de Mieloma Múltiplo no mundo para indivíduos do sexo masculino e feminino com idade superior a 30 anos.	21
Figura 4. Mapa dos dados da OMS sobre as taxas de mortalidade de Mieloma Múltiplo no mundo para indivíduos de ambos os sexos com idade superior a 30 anos.	21
Figura 5. MM extramedular.	24
Figura 6. Estrutura química da molécula da talidomida	33
Figura 7. Estruturas químicas dos análogos da talidomida.	34
Figura 8. Estrutura química da molécula do bortezomibe	36
Figura 9. Diagrama de Venn para resultados da busca de genes nas plataformas HPO para neuropatia periférica e CTD para talidomida e bortezomibe.	80
Figura 10. Análises de expressão diferencial.	82
Figura 10. Análises de expressão diferencial.	83
Figura 11. Coexpressão de <i>MAP2K4</i> e <i>ASPN</i> .	85

Lista de Tabelas

Tabela 1. Frequência das características clínicas em pacientes com MM.	22
Tabela 2. Critérios de diagnóstico para MM e distúrbios relacionados.	25
Tabela 3. Critérios para estadiamento conforme sistema de estadiamento D&S.	28
Tabela 4. Critérios para estadiamento conforme sistema de estadiamento ISS.	29
Tabela 5. Critérios para avaliação da resposta ao tratamento.....	32

Resumo

O tratamento do Mieloma Múltiplo (MM) é baseado no transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TACTH) e esquemas de quimioterapia. No entanto, um dos efeitos adversos mais importantes do tratamento é a neuropatia periférica (NP), uma condição caracterizada pela degeneração dos nervos periféricos e que acomete de 30-68% dos pacientes. A talidomida e o bortezomibe são utilizados em diferentes esquemas terapêuticos no tratamento do MM e são os principais responsáveis pela NP. Variantes em genes que codificam enzimas que atuam no metabolismo desses medicamentos ou genes que desempenham papel fundamental na ação desses fármacos podem ser fontes de variação da resposta terapêutica individual. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre as variantes *CYP2C19*2* (rs4244285), rs363717 (*ABCA1*), rs2839629 (*PKNOX1*), rs6103 (*SERPINB2*) e a ocorrência de NP em pacientes com MM que realizaram esquemas de tratamento incluindo talidomida e/ou bortezomibe. Foram recrutados para este estudo 87 pacientes com MM. Realizamos uma análise descritiva da amostra e um teste qui-quadrado para avaliar a associação entre as variantes e a ocorrência de NP. Curvas de sobrevida foram realizadas através do teste de Kaplan-Meier para avaliar sobrevida global, sobrevida de pacientes submetidos ao TACTH e influência do genótipo de *CYP2C19*2* na sobrevida. O estadiamento desses pacientes de acordo com os sistemas *Durie & Salmon Staging* (D&S) e *International Staging System* (ISS) revelou que 84% dos pacientes encontrava-se no estágio III para D&S e 51% no estágio III para ISS. O principal protocolo de terapia de indução utilizado foi ciclofosfamida, talidomida e dexametasona (54%) e 50% dos pacientes atingiram pelo menos uma resposta parcial muito boa após a indução. A sobrevida global média foi de 13,3 anos (DP 10,7-15,8) e a sobrevida média do grupo que realizou TACTH foi de 13,7 anos (DP 11-16,4). Nos pacientes que não foram submetidos ao TACTH a média de sobrevida foi de 7,3 anos (DP 5,7-8,9). Neste estudo não encontramos associação estatisticamente significativa entre as variantes genéticas e a ocorrência de NP, mas nossos dados sugerem uma possível relação do genótipo heterozigoto de *CYP2C19*2* e maior sobrevida global. De maneira complementar às análises moleculares nós realizamos uma análise de

expressão diferencial e coexpressão para identificar novos genes alvo. Utilizamos dados de um estudo depositado em banco de dados públicos e realizamos as análises através do software RStudio Desktop v.1.0.1. em linguagem R. As análises *in silico* indicaram uma relação entre os genes *MAP2K4* e *ASPN* na presença de NP quando avaliamos a coexpressão. Acreditamos que este estudo possa contribuir com a busca de biomarcadores de resposta ao tratamento e apesar de serem necessários mais estudos, nossos dados sugerem novas hipóteses para explicar os fatores genéticos envolvidos na resposta ao tratamento do MM, assim como influência na sobrevida.

Palavras-chave: Mieloma Múltiplo, Neuropatia Periférica, Talidomida, Bortezomibe, *ABCA1*, *CYP2C19*, *PKNOX1* e *SERPINB2*.

Abstract

Multiple Myeloma (MM) treatment is based on autologous stem-cell transplantation (ASCT) and chemotherapy regimens. However, one of the most important adverse effects of MM treatment is peripheral neuropathy (PN), a condition characterized by the degeneration of peripheral nerves and affecting 30-68% of patients with MM. Thalidomide and bortezomib are used in different therapeutic regimens for MM and are mainly responsible for PN. Variants in genes that encode enzymes that act in the metabolism of these drugs or genes that play a fundamental role in the action of these drugs can be sources of variation in the individual treatment response. Thus, the aim of this study was to assess the association between *CYP2C19*2* (rs4244285), rs363717 (*ABCA1*), rs2839629 (*PKNOX1*) and rs6103 (*SERPINB2*) and the occurrence of PN in patients with MM in treatment regimens that include thalidomide and bortezomib. Eighty seven patients with MM were recruited for this study. We performed a descriptive analysis of the sample and a chi-square test to assess the association between the variants and the occurrence of PN. Survival curves were performed using the Kaplan-Meier test to assess overall survival, survival of patients undergoing ASCT and influence of the *CYP2C19*2* genotype on survival. The staging of these patients according to the Durie & Salmon Staging (D&S) and International Staging System (ISS) systems revealed that 84% of the patients were in stage III for D&S and 51% in stage III for ISS. The main induction therapy protocol used was cyclophosphamide, thalidomide and dexamethasone (54%) and 50% of patients achieved at least a very good partial response after induction. The median overall survival was 13.3 years (SD 10.7-15.8) and the median survival of the group that underwent ASCT was 13.7 years (SD 11-16.4). In patients who were not submitted to ASCT the median survival was 7.3 years (SD 5.7-8.9). We did not find a statistically significant association between the genetic variants and the occurrence of PN, but our data suggest a possible relationship of the heterozygous genotype of *CYP2C19*2* and greater overall survival. In a complementary way to molecular analyses, we performed a differential expression and coexpression analysis to identify new target genes related to PN. We used data from a study deposited in a public database and performed the analyses using RStudio Desktop software v.1.0.1. in R language.

The *in silico* analyses indicated a relationship between the *MAP2K4* and *ASPN* genes in the presence of PN when we evaluated coexpression. We believe that this study can contribute to the search for biomarkers of response to treatment and although more studies are needed, the results raise new hypotheses to explain the genetic factors involved in the response to the treatment of MM, as well as influence on survival.

Keywords: Multiple Myeloma, Peripheral Neuropathy, Thalidomide, Bortezomib, *ABCA1*, *CYP2C19*, *PKNOX1* and *SERPINB2*.

Capítulo I
Introdução

1. Introdução

1.1 Mieloma Múltiplo

O Mieloma Múltiplo (MM) faz parte de uma série de distúrbios referidos como gamopatias monoclonais, também conhecidas como paraproteinemias, disproteinemias ou imunoglobulinopatias, que são associadas com a proliferação monoclonal de plasmócitos. Os plasmócitos se originam a partir de células B que sofrem expansão clonal e diferenciação, produzindo ao final desse processo os plasmócitos e as células B de memória (Figura 1). Os plasmócitos são células secretoras de imunoglobulinas (Igs). No MM, além dos plasmócitos as imunoglobulinas ou fragmentos de Igs secretados também são monoclonais. A presença de plasmócitos na medula óssea em quantidade superior a 5% é um fator determinante para estabelecimento de um quadro clínico potencialmente neoplásico, como o MM (Faria & Silva, 2007).

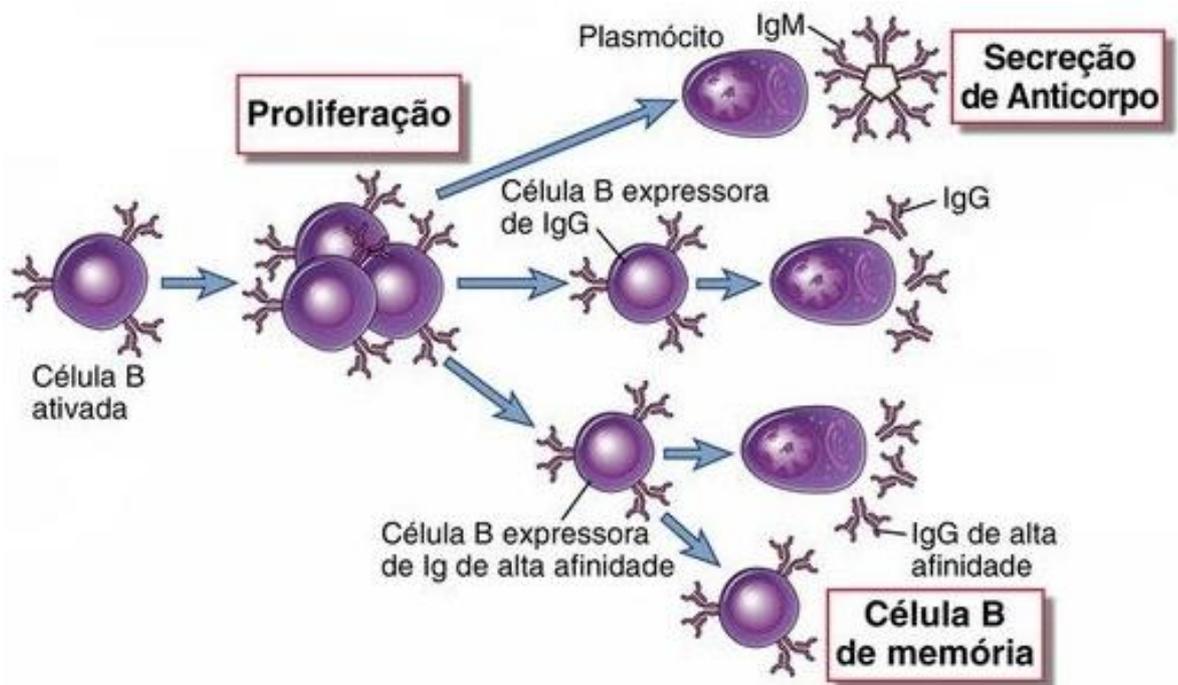


Figura 1. Ativação e proliferação de células B para produção de plasmócitos e células B de memória (adaptado de Abbas 8ª ed.).

Dentre as gamopatias monoclonais, a mais comum é a Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance* - MGUS), caracterizada pela infiltração de células plasmáticas clonais na medula óssea e secreção de proteína monoclonal. O MGUS é assintomático e precede de forma consistente o desenvolvimento do MM, com ou sem uma etapa intermediária referida como Mieloma Múltiplo Latente (*Smouldering Multiple Myeloma* - SMM). Aproximadamente 15% dos pacientes com MGUS irão progredir para um quadro de MM, e 20% para MM ou condição relacionada, como amiloidose, distúrbio linfoproliferativo ou macroglobulinemia (Kumar *et al.*, 2017).

A proliferação de células plasmáticas clonais ocorre tanto na forma intramedular, no ambiente da medula óssea e sendo associado com MGUS, quanto na forma extramedular, quando células plasmáticas atingem outros tecidos e contribuem para manifestações clínicas. A forma extramedular está associada com a progressão da doença para um quadro clínico de SMM, MM ou leucemia de células plasmáticas (Figura 2) (Rajkumar *et al.*, 2014).

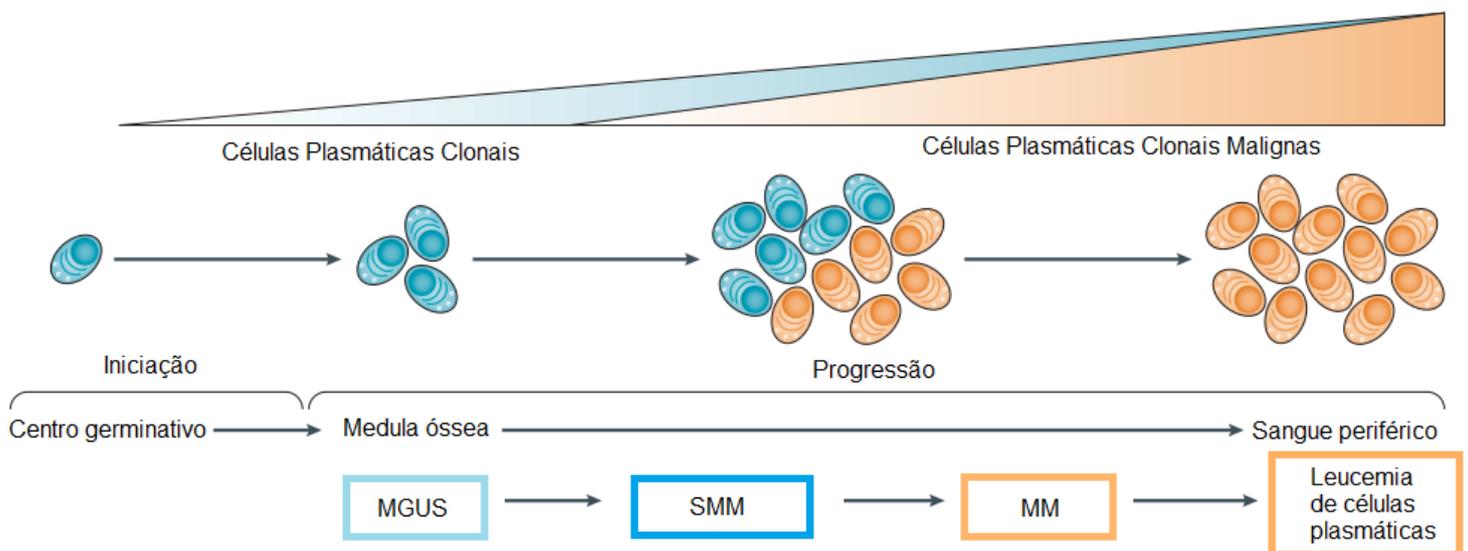


Figura 2. Evolução das gamopatias monoclonais (adaptado de Kumar *et al.*, 2017).

1.2 Epidemiologia

O MM representa 10% das neoplasias hematológicas, sendo mais comum em homens do que em mulheres e duas vezes mais comum em afro-americanos quando em comparação com caucasianos (Landgren & Weiss, 2009). Dados epidemiológicos do *National Institutes of Health* (NIH) para as regiões dos Estados Unidos mostram que em: San Francisco, Connecticut, Detroit, Hawaii, Iowa, New Mexico, Seattle, Utah e Atlanta, a ocorrência é estimada em aproximadamente 30.280 novos casos de MM (17.490 em homens e 12.790 em mulheres) e 12.590 mortes (6.660 em homens e 5.930 em mulheres) anualmente (Smith *et al.*, 2018). Dados do ano de 2018 da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) estimam a ocorrência de 30.770 novos casos de MM diagnosticados nos Estados Unidos, representando 1,8% de todos os novos casos de câncer no país. O número estimado de óbitos em decorrência de MM para o mesmo ano foi de 12.770, representando 2,1% de óbitos em decorrência de câncer nos Estados Unidos (Mikhael *et al.*, 2020). Na Europa, a incidência é de 4,5-6/100.000/ano com média de idade entre 65 e 70 anos; a mortalidade é de 4,1/100.000/ano (Moreau, *et al.* 2013). A doença apresenta alta proporção de mortes relacionadas ao câncer, correspondendo a 2% de todas as mortes por câncer, incluindo 20% de mortes relacionadas a malignidades hematológicas (Jemal, *et al.*, 2008). Na América Latina, pouco se sabe sobre a incidência e os aspectos clínicos do MM, e no Brasil ainda não há um conhecimento exato da incidência da doença, porém, segundo dados de 2016 da *International Myeloma Foundation* (IMF) existem cerca de 30.000 brasileiros em tratamento para o MM (Hungria *et al.*, 2013; Kerbaux *et al.*, 2016).

Na última década, as taxas de sobrevida para pacientes com MM apresentaram significativa melhora na população em geral, principalmente devido à disponibilidade de terapias efetivas como a introdução do transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas como opção terapêutica (Turesson *et al.*, 2010). A média de sobrevida em meses para pacientes com recidiva de MM, ou seja, aqueles pacientes que após um período da doença estabilizada sem apresentar sintomas, ou que após um primeiro tratamento e controle da doença voltam a apresentar sinais da mesma, era de 12 meses antes dos anos

2.000, sendo que após o início da atual década a média de sobrevida passou para 24 meses, tendo um ganho de 12 meses na média de sobrevida dos pacientes com MM (Kumar *et al.*, 2008). As terapias mais modernas, como medicamentos imunomoduladores e inibidores de proteassoma ocasionaram uma melhora na sobrevida dos pacientes com MM, elevando as taxas de sobrevida para uma faixa de 5 a 10 anos (Kazandjian, 2016).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) do ano de 2018 para a distribuição do MM no mundo mostram que para indivíduos com mais de 30 anos a taxa de incidência de MM é maior na América do Norte, Europa e Oceania (Figura 3). Quanto às taxas de mortalidade, dados da OMS mostram que para indivíduos com mais de 30 anos essas taxas aparecem mais altas na América do Norte, Europa, Oceania, alguns países do Sul da África e América do Sul (Figura 4). Dados do DATASUS referentes à MM e neoplasias malignas de plasmócitos para todos os estados do Brasil no período de 2013 a 2018, mostram que o ano de 2018 apresentou o maior número total de novos diagnósticos de MM em todo o país, ao total foram 2.901 diagnósticos (Anexo I), sendo que para esse mesmo período de 2013 a 2018 os casos de MM para indivíduos do sexo masculino contabilizaram um número maior comparado aos casos de MM para o sexo feminino (7.778 homens e 6.954 mulheres) (Anexo II). Os dados também mostram que a faixa de idade com maior número de casos de MM no Brasil é a faixa entre 60 a 64 anos, contabilizando 2.461 casos (Anexo III).

Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento de MM são indivíduos com idade avançada ou que possuem comorbidades. A maioria dos diagnósticos estão associados a indivíduos idosos, sendo incomum o diagnóstico em pacientes com menos de 45 anos de idade. Em pacientes que apresentam diagnóstico de MGUS o risco de progressão para MM é maior naqueles com obesidade, disfunção imunológica ou exposição agrícola, química ou à radiação. Alterações citogenéticas, quando detectadas, são importantes para a estratificação do risco e atribuição do prognóstico (Brigle, 2017).

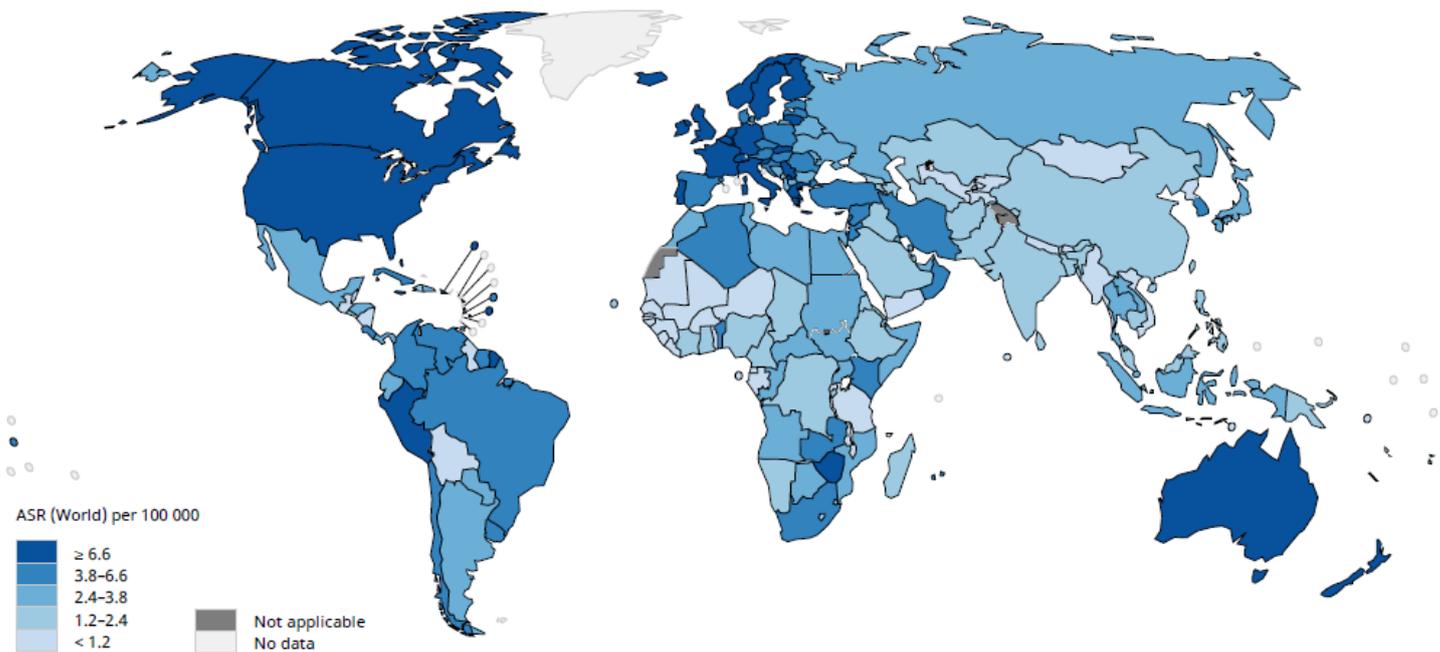


Figura 3. Mapa dos dados da OMS sobre as taxas de incidência de Mieloma Múltiplo no mundo para indivíduos do sexo masculino e feminino com idade superior a 30 anos.

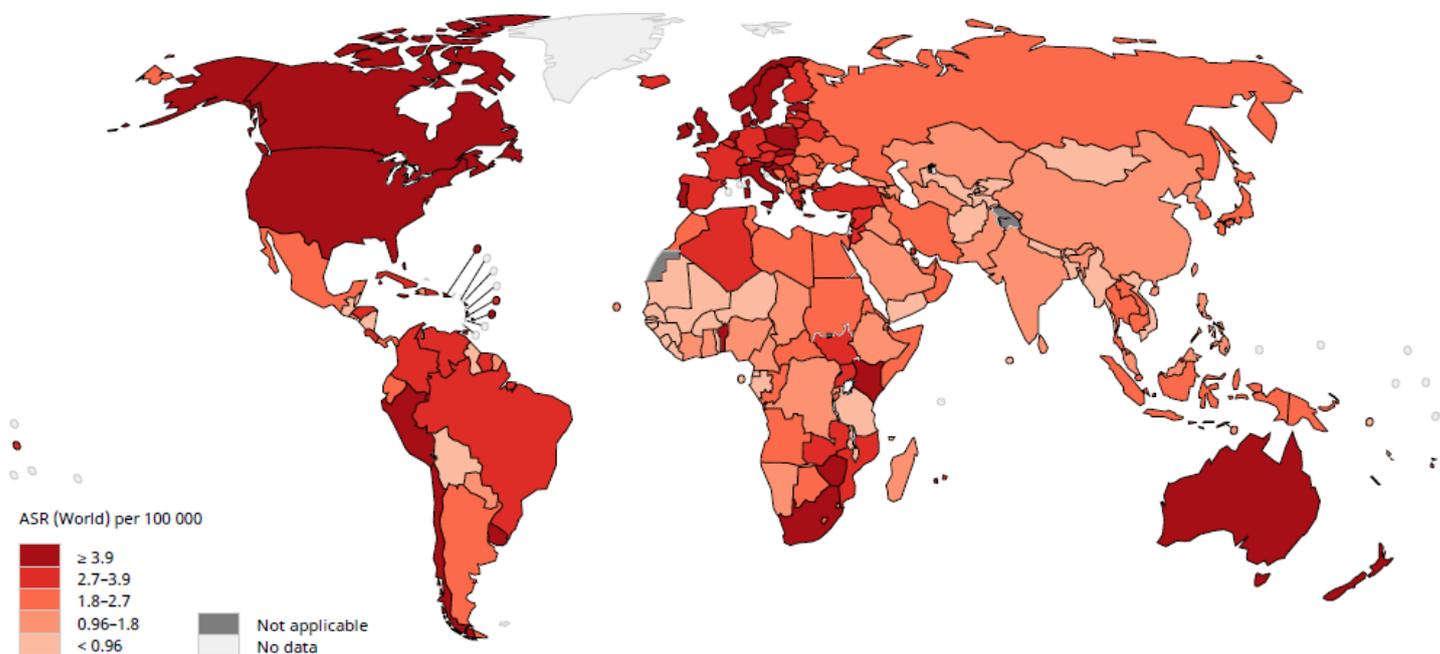


Figura 4. Mapa dos dados da OMS sobre as taxas de mortalidade de Mieloma Múltiplo no mundo para indivíduos de ambos os sexos com idade superior a 30 anos.

1.3 Caracterização clínica

O MM é uma doença com múltiplos sinais e sintomas, e o perfil clínico ao diagnóstico é um paciente com média de idade de 65 anos. A doença óssea é a principal causa de morbidade do MM. Anemia, hipercalcemia, insuficiência renal e maior propensão a infecções são outras características clínicas importantes do paciente acometido pela doença (Tabela 1). A anemia é geralmente relacionada com a infiltração de células na medula óssea ou disfunção renal. Os danos renais ocorrem principalmente como resultado ao dano tubular pelo excesso de proteínas, desidratação, hipercalcemia e uso de medicamentos nefrotóxicos. O risco de infecções é aumentado com a doença ativa, mas diminuído quando há resposta terapêutica (Dimopoulos *et al.*, 2008). Cerca de 1 a 2% dos pacientes apresentam a doença em sua forma extramedular no momento do diagnóstico, enquanto 8% desenvolvem essa forma mais adiante durante o curso da doença (Short *et al.*, 2011).

Tabela 1. Frequência das características clínicas em pacientes com MM.

Característica clínica	Frequência (%)
Anemia	75%
Hipercalcemia	25%
Lesões Ósseas	80%
Insuficiência renal	20 a 40%

Fonte: (adaptado de Dimopoulos *et al.*, 2008; Hungria, 2013).

A maioria dos pacientes com MM evoluem de um estágio pré-maligno que é assintomático, o MGUS, e que está presente em mais de 3% da população acima de 50 anos e progride para o MM ou malignidade relacionada em uma taxa de 1% ao ano. Por ser assintomático, mais de 50% dos indivíduos com MGUS têm essa condição há mais de 10 anos antes de ser realizado o

diagnóstico clínico. Em alguns pacientes uma forma sintomática intermediária pode estar presente, o SMM, que pode ser diagnosticado devido à proliferação de plasmócitos e algumas características clínicas associadas. O SMM pode evoluir para o MM em uma taxa de aproximadamente 10% ao ano nos primeiros 5 anos após o diagnóstico, sendo que esta taxa pode ser influenciada pela presença de alterações citogenéticas que conferem um maior risco de progressão de SMM para MM, como t(4;14), del(17p) e ganho (1q) (Rajkumar, 2016).

Cerca de 80% dos casos de MM são originados de um MGUS de imunoglobulinas não IgM, e 20% dos casos de um MGUS de imunoglobulinas de cadeias leves. Na progressão de MGUS para MM, a imunoglobulina IgM pode estar envolvida com a macroglobulinemia Waldenström, que é um tipo de linfoma não Hodgkin, mas a progressão de um MGUS com IgM para um quadro de MM é raro (taxa de progressão de 0,5 – 1% ao ano). O risco dessa progressão pode ser mais elevado quando há concentração de proteínas monoclonais, taxa de proteína sérica de cadeia leve, plasmocitose na medula óssea, proporção de células plasmáticas clonais e presença de imunoparesia (Rajkumar *et al.*, 2014).

A presença de células plasmáticas no ambiente fora da medula óssea caracteriza um MM extramedular. A origem mais comum do MM extramedular é a partir da extensão direta da medula óssea através do osso cortical, afetando o esqueleto axial, o que caracteriza o comprometimento ósseo do MM extramedular (Figura 5A). De forma menos frequente pode ocorrer disseminação na forma de plasmocitomas de tecidos moles ou órgãos, geralmente envolvendo pele, fígado, rins, sistema nervoso central (SNC), cavidade pleural, linfonodos e pâncreas (Figura 5B). A incidência de MM extramedular em novos diagnósticos de MM é de 7 a 18%, e na recidiva de MM a incidência é de 10 a 30%. A ocorrência de MM extramedular está associada a um pior prognóstico (Muchtart *et al.*, 2017).

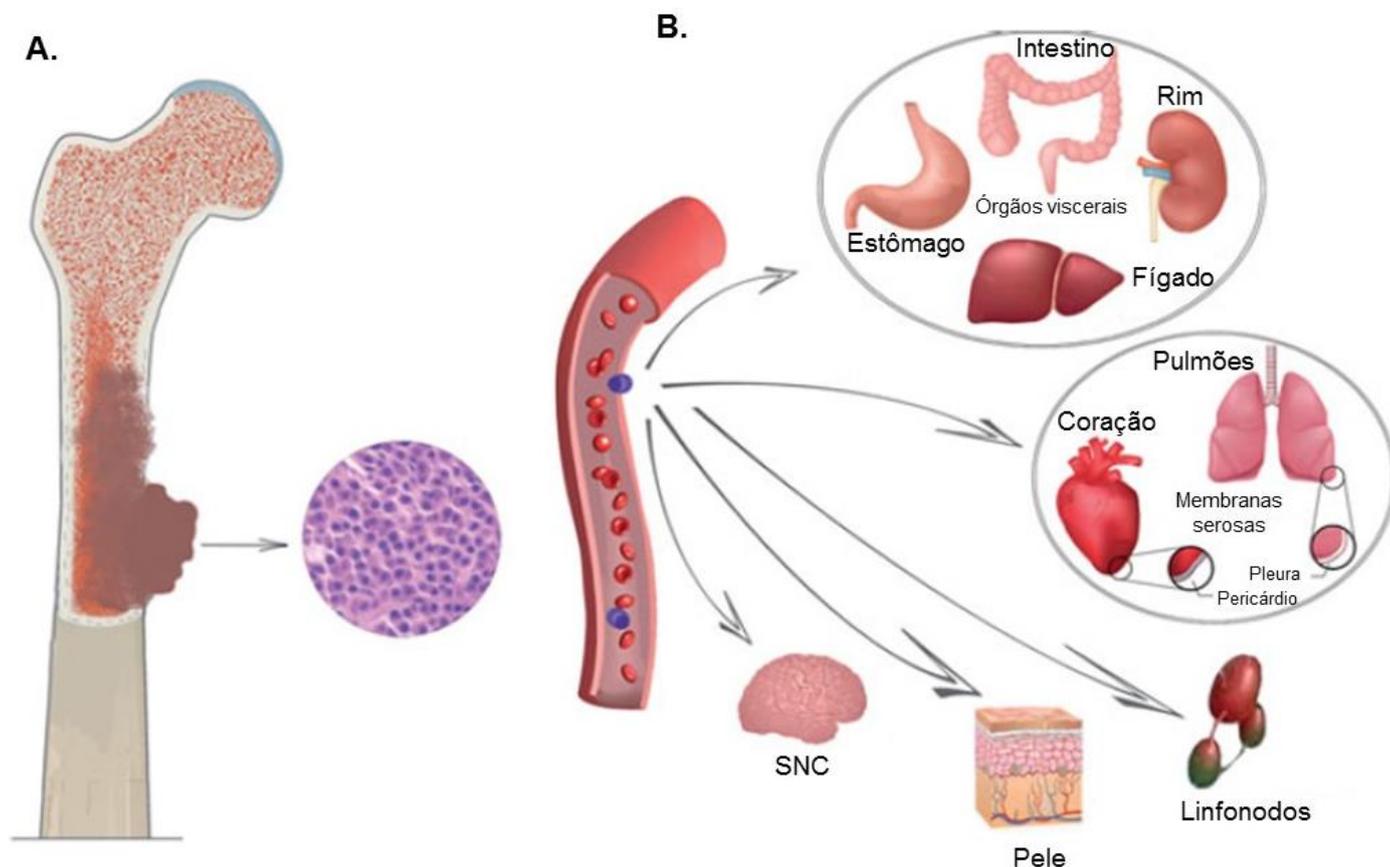


Figura 5. MM extramedular. (A) MM extramedular com comprometimento ósseo. (B) MM extramedular com disseminação de plasmocitomas afetando diversos tecidos e órgãos (adaptado de Muchtar *et al.*, 2017).

1.4 Diagnóstico

O MM é classificado como assintomático ou sintomático, dependendo da ausência ou presença da doença relacionada a disfunções em órgãos ou tecidos, incluindo hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e doença óssea (critérios CRAB) (Kyle & Rajkumar, 2009). Por volta da década de 60, ainda não havia disponibilidade de terapias mais avançadas para o tratamento do MM, e, portanto, a tomada de decisões terapêuticas em casos de recidiva da doença, resultavam em terapias mais restritivas e escassas. Entretanto, ao longo das décadas novos medicamentos foram aprovados para uso no tratamento de MM e critérios diagnósticos antes utilizados como ferramentas para definir a doença a partir de sintomas, passam a ser ferramentas utilizadas como biomarcadores do MM, sendo adicionados aos antigos critérios (hipercalcemia, anemia, dano renal e lesões ósseas), novos critérios como, por exemplo: porcentagem de

células plasmáticas na medula óssea e presença de imunoglobulinas anormais no sangue e/ou urina (Landgren & Rajkumar, 2016). Os critérios de diagnóstico atuais para MGUS, SMM e MM estão descritas na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Critérios de diagnóstico para MM e distúrbios relacionados.

MGUS	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína monoclonal sérica (tipo não IgM) <3 g/dL; - <10% células plasmáticas clonais na medula óssea; - Ausência de hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas que podem ser atribuídas a proliferação plasmática e dano à órgãos.
SMM	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína monoclonal sérica (tipo IgG ou IgA) ≥3 g/dL, ou proteína monoclonal urinária 500mg/24h e/ou 10-60% de células plasmáticas na medula óssea; - Ausência de eventos que definam mieloma ou amiloidose.
MM	<ul style="list-style-type: none"> - 10% de células plasmáticas clonais na medula óssea, ou plasmocitoma ósseo, ou MM extramedular comprovado por biópsia. <p style="text-align: center;"><u>Eventos de definição de MM</u></p> <p style="text-align: center;"><u>(relacionados a proliferação plasmática ou danos à órgãos):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Hipercalcemia: cálcio sérico >25 mmol/L (>1 mg/dL) maior que o limite superior normal, ou >275 mmol/L (>11 mg/dL); - Insuficiência renal: depuração da creatinina <40 mL/min ou creatinina sérica >177 µmol/L (>2 mg/dL); - Anemia: valor de hemoglobina >2 g/dL abaixo do limite inferior normal ou valor de hemoglobina <10 g/dL; - Lesões ósseas: ≥1 lesão osteolítica na radiografia esquelética, TC ou PET/CT;

	<ul style="list-style-type: none"> - 60% de células plasmáticas clonais na medula óssea; - Taxa de FLC sérica (<i>serum free light chain</i>) 100mg/L; - >1 lesão focal em estudos de ressonância magnética (tamanho ≥ 5mm).
--	--

Fonte: (adaptado de Gandolfi *et al.*, 2018).

A investigação diagnóstica completa para o MM é baseada no caráter sistêmico e multifatorial da doença, incluindo três linhas de análise: estudos laboratoriais a partir de amostras de sangue e urina, biópsia de medula e análises radiológicas. A análise laboratorial compreende a contagem completa de células sanguíneas com contagem diferencial e plaquetária, uma abordagem bioquímica através da avaliação de marcadores como creatinina e $\beta 2$ -microglobulina, eletroforese de proteínas séricas com quantificação da proteína M com imunofixação, cadeias leves livres no soro (*serum free light chain* – FLCs) e urina de 24h para eletroforese de proteínas totais. A biópsia de medula é realizada para avaliação do MM a partir de testes de imunohistoquímica, citometria de fluxo e análises de citogenética por hibridização *in situ* por fluorescência (*fluorescence in situ hybridization* - FISH) sendo avaliada a porcentagem de plasmócitos e presença de alterações citogenéticas que podem ter valor prognóstico. As análises radiológicas permitem avaliar as lesões ósseas que são características do MM. Na radiografia as lesões apresentam aparência osteolítica perfurada, na técnica de tomografia computadorizada, que é mais sensível, é possível detectar lesões com destruição óssea <5%, além disso, são úteis para avaliar o envolvimento de tecidos moles circundantes. Técnicas como ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons (*positron emission tomography* - PET) são técnicas ainda mais sensíveis e utilizadas para avaliar o comprometimento sistêmico do MM (Brigle & Rogers, 2017).

O prognóstico do MM depende de alguns fatores como: idade, presença de outras comorbidades, estágio da doença, agressividade da doença e resposta à terapia. Sistemas de estadiamento da doença são capazes de fornecer informações a respeito do prognóstico, mas não são capazes de auxiliar nas escolhas terapêuticas pois se concentram em classificar os pacientes de acordo com alterações laboratoriais juntamente com achados radiológicos (Russel &

Rajkumar, 2011). Alterações citogenéticas podem auxiliar na escolha terapêutica e são fatores importantes para determinação de prognóstico, auxiliando na estratificação de grupos de alto risco (Kumar & Rajkumar, 2018).

1.5 Estadiamento

Há uma grande variação na sobrevida dos pacientes com MM, isso se deve a fatores como carga tumoral, biologia da doença e resposta à terapia. Para auxiliar na tomada de decisões e caracterizar os pacientes de acordo com os achados laboratoriais e clínicos, e assim possibilitar determinar o curso da doença ou escolha terapêutica, se faz o uso de sistemas de estadiamento. Os principais sistemas de estadiamento usados na prática clínica em pacientes com MM são: *Durie & Salmon System (D&S)* e *International Staging System (ISS)*. Esses sistemas consideram características biológicas da doença e presença ou ausência de anormalidades citogenéticas secundárias, sendo que essas alterações variam conforme a fase da doença e muitas vezes auxiliam a determinar o prognóstico dos pacientes (Hari *et al.*, 2009).

O sistema de estadiamento D&S foi descrito pela primeira vez em 1975 através de um estudo que relacionou a medida de massa celular no MM com presença de características clínicas, resposta ao tratamento e sobrevida (Durie & Salmon, 1975). O sistema de estadiamento ISS foi desenvolvido com base em um estudo com 4.445 pacientes com diagnóstico recente de MM provenientes de 11 ensaios internacionais. O estudo mostrou que a taxa de sobrevida em um período de 5 anos de pacientes que foram classificados de acordo com o sistema ISS foi de 82% no estágio I, 62% no estágio II e 40% no estágio III (Rajkumar, 2016).

O sistema D&S (Tabela 3) estratifica os pacientes de acordo com a carga da doença (pico de proteína M, valores de hemoglobina, cálcio sérico e lesões osteolíticas) em três grupos de risco (baixo, intermediário e alto) e faz uma subclassificação em dois grupos (A e B) de acordo com a função renal. O sistema ISS (Tabela 4) é mais simples e preciso, pois não requer uma interpretação médica das imagens radiológicas. ISS utiliza valores de níveis séricos de β 2-

microglobulina e albumina sérica como biomarcadores prognósticos de pacientes com novos diagnósticos. Após revisão do sistema ISS também foram incorporados os valores dos níveis de LDH (lactato desidrogenase) por se mostrarem biomarcadores prognósticos importantes (Ziogas *et al.*, 2018).

Tabela 3. Critérios para estadiamento conforme sistema de estadiamento D&S.

Estádio D&S	Critérios
I	Todos os seguintes critérios: -Hb >10g/dL; -Cálcio normal; -IgG <5g/dL; IgA <3g/dL; -Proteína urinária monoclonal <4g/24h; -Ausência ou lesão óssea única.
II	Entre os estádios I e III.
III	Qualquer um dos seguintes critérios: -Hb <8,5g/dL; -Cálcio >12mg/dL; -IgG >7g/dL; IgA >5g/dL; -Proteína urinária monoclonal >12g/24h; -Múltiplas lesões osteolíticas.
A	se creatinina <2mg/dL.
B	se creatinina ≥2 mg/dL.

Fonte: (adaptado de Deng *et al.*, 2018).

Tabela 4. Critérios para estadiamento conforme sistema de estadiamento ISS.

Estádio ISS	Critérios
I	Apresentar todos os seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none">- Albumina sérica $\geq 3,5$g/dL;- $\beta 2$-microglobulina sérica $< 3,5$mg/L;- Nenhuma alteração citogenética de alto risco;- Níveis de LDH séricos normais.
II	Não pertencer ao estágio I ou III.
III	Apresentar ambos os critérios: <ul style="list-style-type: none">- $\beta 2$-microglobulina sérica $\geq 5,5$g/dL;- Alterações citogenéticas de alto risco [t(4;14), t(14;16), del(17p)] ou níveis elevados de LDH.

Fonte: (adaptado de Rajkumar *et al.*, 2016).

1.6 Tratamento

Pacientes que apresentam condições relacionadas ao MM, como MGUS e SMM, não tem indicação de tratamento, muitas vezes porque não foram diagnosticados com tais condições devido ao caráter assintomático. Pacientes diagnosticados com MGUS e SMM devem seguir em monitoramento quanto à progressão da doença, sendo que o risco de progressão para MM é de cerca de 10% nos primeiros 5 anos da doença, apresentando queda subsequente nos próximos 5 anos, quando o risco é de 3%, e nos 10 anos seguintes, o risco de progressão é reduzido para 1% (Kyle *et al.*, 2007).

O tratamento de plasmocitomas ósseos solitários ou plasmocitomas extra-ósseos, que são lesões ósseas em achados radiológicos que podem evoluir para o MM, é feito a partir de radioterapia ou cirurgicamente; a progressão para o MM

ocorre em 30 a 60% dos casos sendo imprescindível o acompanhamento médico desses pacientes. Pacientes com MM sistêmico ativo tem indicação para tratamento com quimioterapia a fim de prevenir a progressão da doença e reduzir os sintomas. A remissão parcial muito boa ou remissão completa após o tratamento do MM sistêmico está associado a melhora do resultado a longo prazo (Rollig *et al.*, 2015).

O tratamento do MM deve ser iniciado imediatamente em pacientes sintomáticos que demonstrem lesões orgânicas. O primeiro passo para definição do tratamento é quanto à elegibilidade do paciente à realização do transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TACTH) (Anexo 4), que é geralmente indicado para pacientes com menos de 65 anos, com ausência de disfunções no coração, rins, fígado, ou outras comorbidades não controladas, como diabetes. Pacientes elegíveis ao TACTH recebem um tratamento mieloablativo após a indução da remissão pelo tratamento de primeira linha que consiste em administração de agentes alquilantes, como o melfalan. De acordo com o perfil clínico do paciente com MM, normalmente um paciente com idade avançada que na maioria das vezes não será elegível ao TACTH, a conduta terapêutica baseia-se na administração de tratamentos por vários ciclos, a fim de melhorar a resposta terapêutica de acordo com um maior período de administração. É recomendada a redução de dose conforme a idade para evitar efeitos tóxicos e aumentar a tolerabilidade do tratamento nesses pacientes (Harousseau *et al.*, 2010).

Cerca de 15% dos pacientes com MM exibem um curso altamente agressivo da doença. Esses pacientes de alto risco são definidos a partir de análises citogenéticas que permitem identificar alterações com importância prognóstica. As alterações citogenéticas como, t(4;14) e t(14;16), são associadas à um pior prognóstico e estão relacionadas à uma menor sobrevida livre de progressão após indução. Os pacientes que apresentam essas alterações estão mais propensos a manifestar relapso da doença mais precocemente (Joseph *et al.*, 2017).

Do ano de 1950 até o final da década de 1990, o pilar da terapia do MM eram os medicamentos alquilantes (melfalan e ciclofosfamida), antraciclinas, corticosteroides (prednisona e dexametasona) e em pacientes elegíveis ao

TACTH, altas doses de quimioterapia seguido pelo transplante. Subsequentemente, talidomida, bortezomibe e lenalidomida surgiram como agentes eficazes e melhoraram significativamente o desfecho clínico dos pacientes. Talidomida e lenalidomida foram considerados pró-fármacos imunomodulatórios (*Immunomodulatory drugs* - IMiDs), embora estudos mostrem que esses fármacos atuam ligando-se e ativando a proteína Cereblon (*CRBN*) em um complexo ubiquitina E3 ligase, resultando em uma rápida ubiquitinação e degradação de dois específicos fatores de transcrição de células B, *IKZF1* e *IKZF3* (Zhu *et al.*, 2014).

Em 2013, carfilzomib (inibidor de proteassoma de segunda geração) e pomalidomida (outro análogo da talidomida e mais potente IMiD) foram aprovados para uso nos EUA, e em seguida, outros fármacos foram aprovados para o MM, panobinostato (inibidor de deacetilase), ixazomib (inibidor de proteassoma), elotuzumab e daratumumabe (anticorpos monoclonais com alvo em *SLAMF7* e CD38, respectivamente) (Rajan & Kumar, 2016). O aumento da disponibilidade de agentes alvos altamente efetivos com toxicidade limitada tem deslocado o paradigma terapêutico de combinações de 2 medicamentos para o uso de modernas estratégias de combinações de 3 medicamentos efetivos (Landgren & Rajkumar, 2016).

As abordagens terapêuticas variam conforme o quadro clínico do paciente e a tolerância ao tratamento. Terapias de indução em pacientes elegíveis ao TACTH seguem uma abordagem de 3 ou 4 ciclos de tratamento seguido por transplante e manutenção com lenalidomida ou bortezomibe em pacientes com médio ou alto risco, respectivamente. Administração de bortezomibe por via subcutânea ou baixas doses de dexametasona uma vez na semana são preferíveis para uma terapia inicial, porém, para o controle rápido da doença não são as abordagens mais adequadas. Em pacientes não elegíveis ao TACTH as escolhas terapêuticas utilizadas são semelhantes, porém, há um acréscimo no número de ciclos de tratamento que aumentam para 8 a 12 ciclos. Em casos de recidiva do MM deve-se considerar um novo TACTH, caso o paciente seja elegível, ou a retomada da terapia de indução caso a recidiva da doença tenha ocorrido após 6 meses da interrupção do tratamento. Em casos de recidivas frequentes são iniciadas combinações com novos medicamentos e a interrupção

do tratamento é razoável a partir do momento em que se atinge um platô estável, para que assim também se reduzam as chances de toxicidade (Rajkumar, 2018).

Alcançar uma resposta completa (Tabela 5) após o TACTH é um passo crucial para uma resposta e sobrevida mais longas, e isso depende da eficácia da terapia de indução. O uso de talidomida, bortezomibe e lenalidomida em terapias combinadas apresenta um importante avanço no tratamento do MM, resultando em um aumento de resposta completa no pré-transplante e pós-transplante. (Mateos *et al.*, 2015).

Tabela 5. Critérios para avaliação da resposta ao tratamento.

Resposta	Critérios
Resposta completa <i>stringent</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Relação de proteínas de cadeias leves normal; - Ausência de plasmócitos clonais por imunohistoquímica ou citometria de fluxo.
Resposta completa	<ul style="list-style-type: none"> - Imunofixação sérica e urinária negativas; - Ausência de tecido plasmocitário; - <5% de plasmócitos clonais na medula óssea.
Resposta parcial muito boa	<ul style="list-style-type: none"> - Detecção de proteína-M sérica ou urinária por imunofixação com eletroforese negativa ou redução de 90% ou mais na proteína-M sérica; - Nível de proteína-M urinária <100mg em 24 horas.
Resposta parcial	<ul style="list-style-type: none"> - Redução da proteína-M sérica maior que 50%; - Redução da proteína urinária maior que 90% ou <200mg em 24 horas; - Tecido plasmocitário ≥50%.

Fonte: (adaptado de Durie *et al.*, 2006).

1.6.1 Talidomida

A talidomida (Figura 6) foi sintetizada em 1954 pelo laboratório Chemie Grünenthal na Alemanha ocidental. Em 1957 a talidomida começou a ser comercializada como um medicamento sedativo seguro e não tóxico. Em 1960 começaram a surgir crescentes sugestões a respeito do uso da talidomida como a causa de uma epidemia de defeitos graves ao nascimento, especialmente a focomelia (Lenz & Knapp, 1962). Atualmente se sabe que a talidomida tem múltiplas ações no organismo, possuindo ações antiangiogênicas, antiinflamatórias, e imunomodulatórias, sendo utilizada para tratar diversas condições clínicas, incluindo o Eritema Nodoso Hansênico e o MM (Vargesson, 2015).

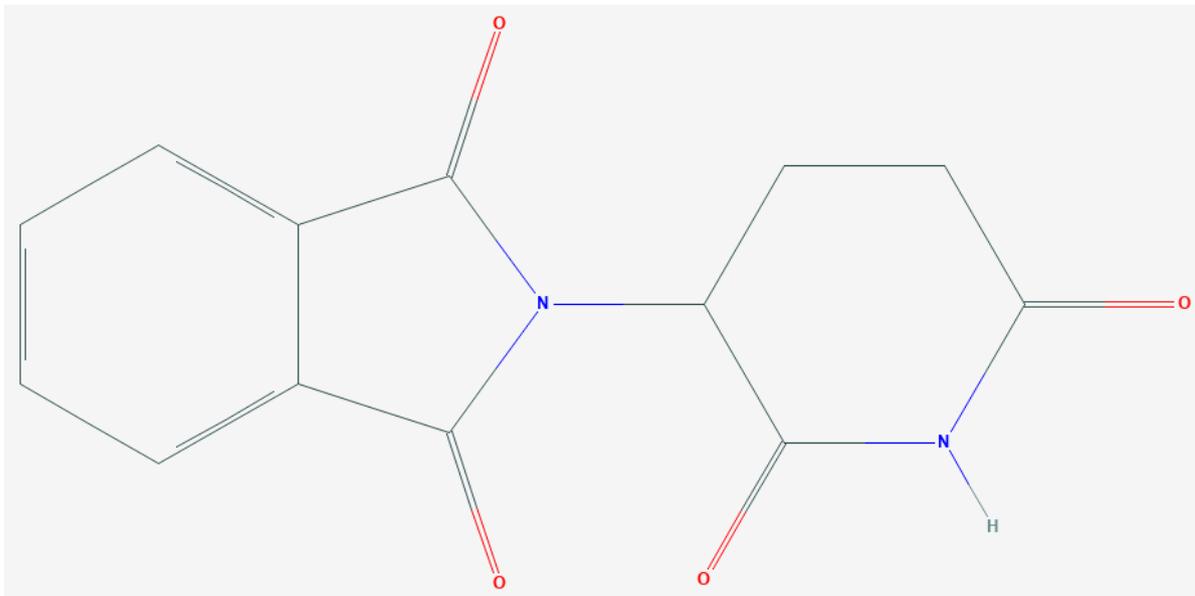


Figura 6. Estrutura química da molécula da talidomida (Disponível em: <https://www.pharmgkb.org/>).

No MM, a talidomida começou a ser utilizada com base no seu potencial efeito antiangiogênico e imunomodulador. A talidomida regula a expressão de moléculas de adesão, inibe a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), estimula a proliferação de células T citotóxicas, favorece o bloqueio do ciclo celular na fase G1 e induz apoptose. A importância da inibição de TNF- α é que a citocina pró-inflamatória auxilia no desenvolvimento neoplásico através da modulação das interações de adesão celular das células de mieloma com o

microambiente tumoral (Lazaro *et al.*, 2018). A talidomida se liga à proteína CRBN que faz parte do complexo ubiquitina E3 ligase que catalisa a fixação de cadeias de ubiquitina para proteínas e as proteínas sinalizadas são degradadas pelo proteassoma, um processo de homeostase celular normal. Ao se ligar ao CRBN, a talidomida induz um efeito inibidor na ubiquitinação de CRBN, sugerindo que esse processo possa contribuir para os seus efeitos terapêuticos. O efeito do CRBN de degradação mediada por proteassoma é bloqueado pela talidomida, resultando em acúmulo de CRBN nas células, e esse aumento dos níveis celulares de CRBN leva também ao aumento da atividade do complexo ubiquitina E3 ligase, facilitando a degradação de seus alvos e aumentando a sensibilidade ao tratamento (Knobloch *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2015).

A fim de buscar alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras, ao longo do tempo foram sintetizados análogos da talidomida, como a lenalidomida (Figura 7A) e a pomalidomida (Figura 7B) que se mostraram mais eficazes na estimulação de linfócitos T citotóxicos, células *natural killer* (NK) e na diminuição da adesão das células plasmáticas ao estroma, com consequente redução na produção de citocinas e indução de apoptose (Mitsiades *et al.*, 2002).

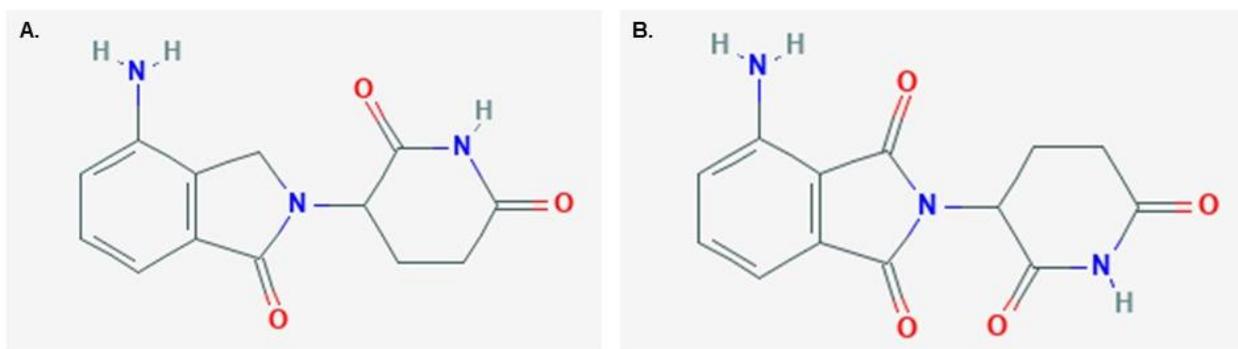


Figura 7. Estruturas químicas dos análogos da talidomida. (A) Estrutura química da lenalidomida. (B) Estrutura química da pomalidomida (Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A talidomida tem como segundo efeito adverso mais importante o desenvolvimento de neuropatia periférica (NP), sendo o primeiro evento adverso mais grave após a teratogênese. A NP induzida por talidomida ocorre em até 70% dos pacientes após exposição prolongada, considerando cerca de 12 meses de uso (Mohty *et al.*, 2010). As taxas de incidência variam de 25 a 80%,

sendo que em aproximadamente 15% desses pacientes essa condição leva à descontinuação do tratamento (Mileshkin *et al.*, 2006).

1.6.2 Bortezomibe

O bortezomibe (Figura 8) faz parte de um grupo de medicamentos chamados inibidores de proteassomas (IP), foi desenvolvido pela companhia farmacêutica americana Millennium/Takeda e Janssen. Apesar de ter sido desenvolvido inicialmente como um agente antiinflamatório, verificou-se que possuía atividade antitumoral na década de 90. Em 2003, após cerca de 7 anos da síntese inicial, o bortezomibe foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de pacientes com MM que apresentaram recaída após dois esquemas terapêuticos anteriores. Em 2014, o bortezomibe foi aprovado para tratamento de pacientes com MM que responderam à terapia anterior com o mesmo medicamento, mas que apresentaram recaída da doença pelo menos 6 meses após o último protocolo de tratamento (Robak, 2019).

O bortezomibe possui alto grau de seletividade para o proteassoma, e não inibe outras proteases, realizando sua atividade antiproliferativa e antitumoral ao inibir a degradação proteassomal de várias proteínas reguladoras ubiquitinadas. Essa inibição ocorre pela ligação do bortezomibe no seu sítio catalítico do proteassoma 26S, o que resulta em níveis intracelulares aumentados de p27 e p53, que são proteínas responsáveis pela inibição da proliferação celular e manutenção da estabilidade genômica, respectivamente (Hideshima *et al.*, 2001). O tratamento com bortezomibe tem sido associado com despolarização da mitocôndria e apoptose. O bortezomibe pode ser administrado por via intravenosa ou principalmente por via subcutânea (Moreau *et al.*, 2011).

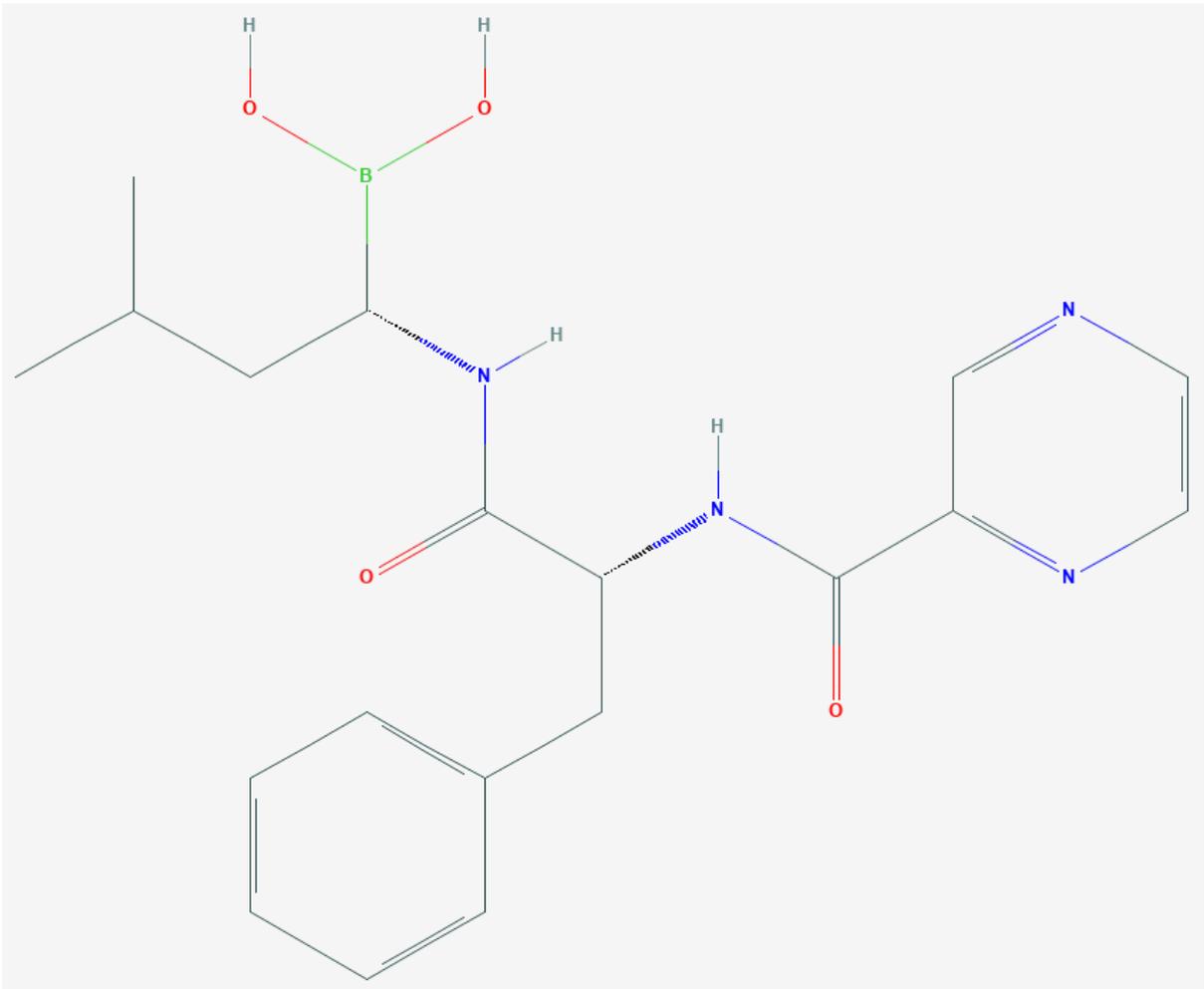


Figura 8. Estrutura química da molécula do bortezomibe (Disponível em: <https://www.pharmgkb.org/>).

O tratamento com bortezomibe em pacientes com MM pode causar NP, a incidência é estimada em até 40% dos pacientes. A NP induzida por bortezomibe é predominantemente sensorial e reversível na maioria dos pacientes, e está relacionada à dose utilizada e ao modo de administração do medicamento. A administração subcutânea do bortezomibe leva a uma diminuição da ocorrência de NP quando comparado à administração intravenosa, sendo que a ocorrência de NP por via intravenosa ocorre em 53% das vezes, enquanto a administração por via subcutânea ocorre em 38% das vezes (Luczkowska *et al.*, 2018).

1.7 Eventos adversos no MM

O MM é uma condição que está associada a diversas comorbidades provenientes tanto da própria doença quanto dos tratamentos utilizados. A maioria dos pacientes recebem diversos medicamentos, seja para controle sintomatológico, resultante do agravamento do quadro clínico, ou por condições específicas da própria doença, fazendo uso de esquemas de tratamento que muitas vezes consistem em combinações terapêuticas. Por conta do uso de múltiplos medicamentos para fins distintos, considera-se difícil atribuir claramente um efeito adverso específico a um medicamento de forma individual (Ludwig *et al.*, 2017).

Para IMIDs, como talidomida e seus análogos (lenalidomida e pomalidomida), o principal evento adverso relacionado é a teratogênese, portanto, medidas de orientação e contracepção são fundamentais. A gravidade e a incidência dos demais eventos adversos associados aos IMIDs são dependentes da dose e do tempo de uso desses fármacos. Eventos adversos mais comumente associados ao uso de IMIDs são: sonolência, constipação, erupção cutânea, eventos cardíacos, tromboembolismo venoso e NP. Em protocolos de tratamento utilizando combinações de IMIDs com outros medicamentos, como melfalan e prednisona, os seguintes eventos adversos podem ocorrer: eventos hematológicos, infecções, trombose venosa profunda, toxicidade dermatológica ou outras toxicidades neurológicas. Além desses, outros eventos adversos podem ocorrer, como: tromboembolismo arterial, tontura, hipotensão ortostática, neutropenia, trombocitopenia, aumento de carga viral em paciente com HIV, bradicardia e convulsões (Kappor *et al.*, 2011; FDA, 2019).

Para os fármacos inibidores de proteassoma (IP) como bortezomibe, carfilzomibe e ixazomibe, os eventos adversos associados são: neutropenia, trombocitopenia, anemia, NP, herpes zoster, náusea, diarreia, constipação, êmese, fadiga, pirexia, dor de cabeça, parestesia, diminuição do apetite, dispneia, erupção cutânea, mialgia e toxicidade renal, pulmonar, cardíaca e gastrointestinal. Alterações de doses para esses medicamentos são

recomendadas em resposta a trombocitopenia, neutropenia, erupção cutânea, NP e outras alterações hematológicas (FDA, 2019).

A NP é uma das complicações mais importantes no tratamento do MM, afetando a qualidade de vida e a realização de atividades diárias normais dos pacientes. A NP pode ser causada pelo próprio MM, mas principalmente em decorrência do uso de certos medicamentos, como bortezomibe e talidomida. O risco de NP é aumentado quando talidomida é usada em combinação com bortezomibe. Estima-se que a ocorrência de NP é de 60% quando o tratamento é combinado em comparação com 13% quando utiliza-se no tratamento a talidomida individualmente (Li *et al.*, 2020).

1.7.1 Neuropatia Periférica

A NP é definida como um dano ou degeneração dos nervos periféricos sensoriais e motores. A manifestação mais comum da neuropatia periférica é a neuropatia sensorial apresentando sintomas como dormência, formigamento nas mãos e pés, mudanças na sensibilidade ao toque e calor, e dor neuropática, na qual os pacientes podem sentir como uma dor ardente. Outra manifestação da NP é a arreflexia (ausência de reflexos) e redução da propriocepção causando falta de coordenação. Menos frequentemente ocorrem prejuízos no sistema nervoso motor causando atrofia, fasciculação ou fraqueza nos músculos distais. Neuropatia autônoma pode resultar na aparição de sintomas como alteração de sudorese, hipotensão ortostática, bradicardia, constipação, retenção urinária ou impotência (Silberman & Lonial, 2008).

A NP que é induzida por quimioterapia é uma condição adversa comum decorrente do tratamento com diversos agentes quimioterápicos incluindo componentes de platina, taxanos, alcaloides da vinca, talidomida e inibidores de proteassoma, como o bortezomibe. A incidência relatada para a NP encontra-se em uma faixa variável de 30% a 68% de pacientes que realizam o tratamento com vários agentes antineoplásicos. A conduta clínica com a NP induzida por quimioterapia não se restringe somente ao manejo do tratamento (redução de

dose, atraso ou cessação da terapia), mas também influencia significativamente na qualidade de vida dos pacientes após o tratamento (Seretny *et al.*, 2014).

No contexto do MM, a NP é uma complicação que pode ocorrer devido à própria doença ou por advento das terapias, incluindo esquemas baseados em talidomida e bortezomibe. Até 20% dos pacientes com MM têm NP no momento do diagnóstico e até 75% podem apresentar NP em decorrência do tratamento (Richardson *et al.*, 2012). A incidência de NP induzida por bortezomibe é estimada em 40% dos pacientes, sendo predominantemente sensorial e reversível em muitos casos. A NP induzida pelo bortezomibe está relacionada com a dose, esquema terapêutico e modo de administração (Terpos *et al.*, 2015).

Fatores de risco para a NP induzida por talidomida em pacientes com MM incluem idade avançada, neuropatia pré-existente e utilização de outros quimioterápicos. Os pacientes apresentam desordens sensoriais simétricas e bilaterais, raramente desordens motoras ou disautonomias (Morawska *et al.*, 2015). As manifestações clínicas incluem tremores, sensações de picadas ou dormência (parestesia distal ou hiperestesia) que inicialmente afetam os dedos do pé e ocasionalmente os dedos das mãos, podendo se estender para as regiões proximais. Nos estágios tardios a sensibilidade vibratória profunda e a propriocepção podem ser afetadas levando à ataxia progressiva, e em casos mais graves, a talidomida também pode causar comprometimento motor (Mileshkin *et al.*, 2006).

A avaliação de NP é baseada em diferentes abordagens, utilizando-se de exames clínicos e classificação em escalas de neurotoxicidade a partir de sintomas. Os sistemas de classificação mais amplamente utilizados para avaliar a neurotoxicidade são os Critérios Comuns de Toxicidade do Instituto Nacional do Câncer (NCI-CTC) e critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Argyriou *et al.*, 2008). Porém é importante observar que até o momento não foi desenvolvida nenhuma ferramenta para avaliação especificamente de pacientes com MM e que levem em consideração uma avaliação mais sensível e focada nos sintomas de NP (Seval & Beksac, 2018). Dentre os vários fatores que influenciam a ocorrência de eventos adversos do tratamento, a genética do indivíduo também é um fator que tem importância nesse desfecho.

1.8 Influência genética na resposta ao tratamento

A resposta individual aos medicamentos varia entre os indivíduos e pode ser influenciada por fatores genéticos. A variabilidade da resposta tem influência no efeito terapêutico e ocorrência de reações adversas, sendo que enzimas metabolizadoras ou transportadoras favorecem variações na resposta ao tratamento. Variantes genéticas em enzimas implicadas no metabolismo de medicamentos representam uma fonte de variação individual na resposta. Entre as enzimas que metabolizam os fármacos, enzimas do citocromo P450, como a CYP2C19, desempenham um papel particularmente importante na resposta à talidomida, devido ao seu efeito terapêutico depender da ativação metabólica pelas enzimas CYP. Estudos com os polimorfismos *CYP2C19*2*, **3* e **4* sugerem que metabolizadores lentos têm pior desfecho clínico pois têm menor capacidade de formar os metabólitos ativos (Ando *et al.* 2002; Vangsted *et al.* 2010).

Fatores de risco genéticos relacionados a eventos adversos do tratamento, como NP, podem fornecer informações sobre possíveis mecanismos do desenvolvimento de disfunções do sistema nervoso periférico. Vários estudos comparam potenciais fatores de risco entre diferentes agentes neurotóxicos e pacientes com MM. A NP induzida por bortezomibe foi associada a variantes em genes de reparo do DNA, genes inflamatórios e de apoptose. A NP induzida por talidomida foi associada a variantes transportadoras de fármacos, de inflamação do sistema nervoso e de reparo de proteínas (Johnson *et al.*, 2011).

1.8.1 Genes e variantes alvo para farmacogenética do MM

Alguns genes já foram relatados na literatura por apresentarem relação com a ocorrência de NP como resultado do tratamento com bortezomibe e talidomida. Existem variantes polimórficas que podem afetar a resposta ao tratamento ou à toxicidade do mesmo (Johnson *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2020). A susceptibilidade à NP induzida por talidomida e bortezomibe tem sido associada a polimorfismos em genes que controlam mecanismos de reparo e inflamação do sistema nervoso periférico (Ludwig *et al.*, 2018). Os genes de estudo foram selecionados a partir de uma revisão da literatura e de bancos de dados para

busca de genes relacionados com talidomida e/ou bortezomibe e ocorrência de NP.

1.8.1.1 *ABCA1*

O gene *ABCA1* está localizado no cromossomo 9 e faz parte de uma superfamília de proteínas, família ABC, que se ligam à molécula de trifosfato de adenosina (ATP). São proteínas transmembrana ubíquas altamente conservadas e abundantes em espécies eucarióticas e procarióticas, e estão implicadas em diversos aspectos da homeostase lipídica e função celular. Especificamente, *ABCA1* é uma proteína de membrana plasmática bem conhecida pelo seu papel na regulação do efluxo de colesterol celular, formação de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e transporte de fosfolipídios, vitaminas e outras moléculas lipofílicas. Outras funções de *ABCA1* incluem efeitos anti-inflamatórios e antiapoptóticos (Bi *et al.*, 2015; Chengmao *et al.*, 2017).

O gene *ABCA1* é altamente expresso em células hepáticas, macrófagos, células intestinais e endoteliais, glândula adrenal e trofoblasto placentário. A expressão anormal da proteína na placenta está associada a doenças como Tangier, deficiência familiar de HDL e síndrome Smith-Lemli-Opitz, todas relacionadas com problemas no metabolismo e biossíntese de colesterol (Chengmao *et al.*, 2017). *ABCA1* de macrófagos possui atividade anti-inflamatória, sendo que a interação de apoA-1 com o *ABCA1* estimula cascatas de sinalização envolvidas no processo de efluxo anti-inflamatório e lipídico mediados por *ABCA1*. O papel de *ABCA1* referente às características metabólicas indicam uma associação com peso corporal, diminuição da secreção e sensibilidade à insulina, porém indicam também um aumento nos níveis de glicemia (Babashamsi *et al.*, 2019). A capacidade dos transportadores da família ABC ao promover o efluxo de colesterol celular livre e melhorar o transporte reverso do colesterol dos macrófagos na periferia do fígado está relacionado também a características cardioprotetoras (Phillips, 2018).

A variante rs363717 é uma das variantes no gene *ABCA1* que é relatada na literatura por estar associada com níveis plasmáticos de HDL diminuídos,

graus severos de anemia e trombocitopenia, e indução de neurotoxicidade periférica induzida por quimioterapia. Essas variantes localizadas em genes que desempenha um papel fundamental no transporte e metabolismo hepático, como é o caso dos genes da família ABC, tem importância na mediação de efeitos colaterais e eficácia de quimioterápicos (Lambrechts *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2015). A variante rs363717 também foi associada com NP induzida por talidomida (Johnson *et al.*, 2011).

1.8.1.2 CYP2C19

O sistema enzimático citocromo P450 (CYP) tem papel importante na biotransformação de muitas substâncias endógenas e exógenas, incluindo medicamentos, aditivos alimentares e poluentes. As enzimas CYP são responsáveis pela fase I do metabolismo de vários substratos. Dentro da subfamília CYP2C, o gene *CYP2C19*, localizado no cromossomo 10, é altamente polimórfico e codifica uma proteína que está envolvida no metabolismo de fármacos antidepressivos e inibidores de bomba de prótons. A enzima CYP2C19 é responsável por metabolizar cerca de 10% de todos os medicamentos. A atividade dessa enzima apresenta heterogeneidade étnica e expressa diferença entre os indivíduos (Fricke-Galindo *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017).

Variantes genéticas no gene *CYP2C19* apresentam um papel importante na variabilidade interindividual na resposta a medicamentos, interações medicamentosas e susceptibilidade a doenças induzidas por produtos químicos (Zhou *et al.*, 2017). A variante *CYP2C19*2* foi associada a uma resposta diferencial ao regime terapêutico com ciclofosfamida e doxorrubicina, que são medicamentos muito utilizados no tratamento de câncer, sendo a ciclofosfamida um pró-fármaco que precisa ser oxidado para exercer seu efeito citotóxico, e essa etapa é catalisada por enzimas do citocromo P450, como a CYP2C19 (Jabir & Hoidy, 2018). Em outros estudos a variante também foi associada com valores baixos de pressão sanguínea sistólica e diastólica (Stathopoulou *et al.*, 2013). A variante *CYP2C19*2* foi associada também com efeitos adversos da utilização do medicamento iguratimod, um anti-inflamatório utilizado no tratamento de

artrite reumatoide, sendo que a variante pode ajudar a prever a eficácia terapêutica e a toxicidade do mesmo (Xiao *et al.*, 2017). O efeito terapêutico da talidomida depende da ativação metabólica pelas enzimas CYP, a enzima CYP2C19 desempenha um papel significativo na ativação da talidomida (Feng *et al.*, 2020). Estudos com variantes sugerem que metabolizadores lentos têm pior desfecho clínico devido à capacidade menor de formar metabólitos ativos (Vangsted *et al.* 2010).

1.8.1.3 *PKNOX1*

PKNOX1, também conhecido como *PREP1* (proteína reguladora de Pbx), pertence à superclasse de proteínas TALE (extensão de loop de três aminoácidos) e está localizado no cromossomo 21. Foi identificado como um dos componentes do fator 3 de transcritores da uroquinase do fator de transcrição humano complexo (UEF-3). *PKNOX1* é uma proteína que forma heterodímero estável com PBX, que é outra subunidade de UEF-3. O complexo *PKNOX1-PBX1* se liga ao DNA cooperativamente com outros fatores de transcrição, incluindo proteínas da família HOX, e o *PKNOX1* é capaz de atuar como um co-ativador na transcrição de promotores ativados por PBX-HOX. Portanto, o *PKNOX1* pode ser um parceiro intracelular estável das proteínas PBX para regular positivamente e negativamente a transcrição de genes específicos (Imoto *et al.*, 2001). A heterodimerização de *PREP1* com *PBX1* forma o fator de transcrição UEF-3 (fator potenciador da uroquinase-3) que controla a expressão da interleucina 3 (IL-3), estromelisina e ativador do plasminogênio da uroquinase (uPA), uma protease envolvida na fibrinólise inata e imunidade adaptativa. Além disso, a co-expressão de *PBX1-PREP1* inibe o promotor de glucagon em células não produtoras de glucagon e regula várias expressões de HOX, enquanto em colaboração com os fatores de transcrição Smad2 e 3, o complexo *PBX1-PREP1* induz a transcrição de actina mediada pela subunidade beta do hormônio folículo estimulante (FSH β) (Oriente *et al.*, 2018). *PKNOX1* assim como *PBX1*, também são essenciais durante o desenvolvimento embrionário, organogênese e diferenciação (Sicouri *et al.*, 2018).

A variante rs2839629 no gene *PKNOX1* foi relatada por afetar a expressão tanto do gene *PKNOX1* quanto do gene *CBS* no tecido nervoso. O alelo de risco A na variante está associado com altos níveis de expressão de *PKNOX1*, sendo que esses genes codificam proteínas que estão envolvidas na dor neuropática e inflamatória (Magrangeas *et al.*, 2016).

1.8.1.4 *SERPINB2*

O gene *SERPINB2* (*SPB2*) também conhecido como inibidor do ativador do plasminogênio 2 (PAI-2), é um gene localizado no cromossomo 18, cuja função é associada à inibição de serina ou cisteína proteases. Foi identificado através da placenta e descrito como um inibidor do ativador extracelular de plasminogênio da uroquinase (uPA) e ativador do plasminogênio tecidual (tPA), e foi descrito como um Serpin intracelular envolvido na transdução de sinal, inibição de apoptose, sobrevivência de macrófagos, diferenciação de monócitos e queratinócitos, cito-progressão ou modulação imune, indicando que a proteína está envolvida em processos de diferenciação celular (Croucher *et al.*, 2008; Majoros *et al.*, 2019).

SERPINB2 é uma das proteínas mais reguladas por irradiação UV, sendo que o nível da proteína aumenta com a radiação UV e é transportada do citoplasma para o núcleo pouco tempo após a indução do dano, sugerindo também que a proteína de *SERPINB2* poderia funcionar como proteína de reparo em células normais, uma vez que a translocação da mesma para o núcleo é bloqueada em células tumorais, interferindo na função de reparo do DNA (Majoros *et al.*, 2019). A expressão elevada de *SERPINB2* foi relacionada à sobrevida prolongada, diminuição da metástase e crescimento tumoral em diversos tipos de câncer, e foi relacionada também com um prognóstico mais favorável em certos tipos de câncer de mama e pâncreas e com um pior prognóstico em câncer de endométrio, ovário e colorretal (Harris *et al.*, 2017; Schroder *et al.*, 2014). *SERPINB2* também foi considerado um marcador de senescência através de um mecanismo de estabilização dos níveis de proteína p21, sendo que a expressão de *SERPINB2* aparece aumentada em células senescentes, e em um estudo esse gene mostrou ser um alvo direto da p53

induzida em células senescentes através de uma via de resposta a danos no DNA (Hsieh *et al.*, 2017).

O *SERPINB2* foi identificado como um dos genes desregulados sinergicamente que estimulam a proliferação e sobrevivência de células-tronco em leucemia, sugerindo que o gene *SERPINB2* poderia servir como marcador sensível para prever respostas tóxicas, como proliferação celular defeituosa ou diferenciação de produtos químicos, além disso, o gene *SERPINB2* foi associado com a capacidade de regular o potencial de proliferação e diferenciação de células-tronco humanas, sugerindo um papel como possível marcador de toxicidade (Lee *et al.*, 2018).

A variante rs6103 no gene *SERPINB2* foi associada com a ocorrência de aborto espontâneo recorrente, e combinado a outras variantes desse mesmo gene foi relatado o aumento de risco dessa mesma condição. Essas variantes já haviam sido associadas com nascimento prematuro, demonstrando que estariam implicadas com desfechos adversos da gravidez (Andraweera *et al.*, 2014). Variantes polimórficas no gene *SERPINB2* foram relatadas por reduzir o risco de dano neuronal e favorecer a resolução de NP induzida por talidomida, dando suporte à hipótese de que a susceptibilidade genética pode ter uma contribuição significativa na história natural da NP induzida por talidomida (Johnson *et al.*, 2011; Bramuzzo *et al.*, 2017).

Capítulo II
Justificativa

2. Justificativa

Os esquemas terapêuticos para o Mieloma Múltiplo contemplam a elegibilidade ao transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas (TACTH) além do uso de combinações de tratamentos. Os pacientes de alto risco (definidos de acordo com as alterações citogenéticas presentes) apresentam menor sobrevida livre de progressão após indução e são mais propensos a apresentarem relapso da doença mais precocemente. No entanto, a caracterização citogenética e molecular é desafiadora devido ao alto custo e dificilmente é realizada em pacientes com Mieloma Múltiplo atendidos no sistema único de saúde (SUS).

As alterações moleculares são marcadores de prognóstico importantes, no entanto, não são utilizados para definição de tratamento na prática clínica de países em desenvolvimento, sendo que a escolha de tratamento é definida independente do conhecimento das alterações citogenéticas presentes. Dentre os múltiplos esquemas da prática terapêutica, a talidomida é extensivamente utilizada em diferentes momentos da terapia. No entanto, um evento adverso importante do tratamento é a neuropatia periférica, uma complicação que geralmente ocorre após longa exposição à talidomida e/ou bortezomibe, sendo um fator que pode desencadear a interrupção do tratamento.

Diante desse cenário, o estudo de variantes genéticas que possam estar envolvidas no desenvolvimento da neuropatia periférica após o tratamento com talidomida e/ou bortezomibe pode auxiliar na busca por biomarcadores que poderão ajudar a entender, e talvez prever o prognóstico e resposta ao tratamento com esses fármacos no âmbito do SUS, sendo uma alternativa de menor custo se comparado à pesquisa de alterações citogenéticas.

Capítulo III
Objetivos

3. Objetivos

3.1 Objetivo principal

Avaliar a existência de associação entre variantes genéticas nos genes *SERPINB2*, *ABCA1*, *PKNOX1* e *CYP2C19* e neuropatia periférica no tratamento com talidomida e/ou bortezomibe em pacientes com Mieloma Múltiplo.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar uma análise descritiva da amostra a partir dos dados clínicos de pacientes com Mieloma Múltiplo;
- Estabelecer a frequência alélica e genotípica das variantes genéticas de *SERPINB2*, *ABCA1*, *PKNOX1* e *CYP2C19* em pacientes com Mieloma Múltiplo;
- Associar as variantes genéticas nos genes *SERPINB2*, *ABCA1*, *PKNOX1* e *CYP2C19* com a ocorrência de neuropatia periférica em pacientes com Mieloma Múltiplo que fazem ou fizeram uso de talidomida e/ou bortezomibe;
- Utilizar ferramentas de bioinformática para buscar genes relacionados com neuropatia periférica e tratamento com talidomida e bortezomibe a partir de análises de expressão diferencial e coexpressão provenientes de dados secundários de estudos experimentais depositados em bancos de dados públicos.

Capítulo IV
Artigo

Association of Genetic Variants in *SERPINB2*, *ABCA1*, *PKNOX1*, and *CYP2C19* Genes with Peripheral Neuropathy in Multiple Myeloma Patients Treated with Thalidomide and Bortezomib: a Brazilian Cohort study

Artigo em preparação

Revista *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*

Capítulo V
Outros Resultados

4. Outros Resultados

Uma vez que não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre os genes de escolha e a ocorrência de neuropatia periférica (NP) realizamos uma nova abordagem por meio de análises *in silico* e biologia de sistemas a fim de identificar novos genes alvo associados com NP induzida pelo tratamento com talidomida e bortezomibe. Os resultados preliminares estão descritos a seguir.

Foi realizada uma pesquisa nos bancos de dados *Human Phenotype Ontology* (HPO) para identificar genes relacionados com NP e uma pesquisa no banco de dados *Comparative Toxicogenomics Database* (CTD) para genes relacionados com talidomida e bortezomibe. A Figura 9 mostra o diagrama de Venn para os resultados da busca. Os 8 genes pertencentes ao conjunto dos genes relacionados com NP, talidomida e bortezomibe foram: *HSPB1*, *FAS*, *STAT3*, *CCND1*, *MYD88*, *IL10*, *RELA* e *TP53*. O gene *ABCA1* encontra-se no conjunto de 18 genes relacionados com NP e talidomida; *CYP2C19* encontra-se no conjunto de 84 genes relacionados com NP e talidomida; *CYP2C19* encontra-se no conjunto de 84 genes relacionados com talidomida e bortezomibe; *SERPINB2* encontra-se no conjunto de 525 genes relacionados com talidomida e o *PKNOX1* não apareceu nessa busca.

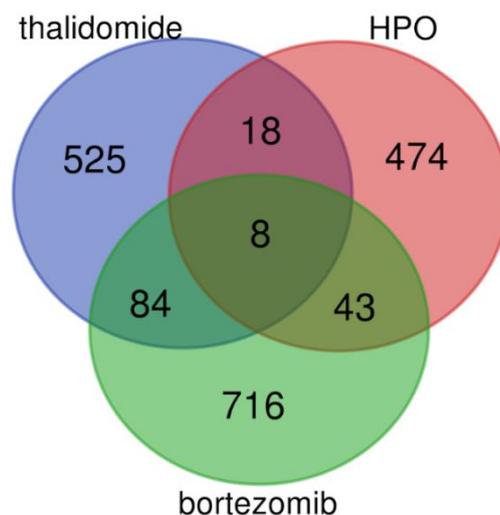
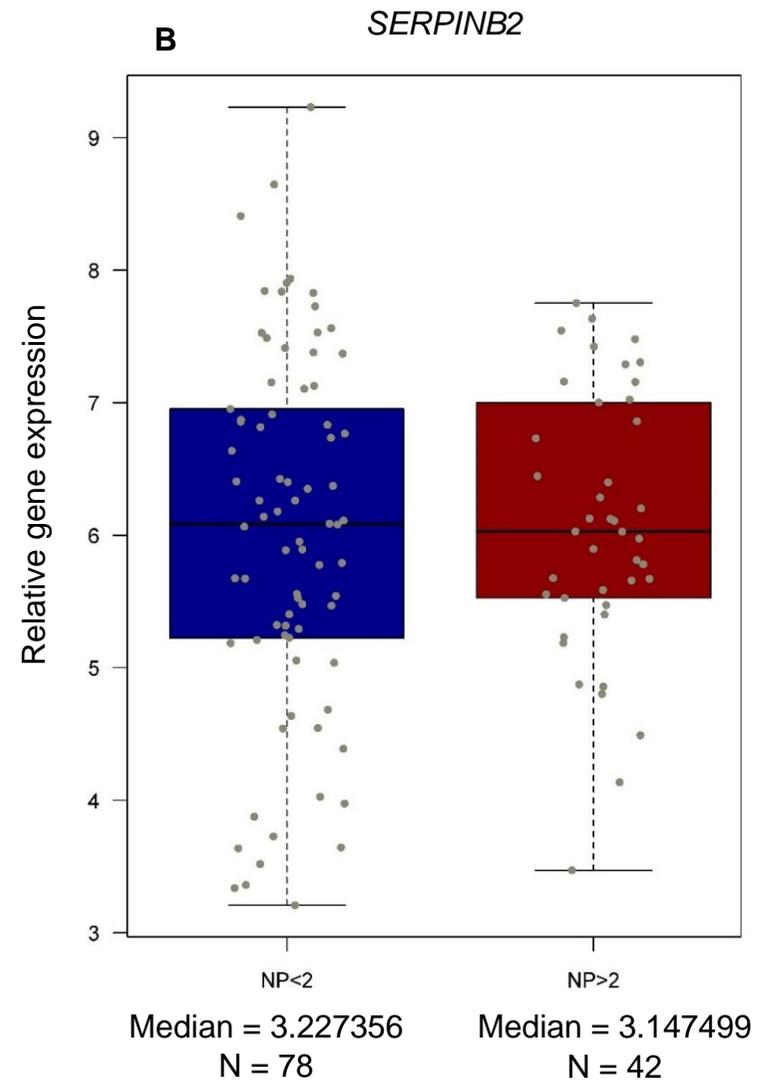
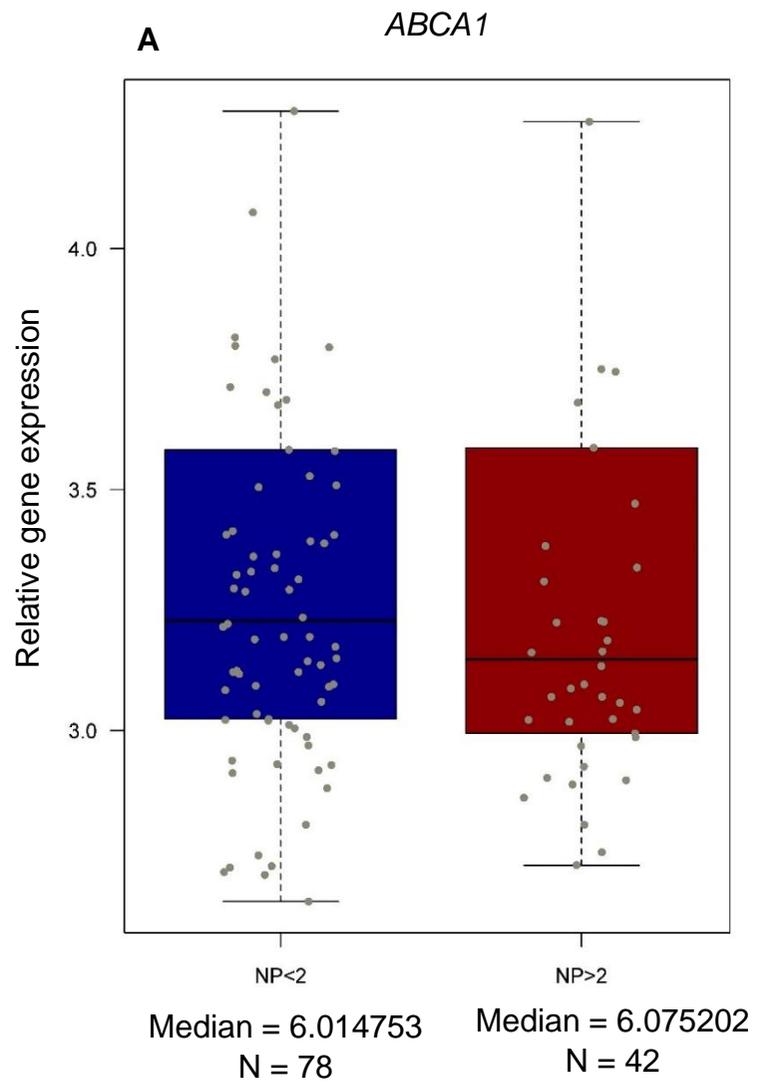


Figura 9. Diagrama de Venn para resultados da busca de genes nas plataformas HPO para neuropatia periférica e CTD para talidomida e bortezomibe.

A seguir foram realizadas análises de expressão gênica diferencial e coexpressão utilizando dados de estudos depositados em repositórios públicos. Um estudo depositado no banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO) intitulado “Expression data from BM-CD138+, obtained from newly diagnosed Multiple Myeloma patients” sob o número GSE58133 foi utilizado para análise e os dados de todas as amostras analisadas foram normalizados no software RStudio Desktop v.1.0.1. em linguagem R. O estudo utilizou amostras de células plasmáticas CD138+ de pacientes randomizados de acordo com o tratamento de indução: 236 pacientes que receberam esquema VTD (bortezomibe, talidomida e dexametasona) e 238 pacientes que receberam esquema TD (talidomida e dexametasona), sendo que esses pacientes também foram estratificados de acordo com o surgimento ou não de NP de grau ≥ 2 .

A análise de expressão diferencial foi conduzida para os 8 genes pertencentes ao conjunto relacionado com talidomida, bortezomibe e NP (*HSPB1*, *FAS*, *STAT3*, *CCND1*, *MYD88*, *IL10*, *RELA* e *TP53*) e dos genes do presente estudo (*ABCA1*, *CYP2C19*, *PKNOX1* e *SERPINB2*). Nenhum gene apresentou expressão diferencial estatisticamente significativa, mas a relação de *CYP2C19* e NP é interessante pois essa enzima metaboliza tanto talidomida quanto bortezomibe, que são dois medicamentos associados com indução de NP (Zhou *et al.*, 2015). As análises de expressão diferencial para os genes *ABCA1*, *SERPINB2*, *PKNOX1* e *CYP2C19* estão apresentadas na figura 10 A-D.



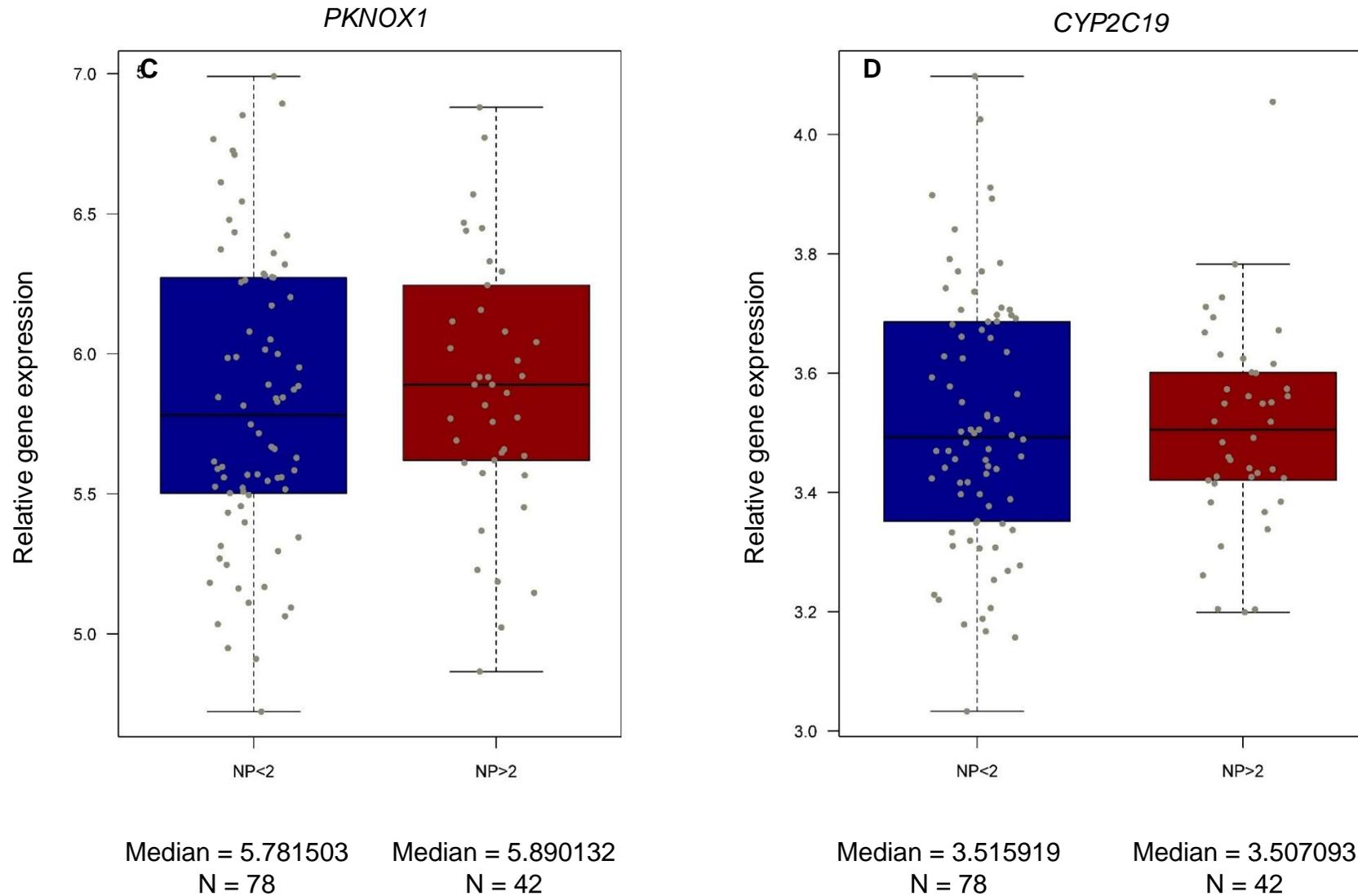


Figura 10. Análises de expressão diferencial. A. *ABCA1* ($p=0,7829$). B. *SERPINB2* ($p=0,4045$). C. *PKNOX1* ($p=0,2895$). D. *CYP2C19* ($p=0,8037$). Os boxes azuis representam a ausência de NP ($n=78$), enquanto os boxes vermelhos a presença de NP ($n=42$).

Considerando que pequenas diferenças na expressão gênica não são percebidas por uma análise de expressão diferencial, o objetivo de fazer uma análise de coexpressão foi avaliar pequenos efeitos na expressão em pares de genes. A análise preliminar de coexpressão identificou 33 pares de genes que se alteram, o par de genes que resultou em um dado interessante foi a coexpressão entre os genes *MAP2K4* e *ASPN* que parecem estar correlacionados na presença de NP. A figura 11A mostra a coexpressão de *MAP2K4* e *ASPN* na ausência de NP, e a figura 11B mostra a coexpressão de *MAP2K4* e *ASPN* na presença de NP. Os dados indicam que há uma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na coexpressão do par de genes *MAP2K4* e *ASPN* na presença de NP, sendo que essa diferença não é observada na ausência de NP.

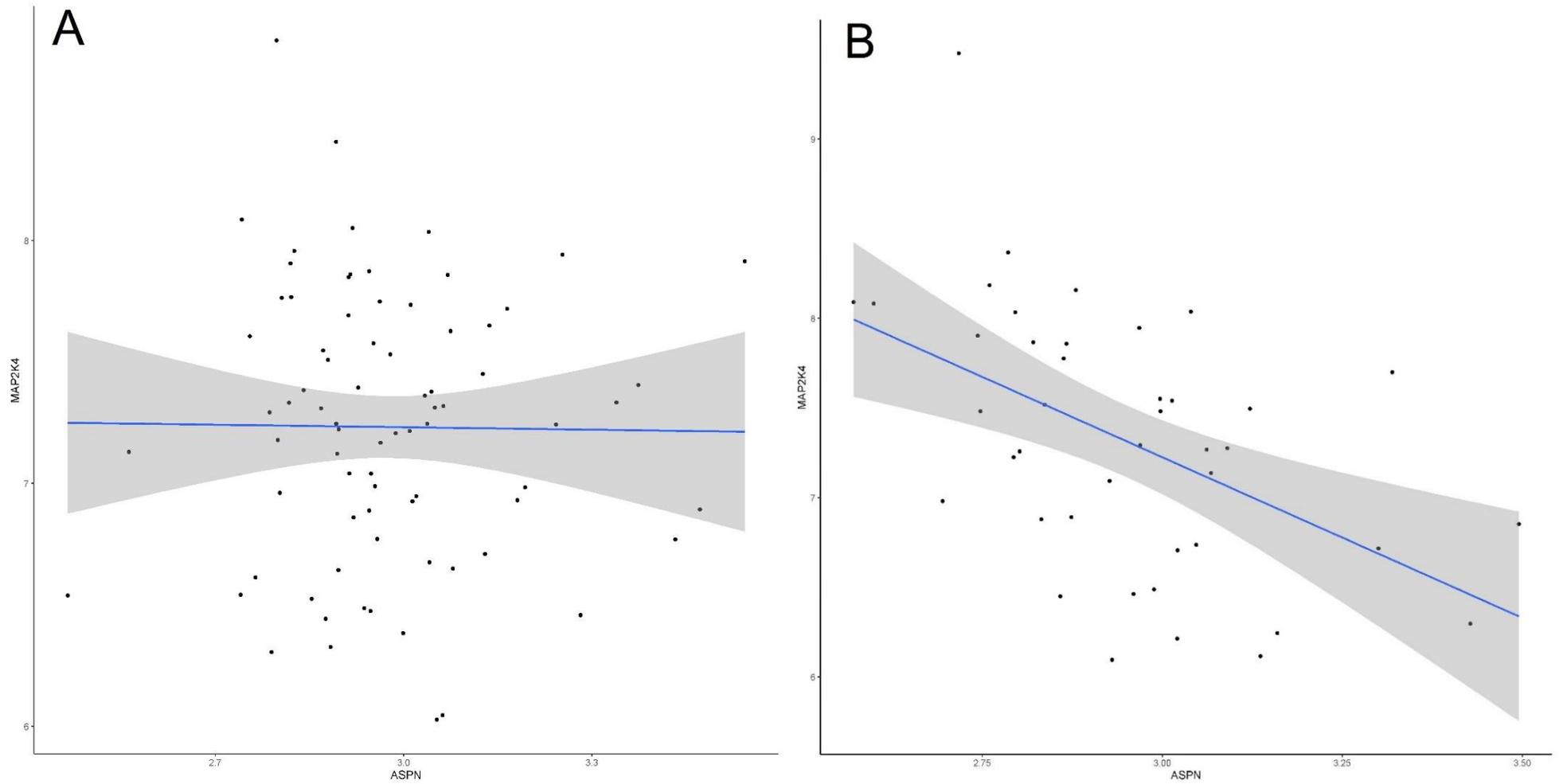


Figura 11. Coexpressão de MAP2K4 e ASPN. A. Coexpressão de *MAP2K4* e *ASPN* na ausência de NP. B. Coexpressão de *MAP2K4* e *ASPN* na presença de NP.

Capítulo VI
Discussão

5. Discussão

A neuropatia periférica (NP) induzida por tratamentos como talidomida e bortezomibe pode ocorrer em até 75% dos pacientes durante o tratamento (Richardson *et al.*, 2012). A NP induzida pelo bortezomibe está relacionada com a dose, esquema terapêutico e modo de administração. A NP induzida por talidomida ocorre em até 70% dos pacientes após exposição prolongada (Terpos *et al.*, 2015; Mohty *et al.*, 2010). A resposta terapêutica varia entre os pacientes e algumas variantes genéticas em genes que codificam enzimas associadas ao metabolismo de medicamentos ou genes associados com eventos adversos ao tratamento podem ser uma fonte de variação dessa resposta.

Variantes nos genes *ABCA1* e *SERPINB2* são relacionadas na literatura com NP induzida por talidomida e resolução de NP induzida por talidomida, respectivamente (Johnson *et al.*, 2011; Bramuzzo *et al.*, 2017). Variantes nos genes *CYP2C19* e *PKNOX1* são relacionadas com ativação metabólica de talidomida e envolvimento em dor neuropática e inflamatória, respectivamente (Feng *et al.*, 2020; Magrangeas *et al.*, 2016). Em nosso estudo as análises de associação das variantes com a ocorrência de NP não apresentaram resultados estatisticamente significativos.

Entretanto, os genótipos homocigoto TT para rs363717 (*ABCA1*) localizado na região 3'UTR, homocigoto GG para rs6103 (*SERPINB2*) relacionado com a troca do aminoácido asparagina para lisina, assim como os genótipos heterocigotos para rs4244285 (*CYP2C19**2) e rs2839629 (*PKNOX1*) foram mais frequentes em nossa amostra de estudo entre aqueles indivíduos que não desenvolveram NP, levantando a hipótese de um possível efeito protetor dessas variantes diante da NP nesses indivíduos. A presença do alelo de risco A para os genes *CYP2C19* e *PKNOX1* em heterocigose não parece conferir risco de desenvolvimento de NP nesses indivíduos. Para que essas associações sejam melhor analisadas outros estudos com amostras maiores são necessários.

As análises de sobrevida mostraram que a média de sobrevida global dos pacientes foi de 13,3 anos, e a sobrevida de pacientes que realizaram o transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas foi maior quando comparada àqueles indivíduos que não realizaram, sendo que a média entre os indivíduos que realizaram o transplante foi de 13,7 anos e os que não realizaram tiveram uma média de sobrevida de 7,3 anos. Alcançar uma resposta completa após o transplante é fundamental para uma resposta e sobrevida mais longas, sendo que essa resposta é dependente da terapia de indução. O uso de talidomida, bortezomibe e lenalidomida (um análogo mais potente da talidomida recentemente aprovado) tem um papel fundamental no avanço do tratamento do MM, resultando em um aumento das taxas de resposta completa tanto no tratamento pré-transplante quanto no pós-transplante (Mateos *et al.*, 2015).

A enzima CYP2C19 está relacionada com a metabolização de talidomida e de outros fármacos que também fazem parte dos protocolos de tratamento para MM, como ciclofosfamida, dexametasona e doxorrubicina (Li, *et al.*, 2007; Jabir & Hoidy, 2018; Chen *et al.*, 2003). O genótipo AA no gene *CYP2C19* é associado na literatura com metabolização lenta da talidomida (Li *et al.*, 2007), a presença do alelo A pode representar uma diminuição da metabolização do fármaco, visto que tanto em heterozigose (GA) quanto em homozigose (AA) ocorre uma redução da atividade metabólica da enzima. A presença do alelo A parece conferir um fenótipo de metabolizador lento, o que resultaria em menor toxicidade da talidomida para esses indivíduos, visto que a talidomida é um pró-fármaco e a sua ativação é dependente da enzima CYP2C19, e, portanto, indivíduos com genótipo AA apresentam menor concentração da forma ativa da talidomida.

Assim, a fim de analisar a influência do genótipo na sobrevida dos pacientes realizamos uma análise utilizando regressão de Cox controlando para a realização de TACTH, uma vez que nossos resultados apontaram o TACTH como um fator que pode influenciar na sobrevida dos pacientes. Quando analisamos apenas os genótipos de *CYP2C19* não encontramos diferenças significativas na sobrevida dos pacientes, sugerindo que o genótipo não estaria influenciando na sobrevida.

Ajustando os dados para a realização de TACTH os resultados sugerem que indivíduos heterozigotos para *CYP2C19* apresentam tempo de sobrevida maior quando comparado à indivíduos homozigotos GG. Assim, com o conjunto de amostras analisadas, sugere-se influência de *CYP2C19**2 na ocorrência de neuropatia periférica e sobrevida dos pacientes.

As análises provenientes de ferramentas de bioinformática trouxeram novas perspectivas ao estudo, principalmente em relação ao direcionamento de futuras análises. As abordagens *in silico* proporcionaram uma abrangência maior de possibilidades de alvos de estudo, sinalizando potenciais alvos como *MAP2K4* e *ASPN* que apresentaram correlação na presença de NP. *Mitogen-Activated Protein Kinase 4 (MAP2K4)* faz parte de um grupo de proteínas que respondem a estímulos extracelulares regulando expressão gênica, mitose, diferenciação, proliferação e apoptose. Esse grupo de proteínas (MAPKs) também está envolvido na ativação da maioria dos oncogenes não nucleares, sendo que *MAP2K4* ativa as proteínas MAPKs em resposta a vários estresses ambientais ou estímulos mitogênicos. Em amostras de osteosarcoma foi encontrada expressão mais alta de *MAP2K4* no momento pré-quimioterapia comparado a amostras pós-quimioterapia e controles. Além disso, a superexpressão de *MAP2K4* em amostras pós-quimioterapia foram associadas a pacientes que não apresentaram remissão completa da doença ao final do tratamento (Tesser-Gamba *et al.*, 2012). Vários estudos relataram também que mutações ou expressão anormal de *MAP2K4* estão envolvidas na patogênese de vários tipos de câncer (Liu *et al.*, 2019). *ASPN* é um gene que codifica uma proteína extracelular da cartilagem que pode regular a condrogênese, sendo que essa proteína também se liga ao colágeno e ao cálcio e pode induzir a mineralização do colágeno. Estudos de variantes no gene *ASPN* demonstraram associação entre *ASPN* e várias doenças ósseas e articulares, incluindo osteoartrite e artrite reumatoide. Estudos sugerem também a relação de *ASPN* expresso no microambiente tumoral como um modulador hereditário da progressão metastática (Hurley *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2019). Estudos sugerem um papel de *ASPN* na oncogênese de câncer gástrico além da sua implicação em mecanismos de invasão local em carcinoma de mama, como também, sugerem que amplificação de *ASPN* pode indicar pior desfecho clínico para pacientes com câncer de colorretal

(Jiang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019). A possível relação desses genes com NP poderia estar associada com a expressão de *MAP2K4* no momento pré e pós quimioterapia, e em *ASPN*, relacionado a comprometimentos neurológicos, assim como ocorre em pacientes com artrite reumatoide, que é uma condição que também pode estar relacionada com a ocorrência de NP. Embora esses genes sejam potenciais candidatos e as análises contribuam para a seleção de alvos de estudo, ensaios experimentais são necessários para prever os efeitos biológicos envolvidos nesses processos.

As análises de associação entre as variantes genéticas e a ocorrência de NP não apresentaram resultados estatisticamente significativos, mas como essas variantes já foram relatadas na literatura por apresentarem alguma relação com talidomida, bortezomibe e/ou NP, não podemos descartar que essa associação exista. O tamanho amostral do estudo pode não ter poder suficiente para detectar uma real associação.

Todos os dados clínicos dos pacientes foram acessados a partir de prontuários eletrônicos, e, por isso, o detalhamento dos dados pode estar comprometido. Outra limitação importante do trabalho está relacionada à avaliação de alterações moleculares citogenéticas, que são informações utilizadas no estadiamento (Rajkumar *et al.*, 2016). As análises de citogenética molecular têm papel importante na determinação do prognóstico do paciente, visto que os portadores de alterações citogenéticas de alto risco, como t(4;14) possuem pior prognóstico (Manier *et al.*, 2017). Reconhecemos que os dados de citogenética molecular podem influenciar em nossos resultados, principalmente ao analisar os dados de sobrevida, porém, devemos considerar que nossa amostra de estudo é composta por pacientes provenientes de um sistema único de saúde e que o acesso a esse tipo de diagnóstico molecular não faz parte da rotina de atendimento devido ao alto custo desses exames e por não haver cobertura do sistema público de saúde para realização desses exames. Esta informação citogenética pode impactar diretamente nos resultados de sobrevida aqui identificados, portanto tal resultado deve ser interpretado com cautela

O estudo buscou avaliar a relação de variantes genéticas já descritas na literatura com NP induzida por tratamento em uma amostra específica de pacientes com MM. Embora os dados do estudo não tenham apresentado associações significativas, sugerimos a reprodução dessas análises com outras abordagens experimentais e amostras maiores para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos e potenciais novos alvos de estudo. Os resultados obtidos nesse estudo devem ser avaliados levando em consideração as suas limitações, entretanto, as informações apresentadas podem colaborar com a compreensão de variantes genéticas envolvidas com o risco de desenvolvimento de NP que é induzida por medicamentos, assim como a sobrevida de acordo com protocolos de tratamento.

Capítulo VII
Conclusões e Perspectivas

6. Conclusões e Perspectivas

A partir dos resultados encontrados foi possível satisfazer a todos os objetivos do estudo. Os objetivos assim como as conclusões dos achados estão descritos abaixo.

- Avaliar a existência de associação entre variantes genéticas nos genes *SERPINB2*, *ABCA1*, *PKNOX1* e *CYP2C19* e neuropatia periférica no tratamento com talidomida e/ou bortezomibe em pacientes com Mieloma Múltiplo.

Como objetivo principal do estudo analisamos se as variantes nos genes de interesse estariam associadas com a ocorrência de NP na amostra de estudo. Os dados mostraram que não houve nenhuma relação estatisticamente significativa entre as variantes rs363717 (*ABCA1*), rs4244285 (*CYP2C19*), rs2839629 (*PKNOX1*) e rs6103 (*SERPINB2*) e a ocorrência de NP nesses indivíduos. Embora nossos resultados não mostrem uma relação estatisticamente significativa, essas variantes são relacionadas na literatura com a ocorrência de NP induzida pelo tratamento com talidomida e/ou bortezomibe, portanto, não descartamos que possa haver uma relação, mas ressaltamos que esses dados devem ser replicados em amostras maiores.

- Realizar uma análise descritiva da amostra a partir dos dados clínicos de pacientes com Mieloma Múltiplo.

A amostra contou com indivíduos em sua maioria caucasianos e do sexo feminino com mediana de idade de 60 anos ao diagnóstico. De acordo com os achados clínicos e laboratoriais a maioria dos indivíduos do estudo foram classificados em estádios que contemplam características associadas a maior severidade do estado clínico e maior extensão da doença. Com relação à ocorrência de eventos adversos e resposta ao tratamento, que em sua maioria contemplou protocolos com talidomida, 36% dos indivíduos desenvolveram a neuropatia periférica.

- Estabelecer a frequência alélica e genotípica das variantes genéticas de *SERPINB2*, *ABCA1*, *PKNOX1* e *CYP2C19* em pacientes com Mieloma Múltiplo.

As frequências alélicas estão de acordo com as frequências encontradas em bancos de dados, especialmente com a população brasileira. As frequências genotípicas mostraram que para as variantes rs363717 (*ABCA1*) e rs4244285 (*CYP2C19*) houve maior frequência de indivíduos com genótipo homozigoto TT e GG, respectivamente. Para as variantes rs2839629 (*PKNOX1*) e rs6103 (*SERPINB2*) a maioria dos indivíduos apresentaram o genótipo heterozigoto e homozigoto ancestral, respectivamente.

- Associar as variantes genéticas nos genes *SERPINB2*, *ABCA1*, *PKNOX1* e *CYP2C19* com a ocorrência de neuropatia periférica em pacientes com Mieloma Múltiplo que fazem ou fizeram uso de talidomida e/ou bortezomibe.

Embora nenhuma variante tenha apresentado associação estatisticamente significativa com a ocorrência de NP, foi possível observar uma frequência maior de indivíduos com genótipo heterozigoto para a variante rs2839629 no gene *PKNOX1* e indivíduos com genótipos homozigotos TT para a variante rs363717 no gene *ABCA1*, CC para a variante rs6103 no gene *SERPINB2* e GG para a variante rs4244285 no gene *CYP2C19*. Entre os indivíduos que não desenvolveram NP a frequência dos genótipos heterozigotos foi maior nos genes *PKNOX1* e *CYP2C19*, e a frequência de genótipos homozigotos para as variantes foram maiores nos genes *ABCA1* (TT) e *SERPINB2* (GG). Essa observação propõe que possivelmente essas variantes possam estar envolvidas com uma relação de proteção ao desenvolvimento de NP. Para confirmar essa observação, amostras maiores devem ser avaliadas.

- Utilizar ferramentas de bioinformática para buscar genes relacionados com neuropatia periférica e tratamento com talidomida e bortezomibe a partir de análises de expressão diferencial e coexpressão provenientes de dados

secundários de estudos experimentais depositados em bancos de dados públicos.

De forma a acrescentar perspectivas ao trabalho e direcionar a novos genes alvo de estudo, a análise preliminar mostrou que para os genes relacionados em bancos de dados com talidomida, bortezomibe e neuropatia periférica, a análise de expressão diferencial não resultou em nenhum gene diferencialmente expresso. Porém, as análises preliminares de coexpressão mostraram uma possível relação entre os genes *MAP2K4* e *ASPN*, sugerindo uma influência de *ASPN* em *MAP2K4* na presença de NP.

A análise de variantes nesses genes, assim como a expressão destes em pacientes com MM com e sem NP pode auxiliar na compreensão do verdadeiro papel desses genes no aparecimento do efeito adverso. Além disso, o acompanhamento desses pacientes quanto ao desenvolvimento tardio de NP e análises de imunofenotipagem podem ser abordagens futuras interessantes de serem agregadas neste contexto. Como a ocorrência de NP é um fator que afeta não somente a qualidade de vida do paciente acometido, mas também pode levar a descontinuidade do tratamento, a utilização de ferramentas para predizer potenciais alvos genéticos envolvidos no desenvolvimento de eventos adversos do tratamento pode contribuir com o conhecimento científico da área e fornecer possíveis biomarcadores de resposta terapêutica.

Capítulo VIII
Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- ANDO, Y.; FUSE, E.; FIGG, W. D. Thalidomide metabolism by the CYP2C subfamily. *Clin. Cancer Res.*, 8, n. 6, p. 1964-1973, Jun. 2002.
- ANDRAWEEERA, P. H.; DEKKER, G. A.; THOMPSON, S. D.; NOWAK, R. C. *et al.* Polymorphisms in the fibrinolytic pathway genes and the risk of recurrent spontaneous abortion. *Reprod. Biomed. Online*, 29, n. 6, p. 745-751, Dec. 2014.
- ARGYRIOU, A. A.; ICONOMOU, G.; KALOFONOS, H. P. Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature. *Blood*, 112, n. 5, p. 1593-1599, Sep. 2008.
- BABASHAMSI, M. M.; KOUKHALOO, S. Z.; HALALKHOR, S.; SALIMI, A. *et al.* *ABCA1* and metabolic syndrome; a review of the *ABCA1* role in HDL-VLDL production, insulin-glucose homeostasis, inflammation and obesity. *Diabetes Metab. Syndr.*, 13, n. 2, p. 1529-1534, 2019 Mar. – Apr. 2019.
- BHUTANI, M.; FOUREAU, D. M.; ATRASH, S.; VOORHEES, P. M. *et al.* Extramedullary multiple myeloma. *Leukemia*, 34, n. 1, p. 1-20, Jan. 2020.
- BRIGLE, K.; ROGERS, B. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Semin. Oncol. Nurs.*, 33, n. 3, p. 225-236, 08 2017.
- CENGIZ SEVAL, G.; BEKSAC, M. The safety of bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin. Drug Saf.*, 17, n. 9, p. 953-962, Sep. 2018.
- CHENGMAO, X.; LI, L.; YAN, L.; JIE, Y. *et al.* *ABCA1* affects placental function via trophoblast and macrophage. *Life Sci.*, 191, p. 150-156, Dec. 2017.
- CROUCHER, D. R.; SAUNDERS, D. N.; LOBOV, S.; RANSON, M. Revisiting the biological roles of *PAI2* (*SERPINB2*) in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 8, n. 7, p. 535-545, Jul. 2008.
- DENG, S.; ZHANG, B.; ZHOU, Y.; XU, X. *et al.* The Role of. *Contrast Media Mol Imaging*, 2018, p. 4198673, 2018.
- DIMOPOULOS, M. A.; KASTRITIS, E.; ROSINOL, L.; BLADÉ, J. *et al.* Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia*, 22, n. 8, p. 1485-1493, Aug. 2008.
- DURIE, B. G.; HAROUSSEAU, J. L.; MIGUEL, J. S.; BLADÉ, J. *et al.* International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 20, n. 9, p. 1467-1473, Sep. 2006.

- DURIE, B. G.; SALMON, S. E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*, 36, n. 3, p. 842-854, Sep. 1975.
- FDA. U.S. Food and Drug Administration. Alterações na rotulagem relacionadas à segurança de medicamentos – Talidomida. Abril 2019. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/020785s067lbl.pdf>. Acesso em: 20/07/20.
- FDA. U.S. Food and Drug Administration. Alterações na rotulagem relacionadas à segurança de medicamentos – Bortezomibe. Abril 2019. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/021602s044lbl.pdf>. Acesso em: 20/07/20.
- FENG, R.; XU, P. P.; CHEN, B. L.; MAO, R. *et al.* *CYP2C19* polymorphism has no correlation with the efficacy and safety of thalidomide in the treatment of immune-related bowel disease. *J. Dig. Dis.*, 21, n. 2, p. 98-103, Feb. 2020.
- FRICKE-GALINDO, I.; CÉSPEDES-GARRO, C.; RODRIGUES-SOARES, F.; NARANJO, M. E. *et al.* Interethnic variation of *CYP2C19* alleles, 'predicted' phenotypes and 'measured' metabolic phenotypes across world populations. *Pharmacogenomics J.*, 16, n. 2, p. 113-123, Apr. 2016.
- GANDOLFI, S.; PRADA, C. P.; RICHARDSON, P. G. How I treat the young patient with multiple myeloma. *Blood*, 132, n. 11, p. 1114-1124, 09 2018.
- HARI, P. N.; ZHANG, M. J.; ROY, V.; PÉREZ, W. S. *et al.* Is the International Staging System superior to the Durie-Salmon staging system? A comparison in multiple myeloma patients undergoing autologous transplant. *Leukemia*, 23, n. 8, p. 1528-1534, Aug. 2009.
- HAROUSSEAU, J. L.; PALUMBO, A.; RICHARDSON, P. G.; SCHLAG, R. *et al.* Superior outcomes associated with complete response in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with nonintensive therapy: analysis of the phase 3 VISTA study of bortezomib plus melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone. *Blood*, 116, n. 19, p. 3743-3750, Nov. 2010.
- HIDESHIMA, T.; RICHARDSON, P.; CHAUHAN, D.; PALOMBELLA, V. J. *et al.* The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.*, 61, n. 7, p. 3071-3076, Apr. 2001.
- HSIEH, H. H.; CHEN, Y. C.; JHAN, J. R.; LIN, J. J. The serine protease inhibitor serpinB2 binds and stabilizes p21 in senescent cells. *J. Cell Sci.*, 130, n. 19, p. 3272-3281, Oct. 2017.

- HUNGRIA, V. T.; CRUSOE, E. Q.; QUERO, A. A.; SAMPAIO, M. *et al.* Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma treatment: Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular Project guidelines: Associação Médica Brasileira - 2012. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 35, n. 3, p. 201-217, 2013.
- HURLEY, P. J.; SUNDI, D.; SHINDER, B.; SIMONS, B. W. *et al.* Germline Variants in Asporin Vary by Race, Modulate the Tumor Microenvironment, and Are Differentially Associated with Metastatic Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.*, 22, n. 2, p. 448-458, Jan. 2016.
- IMOTO, I.; SONODA, I.; YUKI, Y.; INAZAWA, J. Identification and characterization of human *PKNOX2*, a novel homeobox-containing gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287, n. 1, p. 270-276, Sep. 2001.
- ISLAM, B.; LUSTBERG, M.; STAFF, N. P.; KOLB, N. *et al.* Vinca alkaloids, thalidomide and eribulin-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment. *J. Peripher. Nerv. Syst.*, 24 Suppl. 2, p. S63-S73, Oct. 2019.
- JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y. *et al.* Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J. Clin.*, 58, n. 2, p. 71-96, 2008 Mar-Apr. 2008.
- JIANG, K.; LIU, H.; XIE, D.; XIAO, Q. Differentially expressed genes. *Oncol. Lett.*, 17, n. 3, p. 3191-3202, Mar. 2019.
- JOHNSON, D. C.; CORTHALS, S. L.; WALKER, B. A.; ROSS, F. M. *et al.* Genetic factors underlying the risk of thalidomide-related neuropathy in patients with multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.*, 29, n. 7, p. 797-804, Mar. 2011.
- KAPOOR, P.; RAJKUMAR, S. V.; DISPENZIERI, A.; GERTZ, M. A. *et al.* Melphalan and prednisone versus melphalan, prednisone and thalidomide for elderly and/or transplant ineligible patients with multiple myeloma: a meta-analysis. *Leukemia*, 25, n. 4, p. 689-696, Apr. 2011.
- KAZANDJIAN, D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol*, 43, n. 6, p. 676-681, Dec. 2016.
- KERBAUY, L. N.; PARMAR, S.; KUTNER, J. M.; GUSMÃO, B. M. *et al.* Hematological approaches to multiple myeloma: trends from a Brazilian subset of hematologists. A cross-sectional study. *Sao Paulo Med. J.*, 134, n. 4, p. 335-341, 2016 Jul-Aug. 2016.
- KNOBLOCH, J.; JUNGCK, D.; KOCH, A. The Molecular Mechanisms of Thalidomide Teratogenicity and Implications for Modern Medicine. *Curr. Mol. Med.*, 17, n. 2, p. 108-117, 2017.

- KUMAR, S. K.; RAJKUMAR, S. V. The multiple myelomas - current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 15, n. 7, p. 409-421, 07 2018.
- KUMAR, S. K.; RAJKUMAR, S. V.; DISPENZIERI, A.; LACY, M. Q. *et al.* Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*, 111, n. 5, p. 2516-2520, Mar. 2008.
- KUMAR, S. K.; RAJKUMAR, V.; KYLE, R. A.; VAN DUIN, M. *et al.* Multiple myeloma. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 3, p. 17046, Jul. 2017.
- KYLE, R. A.; RAJKUMAR, S. V. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, 23, n. 1, p. 3-9, Jan. 2009.
- KYLE, R. A.; REMSTEIN, E. D.; THERNEAU, T. M.; DISPENZIERI, A. *et al.* Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.*, 356, n. 25, p. 2582-2590, Jun. 2007.
- LANDGREN, O.; RAJKUMAR, S. V. New Developments in Diagnosis, Prognosis, and Assessment of Response in Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.*, 22, n. 22, p. 5428-5433, Nov. 2016.
- LANDGREN, O.; WEISS, B. M. Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: support for genetic factors in pathogenesis. *Leukemia*, 23, n. 10, p. 1691-1697, Oct. 2009.
- LEE, N. H.; CHO, A.; PARK, S. R.; LEE, J. W. *et al.* *SERPINB2* is a novel indicator of stem cell toxicity. *Cell Death Dis.*, 9, n. 7, p. 724, 06 2018.
- LENZ, W.; KNAPP, K. Thalidomide embryopathy. *Arch. Environ. Health*, 5, p. 100-105, Aug. 1962.
- LI, Y.; HOU, J.; JIANG, H.; WANG, D. *et al.* Polymorphisms of *CYP2C19* gene are associated with the efficacy of thalidomide based regimens in multiple myeloma. *Haematologica*, 92, n. 9, p. 1246-1249, Sep. 2007.
- LI, H.; ZHANG, Z.; CHEN, L.; SUN, X. *et al.* Cytoplasmic Asporin promotes cell migration by regulating TGF- β /Smad2/3 pathway and indicates a poor prognosis in colorectal cancer. *Cell Death Dis.*, 10, n. 2, p. 109, 02 2019.
- LI, T.; TIMMINS, H. C.; LAZARUS, H. M.; PARK, S. B. Peripheral neuropathy in hematologic malignancies - Past, present and future. *Blood Rev.*, p. 100653, Jan. 2020.
- LIU, S.; HUANG, J.; ZHANG, Y.; LIU, Y. *et al.* *MAP2K4* interacts with Vimentin to activate the PI3K/AKT pathway and promotes breast cancer pathogenesis. *Aging (Albany NY)*, 11, n. 22, p. 10697-10710, 11 2019.

- LIU, Y.; HUANG, X.; HE, X.; ZHOU, Y. *et al.* A novel effect of thalidomide and its analogs: suppression of cereblon ubiquitination enhances ubiquitin ligase function. *FASEB J.*, 29, n. 12, p. 4829-4839, Dec. 2015.
- LIU, Y.; JIANG, Q.; LIU, X.; LIN, X. *et al.* Cinobufotalin powerfully reversed EBV-miR-BART22-induced cisplatin resistance via stimulating *MAP2K4* to antagonize non-muscle myosin heavy chain IIA/glycogen synthase 3 β / β -catenin signaling pathway. *E. Bio. Medicine*, 48, p. 386-404, Oct. 2019.
- LU, Y.; LIU, Y.; LI, Y.; ZHANG, H. *et al.* Association of ATP-binding cassette transporter A1 gene polymorphisms with plasma lipid variability and coronary heart disease risk. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 8, n. 10, p. 13441-13449, 2015.
- LUCZKOWSKA, K.; LITWINSKA, Z.; PACZKOWSKA, E.; MACHALINSKI, B. Pathophysiology of drug-induced peripheral neuropathy in patients with multiple myeloma. *J. Physiol. Pharmacol.*, 69, n. 2, 04 2018.
- LUDWIG, H.; DELFORGE, M.; FACON, T.; EINSELE, H. *et al.* Prevention and management of adverse events of Novel agents in multiple myeloma: A consensus of the european myeloma network. *Leukemia*, Dec. 2017.
- MANIER, S.; SALEM, K. Z.; PARK, J.; LANDAU, D. A. *et al.* Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 14, n. 2, p. 100-113, 02 2017.
- MATEOS, M. V.; OCIO, E. M.; PAIVA, B.; ROSIÑOL, L. *et al.* Treatment for patients with newly diagnosed multiple myeloma in 2015. *Blood Rev.*, 29, n. 6, p. 387-403, Nov. 2015.
- MIKHAEL, J. Treatment Options for Triple-class Refractory Multiple Myeloma. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, 20, n. 1, p. 1-7, Jan. 2020.
- MILESHKIN, L.; STARK, R.; DAY, B.; SEYMOUR, J. F. *et al.* Development of neuropathy in patients with myeloma treated with thalidomide: patterns of occurrence and the role of electrophysiologic monitoring. *J. Clin. Oncol.*, 24, n. 27, p. 4507-4514, Sep. 2006.
- MILESHKIN, L.; STARK, R.; DAY, B.; SEYMOUR, J. F. *et al.* Development of neuropathy in patients with myeloma treated with thalidomide: patterns of occurrence and the role of electrophysiologic monitoring. *J. Clin. Oncol.*, 24, n. 27, p. 4507-4514, Sep. 2006.
- MISHRA, A.; AWASTHI, S.; RAJ, S.; MISHRA, P. *et al.* Identifying the role of *ASPN* and *COMP* genes in knee osteoarthritis development. *J. Orthop. Surg. Res.*, 14, n. 1, p. 337, Oct. 2019.

- MITSIADES, N.; MITSIADES, C. S.; POULAKI, V.; CHAUHAN, D. *et al.* Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood*, 99, n. 12, p. 4525-4530, Jun. 2002.
- MOHTY, B.; EL-CHEIKH, J.; YAKOUB-AGHA, I.; MOREAU, P. *et al.* Peripheral neuropathy and new treatments for multiple myeloma: background and practical recommendations. *Haematologica*, 95, n. 2, p. 311-319, Feb. 2010.
- MORAWSKA, M.; GRZASKO, N.; KOSTYRA, M.; WOJCIECHOWICZ, J. *et al.* Therapy-related peripheral neuropathy in multiple myeloma patients. *Hematol. Oncol.*, 33, n. 4, p. 113-119, Dec. 2015.
- MOREAU, P.; SAN MIGUEL, J.; LUDWIG, H.; SCHOUTEN, H. *et al.* Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.*, 24 Suppl. 6, p. vi133-137, Oct. 2013.
- MUCHTAR, E.; MAGEN, H.; GERTZ, M. A. High-risk multiple myeloma: a multifaceted entity, multiple therapeutic challenges. *Leuk. Lymphoma*, 58, n. 6, p. 1283-1296, 06 2017.
- ORIENTE, F.; PERRUOLO, G.; CIMMINO, I.; CABARO, S. *et al.* Prep1, A Homeodomain Transcription Factor Involved in Glucose and Lipid Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, p. 346, 2018.
- RAJAN, A. M.; KUMAR, S. New investigational drugs with single-agent activity in multiple myeloma. *Blood Cancer J.*, 6, n. 7, p. e451, 07 2016.
- RAJKUMAR, S. V. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.*, 91, n. 7, p. 719-734, 07 2016.
- RAJKUMAR, S. V. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book*, 35, p. e418-423, 2016.
- RAJKUMAR, S. V.; DIMOPOULOS, M. A.; PALUMBO, A.; BLADE, J. *et al.* International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.*, 15, n. 12, p. e538-548, Nov. 2014.
- RAJKUMAR, S. V. Multiple Myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.*, 93, n. 8, p. 981-1114, 08 2018.
- RICHARDSON, P. G.; DELFORGE, M.; BEKSAC, M.; WEN, P. *et al.* Management of treatment-emergent peripheral neuropathy in multiple myeloma. *Leukemia*, 26, n. 4, p. 595-608, Apr. 2012.
- RICHARDSON, P. G.; SONNEVELD, P.; SCHUSTER, M. W.; IRWIN, D. *et al.* Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.*, 352, n. 24, p. 2487-2498, Jun. 2005.

- ROBAK, P.; ROBAK, T. Bortezomib for the Treatment of Hematologic Malignancies: 15 Years Later. *Drugs R. D.*, 19, n. 2, p. 73-92, Jun. 2019.
- RUSSELL, S. J.; RAJKUMAR, S. V. Multiple myeloma and the road to personalised medicine. *Lancet Oncol.*, 12, n. 7, p. 617-619, Jul. 2011.
- RÖLLIG, C.; KNOP, S.; BORNHÄUSER, M. Multiple myeloma. *Lancet*, 385, n. 9983, p. 2197-2208, May 2015.
- SERETNY, M.; CURRIE, G. L.; SENA, E. S.; RAMNARINE, S. *et al.* Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain*, 155, n. 12, p. 2461-2470, Dec. 2014.
- SHORT, K. D.; RAJKUMAR, S. V.; LARSON, D.; BUADI, F. *et al.* Incidence of extramedullary disease in patients with multiple myeloma in the era of novel therapy, and the activity of pomalidomide on extramedullary myeloma. *Leukemia*, 25, n. 6, p. 906-908, Jun. 2011.
- SICOURI, L.; PISATI, F.; PECE, S.; BLASI, F. *et al.* Prep1 (*PKNOX1*) transcription factor contributes to pubertal mammary gland branching morphogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 62, n. 11-12, p. 827-836, 2018.
- SILVA, R.; BRANDÃO, K.; PINTO, P. *et al.* Multiple myeloma: clinical and laboratory characteristics in the diagnosis and prognostic study. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, 31, n. 2, p. 63-68, 2009.
- SILBERMAN, J.; LONIAL, S. Review of peripheral neuropathy in plasma cell disorders. *Hematol. Oncol.*, 26, n. 2, p. 55-65, Jun. 2008.
- SMITH, C. J.; AMBS, S.; LANDGREN, O. Biological determinants of health disparities in multiple myeloma. *Blood Cancer J.*, 8, n. 9, p. 85, 08 2018.
- STATHOPOULOU, M. G.; MONTEIRO, P.; SHAHABI, P.; PEÑAS-LLEDÓ, E. *et al.* Newly identified synergy between clopidogrel and calcium-channel blockers for blood pressure regulation possibly involves *CYP2C19* rs4244285. *Int. J. Cardiol.*, 168, n. 3, p. 3057-3058, Oct. 2013.
- TERPOS, E.; KLEBER, M.; ENGELHARDT, M.; ZWEEGMAN, S. *et al.* European Myeloma Network guidelines for the management of multiple myeloma-related complications. *Haematologica*, 100, n. 10, p. 1254-1266, Oct. 2015.
- TESSER-GAMBA, F.; PETRILLI, A. S.; DE SEIXAS ALVES, M. T.; FILHO, R. J. *et al.* *MAPK7* and *MAP2K4* as prognostic markers in osteosarcoma. *Hum. Pathol.*, 43, n. 7, p. 994-1002, Jul. 2012.

- TURESSON, I.; VELEZ, R.; KRISTINSSON, S. Y.; LANDGREN, O. Patterns of improved survival in patients with multiple myeloma in the twenty-first century: a population-based study. *J. Clin. Oncol.*, 28, n. 5, p. 830-834, Feb. 2010.
- VANGSTED, A. J.; SØEBY, K.; KLAUSEN, T. W.; ABILDGAARD, N. *et al.* No influence of the polymorphisms *CYP2C19* and *CYP2D6* on the efficacy of cyclophosphamide, thalidomide, and bortezomib in patients with Multiple Myeloma. *BMC Cancer*, 10, p. 404, Aug. 2010.
- VARGESSON, N. Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. *Birth Defects Res. C. Embryo Today*, 105, n. 2, p. 140-156, Jun. 2015.
- ZHU, Y. X.; BRAGGIO, E.; SHI, C. X.; KORTUEM, K. M. *et al.* Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood*, 124, n. 4, p. 536-545, Jul. 2014.
- ZHOU, W.; AN, G.; JIAN, Y.; GUO, H. *et al.* Effect of *CYP2C19* and *CYP3A4* gene polymorphisms on the efficacy of bortezomib-based regimens in patients with multiple myeloma. *Oncol. Lett.*, 10, n. 2, p. 1171-1175, Aug. 2015.
- ZIOGAS, D. C.; DIMOPOULOS, M. A.; KASTRITIS, E. Prognostic factors for multiple myeloma in the era of novel therapies. *Expert. Rev. Hematol.*, 11, n. 11, p. 863-879, 11 2018.

Capítulo IX
Anexos

Anexo I. Dados do DATASUS a respeito dos casos de MM por ano do diagnóstico para os estados do Brasil no período de 2013 a 2018. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sih/cnv/nruf.def>.

Painel-Oncologia - BRASIL- Data da última atualização: 09/07/2020

Casos por Ano do diagnóstico segundo UF do diagnóstico

Diagnóstico : Neoplasias Malignas (Lei no 12.732/12)

Diagnóstico Detalhado: C90 - Mieloma múltiplo e neoplasias malignas de plasmócitos

Ano do diagnóstico: 2013-2018

UF do diagnóstico	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Total
Total	2.223	2.289	2.422	2.377	2.520	2.901	14.732
11 Rondônia	5	18	10	14	15	22	84
12 Acre	7	6	3	1	2	5	24
13 Amazonas	10	17	17	22	18	23	107
14 Roraima	6	6	3	3	3	1	22
15 Pará	19	20	21	28	29	30	147
16 Amapá	9	4	3	7	6	5	34
17 Tocantins	8	11	11	9	10	20	69
21 Maranhão	49	50	46	46	39	57	287
22 Piauí	33	46	46	35	42	46	248
23 Ceará	109	130	119	132	111	112	713
24 Rio Grande do Norte	53	45	51	37	53	68	307
25 Paraíba	55	46	61	39	56	70	327
26 Pernambuco	91	108	96	116	89	108	608
27 Alagoas	18	29	35	30	29	32	173
28 Sergipe	10	-	-	7	26	18	61
29 Bahia	127	135	140	143	159	178	882
31 Minas Gerais	255	292	296	301	289	322	1.755
32 Espírito Santo	58	55	59	67	55	58	352
33 Rio de Janeiro	146	163	157	178	183	194	1.021
35 São Paulo	595	566	613	577	625	633	3.609
41 Paraná	118	139	155	161	214	245	1.032
42 Santa Catarina	91	85	107	103	126	108	620
43 Rio Grande do Sul	190	160	173	171	174	193	1.061
50 Mato Grosso do Sul	38	26	36	22	25	35	182
51 Mato Grosso	25	19	23	18	34	32	151
52 Goiás	57	55	69	73	63	74	391
53 Distrito Federal	41	58	72	37	45	53	306
Ignorado	-	-	-	-	-	159	159

Anexo II. Dados do DATASUS a respeito dos casos de MM por sexo para os estados do Brasil no período de 2013 a 2018. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/nruf.def>.

Painel-Oncologia - BRASIL- Data da última atualização: 09/07/2020

Casos por Sexo segundo UF do diagnóstico

Diagnóstico : Neoplasias Malignas (Lei no 12.732/12)

Diagnóstico Detalhado: C90 - Mieloma múltiplo e neoplasias malignas de plasmócitos

Ano do diagnóstico: 2013-2018

UF do diagnóstico	Masculino	Feminino	Total
Total	7.778	6.954	14.732
11 Rondônia	41	43	84
12 Acre	15	9	24
13 Amazonas	60	47	107
14 Roraima	12	10	22
15 Pará	94	53	147
16 Amapá	23	11	34
17 Tocantins	38	31	69
21 Maranhão	154	133	287
22 Piauí	131	117	248
23 Ceará	367	346	713
24 Rio Grande do Norte	167	140	307
25 Paraíba	170	157	327
26 Pernambuco	284	324	608
27 Alagoas	86	87	173
28 Sergipe	30	31	61
29 Bahia	435	447	882
31 Minas Gerais	934	821	1.755
32 Espírito Santo	188	164	352
33 Rio de Janeiro	504	517	1.021
35 São Paulo	1.935	1.674	3.609
41 Paraná	554	478	1.032
42 Santa Catarina	336	284	620
43 Rio Grande do Sul	568	493	1.061
50 Mato Grosso do Sul	103	79	182
51 Mato Grosso	75	76	151
52 Goiás	221	170	391
53 Distrito Federal	165	141	306
Ignorado	88	71	159

Anexo III. Dados do DATASUS a respeito dos casos de MM por faixa etária para os estados do Brasil no período de 2013 a 2018. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sih/cnv/nruf.def>.

Painel-Oncologia - BRASIL- Data da última atualização: 09/07/2020

Casos por Faixa etária segundo UF do diagnóstico

Diagnóstico : Neoplasias Malignas (Lei no 12.732/12)

Diagnóstico Detalhado: C90 - Mieloma múltiplo e neoplasias malignas de plasmócitos

Ano do diagnóstico: 2013-2018

UF do diagnóstico	0 a 19 anos	20 a 24 anos	25 a 29 anos	30 a 34 anos	35 a 39 anos	40 a 44 anos	45 a 49 anos	50 a 54 anos	55 a 59 anos	60 a 64 anos	65 a 69 anos	70 a 74 anos	75 a 79 anos	80 anos e mais	Total
Total	25	16	49	115	250	532	927	1.491	2.111	2.461	2.444	1.901	1.358	1.052	14.732
11 Rondônia	-	-	-	2	-	1	5	15	13	14	17	9	5	3	84
12 Acre	-	-	-	-	1	-	4	3	4	5	2	4	1	-	24
13 Amazonas	1	-	1	-	3	6	7	8	23	19	21	8	6	4	107
14 Roraima	-	-	-	-	1	1	3	3	3	3	2	3	2	1	22
15 Pará	-	2	-	3	2	6	10	22	19	29	23	9	17	5	147
16 Amapá	1	1	3	4	2	2	6	-	3	5	3	3	1	-	34
17 Tocantins	-	-	-	-	-	1	7	8	7	15	13	8	5	5	69
21 Maranhão	3	2	1	5	3	17	26	28	39	44	43	32	20	24	287
22 Piauí	-	1	2	5	5	5	18	31	37	45	36	27	17	19	248
23 Ceará	3	1	5	6	13	29	44	79	91	107	122	96	54	63	713
24 Rio Grande do Norte	1	-	1	6	7	6	21	24	43	41	46	41	32	38	307
25 Paraíba	-	-	1	4	4	16	28	36	35	38	58	39	35	33	327
26 Pernambuco	-	1	2	6	15	24	48	61	88	92	106	78	57	30	608
27 Alagoas	-	-	-	-	1	6	12	26	19	24	37	19	21	8	173
28 Sergipe	-	1	1	-	-	1	6	7	12	12	7	7	6	1	61
29 Bahia	-	-	-	6	19	42	52	83	125	142	146	122	78	67	882
31 Minas Gerais	1	1	3	12	24	63	106	139	252	300	278	252	181	143	1.755
32 Espírito Santo	-	1	-	2	10	9	20	33	37	61	54	57	36	32	352
33 Rio de Janeiro	1	-	6	10	21	40	58	108	140	164	162	135	108	68	1.021
35 São Paulo	3	3	11	24	61	133	218	385	536	614	592	451	334	244	3.609
41 Paraná	2	-	3	4	11	30	70	111	163	191	164	122	81	80	1.032
42 Santa Catarina	-	-	-	5	6	19	35	68	83	126	95	99	52	32	620
43 Rio Grande do Sul	-	-	1	6	17	26	36	100	168	182	211	138	99	77	1.061
50 Mato Grosso do Sul	-	-	1	-	2	3	18	17	27	28	34	21	18	13	182
51 Mato Grosso	-	-	1	-	2	5	9	14	23	31	23	19	17	7	151
52 Goiás	-	-	3	-	6	18	28	40	55	68	61	49	34	29	391
53 Distrito Federal	1	-	1	1	8	17	21	32	49	42	55	35	30	14	306
Ignorado	8	2	2	4	6	6	11	10	17	19	33	18	11	12	159

Anexo IV. Fluxograma de definição do tratamento para pacientes com MM (adaptado de Rollig *et al.*).

