

Susana Daniela Ferraz de Noronha e Vasconcelos

Farmacogenómica do Mieloma Múltiplo



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

2021

Susana Daniela Ferraz de Noronha e Vasconcelos

Farmacogenómica do Mieloma Múltiplo

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Professora Doutora Vera Linda Ribeiro Marques



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

2021

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright©

(Susana Daniela Ferraz de Noronha e Vasconcelos)

A universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Primeiramente, um especial agradecimento aos meus pais, por todo o apoio, ajuda e compreensão ao longo destes anos, nem sempre fáceis.

Um enorme agradecimento aos meus irmãos por toda a ajuda e motivação sobretudo nesta etapa final.

À minha madrinha, muito obrigada por todo o incentivo, ajuda e dedicação.

Um obrigado às minhas amigas que mesmo longe, sempre deram força e ânimo ao longo destes anos.

Um agradecimento aos meus colegas e amigos, pela partilha de muitos bons momentos durante esta caminhada.

À professora Vera, um agradecimento pela ajuda, apoio e motivação fundamental para a realização deste trabalho.

Por fim, esta tese foi feita em homenagem, à minha tia, que infelizmente, não conseguiu vencer esta doença. Fica a esperança e convicção que com os avanços da ciência e da medicina outros doentes consigam a sua cura.

Resumo

O Mieloma Múltiplo caracteriza-se por uma neoplasia hematológica associada à proliferação clonal de plasmócitos malignos na medula óssea e como consequência, a imunoglobulina (proteína M), é produzida em excesso, provocando vários problemas no organismo, responsáveis pelos sinais e sintomas da doença.

As primeiras descrições sobre o Mieloma Múltiplo surgiram no século XIX. Em 1844, Samuel Solly fez a primeira descrição detalhada de um doente com esta patologia. Mais tarde, Bence Jones descreveu o aparecimento de uma proteína na urina destes doentes. Após um século, Edelman e Gally, mostraram que a proteína presente na urina era a mesma que estava no sangue. Assim, ao longo dos anos foram feitos vários estudos e começou-se a estruturar um conjunto de informações que iria levar a uma mais rápida identificação desta doença.

Nos últimos anos surgiram diversas terapêuticas que permitem controlar este tipo de cancro e que melhoram significativamente a qualidade de vida dos doentes. Esta evolução no tratamento, permitiu um aumento significativo da esperança média de vida, passando de 2 anos para 10 anos, com uma boa qualidade de vida.

Relativamente ao tratamento farmacológico, a sua evolução é longa e inicialmente lenta. Só a partir do ano 2000 é que houve um maior destaque e estudo sobre o tratamento do Mieloma Múltiplo, surgindo novos agentes, com mecanismos de ação distintos: os imunomoduladores (talidomida e lenalidomida) e o inibidor do proteassoma (bortezomib), entre muitos outros novos fármacos.

Portanto, os estudos farmacogenómicos são fundamentais para a escolha de uma terapêutica mais eficaz, uma vez que estuda a variabilidade genética individual, e a sua influência na resposta ao fármaco. Isto permite adaptar a terapêutica medicamentosa e sua dosagem à diversidade genética dos pacientes, isto é, permite a implementação de uma terapêutica personalizada.

Neste trabalho, através de uma revisão bibliográfica foram analisados os diversos polimorfismos identificados nos doentes de MM, que estão associados à resposta individual à terapêutica desta patologia.

Palavras-chave: Mieloma Múltiplo, Neoplasia, Medula Óssea, plasmócitos, terapêutica personalizada, farmacogenómica.

Abstract

Multiple Myeloma is a hematological neoplasm associated with the clonal proliferation of malignant plasma cells in the bone marrow and as a consequence, immunoglobulin (protein M) is produced in excess, causing various problems in the body, responsible for the signs and symptoms of the disease.

The first descriptions about Multiple Myeloma appeared in the 19th century. In 1844, Samuel Solly gave the first detailed description of a patient with this pathology. Later, Bence Jones described the appearance of a protein in the urine of these patients. After a century, Edelman and Gally, showed that the protein in the urine was the same as the one present in the blood. Thus, over the years, several studies were carried out and a set of information started to be structured that would lead to a faster identification of this disease.

In recent years, several therapies have emerged to control this type of cancer and significantly improve patients' quality of life. This evolution in treatment has allowed a significant increase in average life expectancy, from 2 years to 10 years, with a good quality of life.

Regarding the pharmacological treatment, its evolution is long and initially slow. Only from the year 2000 that there was a greater emphasis and study on the treatment of Multiple Myeloma, with the emergence of new agents, with different mechanisms of action: the immunomodulators (thalidomide and lenalidomide) and the proteasome inhibitor (bortezomib), among many other new drugs.

Thus, pharmacogenomic studies are fundamental for choosing a more effective therapy since it studies individual genetic variability and its influence on the response to the drug. This allows for adapting drug choice and dosage to the genetic diversity of patients, that is, it allows the implementation of personalized therapy.

In this work, through a literature review, the various polymorphisms that were identified in MM patients were analyzed, which are associated with individual response to treatment of this pathology.

Key Words: Multiple Myeloma, Neoplasm, Bone Marrow, plasma cells, personalized therapy, pharmacogenomic.

Índice de Tabelas

Tabela 1.1- Achados clínicos e laboratoriais presentes na Gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI), no mieloma múltiplo assintomático (MMA) e no mieloma múltiplo (MM)	25
Tabela 1.2- Sistema de Estadiamento Internacional.	26
Tabela 2.1- Associação entre 4 SNPs e o risco de desenvolvimento de neuropatia periférica em pacientes com MM tratados com bortezomib	45
Tabela 2.2- Incidência dos genótipos dos polimorfismos G34A e C421A no gene ABCG2 em pacientes com MM e indivíduos saudáveis.	51

Índice de Figuras

Figura 1.1- Taxa de incidência do mieloma múltiplo, em ambos os sexos, no ano de 2018.	3
Figura 1.2- Formação das células plasmáticas de vida longa e origem das células de mieloma múltiplo	5
Figura 1.3- Regimes terapêuticos usados no MM	28
Figura 1.4- Tratamento no caso de recidiva	32
Figura 2.1- Sobrevivência livre de progressão em pacientes com mieloma múltiplo (MM) em relação aos SNPs BSG.	47
Figura 2.2- Sobrevivência global (OS) em pacientes com MM em relação ao polimorfismo SLC16A1 rs7556664 A	48
Figura 2.3- Taxa de sobrevivência livre de progressão e taxa de sobrevivência global de acordo com polimorfismos no FccR	50

Lista de Abreviaturas

ABCG2- *ABC sub-family G member 2*

ADCC- citotoxicidade celular dependente de anticorpos

ADCP- fagocitose celular dependente de anticorpos

AKT- *protein kinase B*

ANP23E- *Acidic nuclear phosphoprotein 32 family member A*

ASR - taxa padronizada por idade

AURKA - Aurora cinase A

BAFFR- *B-cell activation factor of the TNF family receptor*

BCL-XL – *B cell CLL lymphoma extra large*

BCR -B- *B cell receptor*

BPNI3- *BCL2/adenovirus E1B protein-interacting protein 3*

BRAF- *B-Raf. Proto-oncogene, serine/threonine kinase*

CBS- *Cystathionine beta- synthase*

CCND1 - Ciclina D1

CCND2- Ciclina D2

CCND3- Ciclina D3

CD- *cluster differentiation*

CDC- citotoxicidade dependente do complemento

CDK4- *Cyclin-dependent kinase 4*

CDKN1C- Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C

CDKN2C- *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2C*

CG- centro germinativo

CKS1B- *CD28 protein kinase regulatory subunit 1B*

CNV- *copy number variation*

CpG- citosinas que precedem guaninas

CRAB- *calcium elevation, renal insufficiency, anemia and bone diase*

CRBN- *E3 ubiquitina ligase cereblon*

CREBBP- *CREB-binding protein*

CSR- recombinação de troca de classe

CTD- ciclofosfamida, talidomida, dexametasona

DAPK- *death-associated protein kinase*

DaraRd- daratumumab, lenalidomida, dexametasona de baixa dose

DaraVD-daratumumab, bortezomib, dexametasona

DNA- ácido desoxirribonucleico

DNMTs- DNA- metiltransferases

EloRd- elotuzumab, lenalidomida, dexametasona de baixa dose

EloVD- elotuzumab, bortezomib, dexametasona

EMA- Agência Europeia de Medicamentos

EP300- *histone acetyltransferase p 300*

EZH2- *enhancer of zeste 2*

FAF1- Fas Associated Factor 1

FAM46C- *family with sequence similarity 46, member C*

FAS- *Fas cell surface death receptor*

FDA- *Food and Drug Administration*

FGF- fator de crescimento de fibroblastos

FGFR3- recetor para o fator de crescimento de fibroblastos 3 (*fibroblast growth factor receptor 3*)

FISH - *Fluorescent In Situ Hybridization*

GMSI- Gamapatia monoclonal de significado indeterminado

GRs- recetores de glicocorticóides

HATs- acetiltransferases das histonas

HDACIs- inibidor das desacetilases das histonas

HDACs- desacetilases das histonas

HDMs- desmetilases das histonas

HMTs- metiltransferases das histonas

HSCs- células estaminais hematopoiéticas

Ig- imunoglobulina

IgM- imunoglobulina M

IGF-1- fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (*insulin-like growth factor 1*)

IGH - cadeia pesada de imunoglobulina

IKK2- *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*

IL- interleucina

IL-6 – interleucina-6

IMiDs- agentes imunomoduladores

IMMERSE- *International Multiple Myeloma Research*

IMWG- *International Myeloma Working Group*

IPs- Inibidores dos proteassomas

ISS- International Staging System

IxaRd- izaxomib, lenalidomida, dexametasona de baixa dose

JAG2- *Jagged canonical notch ligand 2*

JAK/STAT – *janus kinase/ signal transducer and activator of transcription*

JNH- *kinaseNH2- terminal c-jun*

Kd- carfilzomib, dexametasona de baixa dose

KRAS- *Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog*

KRd- carfilzomib, lenalidomida, dexametasona de baixa dose

LDH- lactato desidrogenase

LINE-1- *Long interspersed nuclear elemento 1*

LT β R- *lymphotoxin β -receptor*

mAbs- anticorpos monoclonais

MAFB- avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B

MAPK- *mitogen activated protein kinase*

MAP3K14- *mitogen activated protein kinase 14*

MEK- *MAP kinase/ ERK kinase*

MiRNA- micro RNA

MM- Mieloma Múltiplo

MMA- Mieloma Múltiplo Assintomático

MMSET- *Multiple Myeloma SET domain protein*

MO- medula óssea

MP- melfalano, prednisona

MPT- melfalano, prednisona, talidomida

MYC- oncogene associado à mielocitomatose (*myelocytomatosis oncogene*)

NARS- *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*

NF- κ B- *nuclear fator Kappa B*

NK- *natural killer*

NPT- nutrição parentérica total

OR- *odds ratio*

ORR -taxas de resposta global

OS- Sobrevivência global (*overall survival*)

PAD- bortezomib, doxorrubicina, dexametasona

PanoVD- panobinostat, bortezomib, dexametasona

PCR -*Polymerase chain reaction*

PET- tomografia por emissão de positrões

PFS- sobrevivência livre de progressão (*progression free survival*)

PGx- farmacogenómica (*Pharmacogenomics*)

PI3K- fosfatidil inositol-3-cinase

PIP3- fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PRC2- *Polycomb Repressive Complex 2*

PTEN- *phosphatase and tensin homolog*

PTMs- modificações pós-traducionais

RAF- *Rapidly accelerated fibrossarcoma virus*

RANK- *receptor activator of nuclear factor KB*

RASSF4- *Ras association domain family member 4*

RAS- *Rat sarcoma virus*

RB1 - *retinoblastoma susceptibility gene*

RCM- resumo das características do medicamento

Rd- lenalidomida, dexametasona de baixa dose

RelA- *V-real avian reticuloendothelious viral oncogene homolog A*

RM- ressonância magnética

RT- PCR - *Reverse transcription polymerase chain reaction*

RVD- lenalidomida, bortezomib, dexametasona

SNP- polimorfismo de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*)

STAT- *signal transducer and activator of transcription*

STAT3- *signal transducer and activator of transcription 3*

TAPH- transplante autólogo com células de progenitoras hematopoiéticas

TC- tomografia computadorizada

TENM3- *Teneurin transmembrane protein 3*

TEV- tromboembolismo venoso

TGF- β – fator de crescimento transformador β (*transforming growth factor β*)

TLR4- *toll like receptor 4*

TNF - *tumour necrosis factor a e b*

TNFR- *tumour necrosis factor receptor*

TNFRSF1A- *TNF receptor superfamily member 1^a*

TRAF3- *tumour necrosis factor receptor- associated factor 3*

TYK2- *tyrosine kinase 2*

UPS- sistema ubiquitina proteassoma

VCD- bortezomib, ciclofosfamida, dexametasona

Vd- bortezomib, dexametasona de baixa dose

VEGF- fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endotelial growth factor*)

VMP- bortezomib, melfalano, prednisona

VRd- lenalidomida, baixa dose de dexametasona, bortezomib

VTD- bortezomib, talidomida, dexametasona

XRCC1- *X-ray repair cross complementing 1*

WWOX- oxidoreductase contendo domínios WW (*WW- containing oxirreductase*)

Índice de Conteúdos

Resumo	v
Abstract	vi
Índice de Tabelas	vii
Índice de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas	ix
CAPÍTULO I – O MIELOMA MÚLTIPLO	1
1. Enquadramento teórico	1
2. Epidemiologia	2
3. Etiologia	3
4. Fisiopatologia	4
4.1. Desenvolvimento dos linfócitos B e das células do mieloma	4
4.1.1. Eventos genéticos primários	5
4.1.1.1. Translocações cromossómicas no mieloma não-hiperdiplóide e hiperdiplóide	5
4.1.1.1.1. Translocações IgH	6
4.1.1.1.1.1. Translocações t (11;14)	6
4.1.1.1.1.2. Translocação t (4;14)	7
4.1.1.1.1.3. Translocação t (14; 16) e a t (14;20)	7
4.1.1.1.1.4. Translocação t (6;14)	8
4.1.2. Eventos genéticos secundários	8
4.1.2.1. Translocações secundárias	8
4.1.2.2. Variação do número de cópias	9
4.1.2.2.1. Deleção do cromossoma 17p	9
4.1.2.2.2. Deleção do cromossoma 13	9
4.1.2.2.3. Anomalias no cromossoma 1	10
4.1.2.3. Vias de sinalização envolvidas na patogénese do MM	11
4.1.2.3.1. Via do fator nuclear NF-kB	11
4.1.2.3.2. Via MAPK	13
4.1.2.3.3. Via JAK/STAT	14
4.1.2.3.4. Via da fosfatidilinositol 3- cinase (PI3K)	14
4.1.2.4 Alterações epigenéticas	15
4.1.2.4.1 Metilação do DNA	15

4.1.2.4.2	Modificações das histonas	17
4.1.2.4.3	Expressão anormal de microRNAs (miRNAs)	19
4.2.	O microambiente da medula óssea no mieloma múltiplo	21
5.	Marcadores de diagnóstico e estadiamento	23
6.	Abordagem terapêutica farmacológica	27
6.1.	Corticosteroides	33
6.2.1.	Melfalano	33
CAPÍTULO II - FARMACOGENÓMICA DO MIELOMA MÚLTIPLO		42
1.	Farmacogenómica – Estado da Arte	42
2.	Polimorfismos relevantes na terapêutica com melfalano	43
3.	Polimorfismos relevantes na terapêutica com bortezomib	44
4.	Polimorfismos relevantes na terapêutica com talidomida e lenalidomida	46
5.	Polimorfismos relevantes na terapêutica com daratumumab	49
6.	Outros polimorfismos envolvidos na suscetibilidade ao MM e na resposta ao tratamento para o MM	50
CONCLUSÃO		53
BIBLIOGRAFIA		54

Capítulo I – O Mieloma Múltiplo

1. Enquadramento teórico

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia hematológica heterogénea, caracterizada pela acumulação de plasmócitos malignos na medula óssea, que provoca uma superprodução de imunoglobulinas, no caso a proteína M. O acúmulo desses plasmócitos aberrantes impede que as células sanguíneas normais sejam produzidas. A somar à presença da proteína M no sangue e urina, há uma interação dos plasmócitos monoclonais aberrantes com outras células da medula óssea, causando uma série de problemas, incluindo lesões ósseas, anemia, infeções, hipercalcemia, insuficiência renal, fadiga e dor (1).

O MM é uma doença geneticamente complexa, resultante de múltiplos eventos genómicos que conduzem ao desenvolvimento e progressão do tumor. Como tal, apresenta estados pré-malignos bem definidos, denominados por gamapatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) e mieloma múltiplo assintomático (MMA). A GMSI é uma discrasia plasmática assintomática e indolente, definida pela presença de menos de 10% de plasmócitos anormais na medula óssea. É então, uma doença benigna, logo não causa danos nos órgãos-alvo. Sabe-se que tem uma prevalência superior a 5%, em adultos com mais de 70 anos e aproximadamente 1% dos casos por ano de GMSI progridem para MM, além disso, quase todos os pacientes com MM apresentam uma GMSI precedente. A GMSI pode progredir para o mieloma múltiplo assintomático (MMA), que é um estágio clínico intermédio entre a GMSI e o MM, que apresenta um nível superior a 10% de plasmócitos malignos e um risco médio de progressão para mieloma de 10% ao ano nos primeiros cinco anos. Nem a GMSI nem o MMA necessitam de tratamento, mas os pacientes precisam de acompanhamento regular devido à potencial progressão para o MM, apesar do risco de progressão ser de apenas 1% por ano de vida (2–4).

As primeiras descrições detalhadas desta doença surgiram no século XIX. Em 1844, foi descrito por *Solly* o primeiro caso bem pormenorizado de um doente com MM. O termo mieloma múltiplo foi introduzido por *Von Rustizky* em 1873, aquando na autópsia de um paciente, encontrou oito tumores distintos de cor avermelhada na medula óssea designados como “mieloma múltiplo”. Alguns anos depois, Bence

Jones descreveu o aparecimento de uma proteína na urina em doentes com MM, que passou a ter o seu nome. Em 1898, Weber afirmou que a medula óssea é o local de produção da proteína de Bence Jones. Uns anos mais tarde, Jacobson e Walters reconheceram a existência da proteína de Bence Jones na corrente sanguínea (5). A separação das proteínas séricas por eletroforese foi descrita pelo bioquímico Tiselius em 1930 que, sete anos depois, descreveu a separação das globulinas séricas em três componentes principais, que designou como alfa, beta e gama. Em 1939, Lewis Longworth, aplicou a eletroforese ao estudo do MM e demonstrou a presença de um pico alto de base estreita que o caracteriza. Em 1953, Grabar e Williams descreveram a imunoeletroforese, que facilita o diagnóstico do mieloma múltiplo (5).

Waldenstrom, em 1961, introduziu o conceito da diferença entre gamopatias monoclonais e policlonais. Alguns pacientes com proteínas monoclonais apresentavam o diagnóstico de MM ou macroglobulinemia, enquanto outros com hipergamaglobulinemia policlonal não apresentavam evidência de patologia maligna pelo que eram considerados como tendo “hipergamaglobulinemia essencial” ou “uma proteína monoclonal benigna”, que atualmente a designação adotada é a GMSI (6,7).

Relativamente, ao tratamento, o uretano foi o primeiro medicamento proposto para o tratamento do MM e foi usado pela primeira vez, em 1947, por Alwall. Mais tarde, surgiu o primeiro avanço na terapêutica com a introdução do agente quimioterapêutico melfalano, sendo o primeiro fármaco a mostrar uma melhor resposta terapêutica (8).

Atualmente, tanto o conhecimento sobre esta doença, como o tratamento evoluíram bastante. Continuam a surgir novas terapêuticas, sendo uma das classes mais promissoras a imunoterapia, incluindo a terapia de células T adotivas, terapias combinadas, anticorpos monoclonais e vacinas. Apesar dos progressos terapêuticos, a recidiva da doença é inevitável e o mieloma múltiplo permanece incurável (9).

2. Epidemiologia

A prevalência anual do MM é de aproximadamente 31 casos por 100.000 pessoas na faixa etária dos 65 aos 74 anos, e aumenta para 46 casos por 100.000 pessoas no grupo acima de 74 anos. A nível mundial, de acordo com dados de 2008, estima-se que cerca de 159.985 casos incidentes ocorram anualmente (89.897 homens

e 70.088 mulheres). Cerca de 106.105 mil pessoas morrem da doença a cada ano (58.825 mil homens e 47.280 mil mulheres). Em termos de taxas padronizadas por idade (ASR), observa-se um predomínio no sexo masculino, onde as taxas de incidência anuais são de 2,1 por 100.000 no sexo masculino e 1,4 no sexo feminino e as taxas de mortalidade em 1,3 (homens) e 0,9 (mulheres) (10,11).

A distribuição geográfica a nível mundial dos doentes com MM é muito variável, tendo mostrado, no ano de 2018, uma incidência superior na Ásia, Europa, América do Norte (ver figura 1.1). Etnicamente, observou-se na população dos EUA uma ocorrência quase duplicada do MM na etnia negra em comparação com os caucasianos, ao passo que, os indivíduos de origem asiática, especialmente chineses e japoneses, têm uma incidência muito reduzida (12).

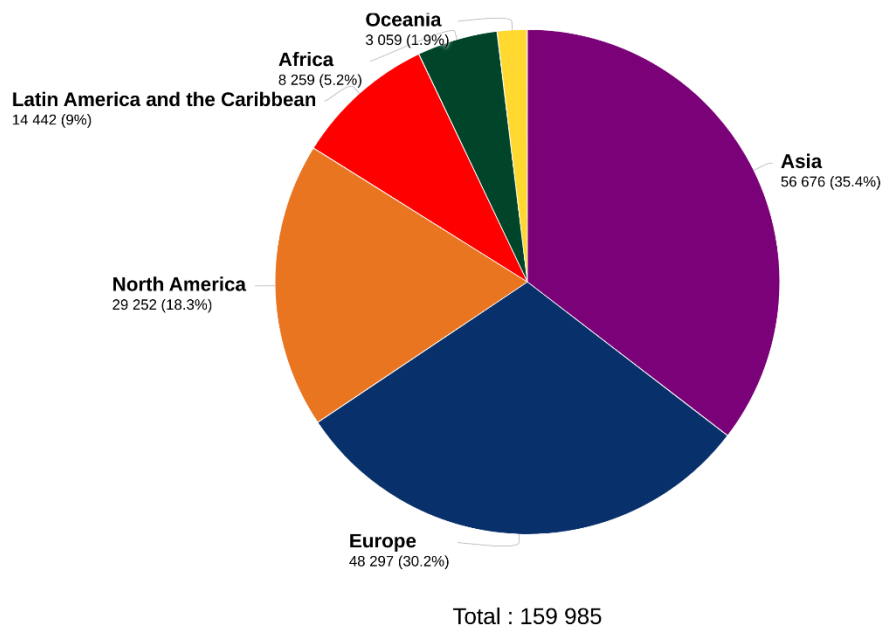


Figura 1.1 Taxa de incidência do mieloma múltiplo, em ambos os sexos, no ano de 2018. Adaptado de (13).

3. Etiologia

A etiologia do mieloma múltiplo é ainda pouco clara. Isso deve-se ao facto de ser uma doença pouco conhecida, como tal são realizados menos estudos. No entanto, existem indicações de que está relacionada com a idade, etnia, sexo, fatores ambientais e com a presença de condições pré-malignas, como a GMSI. Também existem estudos epidemiológicos que apoiam uma maior predisposição desta doença

em pessoas obesas. Para além deste, há vários estudos de coorte e caso-controlo, que descreveram uma relação positiva entre o MM e os pacientes com infeções virais ou doenças autoimunes. Igualmente foi investigada a correlação entre a exposição a toxinas, ou a radiações ionizantes e o aumento do risco de MM, onde os resultados obtidos foram incongruentes (12,14,15).

4. Fisiopatologia

4.1. Desenvolvimento dos linfócitos B e das células do mieloma

O entendimento do desenvolvimento normal dos linfócitos B e da biologia das células plasmáticas é fundamental para a compreensão do mieloma múltiplo. Os linfócitos B se desenvolvem a partir das células estaminais hematopoiéticas, que sofrem várias fases de diferenciação na medula óssea e nos órgãos linfoides secundários. O linfócito B imaturo diferencia-se na medula óssea, migrando depois para os órgãos linfoides secundários onde há exposição antigénica, levando as células B imaturas a diferenciarem-se em plasmócitos de vida curta, que geralmente produzem IgM (imunoglobulina M) de baixa afinidade. Estes plasmócitos formados nesta resposta extrafolicular precoce, sofrem apoptose in situ. Subsequentemente, antigénios e células T auxiliares causam a proliferação de células B foliculares virgens, ocorrendo rearranjo V(D)J, maturação de afinidade, hipermutação somática e recombinação por troca de classe no centro germinativo (CG). Tudo isto, leva à produção de células B de memória e plasmócitos diferenciados de longa duração, que segregam grandes quantidades dos anticorpos de alta afinidade com o isótopo predominantemente ligado, e que estão localizados principalmente na medula óssea (16–18). No MM as sequências do gene da imunoglobulina dos plasmócitos são somaticamente hipermutadas e mantêm-se constantes ao longo do percurso clínico, sugerindo que a doença ocorre a partir de uma célula B pós-CG (ver figura 1.2) (18).

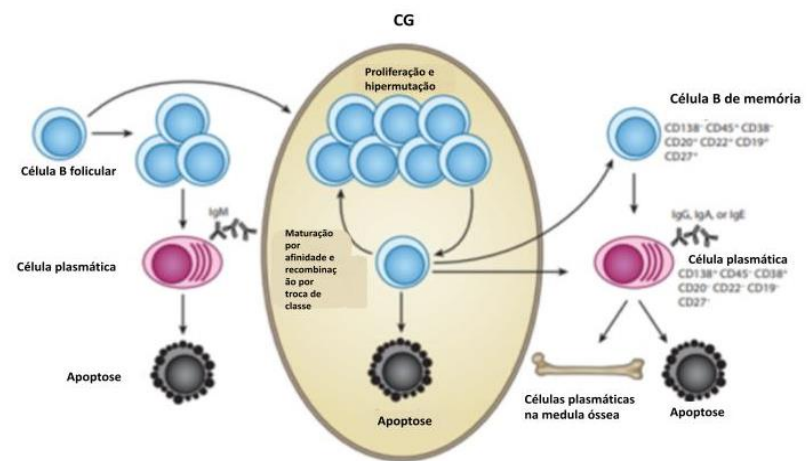


Figura 1.2. Formação das células plasmáticas de vida longa e origem das células de mieloma múltiplo. Adaptado de (18).

O mieloma múltiplo é clinicamente e biologicamente heterogêneo, tal como foi supracitado, com várias alterações genéticas que ocorrem em células plasmáticas tumorais que desempenham um papel importante na patogénese. Vários estudos genéticos e moleculares, indicam que o mieloma pode ser distinguido inicialmente em eventos genéticos primários, relacionados diretamente com a patogénese da doença, e eventos secundários, associados à progressão da doença (19).

4.1.1. Eventos genéticos primários

As alterações primárias podem ser subdivididas em duas categorias, baseadas em anomalias cromossómicas: hiperdiploide e não hiperdiploide. O mieloma não hiperdiploide é encontrado em 45% dos casos e o hiperdiploide em 50% dos pacientes, em 5% dos casos estas anomalias não estão presentes (20).

4.1.1.1. Translocações cromossómicas no mieloma não-hiperdiploide e hiperdiploide

No mieloma não-hiperdiploide ocorrem translocações de genes que codificam a cadeia pesada da IgH no locus 14q32, com outros genes envolvidos em cinco áreas de translocação cromossómica, bem definidas t (4; 14), t (6; 14), t (11; 14), t (14; 16) e t (14; 20), o que conduz num aumento da expressão da IgH. Este mieloma está associado a um aumento da probabilidade de progressão da doença e a um

prognóstico desfavorável. No mieloma hiperdiplóide surgem múltiplas trissomias envolvendo os cromossomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21, com uma reduzida prevalência de translocações IgH. As trissomias 3 e 5 têm sido associadas a um bom prognóstico, enquanto a trissomia 21 está associada a um prognóstico desfavorável. A hiperexpressão da ciclina D na ausência de elevada IgH é a principal característica do mieloma hiperdiplóide. Estas alterações cromossómicas que ocorrem em ambos os eventos levam à desregulação da transição G1/S do ciclo celular, sendo esta uma anomalia molecular precoce e determinante no MM, estando recomendada uma avaliação do rearranjo da IgH no diagnóstico de pacientes com mieloma (18,20–22).

4.1.1.1.1. Translocações IgH

As translocações primárias são uma classe de eventos genéticos importante e estas são observadas, sobretudo no início do desenvolvimento da doença (GMSI e MMA). Estas translocações estão associadas a uma hiperexpressão de oncogenes, como o MMSET (*Multiple Myeloma SET domain protein*), o FGFR3 (recetor para o fator de crescimento de fibroblastos 3), o c-MAF (*avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog C*) e a ciclina D (15). As translocações primárias mais comuns identificadas no MM são a t (4; 14), a t (6; 14), a t (11; 14), a t (14; 16) e a t (14; 20) (20).

4.1.1.1.1.1. Translocações t (11;14)

A translocação t (11; 14), é encontrada em 15-20% dos pacientes com mieloma múltiplo, e esta leva ao aumento da expressão do gene CCND1, que codifica a ciclina D1, importante para o desenvolvimento do ciclo celular. Quanto ao impacto no prognóstico da doença, existem dados de que, a combinação da translocação t (11; 14) com mutações no CCND1 está associada a um mau prognóstico. Além disso, esta translocação acontece frequentemente no início do desenvolvimento dos linfócitos B, o que pode explicar o fenótipo do tipo de linfoma observado em alguns casos. Ora, pacientes com translocações t (11; 14) podem ter uma restrição da cadeia leve, diferenciação linfoplasmocitária e hiperexpressão do CD20, logo nestes casos os pacientes podem não responder tão eficazmente aos tratamentos tradicionais do mieloma, e estudos clínicos recentes de fase I/II indicam, que esses pacientes podem ter uma melhor resposta ao tratamento com novos medicamentos desenvolvidos sobretudo para o linfoma (17,20).

4.1.1.1.1.2. Translocação t (4;14)

A translocação t (4; 14) é a segunda mais frequente, sendo encontrada em cerca de 15% dos pacientes com mieloma múltiplo. Esta é uma translocação que apenas é detetada pelo método de FISH ou PCR de transcriptase reversa (RT-PCR). Esta translocação justapõe dois oncogenes, o MMSET e o FGFR3, ambos localizados em 4p16.3.e8, com o promotor IgH, o que provoca uma hiperexpressão destes genes. O gene MMSET codifica um fator essencial na remodelação da cromatina com atividade de metiltransferase, sugerindo que este gene possa ter um papel importante na regulação epigenética. O FGFR3, codifica um recetor oncogénico de tirosina cinase, este gene não é expresso por plasmócitos normais, mas neste caso é hiperexpresso, provocando uma progressão da proliferação das células do mieloma e previne a apoptose. Ora, o gene MMSET é expresso em todos os casos com esta translocação, já o FGFR3 não é expresso em 25% dos pacientes com t (4; 14) devido à perda do cromossoma derivado 14, no qual o FGFR3 é translocado. A translocação t (4; 14) está associada a um mau prognóstico, tanto em relação à sobrevivência livre de progressão quanto à sobrevivência global. Contudo, estudos recentes revelaram que o tratamento com bortezomib e/ou carfilzomib consegue superar, pelo menos em parte, o prognóstico desfavorável associado à presença desta translocação nos pacientes com MM (16–20).

4.1.1.1.1.3. Translocação t (14; 16) e a t (14;20)

As translocações t (14; 16) e a t (14; 20) envolvem o proto-oncogene c-MAF e o oncogene MAFB, respetivamente, e resultam na sua hiperexpressão. O gene c-MAF regula a integrina B7, e esta se liga à E-caderina expressa nas células do estroma da medula óssea. Como tal, a hiperexpressão da c-MAF favorece a interação entre as células do estroma e as células do mieloma, levando ao aumento da secreção de VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) e ao desenvolvimento de lesões ósseas líticas. Ora, o VEGF é um potente estimulador da angiogénese, logo os seus níveis aumentados podem promover a progressão tumoral. Além disto, os pontos de quebra do cromossoma 16 em t (14; 16) estão dentro do último intrão do WWOX (oxirredutase contendo domínios WW), um gene supressor tumoral, resultando na

interrupção deste gene. Estas translocações, por sua vez, afetam o gene CCND2 (ciclina D2), estando este envolvido na transição G1/S, promovendo a progressão ao longo do ciclo celular. Tanto t (14; 16) como a t (14; 20) estão associadas a um prognóstico desfavorável. É importante ressaltar que a transição (14; 20), apesar de estar associada à curta sobrevida nos pacientes com MM, também está associada a uma doença estável a longo prazo em doentes com GMSI e MMA, sugerindo que a translocação sozinha não pode ser a responsável, pelo que a presença de eventos genéticos adicionais é necessária para o prognóstico desfavorável (19,20).

4.1.1.1.1.4. Translocação t (6;14)

A translocação t (6;14) é rara, encontrando-se presente em apenas 5% dos doentes com MM. Esta provoca um aumento da expressão do gene CCND3 (ciclina D3), através da justaposição com o promotor IgH. Não apresentando impacto no prognóstico (18,20).

4.1.2. Eventos genéticos secundários

Como referido anteriormente, a presença de eventos genéticos secundários reflete a progressão do tumor. No MM, várias alterações secundárias têm sido descritas, sendo as mais frequentes: translocações, variação do número de cópias, vias de sinalização desreguladas e alterações epigenéticas.

4.1.2.1. Translocações secundárias

As translocações secundárias são independentes de recombinações relacionadas com mudança de classe das imunoglobulinas, e geralmente ocorrem em estádios avançados da doença, sendo a translocação secundária mais frequente, a t (8;14). O gene tipicamente desregulado nestas translocações é o MYC (oncogene associado à mielocitomatose), localizado no locus 8q24. Este apresenta um papel fundamental no crescimento e na proliferação celular, sendo que a sua hiperexpressão está associada a um prognóstico desfavorável. A hiperexpressão do MYC é pouco frequente na GMSI, mas é observada em 15% dos doentes recentemente diagnosticados com MM e em 50% dos casos de doença avançada. Contudo, existem estudos recentes que demonstraram que alterações na expressão do oncogene c-MYC

poderão ter um papel funcional implícito na progressão de GMSI para MM, o que indica que o MYC pode desempenhar um papel importante, tanto na fase inicial, como na fase tardia da doença (3,19,23).

4.1.2.2. Variação do número de cópias

A variação no número de cópias resulta de ganhos e perdas de DNA. Essas ampliações e deleções podem ser parciais ou de todo o braço cromossómico. As alterações mais frequentes são: a deleção do cromossoma 17p, deleção do cromossoma 13 e anomalias no cromossoma 1 (deleções 1p e ganhos 1q) (3).

4.1.2.2.1. Deleção do cromossoma 17p

A deleção alélica somática (17p) é considerada como o fator de prognóstico citogenético mais importante no MM e está associada a um mau prognóstico. Esta deleção é normalmente monoalélica e o gene relevante, que não é expresso na del (17p) é o gene supressor tumoral p53. O gene p53, está localizado na região 17p13, portanto este é sempre incluído na região deletada em 17p. O p53 tem um papel muito importante em diversos processos celulares, tais como: controlo do ciclo celular, apoptose e senescência, deste modo, uma deleção ou mutação no gene TP53 pode predispor as células a danos no DNA ou permitir a sobrevivência celular. Deleções bialélicas de 17p ou deleções 17p combinadas, com mutação no TP53, no alelo remanescente estão frequentemente associadas a maus prognósticos. As deleções de 17p são observadas em 10% dos pacientes recém-diagnosticados com mieloma e em cerca de 80% dos doentes com estágios pré-malignos da doença (18–20,23).

4.1.2.2.2. Deleção do cromossoma 13

A deleção no cromossoma 13 (Del13q) encontra-se em 40-50% dos casos com MM e é mais comum em mielomas não-hiperdiploides. Na generalidade dos casos, ocorre a perda de todo o braço longo do cromossoma 13, tendo sido verificado que a região deletada inclui o gene supressor de tumor Rb1, que possui um papel na regulação do ciclo celular, logo este está subexpresso na del (13/13q) o que origina um menor efeito regulador negativo no ciclo celular. Já o gene DIS3 está localizado no braço longo do cromossoma 13, e apesar de muitas vezes ser mutado ou excluído no mieloma, este

não se encontra na região excluída por esta deleção. Vários estudos têm mostrado, que o del13q poderá estar associado a um prognóstico desfavorável, no entanto, a maioria dos pacientes com 13q têm concomitantemente translocações t (4; 14), apresentado estas uma forte associação. Logo, atualmente o impacto prognóstico da del (13/13q) é difícil de definir, não é perceptível saber se a del13q tem uma implicação prognóstica independente das translocações t (4; 14). Também se verificou, que a perda do cromossoma 13 indica um mau prognóstico na quimioterapia convencional, mas isto não ocorre no tratamento com o inibidor de proteassoma (bortezomib) (20).

4.1.2.2.3. Anomalias no cromossoma 1

As alterações estruturais no cromossoma 1 ocorrem em 45% dos doentes com MM. Entre estas alterações, identificou-se os ganhos/amplificações do braço longo do cromossoma 1 (1q), frequentemente observados em associação com perdas do braço curto do mesmo cromossoma (1p). De realçar que o ganho 1q21 é raramente encontrado na GMSI, aumentando a sua incidência significativamente no MM em recidiva. A ligação das anomalias +1q e/ou -1p a um prognóstico desfavorável foi considerada, por alguns autores e diferentes estudos corroboram que esta alteração introduz um aumento do nível de instabilidade genética nas células do mieloma, sugerindo a amplificação 1q como um possível marcador de tumores clonais mais avançados (19,20).

A região amplificada contém 679 genes, dos quais vários oncogenes foram mapeados como o CKS1B (*CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B*) e ANP23E (*acidic nuclear phosphoprotein 32kDa*). O CKS1B que codifica uma proteína reguladora do ciclo celular que ativa cinases dependentes de ciclina, de modo, a promover a proliferação e a progressão do ciclo celular. Este gene também induz a ubiquitinação de proteínas inibitórias, promovendo assim a proliferação celular. A sua hiperexpressão foi associada a uma elevada taxa de proliferação e a um mau prognóstico nos pacientes com MM. O gene ANP32E, é um inibidor da fosfatase de proteínas 2A, que tem um papel na regulação da transcrição e na remodelação da cromatina, e demonstrou estar independentemente associado a uma menor sobrevivência (19,20).

As deleções do braço curto do cromossoma 1 (del 1p) são identificadas em 30% dos doentes com mieloma, e também estão associadas a um prognóstico desfavorável. Foram observadas duas regiões: a 1p12 e 1p32, que representam um papel importante na patogénese do MM, quando deletadas. A primeira região, a 1p21, contém o gene supressor tumoral FAM46C (*family with sequence similarity 46, member C*), cujo diversos estudos revelaram ter uma função importante na tradução proteica. Além disso, a região 1p32 inclui dois genes o CDKN2C (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2C*) e o FAF1 (*Fas associated factor 1*). O CDKN2C é um inibidor da cinase 4 dependente da ciclina (CDK4), levando a inibição do ciclo celular, logo neste caso, havendo a deleção deste gene o ciclo celular fica mais rápido. O FAF1, por sua vez, codifica uma proteína envolvida na iniciação e promoção da apoptose através da via do FAS (*Fas cell surface death receptor*). Em estudos recentes, foram avaliados a incidência e o impacto no prognóstico, das deleções em 1p22 e 1p32 e verificou-se que, apesar de ambas as deleções serem preditivas de sobrevivência livre de progressão e sobrevida global, a deleção 1p32 aparece como um importante fator de prognóstico independente (19,20).

4.1.2.3. Vias de sinalização envolvidas na patogénese do MM

Existem várias vias de sinalização desreguladas no MM, estando envolvidas na sua patogénese, na proliferação, migração, sobrevivência, apoptose e resistência a medicamentos (3).

4.1.2.3.1. Via do fator nuclear NF- κ B

O NF- κ B (fator nuclear kappa B) é uma família de fatores de transcrição composta por cinco proteínas, a NF- κ B1, NF- κ B2, RelA (*v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A*), RelB e c-Rel, que apresentam um papel fundamental em vários processos celulares, nomeadamente na proliferação, apoptose, na adesão celular, na inflamação e no stress oxidativo. É, ainda, observado que muitas das vias de sinalização envolvidas no cancro estão, de modo direto ou indireto, ligadas à ativação do NF- κ B (3,24).

O NF- κ B é mantido inativo no citoplasma, pela ligação às proteínas inibitórias I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ . Em resposta à estimulação celular, ocorre a ativação da cinase da I κ B (IKK),

esta leva à fosforilação das proteínas IKBs e à sua consequente degradação pelo proteassoma. Assim, o NF- κ B fica livre e é transferido para o núcleo, onde promove a transcrição de diversos genes, especialmente os que codificam citocinas pró-inflamatórias e fatores antiapoptóticos. Assim sendo, existem duas vias gerais de ativação do NF- κ B: a clássica (ou canónica) e a alternativa (não-canónica). A via canónica é ativada por diversos estímulos, incluindo a sinalização externa através dos recetores BCR (*B cell receptor*) e TNFR (*tumor necrosis factor receptor*), que estimula a síntese dos fatores pró-inflamatórios e pró-sobrevivência, envolvendo a atividade da RelA. A via não-canónica é ativada por sinais organogénicos e diferenciadores de células, que envolvem BAFFR (*B-cell activation factor of the TNF family receptor*), CD40 (*Cluster of differentiation 40*), LT β R (*lymphotoxin β -receptor*) e RANK (*receptor activator of nuclear factor κ B*), o que desencadeia a ativação do RelB durante a diferenciação (3,25–27).

Desta forma, a via NF- κ B para além de ser ativada por citocinas pró-inflamatórias presentes no microambiente das células do mieloma, é igualmente ativada, por mutações na via de sinalização. Estudos recentes comprovaram a existência de 10 mutações pontuais e quatro rearranjos estruturais, que afetam 11 genes da via do NF- κ B. Os genes desregulados relacionados à via canónica são: o TLR4 (*toll like receptor 4*); o TNFRSF1A (*TNF Receptor Superfamily Member 1*), que codifica o TNFR1. Por sua vez, os genes mutados que estão presentes na via não-canónica são: o MAP3K14 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14*), TRAF3 (*tumour necrosis factor receptor-associated factor 3*) e o CYLD. Ainda, um estudo recente identificou mutações que levam à perda de função no gene A20, que codifica um regulador negativo da IKK2. Assim, a ativação excessiva do NF- κ B, devido a anomalias genéticas, é característica de muitas neoplasias malignas, como o MM (24–26).

No MM, a via do NF- κ B encontra-se ativa em mais de 50% dos casos e é provável que represente um papel relevante para a evolução desta patologia, visto que esta ativação é significativamente superior em estádios avançados do MM, comparativamente à fase inicial (GMSI). Assim, a elevada frequência de desregulação desta via fundamenta a sua evidente importância na patogénese desta doença, apesar do impacto do prognóstico de muitos dos genes envolvidos não esteja totalmente elucidado (3).

4.1.2.3.2. Via MAPK

A via MAPK (*mitogen activated protein kinase*) é uma via de sinalização celular, envolvida na regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. A via MAPK é ativada por uma cascata de fosforilação, através de fatores de crescimento ou por citocinas inflamatórias, como o TNF- α , a IL-6 e a IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), que por seu lado ativam uma cascata de cinases, RAF (*rapidly accelerated fibrossarcoma*), RAS (*rat sarcoma*), MEK (*MAP kinase/ERK kinase*) e MAPK, resultando na alteração da expressão genética. O NRAS (*neuroblastoma RAS*) e o KRAS (*kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), são os dois oncogenes que têm um papel dominante nesta via, estando presentes e desregulados em muitas neoplasias, no caso do MM estes oncogenes estão frequentemente mutados, com uma prevalência combinada de 20 a 35%. As mutações no gene NRAS tem um papel importante na progressão, uma vez que se encontram frequentemente em estádios avançados da doença e raramente são encontradas na GMSI. Também, as mutações neste gene são associadas a um fenótipo mais agressivo da doença, conferindo um marcador de prognóstico desfavorável e uma menor sobrevivência. Por outro lado, apesar das mutações KRAS estarem praticamente ausentes na GMSI, estudos recentes demonstraram, que o KRAS, não o NRAS, poderá influenciar de forma mais marcante o prognóstico. Esta é uma descoberta que poderá levar a consequências importantes, caso as alterações genéticas forem usadas para estratificação do risco (3).

Devido à importância das mutações do RAS e da via MAPK presente em diversas neoplasias, os inibidores terapêuticos são um dos principais focos de pesquisa na área, como tal, vários inibidores da MEK foram desenvolvidos e investigados em modelos pré-clínicos e clínicos, sendo os resultados obtidos bastante promissores, sugerindo que estes inibidores, isoladamente ou em combinação com outras terapêuticas convencionais podem ter um papel significativo no tratamento da patologia. Nalguns estudos foi também observado que alguns doentes com MM apresentam mutações BRAF (*B -Raf. proto-oncogene, serine/threonine kinase*) podendo beneficiar de uma terapêutica com inibidores BRAF, cuja atividade clínica já foi comprovada (3,28).

4.1.2.3.3. Via JAK/STAT

A via JAK/STAT (*janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) é uma das cascatas principais de sinalização intracelular na transdução de sinais extracelulares para o núcleo, de modo a controlar a expressão genética, sendo que diversas citocinas e fatores de crescimento utilizam esta via (29).

A família JAK, contém quatro tirosina-cinases citoplasmáticas, nomeadamente, a JAK1-3 e a Tyk2 (*tyrosine kinase 2*). Essas cinases vão ligar-se aos recetores das citocinas, deste modo, esta ligação resulta na dimerização do recetor, levando à ativação da atividade da JAK cinase. As JAKs ativadas subsequentemente irão fosforilar o domínio citoplasmático do recetor. Desta forma, o complexo JAK- citocina recetor ativado recruta e fosforila fatores de transcrição específicos, denominados por proteínas STAT. A fosforilação das proteínas STAT resulta na sua dimerização e na posterior translocação para o núcleo, onde irão interagir com vários elementos reguladores da expressão genética (29).

A via JAK-STAT encontra-se constitutivamente expressa em 50% das amostras de mieloma, bem como em células estromais da medula óssea. A ativação desta via leva à hiperatividade da STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), que resulta na expressão elevada de proteínas antiapoptóticas, como a BCL-XL (*B cell CLL/lymphoma extra large*), uma proteína relacionada com a resistência à quimioterapia em doentes com MM. No entanto, estudos recentes verificaram que a sobreexpressão de proteínas anti-apoptóticas pode não depender da ativação de STAT3, portanto o papel dessa via na patogénese do mieloma ainda precisa ser mais bem esclarecido. O envolvimento específico da via JAK/STAT em várias neoplasias hematológicas, torna-a alvo ideal para intervenção farmacológica, e como tal, várias estratégias foram propostas para inibir ou modular esta via, surgindo então, os inibidores de JAK, cuja eficácia terapêutica é observada (3,29).

4.1.2.3.4. Via da fosfatidilinositol 3- cinase (PI3K)

As PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) são uma família de enzimas intracelulares que gera o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). O PIP3 fornece um local de acoplamento da membrana para a AKT (*protein kinase B*), a qual regula

positivamente os sinais de expressão do fator tecidual, coagulação, proliferação e sobrevivência celular. A desregulação da via de sinalização PI3K/AKT é frequentemente relatada diversos tipos de cancros, incluindo neoplasias hematológicas, como leucemia, linfoma e mieloma múltiplo. No MM esta desregulação assume grande importância, uma vez que foi demonstrado que a AKT se encontra fosforilada em cerca de 50% dos casos de MM, o que constitui um indicador de atividade desta via (3,30,31).

Assim, a hiperativação desta via confere resistência à quimioterapia e um prognóstico desfavorável, enquanto a inibição da PI3K ou AKT leva à morte das células cancerígenas. Portanto, a via PI3K/AKT é considerada um alvo ideal para a intervenção terapêutica. Na verdade, vários inibidores da via PI3K/AKT foram identificados, como o *Idelalisibe*, NVP-BKM120 e a perifosina, dos quais já alguns apresentam sucesso na avaliação clínica (30,31).

4.1.2.4 Alterações epigenéticas

Para além do papel, anteriormente mencionado, das alterações genéticas no microambiente e na patogénese do MM, tornou-se cada vez mais claro que a maquinaria epigenética também desempenha um papel fundamental no MM. Assim, as alterações epigenéticas como a metilação do DNA, a modificação de histonas e a expressão anormal de microRNAs (miRNA) estão implicadas na patogénese do MM. É relevante salientar, que estas epimutações estão frequentemente associadas à instabilidade genómica, proliferação, resistência a medicamentos, à progressão do MM e à curta sobrevivência livre de progressão. Além disso, as alterações epigenéticas, também estão ligadas à plasticidade das células do MM, o que leva à diferenciação destas células para um estado menos maduro e resistente a medicamentos (32,33).

4.1.2.4.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é a alteração epigenética mais estudada e tem um enorme impacto na estabilidade do genoma e nos padrões de expressão genética. A metilação do DNA nos dinucleótidos CpG (citosinas que precedem guaninas) tem sido associada à repressão genética estável e permanente. No entanto, agora é sabido que a metilação

do DNA é um processo reversível. Os estudos de metilação do DNA concluíram que as células cancerígenas, incluindo as células do MM, são geralmente caracterizadas por uma hipometilação global do DNA e hipermetilação dos genes supressores de tumores. Como tal, nalguns estudos foi observado que, nos pacientes com MM, os elementos repetitivos LINE-1 (*long interspersed nuclear element-1*), Alu e SAT-a são hipometilados, correlacionando-se com a instabilidade genómica, a progressão da doença e um prognóstico desfavorável. O MM também é caracterizado pela hipermetilação, levando ao silenciamento de vários genes relacionados com o cancro, incluindo, p53, p15, p16, DAPK1, BNIP3, RB1, DIS3, CDKN2A e o CDKN2C, tendo-se ainda verificado que a hipermetilação do promotor dos genes p16, BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B protein-interacting protein 3*), DAPK1 (*death-associated protein kinase*) encontra-se associada a um prognóstico desfavorável. Recentemente, foi também demonstrado que o RASSF4 (*Ras Association Domain Family Member 4*), que é responsável por mediar os efeitos antitumorais do RAS, também é silenciado por metilação do promotor durante a progressão do MM, estando associado a um mau prognóstico. Embora rara, foi relatada a ocorrência da hipometilação promotora do ligando JAG2 (*Jagged Canonical Notch Ligand 2*), em células plasmáticas malignas de pacientes com GMSI e MM. Essa sobreexpressão do JAG2, leva ao aumento na secreção dos fatores de crescimento, tais como IL-6, VEGF e IGF-1 em células estromais, sugerindo que a hipometilação do DNA do promotor JAG2 pode ser um evento precoce na patogénese do MM. A metilação do DNA, também demonstrou regular a expressão de genes de microRNAs com funções supressoras tumorais. Zhang *et al.* definiram o miR-152, o miR-10b-5p e o miR-34c-3p, como os microRNAs supressores de tumores cuja expressão é prejudicada pela hipermetilação do DNA no MM. É importante ressaltar que, através de uma análise global a nível do genoma (*genome-wide*) dos padrões de metilação do DNA, averiguou-se que esses padrões mudam durante a progressão do MM (32,33).

As alterações mais significativas na metilação do DNA, influenciando a sobrevivência celular, a progressão do ciclo celular e a reparação de DNA, são observadas em translocações t (4; 14), presente em 15-20% dos doentes com MM e associada a um prognóstico desfavorável (3,32).

Os mecanismos subjacentes aos padrões anormais da metilação do DNA no MM são atualmente desconhecidos, existindo, no entanto, cenários possíveis que podem explicar parcialmente essas alterações. Esses dados indicam a importância da metilação do DNA na patogénese do MM e, de facto, sugerem que os componentes ativos nos mecanismos e perfis de metilação do DNA são alvos importantes para a terapêutica a ser utilizada no MM (33).

4.1.2.4.2 Modificações das histonas

Nos eucariotas, a cromatina é constituída por múltiplos nucleossomas, que consistem num octâmetro de histonas, composto por 4 histonas (H2A, H2B, H3, H4) e a histona ligante H1. As histonas apresentam caudas do terminal N que se projetam do nucleossoma, que são alvo de modificações reversíveis, incluindo a acetilação, fosforilação, desaminação, ubiquitinação ou sumoilação em diferentes resíduos de aminoácidos, mais frequentemente lisina, arginina e serina. Estas modificações são chamadas modificações pós-traducionais (PTMs) de histonas, que alteram a estrutura e a densidade da cromatina, que por sua vez influencia a acessibilidade do DNA para a maquinaria de transcrição e outros processos relacionados com o DNA, como a reparação, a replicação e recombinação do DNA. A acetilação, metilação e fosforilação das histonas representam as modificações pós-traducionais mais estudadas devido ao seu papel crucial na regulação da transcrição dos genes (3,32,33).

A acetilação das histonas é uma das modificações pós-traducionais das histonas mais bem estudada. Este processo é mediado por duas famílias diferentes de enzimas: as histonas acetiltransferases (HATs) e as histonas desacetilases (HDACs). As HATs estão correlacionadas, com a transcrição ativa e as HDACs estão relacionadas, com o silenciamento transcricional. Recentemente foram encontradas, em pacientes com MM, mutações nas histonas acetiltransferases (HATs) codificadas por genes como o EP300 (*histone acetyltransferase p300*) e o CREBBP (*CREB binding protein*). Especificamente, mutações no gene CREBBP foram significativamente observadas em pacientes com MM recidivo, sugerindo um possível envolvimento na resistência a medicamentos. Por sua vez, a hiperexpressão das HDACs é encontrada em pacientes com MM, onde há níveis elevados de HDACs de Classe I (HDAC 1-3 e 8) sendo um indicativo de um prognóstico desfavorável no MM. Coletivamente, estes dados

sugerem que as atividades desreguladas das HATs e das HDACs podem contribuir para o fenótipo maligno do MM (32,33).

A metilação das histonas é uma modificação pós-traducional mais complexa do que a acetilação das histonas. A metilação ocorre principalmente nos resíduos de lisina ou arginina das histonas H3 e H4 e é mediada por histonas metiltransferases (HMTs) e histonas demetilases (HDMs). Em geral, a metilação da H3K4, H3K36 e H3K79 está associada à ativação dos genes, enquanto a metilação da H3K9, H3K27 e H4K20 está associada ao silenciamento dos genes. As enzimas de metilação das histonas também têm como alvo proteínas não-histonas, que influenciam importantes vias celulares, incluindo as vias NFkB, RAS, PI3K/Akt, Wnt β -catenina e P53. Uma das HMTs mais estudadas no MM é a lisina metiltransferase MMSET. A translocação t (4; 14), como foi dito anteriormente, leva à hiperexpressão do gene MMSET e do FGFR3 estando associada a uma sobrevida global mais curta. No MM, a hiperexpressão do MMSET resulta no aumento dos níveis de H3K36me₂, causando ativação transcricional dos oncogenes e promovendo a transformação oncogénica das células primárias. Os estudos do perfil de expressão génica revelaram que o gene MMSET regula outros genes envolvidos na via P53 (p. ex. BAX e Bcl2), na apoptose, na regulação do ciclo celular (p. ex. ciclina E2), na adesão e na reparação do DNA. O silenciamento deste gene pode afetar negativamente a sobrevivência e a adesão dos plasmócitos tumorais, além disso, este silenciamento aumentou a sensibilidade ao tratamento com melfalano in vivo. Mais recentemente, o MMSET demonstrou metilar a Aurora cinase A (AURKA), resultando na degradação do p53, aumentando assim a proliferação nos tumores sólidos. Finalmente, foi demonstrado que o MMSET desempenha um papel na resposta a danos no DNA. Assim, este representa um alvo terapêutico interessante no MM, contudo, até o momento, ainda não existem comercialmente inibidores potentes específicos do MMSET (32,33).

Outra HMT estudada é o *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2), cuja subunidade catalítica EZH2 (*enhancer of zeste 2*) pode mediar os três estados de metilação da lisina 27 na histona H3 (H3K27), levando ao silenciamento dos genes através da sua trimetilação (H3K27me₃). Além disso, o EZH2 também pode metilar proteínas não-histonas como a STAT3, levando ao aumento da atividade desta proteína. A hiperexpressão de EZH2 em MM tem sido associada à estimulação do IL-

6R, ativação do c-MYC e à regulação negativa de miR26a. Por fim, também foi relatado que o EZH2 está envolvido na doença óssea associada ao MM. No estudo do perfil de expressão genética verificou-se que o EZH2 está correlacionado com a progressão e o prognóstico da doença. Recentemente, o EZH2 tornou-se um tema importante no MM e a sua inibição farmacológica tem sido extensamente estudada, como evidenciado pelo grande número de publicações dos últimos anos (32,33).

4.1.2.4.3. Expressão anormal de microRNAs (miRNAs)

Os microRNAs (miRNAs, miRs) são pequenas moléculas de RNA não codificantes endógenas, que regulam a expressão genética, induzindo a degradação do RNA mensageiro (mRNA) ou inibindo a sua tradução. A importância dos miRNA na regulação de vários processos celulares, incluindo a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose, foi destacada em vários estudos. As suas funções reguladoras encontram-se frequentemente alteradas no cancro, tendo um elevado impacto em diferentes tipos de neoplasias, incluído o MM, visto que foram observados vários mecanismos relacionados com a expressão e a função anormal de miRNAs. A análise global da expressão de miRNAs nesta patologia também revelou a existência de relevância clínica, pois a análise permitiu correlacionar a expressão de miRNAs à progressão da doença, subtipo molecular, sobrevivência e resposta ao tratamento (3,33).

Os miRNAs desempenham papéis substanciais na regulação negativa pós-transcricional de metade dos genes codificadores de proteínas no genoma humano, incluindo oncogenes e genes supressores de tumores, por meio da ativação de várias vias de sinalização associadas ao MM, incluindo a via de sinalização NF- κ B, interleucina (IL) 6, via de sinalização da transcrição (STAT) 3, P53, via de sinalização PI3K/AKT. De facto, os miRNAs são reguladores críticos da iniciação, progressão e disseminação do cancro, atuando como "oncomiRs" se seus alvos são os genes supressores de tumores e a sua expressão é aumentada em células cancerígenas, promovendo o desenvolvimento tumoral ou como "miRNAs supressores de tumores" (TS-miRs), se os seus alvos são oncogenes e a sua expressão é regulada negativamente nas células tumorais (34–36).

Vários grupos de investigadores avaliaram o perfil de expressão de miRNAs, *in vitro* e *in vivo*, utilizando plasmócitos normais, amostras de GMSI, amostras de MM e linhas de células MM, a fim de fornecer informações sobre o papel funcional dos miRNAs nesta patologia. Esta análise revelou que a expressão do miR-21 se encontra aumentada em amostras de GMSI e MM, em comparação com os plasmócitos normais, demonstrando que a expressão do miR-21 tem um impacto na sensibilidade das células MM ao tratamento farmacológico citotóxico, uma vez que a inibição do miR-21 sensibiliza as células do mieloma à dexametasona e à doxorrubicina. Também se identificou que o miR-21 está sob o controlo da via de sinalização da IL-6, através de um mecanismo envolvendo STAT3, indicando um papel oncogénico para este miRNA. Todos estes dados sugerem que a expressão do miR-21 pode estar envolvida na iniciação, progressão e resposta do MM aos agentes terapêuticos (33).

Foram igualmente identificados outros microRNAs, como o miR-32, miR-17-92, miR-106b25 e miR-181a/b, os quais apresentam uma regulação positiva nas linhas celulares do MM. Além disso, o cluster miR-106b-25 e miR-181a/b também têm uma regulação positiva nos pacientes com GMSI, sendo que o facto desses miRNAs terem demonstrado ter como alvo os genes supressores de tumores, indicando que esses miRNAs poderiam predispor ao desenvolvimento de MM. Por outro lado, os clusters miR-32 e miR-17-92 apresentaram elevada expressão apenas em pacientes com MM, sugerindo que esses miRNAs poderiam estar envolvidos na patogenicidade do MM. Os pacientes com MM apresentaram níveis aumentados de miR-221, miR-222, miR-382 e miR-181a/b em comparação com os controlos, enquanto os níveis de miR-15 e miR-16, que estão localizados no cromossoma 13q14, uma área geralmente excluída no MM, estão diminuídos nos pacientes com MM ou ausentes nos pacientes portadores da deleção do cromossoma 13. Ora, o miR-221/222, demonstrou promover o crescimento das células do MM através da regulação negativa do CDKN1C (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C*) e do TEN (*phosphatase and tensin homolog*). Já o cluster miR-15/16 pode funcionar como um supressor tumoral no MM, pois a sua hiperexpressão leva à inibição das vias AKT3 e NF-κB, à regulação negativa das proteínas do ciclo celular, incluindo ciclina D1, ciclina D2 e a CDC25A e à supressão da angiogénese *in vitro* e *in vivo* (33).

O miR-29b é subexpresso no MM e conhecido por controlar a expressão das DNMTs, a DNMT3A e DNMT3B, levando a um perfil aberrante da metilação do DNA em células do MM. Além disso, o miR-29b demonstrou desempenhar um papel importante na remodelação óssea, pois a hiperexpressão do miR-29b nos osteoclastos reduz a reabsorção óssea *in vitro*, sugerindo sua contribuição para a doença óssea relacionada com o mieloma. Por fim, o miR-34a, é um exemplo de um miRNA supressor de tumor, onde o alvo é o p53 e apresenta-se subexpresso. A expressão ectópica do miR-34a nas células do MM mostrou atividade anti-MM *in vitro* e *in vivo* através da inibição do crescimento celular e indução da apoptose (33–36).

Estes dados indicam nitidamente que a desregulação da expressão de microRNA no mieloma múltiplo afeta várias vias extrínsecas e intrínsecas, levando a um aumento da sobrevivência e proliferação das células malignas.

4.2. O microambiente da medula óssea no mieloma múltiplo

O microambiente ósseo é dividido num compartimento celular e não celular. O compartimento celular é composto por células hematopoiéticas e não hematopoiéticas. As células hematopoiéticas incluem as células mieloides, linfócitos T e B, célula *natural killer* (NK) e osteoclastos, enquanto as células não hematopoiéticas incluem as células estromais da medula óssea, células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea, osteoblastos, fibroblastos, adipócitos, vasos sanguíneos e as células endoteliais. No compartimento não celular compreende a matriz extracelular mineralizada e as várias citocinas, fatores de crescimento (por exemplo, IL-6, IGF-1, VEGF, bFGF), moléculas de adesão, hormonas e exossomas que são produzidos pelo compartimento celular (1,35,37).

O microambiente da medula óssea (MO) tem um papel central na patogénese do mieloma múltiplo. As células do mieloma crescem quase exclusivamente na medula óssea, o que ressalta a importância do microambiente da MO no apoio ao crescimento e à sobrevivência destas células. As interações complexas funcionais e bidirecionais entre as células do MM e os diferentes compartimentos da MO, não só promovem a sobrevivência, proliferação e migração das células do mieloma, mas também contribuem para o desenvolvimento da resistência aos medicamentos, osteólise, aumento da angiogénese e supressão imunológica (1,32).

Assim, a interação física entre as células do mieloma com as células estromais da medula óssea e os osteócitos desencadeia uma cascata de ativação das vias proliferativas e antiapoptóticas. A ativação da via NF- κ B nas células estromais leva à secreção de citocinas proliferativas, antiapoptóticas e quimiotáticas, como a interleucina (IL) -6, o fator 1 derivado de células estromais e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), que acabam levando à progressão da doença. Ainda, é importante salientar o papel da IL-6, que, por sua vez, aumenta a secreção do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) pelas células do MM que impulsionam o crescimento de novos vasos sanguíneos na medula óssea, logo promovem a progressão tumoral. Também se demonstrou em vários estudos, que as células estromais da medula óssea liberam exossomas que são vesículas do tamanho de nanómetros, contendo proteínas, lípidos e microRNAs, que são transferidas para as células do MM (37).

Os osteoclastos também produzem uma série de fatores, como o IL6 e AXII, que estimulam o crescimento celular e evitam a apoptose das células do MM, bem como, atuam como células angiogénicas e podem contribuir para o aumento da densidade dos microvasos. Além disso, a reabsorção óssea osteoclástica liberta fatores de crescimento da matriz, como o IGF-1, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o TGF- β , que promovem o crescimento das células do MM. Para além disto, devido ao papel no crescimento das células do mieloma, é interessante notar que, com raras exceções, a inibição da atividade dos osteoclastos tem pouco efeito no prolongamento da sobrevivência global nesses pacientes, contudo, a terapêutica dirigida aos osteoclastos reduz significativamente ou atrasa os eventos relacionados à doença óssea, associada a esta patologia (1,37).

Evidências recentes sugerem que os adipócitos também desempenham um papel importante no MM. A interação dinâmica entre osteoblastos e os adipócitos, que estão presentes em número elevado na medula óssea, apoiam o crescimento e a proliferação das células do MM e evitam a apoptose induzida por quimioterapia, através da secreção de fatores, como o IL-6, TNF- α , MCP-1 e insulina. Contudo, a adipocina e a adiponectina, reduz a proliferação do MM e induz a morte das células do MM, e foram observados níveis circulantes reduzidos de adiponectina em pacientes

com GMSI que desenvolveram MM, sendo estudado o seu uso potencial no tratamento farmacológico (1,37).

A progressão do MM é auxiliada pela sua capacidade de ultrapassar o sistema imunológico normal do hospedeiro. O MM modifica verdadeiramente a função imunológica do microambiente da medula óssea. Nestes casos, há uma mudança na composição da população de linfócitos presentes no microambiente da medula óssea, como tal, sabe-se que as células T modulam a diferenciação, sobrevivência e atividade das células ósseas. Vários estudos relataram que as células T reguladoras CD4 + que produzem IL-17 estão aumentadas na medula óssea dos pacientes com MM, sabe-se ainda que a IL-17 tem sido envolvida na sobrevivência das células MM e na destruição óssea lítica. Além disso, o IL-6 e o TGF β apresentam níveis elevados no microambiente da medula óssea. Estes criam um ambiente imune privilegiado para as células mieloides, como tal o aumento do número desses linfócitos nos pacientes com MM se correlaciona com um menor tempo de progressão e uma menor sobrevivência global. Essas células também secretam fatores que promovem o desenvolvimento de osteoclastos e subsequente doença óssea no mieloma múltiplo. As células T citotóxicas CD8 + e as células NK nos pacientes com MM são funcionalmente diferentes daquelas dos pacientes saudáveis, apresentando expressão aumentada, na superfície celular, do recetor da proteína de morte celular programada-1 (PD1), que ativa vias internas que acabam inibindo a atividade anti tumoral natural dessas células (1,37).

5. Marcadores de diagnóstico e estadiamento

Os critérios de diagnóstico do *International Myeloma Working Group* (IMWG) são os mais amplamente aceites e utilizados. Logo, o diagnóstico deve ser feito de acordo com esses critérios, que têm como base a infiltração medular por células de MM, os níveis séricos de proteínas monoclonais (proteína M), e ainda os critérios CRAB que incluem hipercalcémia, insuficiência renal, anemia e lesão óssea (*CRAB – calcium elevation, renal insufficiency, anemia and bone disease*). Assim, são realizados testes laboratoriais, biópsia medular óssea e exames radiológicos. Os testes laboratoriais compreendem um hemograma completo, análise à creatinina, lactato desidrogenase (LDH), β 2-microglobulina e eletrólitos, incluindo cálcio, eletroforese de proteínas séricas com quantificação da proteína M e pesquisa de cadeias leves de

imunoglobulinas livres séricas (CLL). A título de exemplo, no caso do biomarcador LDH, níveis acima do limite superior do normal indicam um aumento da agressividade da doença. Além disso, são realizadas análises à urina, usando uma amostra de urina de 24 horas para eletroforese de proteínas totais e proteínas séricas (como a proteína M) com imunofixação. O aspirado medular ósseo e a biópsia óssea são importantes para o diagnóstico, no que permite efetuar-se alguns estudos, como a imuno-histoquímica e/ou imunofenotipagem por citometria de fluxo e a análise citogenética por FISH. As sondas FISH devem detetar a presença das anomalias citogenéticas que têm significado prognóstico no MM, como a del13, del17p, t (4; 14), t (11; 14), t (14; 16) e anomalias no 1q21. Observou-se que a presença da deleção 17 p ou da translocação t (4; 14) e t (14; 16) está associada a uma sobrevivência global mediana de 24,5 meses em comparação com uma sobrevivência global mediana de 50,5 meses para os pacientes sem alterações citogenéticas (1,35).

Quanto às lesões ósseas, como se sabe são uma característica da patogénese do MM. No diagnóstico inicial, a radiografia do esqueleto (raio-X) é o exame de referência utilizado na avaliação das lesões ósseas. Na radiografia, as lesões de MM apresentam aparência osteolítica perfurada, porém pelo menos 50% do osso trabecular envolvido, necessita estar destruído para que essas lesões ósseas sejam detetadas por esta técnica. No caso, de áreas sintomáticas que não apresentam alterações na radiografia ou zonas suspeitas que necessitem de ser clarificadas devem ser avaliadas por técnicas de imagem mais sensíveis, como a ressonância magnética (RM), a tomografia computadorizada (TC), a tomografia por emissão de positrões (PET) e a PET-TC. As TCs, conseguem detetar lesões com <5% de destruição óssea trabecular. A ressonância magnética (RM), idealmente de corpo inteiro, é uma técnica muito sensível, pelo que é usada para detetar a doença óssea e o envolvimento dos tecidos moles, portanto, o IMWG difundiu uma declaração de consenso que descreve as indicações para o seu uso no MM, pelo que deve ser usada em doentes com suspeita de MM, mas com ausência de características de CRAB e em pacientes com GMSI. No entanto, as RM corporais não estão amplamente disponíveis, pelo que, a PET/TC está a ser utilizada de forma mais generalizada, pois tem a capacidade de detetar lesões extramedulares, ao contrário de outras técnicas de imagem (1,4).

O diagnóstico diferencial mais importante em pacientes com MM, envolve a sua distinção entre doentes com GMSI ou MMA. Os critérios de diagnóstico para GMSI, MMA e MM estão descritos na tabela 1.1. O diagnóstico de GMSI é definido por uma concentração sérica de proteína M inferior a 3 g/dL, uma razão alterada de cadeias leves livres (CLL) (<0,26 ou > 1,65), menos de 10% de células plasmáticas clonais na MO e ausência de eventos que definem o MM, como a ausência de lesões nos órgãos alvo e de biomarcadores malignos. Por sua vez, o diagnóstico de MMA compreende a deteção de uma concentração sérica de proteína M sérica superior a 3 g/dL, infiltração medular de células de MM a 10-60% e, igualmente, ausência de eventos que definem o MM. Por fim, o diagnóstico de MM inclui a plasmocitose medular (>10%), a presença da proteína M no soro e/ou urina e a presença dos eventos que definem o mieloma múltiplo, como os critérios CRAB (38).

Tabela-1.1 Achados clínicos e laboratoriais presentes na Gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI), no mieloma múltiplo assintomático (MMA) e no mieloma múltiplo (MM). Adaptado de (1).

GMSI	<p>Todos os seguintes critérios devem estar presentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteína monoclonal sérica <3g/dl; ▪ <10% de plasmócitos no exame à MO; ▪ Ausência de lesão em órgão-alvo atribuível ao distúrbio plasmocitário em causa. Presença de hipercalcémia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas (CRAB);
MMA	<p>Ambos os critérios devem estar presentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteína monoclonal sérica (IgG ou IgA) ≥3g/dl ou proteína monoclonal urinária ≥500mg/24h e/ou (10%-60%) de plasmócitos no exame de MO; ▪ Ausência de lesão de órgão-alvo tal como: hipercalcémia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas, atribuível ao distúrbio plasmocitário em causa.
MM	<p>Todos os seguintes critérios devem estar presentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ ≥10% de plasmócitos no mielograma ou existência de plasmocitoma comprovado por biópsia; ▪ Evidência de lesão de órgão-alvo atribuível ao distúrbio plasmocitário em causa, especificamente: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hipercalcémia: cálcio sérico > 11mg/dl (2.75mmol/l); ou ▪ Insuficiência renal: creatinina sérica > 2mg/dl (177µmol/l); clearance de creatinina < 40 ml/min ou ▪ Anemia normocrômica, normocítica com valor de hemoglobina < 10g/dl ou > 2g/dl abaixo do limite inferior do normal ou lesões ósseas: ≥1 lesão osteolítica na radiografia convencional, TC ou TEP-TC; osteopenia severa; fraturas patológicas. <p>Na ausência de lesões de órgão-alvo, presença de eventos definidores de MM:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Plasmócitos na MO ≥ 60%; ▪ Relação CLL ≥100 (excesso de κ) ou <0.01 (excesso de λ); ▪ ≥2 lesões focais, com evidência de envolvimento ósseo ou doença extramedular, detetadas por estudos RMN (cada lesão focal ≥5mm).

O sistema de estadiamento utilizado é o *International Staging System (ISS)*, que se baseia nos níveis séricos de albumina e da β2-microglobulina. O ISS estratificou os

pacientes em três estádios: o estágio I, inclui pacientes com níveis de albumina e β 2-microglobulina $\geq 3,5$ g / dL e $<3,5$ mg / L, respetivamente (sobrevivência global média de 62 meses); o estágio II inclui pacientes não considerados no estágio I ou III (sobrevivência global média de 44 meses); e o estágio III inclui pacientes com nível de proteína β 2-microglobulina $\geq 5,5$ mg / L (sobrevivência global média de 29 meses). Para criar uma medida de prognóstico mais robusta, o ISS foi revisto em 2015 e foram adicionados outros marcadores, que são as alterações citogenéticas, nomeadamente, as alterações de alto risco genético, como a presença de translocações t (4;14) e t (14;16) e deleções del (17p), e também, os níveis de LDH sérico. Assim, atualmente, o Sistema de Estadiamento Internacional, em conjunto com as alterações citogenéticas, é o método mais amplamente utilizado para a avaliação do prognóstico (ver tabela 1.2)(1,35).

Tabela- 1.2 Sistema de Estadiamento Internacional.

Estádio	Sistema de Estadiamento Internacional	Sistema de Estadiamento Internacional Revisto
I	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Níveis séricos de β2-microglobulina < 3.5 mg/L ▪ Albumina sérica ≤ 3.5g/dL 	<p><u>Todos os critérios devem constar:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Níveis séricos de β2-microglobulina < 3.5 mg/L ▪ Albumina sérica ≤ 3.5g/dL ▪ Níveis normais de LDH ▪ Ausência de alterações citogenéticas de risco: t (4;14), t (14;16) ou del(17p)
II	Ausência de critérios que se enquadrem no estágio I ou III	Ausência de critérios que se enquadrem no estágio I ou III
III	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Níveis séricos de β2-microglobulina > 5.5 mg/L 	<p><u>Todos os critérios devem constar:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Níveis séricos de β2-microglobulina > 5.5 mg/L ▪ Presença de alterações citogenéticas de risco: t (4;14) OU t (14;16) OU del(17p) OU níveis séricos elevados de LDH

6. Abordagem terapêutica farmacológica

O tratamento para o mieloma múltiplo evoluiu gradativamente e mudou as perspectivas de sobrevivência, desde a introdução inicial dos agentes alquilantes e corticosteroides, como o melfalano e a prednisona, na década de 1960, que prolongaram a sobrevivência média, para dois a três anos. Depois, a utilização do melfalano em altas doses, seguido do transplante autólogo com células progenitoras hematopoiéticas (TAPH), que foi pioneiro na década de 1970 e aumentou a sobrevivência média para 5 anos. A inclusão adicional de inibidores do proteassoma e os agentes imunomoduladores (IMiDs), e outras classes farmacológicas, transformou durante a última década o paradigma do tratamento do MM e aumentou a sobrevivência média para mais de 6 anos. Mais recentemente, os anticorpos monoclonais foram aprovados para o tratamento do mieloma, como o daratumumab (39,40).

A terapêutica escolhida tem em consideração diversos fatores, entre os quais as características do paciente, como a idade e comorbidades, e parâmetros específicos da doença, como o estágio da doença e alterações citogenéticas. Nos últimos anos, há uma maior preocupação em usar uma terapêutica individualizada, adaptada às necessidades do doente, de modo, a prolongar significativamente a sobrevida e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. O regime terapêutico para o mieloma múltiplo, em pacientes até 70 anos de idade e que apresentam boas condições clínicas e, portanto, são considerados elegíveis para a realização do TAPH, consiste em quimioterapia mieloablativa, por até 4 meses antes da colheita das células estaminais hematopoiéticas (HSCs), durante 3 a 6 ciclos, usando, concomitantemente, dois ou três fármacos em doses elevadas, que irão funcionar como uma terapia de indução, seguida de altas doses de melfalano e o TAPH. Depois do transplante, é utilizada uma terapia de consolidação de curto prazo, e por fim uma terapia de manutenção, de modo a prolongar a resposta e com toxicidade mínima. No caso, dos pacientes mais velhos e aqueles com comorbidades relevantes, geralmente não são elegíveis para transplantação, pelo que é utilizada uma quimioterapia alternativa. Contudo, estudos mais recentes evidenciam que a idade em si não elimina o benefício desse tratamento,

e agora esses doentes podem receber tratamentos mais agressivo. As principais terapêuticas utilizadas no MM são apresentadas na figura 1.3 (41,42).

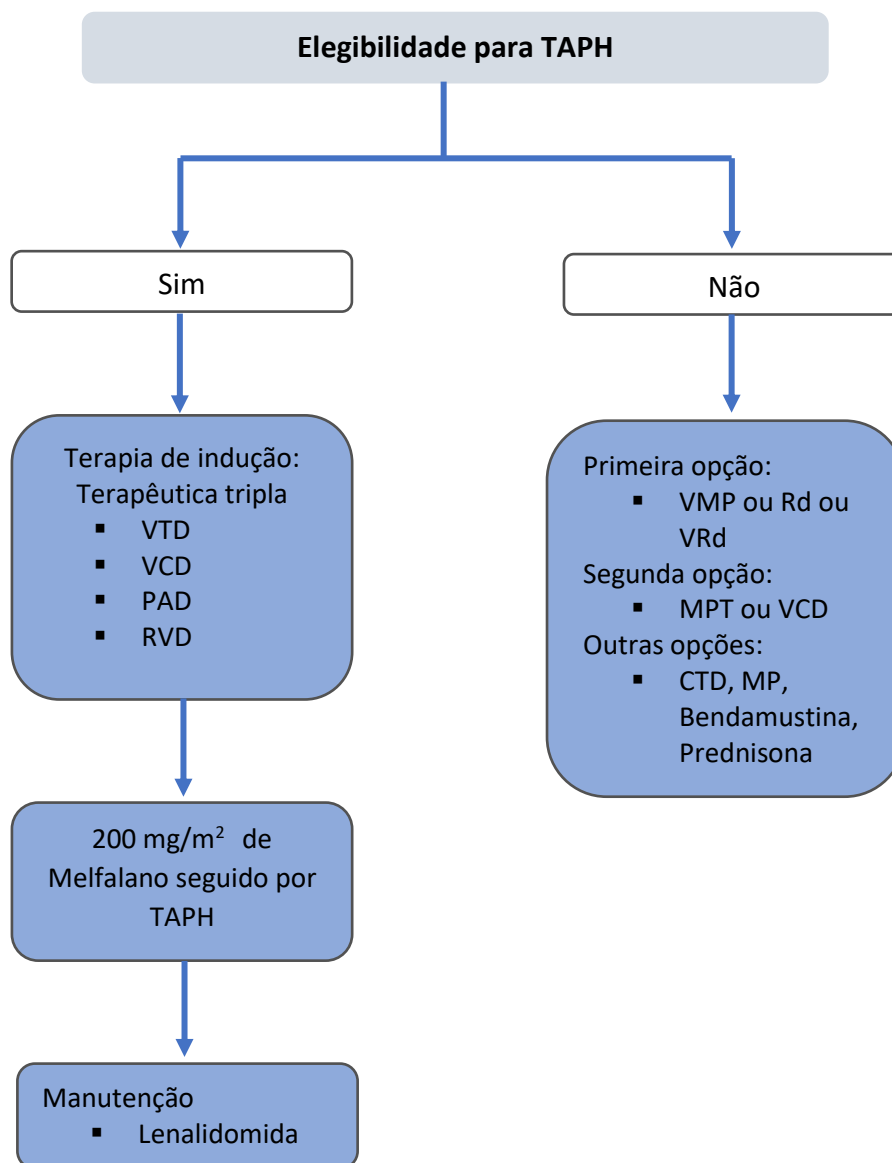


Figura 1.3.- Regimes terapêuticos usados no MM. CTD: ciclofosfamida, talidomida, dexametasona; MP: melfalano, prednisona; MPT: melfalano, prednisona, talidomida; PAD: bortezomib, doxorubicina, dexametasona; Rd: lenalidomida, dose baixa de dexametasona; RVD: lenalidomida, bortezomib, dexametasona; VCD: bortezomib, ciclofosfamida, dexametasona; VMP: bortezomib, melfalano, prednisona; VRd: lenalidomida, baixa dose de dexametasona, bortezomib; VTD: bortezomib, talidomida, dexametasona. Adaptado de (43).

Nos pacientes não elegíveis para transplante, a terapêutica a usar baseia-se em dados de estudos randomizados de fase III, pelo que as principais terapêuticas são: a VMP (bortezomib, o melfalano e a prednisona); e a terapêutica Rd (lenalidomida com dexametasona de baixa dose), em que ambas são aprovadas pela EMA. Também pode ser usada, a terapêutica com melfalano, prednisona, combinada com talidomida

(MPT), que também é aprovada pela EMA, mas os parâmetros de PFS (sobrevivência livre de progressão) e OS (sobrevivência global) são inferiores à terapêutica Rd. Outra terapêutica é com ciclofosfamida, dexametasona e bortezomib (VCD) apesar de não ser aprovada pela EMA, é amplamente utilizada e induz elevadas taxas de resposta e uma PFS prolongada. No caso, da bendamustina e a prednisona a sua utilização, também é aprovada pela EMA, nos pacientes que exibem neuropatia clínica no momento do diagnóstico, evitando o uso de talidomida através dos regimes MPT ou VMP. Outro estudo, observou, que a ciclofosfamida, com a talidomida e a dexametasona (CTD) comparativamente, à terapêutica MP (melfalano e prednisona) é superior em termos de taxas de resposta, mas não têm maior OS (43).

Os esquemas para a terapia de indução, no caso dos pacientes ilegíveis para TAPH incidem, essencialmente, na combinação de um inibidor de proteassoma (bortezomib (BZ), carfilzomib (CZ) e ixazomib (IZ)) com um medicamento imunomodulador (talidomida, lenalidomida e pomalidomida). Vários estudos demonstraram que a terapêutica tripla leva a melhores respostas terapêuticas, do que as duplas, logo combinações triplas, com bortezomib, talidomida e dexametasona (VTD) ou com a vincristina, doxorrubicina e dexametasona (VAD) tiveram melhores taxas de resposta, em comparação com a talidomida e dexametasona (TD) ou bortezomib e dexametasona (VD). Vários estudos de fase 3 compararam, ainda, as diferentes terapêuticas triplas disponíveis: o bortezomib, doxorrubicina e a dexametasona (PAD), que demonstrou taxas de resposta mais altas e sobrevivência livre de progressão (PFS) e sobrevivência global (OS) superiores à VAD; a terapêutica VCD demonstrou não ter estes parâmetros inferiores à PAD e era menos tóxica; uma comparação direta da VTD com a VCD, a VTD apresentou taxas de resposta mais elevadas que a VCD, mas esta terapêutica foi associada a uma taxa mais alta de neuropatia periférica; por último, a lenalidomida com a dexametasona de baixa dose (Rd) foi recentemente comparada, num estudo prospetivo, com a Rd juntamente com o bortezomib (VRd), e esta adição resultou num PFS e OS, significativamente superiores, bem como teve um perfil risco/benefício aceitável.

Assim, atualmente, as terapêuticas triplas, que inclui pelo menos, o bortezomib e a dexametasona, são o modelo de tratamento aconselhado e mais utilizado antes do TAPH, sendo a VTD e a VCD as terapêuticas prediletas na Europa. Contudo, é

importante notar que as terapêuticas triplas podem estar associadas a maiores riscos de toxicidade, pelo que a duração do tratamento deve ser avaliada, visto que a toxicidade associada a este regime pode ser aceitável para uma terapia de indução, que é administrada por um período relativamente curto. Como tal, é importante ter em consideração a toxicidade ao decidir sobre o tratamento mais apropriado para cada doente, atendendo a que a eficácia deve ser priorizada sempre que possível (40,41,43,44).

A terapia de consolidação é um tratamento intensivo, durante um número limitado de ciclos, com o objetivo de melhorar a resposta após o transplante, visto que reduz ainda mais a carga do tumor. A terapêutica predominante utilizada é a VTD, mas ainda não há evidências suficientes de que a terapia de consolidação deva ser aplicada sistematicamente. Por outro lado, a terapia de manutenção, geralmente é um tratamento mais prolongado, mas de menor intensidade, com o objetivo de conseguir controlar a doença a longo prazo. A terapia de manutenção com talidomida, lenalidomida ou bortezomib demonstrou ter algum benefício. Diversos estudos randomizados de fase III demonstraram que a lenalidomida, após o TAPH está associada a um aumento da OS, para mais de dois anos, em comparação com o placebo ou nos casos de nenhuma terapia de manutenção. Em 2017, o uso da terapia de manutenção com a lenalidomida, para pacientes com MM recém-diagnosticados submetidos ao TAPH foi aprovada, pela EMA e pela FDA. Estão ainda a realizar-se novos ensaios clínicos, para avaliar o uso dos medicamentos mais recentes (tais como ixazomib, carfilzomib, elotuzumab, daratumumab, vorinostat e panobinostat) para a terapia de manutenção. No caso dos pacientes idosos ou não elegíveis para o transplante, vários estudos randomizados exploraram o benefício da terapia de manutenção em termos de OS, e não demonstraram um claro benefício, bem como os medicamentos estudados não estão aprovados pela EMA, portanto, atualmente, a terapia de manutenção não pode ser recomendada em pacientes idosos (4,41,43,44).

Assim, para pacientes elegíveis para o transplante, recomenda-se utilizar uma terapêutica tripla, como a VTD, VRd ou VCD, para indução antes do TAPH, desde que haja equilíbrio entre os benefícios e os riscos. Para a manutenção, é recomendada a administração da lenalidomida, devido ao seu potencial de aumentar a PFS e a OS, para todos os pacientes nos quais é tolerada. Ainda, os pacientes com doença de alto

risco são frequentemente incluídos em ensaios clínicos no início do tratamento, pois o prognóstico é mau, utilizando os regimes convencionais (41).

Relativamente, à escolha da terapêutica para o mieloma múltiplo refratário/recidivo, depende de vários parâmetros, como a idade, comorbidades, o estado clínico, o tipo, tolerância e eficácia do tratamento prévio, opções de tratamento restantes disponíveis, toxicidade, intervalo desde a última terapêutica e o tipo de recidiva, devendo ainda pesar a qualidade de vida dos pacientes. No cenário de recidiva, são recomendados regimes triplos, que dependem sempre das primeiras linhas terapêuticas aplicadas anteriormente. No ano de 2015, a EMA havia aprovado, nestes casos, a lenalidomida em combinação com a dexametasona, e o bortezomib, em monoterapia ou em combinação com a doxorrubicina, sendo a terapêutica dupla mais utilizada. Em 2015 e 2016, com base nos resultados dos ensaios clínicos randomizados de fase III, novas combinações triplas de medicamentos foram aprovadas pela EMA. E o panobinostat, em combinação com o bortezomib e dexametasona, agora é indicado para o tratamento de pacientes com MM recidivo que receberam pelo menos duas terapêuticas medicamentosas anteriores, incluindo o bortezomib e um agente imunomodulador. Outras terapêuticas, que também foram aprovadas são o carfilzomib (inibidor de proteassoma) na dose de $27\text{mg}/\text{m}^2$ em combinação com a lenalidomida e a dexametasona; o carfilzomib na dose de $56\text{mg}/\text{m}^2$, concomitantemente, com a dexametasona; o elotuzumab (anti-SLAMF-7) em combinação com a lenalidomida e a dexametasona, que aumenta a PFS; o ixazomib, concomitantemente, com lenalidomida e a dexametasona. No MM recidivo em doentes com um estágio muito avançado, dois outros medicamentos são aprovados pela EMA, que são: a pomalidomida, combinada com a dexametasona em baixa dose, sendo usada geralmente em pacientes que fizeram pelo menos duas terapias prévias, que incluíam a lenalidomida e o bortezomib; e o daratumumab, direcionado para o CD38, em doentes, cujo tratamento anterior abrangia, um inibidor de proteassoma e um agente imunomodulador. Em pacientes jovens, pode ser considerado um segundo TAPH, desde que o paciente tenha respondido bem ao transplante anterior e tenha uma sobrevivência livre de progressão de mais de 24 meses. Na situação de recaída, um transplante de medula óssea alogénico deve ser realizado, apenas no contexto de

participação num ensaio clínico. Os possíveis regimes terapêuticos para o MM refratário/recidivo é apresentado na figura 1.4 (4,41,43).

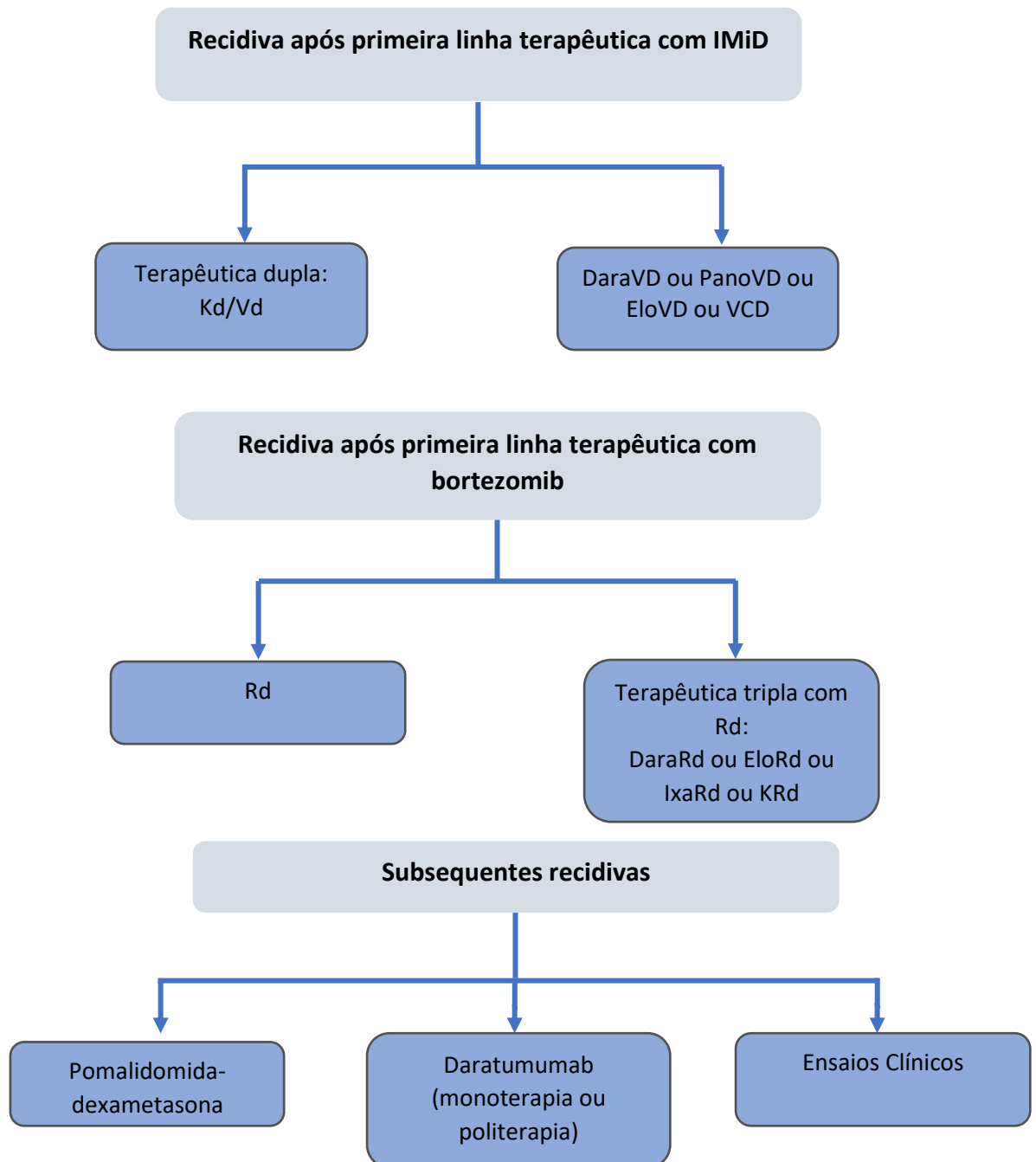


Figura 1.4.- Tratamento no caso de recidiva. DaraRd, daratumumab, lenalidomida, dexametasona de baixa dose; DaraVD, daratumumab, bortezomib, dexametasona; EloRd, elotuzumab, lenalidomida, dexametasona de baixa dose; EloVD, elotuzumab, bortezomib, dexametasona; IxaRd, izaxomib, lenalidomida, dexametasona de baixa dose; KRd, carfilzomib, lenalidomida, dexametasona de baixa dose; PanoVD, panobinostat, bortezomib, dexametasona; Rd, lenalidomida, dexametasona de baixa dose; VCD, bortezomib, ciclofosfamida, dexametasona; Vd, bortezomib, dexametasona de baixa dose. Adaptado de (43).

Portanto, as principais classes de fármacos usadas no tratamento do MM são: corticosteroides, agentes alquilantes, agentes imunomoduladores (talidomida, lenalidomida e pomalidomida), inibidores do proteossoma (bortezomib, carfilzomib e ixazomib), anticorpos monoclonais (daratumumab e elotuzumab) e um inibidor da histona deacetilase (panobinostat).

6.1. Corticosteroides

Os corticosteroides, dexametasona e prednisona estão entre os agentes mais antigos para o tratamento de neoplasias hematológicas, incluindo linfomas, leucemias e MM, sendo amplamente utilizados no MM. Sabe-se que os corticosteroides se ligam a recetores de glicocorticóides (GRs). Esses GRs ativados podem ativar as vias de sinalização na membrana celular, como a via MAPK, além disso, afetam a transcrição genética, por meio de interações inibitórias dos corticosteroides com alguns fatores de transcrição, incluindo o fator nuclear NF- κ B e a proteína ativadora-1 (AP-1). Contudo, o tratamento com estes, a longo prazo, deve ser ponderado, devido à possível elevada toxicidade para o paciente, podendo causar insuficiência suprarrenal periférica (40,45,46).

6.2. Agentes alquilantes

Os agentes alquilantes, como o melfalano, ciclofosfamida e bendamustina, atuam formando adutos bifuncionais, com ligações cruzadas entre as duas cadeias de DNA, essas ligações deformam a dupla hélice do DNA, afetando a síntese e replicação do DNA e a proliferação celular, levando à apoptose e a uma ação citotóxica (38,47).

6.2.1. Melfalano

O melfalano, foi aprovado em 1964, ainda é bastante utilizado e essencial na terapêutica do MM, devido à sua eficácia, bom perfil de segurança e custo, no entanto, está associado a uma possível toxicidade e desenvolvimento de resistência. Quanto à sua indicação de administração, pode ser administrado em altas doses por via intravenosa em pacientes mais jovens, como terapia de indução antes do TAPH, enquanto que em pacientes não elegíveis para o transplante, o melfalano é administrado na sua forma oral, em terapias combinadas com IMiD, IPs, mAbs e/ou

Prednisona. Outra característica importante do melfalano oral, é que devida à sua toxicidade limitada, pode exercer uma função paliativa (47,48).

6.2.2. Bendamustina

A bendamustina surgiu na década de 1960, mas, só recentemente, tem sido investigado o seu potencial no tratamento do MM. Ensaio clínicos recentes indicaram, que há eficácia da bendamustina, em regimes combinados, tais como, a terapêutica tripla de bendamustina com lenalidomida e dexametasona (BLD), que demonstrou ser eficaz e segura nos pacientes com MM refratário; a combinação tripla de bendamustina com bortezomib e dexametasona, também mostra ter uma atividade antimielóide notável e uma toxicidade tolerável em pacientes com MM previamente tratados, bem como, a combinação da bendamustina com talidomida e prednisolona, exibiu ser bem tolerada e eficaz. Atualmente, estão a decorrer muitos ensaios clínicos de fase 1 e 2 para pesquisar a terapêutica tripla da bendamustina com carfilzomib e dexametasona em pacientes refratários, e ainda a combinação da bendamustina, melfalano e carfilzomib como terapia de indução antes do TAPH (49,50).

6.3. Agentes imunomoduladores (IMiDs)

Os IMiDs, como talidomida, lenalidomida e pomalidomida, são utilizados no tratamento do MM e atuam através da ativação imune e inativação do TNF- α , da angiogénese e da proliferação e têm como alvo os plasmócitos no microambiente da medula óssea. A interação dos IMiDs com o MM é complexa, mas bem estudada. Pensa-se que os IMiDs inibem o crescimento celular do MM. Como foi descrito anteriormente, a proliferação celular das células do MM aumenta quando estão em contato com o microambiente da MO e isso cria um meio confortável para que essas células prosperem ainda mais, resultado na progressão da doença e resistência a medicamentos (40,51).

Os IMiDs, levam à morte das células do mieloma, através de diferentes mecanismos de ação, tais como: modificações no microambiente da MO, que afetam indiretamente as células do mieloma; interferem na expressão das moléculas de adesão, osteoclastos e na regulação negativa do fator de transcrição PU.1 e das células reguladoras T; também, inibem a génese da IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α , e tanto a IL-6

quanto o TNF- α estimulam o crescimento das células do mieloma, portanto, a inibição dessas citocinas pode levar à morte celular. Além disso, as propriedades antiangiogénicas dos IMiDs, ocorrem por meio da inibição do VEGF. O seu efeito no sistema imunológico, ocorre através da estimulação da síntese das células T CD4, CD8, da IL-2 e do interferão-gama, pelo que o aumento da IL-2 e do interferão-gama estimula a proliferação das células NK, bem como a sua citotoxicidade celular. Posto isto há diminuição da tolerância imunológica às células do mieloma e estimulação da resposta imunológica contra elas. No caso da lenalidomida e da pomalidomida, estes fármacos apresentam efeitos apoptóticos diretos, através da ativação da caspase 8, levando à interrupção do ciclo G0/G1 inibindo a proliferação de células tumorais e induzindo a sua apoptose. Mais recentemente, a E3 ubiquitina ligase cereblon (CRBN) foi identificada como alvo molecular da lenalidomida. A ligação da lenalidomida ao CRBN induz a ubiquitinação e a degradação dos fatores de transcrição linfoides, o Ikaros (IKZF1) e Aiolos (IKZF3), que, por sua vez, medeiam os efeitos citotóxicos e imunológicos dos IMiDs. Ainda que, as estruturas sejam bastante semelhantes, os IMiDs usados diferem em relação a várias propriedades farmacológicas, incluindo a dosagem, o tempo de meia-vida, o metabolismo e os efeitos adversos (39,40,51).

6.3.1. Talidomida

A talidomida é o primeiro membro da classe dos IMiDs e apresenta uma longa história. Foi inicialmente sintetizada na década de 1950 e o seu primeiro uso terapêutico foi na Europa e no Canadá, onde era vendido como um medicamento não sujeito a receita médica, usado principalmente como sedativo e como antiemético durante a gravidez. No entanto, em 1961, observou-se uma elevada associação entre a talidomida e o aumento acentuado de malformações em bebés, tendo sido posteriormente retirada do mercado. Em 1999, vários ensaios clínicos foram realizados em pacientes com MM em estado terminal, ou MM refratário e foi administrada talidomida, onde obteve-se uma resposta significativa. Os estudos seguintes, centraram-se nas terapêuticas em combinação de talidomida com dexametasona em pacientes refratários e para terapêutica de indução nos doentes com MM recém-diagnosticados e que podem fazer o transplante, tendo uma taxa de resposta superior à monoterapia só com a talidomida. Foi adotada esta terapêutica, em 2006, para

pacientes recém-diagnosticados, com aprovação da FDA. Também foram realizados ensaios clínicos randomizados para investigar o uso de talidomida após o TAPH, tendo sido demonstrado que há um aumento da sobrevivência livre de progressão (PFS), mas não houve um resultado significativo e constante na OS. A terapêutica com talidomida no pós-transplante, não pode ser prolongada, geralmente é limitada a um ano, devido à toxicidade, provocando efeitos adversos, particularmente, neuropatia periférica (51,52).

6.3.2. Lenalidomida

A lenalidomida é o segundo membro da classe IMiD, e é mais potente e menos tóxico que a talidomida. A lenalidomida foi aprovada em 2006, com base em dois estudos comparando-a ao placebo, sendo o uso da lenalidomida em combinação com dexametasona aceite como a terapêutica padrão para o MM recidivo. Em 2015, essa terapêutica dupla foi aprovada para o tratamento do mieloma múltiplo dos doentes recém-diagnosticados, visto que os ensaios clínicos demonstraram taxas de resposta global (ORR) de 68 a 91%, pelo que substituiu a terapêutica dupla com talidomida/dexametasona. Também se verificou, num ensaio clínico de fase I, que a dose máxima tolerada é 25 mg e é administrada durante 14, 21 ou 28 dias de um ciclo, dependendo do regime, tendo demonstrado uma ausência de efeitos adversos típicos na talidomida. Recentemente, a terapêutica tripla de lenalidomida, bortezomib e dexametasona tornou-se um padrão de tratamento para pacientes recém-diagnosticados. Como discutido anteriormente, no cenário de manutenção pós-transplante, a lenalidomida é amplamente usada, pois possui propriedades apoptóticas e antiangiogénicas e, portanto, pode ser usada na terapia de manutenção. Além disso, como a talidomida, a lenalidomida foi estudada em combinação com vários fármacos diferentes, incluindo agentes alquilantes, doxorrubicina, inibidores de proteassoma, inibidores de HDAC e anticorpos monoclonais. Pelo que, atualmente é aprovada pela FDA para uso em combinação com dexametasona, carfilzomib, ixazomib, daratumumab e elotuzumab ou como um agente único para terapia de manutenção após o TAPH (51,52).

6.3.3. Pomalidomida

A pomalidomida é um IMiD de terceira geração e foi aprovada em 2013, para o tratamento do MM refratário, especificamente para pacientes, que previamente tinham feito pelo menos duas terapêuticas farmacológicas, onde incluía a lenalidomida e o bortezomib. Num estudo clínico de fase II, avaliou-se a combinação da pomalidomida com a dexametasona e esta apresentou uma taxa de resposta global (ORR) de 63% e a PFS foi de 11,6 meses, porque, embora a pomalidomida seja estruturalmente semelhante aos seus análogos da classe, ela é mais potente e eficaz em pacientes resistentes à talidomida e lenalidomida. Até agora, a pomalidomida não foi estudada no contexto inicial de terapia de indução ou no pós-transplante na terapia de manutenção. Estão em andamento estudos que combinam pomalidomida com outras classes típicas de medicamentos para o tratamento do MM. Este fármaco demonstrou ter um perfil de segurança relativamente tolerável, contudo apresentou um risco aumentado de tromboembolismo venoso (TEV), pelo que é recomendado o uso concomitante de profilaxia para TEV (50–52).

6.4. Inibidores do proteassoma (IPs)

Os inibidores do proteassoma usados no tratamento do MM são o bortezomib, carfilzomib e ixazomib. Os IPs atuam a nível do proteassoma 26S, que é um complexo crítico do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), sendo composto por um centro catalítico denominado de proteassoma 20S e por subunidades reguladoras 19S. O proteassoma 26S controla vários processos celulares, como a proliferação, inflamação e apoptose, através da degradação de inúmeras proteínas nas vias do MM que estão envolvidas na proliferação das células do mieloma, sobrevivência e resistência a medicamentos. Os IPs têm a capacidade de inibir o centro catalítico do proteassoma e ainda exercem seus efeitos citotóxicos por meio de mecanismos adicionais, que incluem indução da paragem do ciclo celular e apoptose, autofagia ou degradação celular, indução de stress no retículo endoplasmático, inibição da via NF- κ B, regulação negativa dos recetores do fator de crescimento e ativação da cinase NH2 terminal c-Jun (JNK) (40,51,53).

6.4.1. Bortezomib

O bortezomib foi aprovado em 2003 e é indicado para o tratamento dos pacientes com MM e para o linfoma de células do manto. Existem vários ensaios clínicos randomizados, que demonstraram a sua eficácia, tanto nos pacientes com mieloma recém-diagnosticados como no MM recidivo/refratário. As indicações terapêuticas para este medicamento são em monoterapia ou em combinação com a doxorrubicina lipossômica ou com a dexametasona, no tratamento de doentes com mieloma múltiplo em progressão que tenham recebido pelo menos uma terapêutica prévia e que já tenham sido sujeitos a transplante ou que não sejam elegíveis para o fazer. No caso de doentes com mieloma múltiplo recém-diagnosticados e que não sejam elegíveis para o TAPH, é indicada a utilização do bortezomib em associação com o melfalano e a prednisona. É ainda indicado para a terapia de indução, em pacientes com MM recém-diagnosticados e que sejam elegíveis para TAPH, o bortezomib em combinação com dexametasona ou em terapêutica tripla com dexametasona e talidomida. O modo de administração do bortezomib, é por via subcutânea e via intravenosa, sendo as concentrações usadas 1 mg/mL e 2,5 mg/mL, respetivamente. A terapia farmacológica com bortezomib é bem tolerada e os efeitos adversos comumente são facilmente tolerados (51,54).

6.4.2. Carfilzomib

O carfilzomib é um novo IP, é uma epoxicetona tetrapeptídica que se liga seletivamente e irreversivelmente à subunidade β -5. Em ensaios clínicos in vitro mostraram que o carfilzomib era mais potente a induzir a caspase-8 e a caspase-9, do que o bortezomib e como tal poderia superar a resistência ao bortezomib observada nas células mieloides. Em três ensaios clínicos de Fase II, o carfilzomib produziu respostas mesmo em pacientes com MM refratário após terapêutica com bortezomib. Também em diversos ensaios clínicos de fase I e fase II demonstrou-se segurança e eficácia em pacientes em recidiva. No estudo ASPIRE, multicêntrico, aleatório e sem ocultação em 792 doentes com mieloma múltiplo refratário/recidivo, que avaliou a segurança e a eficácia na combinação do carfilzomib com lenalidomida e dexametasona (KRd), comparativamente, com apenas lenalidomida e dexametasona (Rd), os doentes com a terapêutica KRd demonstraram melhoria (45%) na PFS,

comparativamente aos incluídos na terapêutica Rd. Então, em 2015, a terapêutica KRd, recebeu a aprovação, com base nos dados de ensaios clínicos de fase III para pacientes com MM que tenham recebido pelo menos uma terapêutica prévia. Além disso, foi aprovada a terapêutica do carfilzomib combinando com a dexametasona em pacientes com MM refratário, com base nos resultados do estudo *ENDEAVOR* de fase 3, aleatório, onde a segurança e a eficácia do carfilzomib com dexametasona (Kd), versus, o bortezomib com dexametasona (Vd), demonstrou uma melhoria significativa na PFS para os doentes com a terapêutica Kd, comparativamente aos Vd (50,51).

6.4.3. Ixazomib

O ixazomib foi o primeiro IP oral de segunda geração aprovado e a ser estudado em ensaios clínicos. Os estudos pré-clínicos demonstraram que o ixazomib em monoterapia ou em combinação com a lenalidomida e dexametasona tem atividade anti-MM sinérgica. Em 2015, a FDA e a EMA aprovaram o ixazomib em combinação com a lenalidomida e dexametasona para o tratamento de pacientes com MM que receberam pelo menos uma terapia prévia. Esta aprovação foi baseada nos resultados de um ensaio clínico internacional randomizado, duplo-cego, fase III (*TOURMALINE-MM1*), que comparava o ixazomib com a lenalidomida e a dexametasona com a terapêutica com placebo, lenalidomida, dexametasona, envolvendo pacientes com MM refratário. Este estudo relatou uma melhoria na PFS na terapia com ixazomib, comparando à outra terapia (50,51,54).

6.5. Inibidor das desacetilases das histonas (HDACIs)

Os HDACs são enzimas multifuncionais que regulam a atividade da proteína alvo através da remoção de grupos acetil, estas têm alvos específicos que mediam o silenciamento epigenético da expressão genética, modulando os principais processos celulares. No caso, do mieloma múltiplo a atividade da HDAC é desregulada, que se traduz numa expressão genética anómala e numa sinalização celular que promove a progressão do ciclo e resistência à apoptose (39,55).

6.5.1. Panobinostat

O panobinostat é um HDACI que inibe a atividade enzimática da HDAC. Esta atividade resulta num aumento da acetilação das proteínas histonas, uma alteração epigenética que provoca a libertação de cromatina resultando em ativação transcricional. O *PANORAMA 1* consistia num estudo randomizado multicêntrico, em duplo cego, controlado com placebo, de fase III realizado em 768 pacientes com mieloma múltiplo refratário, os pacientes foram randomizados e a uns foi administrado panobinostat (n =381) e a outros o placebo (n =387) em combinação com o bortezomib e dexametasona. O PFS mediano obtido foi, significativamente, mais longo no panobinostat (12,0 meses) do que no placebo (8,1 meses; $P < 0,0001$), também houve um aumento do OS no tratamento com panobinostat, comparativamente ao do placebo (33,6 meses vs. 30,4 meses; $P = 0,26$). Assim, o panobinostat em combinação com o bortezomib e dexametasona foi aprovado pela FDA e a EMA para o tratamento dos pacientes com MM recidivo/refratário tratados previamente com pelo menos duas terapêuticas, incluindo o bortezomib e um agente imunomodulador, visto que, foi comprovado ser eficaz e tolerável (49,50,56).

6.6. Anticorpos monoclonais (mAbs)

Os anticorpos monoclonais são imunoglobulinas que se ligam a antígenos específicos, com alta especificidade para um epítopo. Foram avaliados em ensaios pré-clínicos e clínicos, mAbs contra alvos específicos, que incluem fatores de crescimento e seus recetores, outras moléculas de sinalização e antígenos expressos exclusiva ou predominantemente nas células do MM. Os mecanismos de ação desta terapêutica são diversos e envolvem citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), citotoxicidade dependente do complemento (CDC), interferência nas interações recetor-ligante e conjugação do mAb a radioisótopos ou toxinas (57–59).

6.6.1. Daratumumab

O daratumumab é um anticorpo monoclonal humano IgG1κ, com um amplo espectro de atividade, que tem como alvo a proteína, CD38, que está presente em grande número nas células do mieloma múltiplo, logo ao ligar-se à CD38 nas células do mieloma, o daratumumab ativa o sistema imunitário levando à apoptose das células

cancerígenas. Atuando por 3 mecanismos, através da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), citotoxicidade depende do complemento (CDC) e por fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP). O daratumumab em monoterapia foi avaliado em ensaios clínicos de fase II, e demonstrou eficácia e um perfil de segurança favorável, pelo que, com base nos resultados deste estudo de 2015, a FDA aprovou o daratumumab em pacientes com MM refratários/recidivo, cuja terapêutica anterior tenha incluído um IP e um IMiD. Em 2016, a FDA aprovou o uso do daratumumab em terapia tripla com lenalidomida e dexametasona ou bortezomib e dexametasona, para o tratamento de pacientes com MM que receberam pelo menos uma terapia prévia. Outra indicação terapêutica é a utilização do daratumumab em combinação com bortezomib, melfalano e prednisona para o tratamento de doentes com mieloma múltiplo não elegíveis para TAPH, após um ensaio de fase III, randomizado e onde se verificou um risco significativamente menor de progressão da doença (59–61).

6.6.2. Elotuzumab

O elotuzumab é um anticorpo monoclonal humano IgG1, imunoestimulador, que tem como alvo a proteína SLAMF7. A SLAMF7 apresenta expressão muito elevada em células do MM, também é expressa nas células NK, células normais do plasma, e outras células do sistema imunitário. Os mecanismos de ação do Elotuzumab contra o MM, consiste na ligação do elotuzumab ao SLAMF7 presente na superfície celular do mieloma, promovendo a apoptose dessas células, através da ADCC mediada por células NK e ADCP mediada por macrófagos. Este fármaco ativa também, diretamente, as células NK através das vias SLAMF7 induzindo a atividade antimieloma. O elotuzumab em combinação com lenalidomida e dexametasona é indicado para o tratamento do mieloma múltiplo em doentes que receberam uma a três terapêuticas anteriormente, tendo sido aprovado em 2015, após um estudo randomizado, sem ocultação, conduzido para avaliar a eficácia e a segurança desta terapêutica tripla. Da mesma forma, o elotuzumab em combinação com pomalidomida e dexametasona (E-Pd), foi aprovado como terapêutica em doentes com mieloma múltiplo refratário que receberam pelo menos duas terapêuticas prévias, que incluíam a lenalidomida e um IP (59,60).

Capítulo II - Farmacogenómica do Mieloma Múltiplo

1. Farmacogenómica – Estado da Arte

No início de 1900, Archibald Garrod desenvolveu o conceito de "individualidade química", que descreveu como a capacidade dos indivíduos de tolerar diferentes doses de medicamentos e venenos. Na década de 1950, novas metodologias e instrumentação permitiram a medição da atividade enzimática e concentrações dos metabolitos dos fármacos. Vários genes relacionados com o metabolismo dos medicamentos foram identificados, clonados e caracterizados nas décadas de 1980 e 1990 - incluindo o CYP2D6, NAT2 e CYP2C19. O Projeto Genoma Humano trouxe imensas melhorias na tecnologia e aprofundou a compreensão da genética humana, permitindo um avanço significativo nesse campo (62).

A farmacogenómica é o estudo de como a variação genética afeta a resposta individual aos medicamentos. São amplamente estudados polimorfismos pontuais (SNPs), deleções, inserções, CNVs e outras alterações nos genes envolvidos na biotransformação de Fase I (CYP), nos recetores dos fármacos, nos transportadores de fármacos, enzimas de conjugação de Fase II, enzimas que regem a regeneração de agentes de conjugação da Fase II e coenzimas necessários ao metabolismo (63). Estes estudos podem revelar como a variação genética entre os indivíduos afeta a farmacocinética e a farmacodinâmica de um medicamento (64).

A farmacogenómica é uma ferramenta de grande utilidade no tratamento do cancro, na medida em que a capacidade de prever como um paciente com cancro responderá a um regime de tratamento específico, é uma meta ambiciosa da oncologia personalizada. Com esta ferramenta, os médicos podem otimizar os regimes terapêuticos. Como tal, a aplicação da farmacogenómica cresceu exponencialmente, devido ao avanço dos testes laboratoriais, os médicos agora podem identificar biomarcadores farmacogenómicos específicos em células cancerígenas. Essas informações permitem que consigam selecionar e personalizar os regimes de quimioterapia específicos com base no genótipo específico do indivíduo. Assim, é fundamental que os médicos estejam familiarizados com a aplicação desta ferramenta na prática clínica para que haja uma maximização dos benefícios e minimização dos efeitos adversos (65).

Nos últimos anos, na Europa foi adotada uma estratégia regulatória, para aumentar a conscientização sobre a farmacogenómica, e como tal no RCM dos medicamentos as informações farmacogenómicas estão cada vez mais presentes, facilitando o acesso aos prescritores e pacientes e, conseqüentemente, a terapêutica medicamentosa adaptada às características genéticas dos pacientes. Para além disso, também são fornecidas orientações práticas sobre o porquê, quando e como obter dados farmacogenómicos individuais dos pacientes, para facilitar o tratamento farmacológico. De forma a promover ainda mais a integração clínica da informação proveniente da investigação em farmacogenómica, a EMA estabelece recomendações e requisitos para a investigação e incorporação dessa informação e metodologias no desenvolvimento de medicamentos e farmacovigilância. Além disso, a agência criou orientações sobre a importância da identificação e validação de biomarcadores genómicos, estabelecendo atividades e procedimentos para tal (66).

Em suma, a farmacogenómica é uma área em crescimento com a promessa de melhorar significativamente a segurança e a eficácia dos medicamentos no futuro. Como, em qualquer nova área da medicina, são necessários estudos clínicos para demonstrar o impacto positivo nos resultados clínicos dos pacientes. As metodologias dos testes farmacogenómicos continuam a evoluir e, com testes aperfeiçoados, espera-se uma melhor interpretação clínica e a utilização desses resultados na prática clínica (62).

2. Polimorfismos relevantes na terapêutica com melfalano

O agente alquilante melfalano, como suprarreferido, apresenta um elevado grau de toxicidade, podendo causar mielosupressão e lesões gastrointestinais, como o desenvolvimento de mucosite.

Existem polimorfismos nos genes SLC7A5 e SLC7A8, que codificam os transportadores de aminoácidos, o LAT1 e LAT2, respetivamente, sendo que estes atuam como os principais mediadores da entrada do melfalano nas células. Assim, estudos foram realizados para descobrir se existe correlação entre estes polimorfismos e o desenvolvimento de toxicidade gastrointestinal, particularmente em casos em que é necessária a nutrição parentérica total (NPT), após o tratamento com doses elevadas deste fármaco. Num estudo de Giglia *et al*, foram genotipados sete SNPs no gene

SLC7A5 e vinte no SLC7A8, em 135 pacientes com MM, tratados com melfalano e que já realizaram um TAPH conclui-se que um polimorfismo no primeiro intrão do gene SLC7A5, rs4240803, estava significativamente associado ao uso da NPT (OR = 0,45, IC 95% = 0,25 a 0,79; P = 0,007). Além disso, cada haplótipo que se correlacionou com o requisito da NPT apresentava este SNP. Estes resultados sugerem que a variabilidade no transporte do melfalano influencia o aparecimento de mucosite (67).

Demonstrou Van Ness *et al*, que a diarreia causada pelo tratamento com melfalano, está associada aos genótipos do TGF- β , CYP3A4 e ERCC2, enquanto os polimorfismos da IL-6 foram significativamente associados à infeção. Por outro lado, o estudo de Sonneveld *et al*. descreveu que os pacientes homocigotos para um alelo variante do CYP3A4 obtiveram uma toxicidade aumentada (P= 0,04), mas melhorou o OS (P= 0,01) e a sobrevida livre de progressão (P= 0,04). Neste estudo, também se descobriu que os polimorfismos nos genes XRCC1 (*X-Ray Repair Cross Complementing 1*) e BRCA1, genes envolvidos na reparação do DNA, CDKN1A e genes que codificam isoformas de CYP2C estão associados à ocorrência de mucosite grave (68).

3. Polimorfismos relevantes na terapêutica com bortezomib

O bortezomib é um dos fármacos mais utilizados na terapêutica desta patologia, como tal, tem sido o foco de vários estudos farmacogenómicos, sobretudo, devido à neuropatia periférica (NP), que é uma das principais e limitantes reações adversas deste medicamento, tendo sido observada uma grande variabilidade e suscetibilidade interindividual entre os pacientes com esquemas terapêuticos semelhantes (69).

Num estudo farmacogenómico GWAS de Magrangeas *et al*, foi realizado um ensaio clínico randomizado com 598 pacientes com MM, cuja terapêutica de indução foi bortezomib e dexametasona, com o objetivo de identificar novos polimorfismos associados à NP induzida por bortezomib. Assim, foi observado um SNP no gene PKNOX1 (rs2839629) com grande ligação à neuropatia periférica (OR= 1,89; IC 95%: [1,45-2,44]; P = 7,6 x 10⁻⁶), e em desequilíbrio de ligação (LD) com o SNP rs915854, que se localiza na região intergénica entre o PKNOX1 e o CBS (*Cystathionine Beta-Synthase*). O PKNOX1 é conhecido por modular a atividade transcricional da proteína quimiotática de monócitos MCP-1, sendo que esta proteína está presente em diversos

estudos sobre a dor neuropática e pode ser considerada como um biomarcador da dor crónica. Analisaram a relação entre o SNP rs2839629A e o rs1024611G e foi encontrada uma associação significativa, entre o genótipo A/A do SNP rs2839629 e o alelo G do SNP rs1024611 ($p= 0,01$), que pode ter impacto na regulação da expressão da MCP-1. Tanto o gene PKNOX1 quanto o CBS são fortes candidatos a biomarcadores para predisposição à NP, dado que estes genes estudados codificam proteínas que estão diretamente ou indiretamente envolvidas na dor neuropática e inflamatória. Estes resultados podem ajudar na identificação dos pacientes que tem maior risco de NP grave, de forma que esses pacientes possam beneficiar de uma terapêutica alternativa, bem como, fornecer novos alvos possíveis para o tratamento da NP (70).

Outro estudo de GWAS de Campo *et al.* com 646 pacientes identificou 4 novos *loci* promissores para a NP induzida pelo bortezomib, que são o 4q34.3 (rs6552496), 5q14.1(rs12521798), 16q23.3 (rs8060632) e 18q21.2 (rs17748074), como podemos verificar na tabela 2.1. Os polimorfismos identificados estão presentes, nos genes envolvidos no desenvolvimento e sinalização do sistema nervoso, tais como os genes CDH13, DCC e o TENM3 (*Teneurin Transmembrane Protein 3*) (71).

Tabela 2.1- Associação entre 4 SNPs e o risco de desenvolvimento de neuropatia periférica em pacientes com MM tratados com bortezomib. Adaptado de (71).

GWAS					
SNP	Alelo	NP	Sem NP	OR [95% IC]	P value
rs6552496	A	63	514	1.00[ref]	7.82×10^{-6}
	C	141	574	2.00[1.46-2.76]	
rs12521798	G	22	272	1.00[ref]	3.80×10^{-6}
	A	182	816	2.76[1.73-4.38]	
rs8060632	C	42	408	1.00[ref]	1.58×10^{-6}
	A	162	680	2.31[1.61-3.32]	
rs17748074	G	93	678	1.00[ref]	8.60×10^{-6}
	A	111	410	1.96[1.45-2.65]	

O SNP rs8060632 está presente na região intrónica do CDH13. Este gene codifica um membro da superfamília das caderinas, que têm uma atividade reguladora inibitória no crescimento das células neuronais. O SNP rs17748074 reside na região intrónica do gene DCC. Este SNP modifica os locais de ligação de muitos fatores de transcrição, como o Maf, Nkx3 e 4 e o Pax2 e afeta também as regiões regulatórias em diferentes tecidos, incluindo o cérebro. O rs6552496 é um SNP intergénico localizado

entre o gene RP11-665C14.2 e o TENM3, que codifica uma proteína que atua na regulação do desenvolvimento neuronal. O rs6552496 está localizado em genes que funcionam como repressores transcricionais. Concluindo, este GWAS sugere uma correlação entre o histórico genético do paciente e o desenvolvimento de efeitos adversos induzidos pelo tratamento. No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender melhor o papel destes SNPs no desenvolvimento da NP (71).

4. Polimorfismos relevantes na terapêutica com talidomida e lenalidomida

Na terapêutica com agentes imunomoduladores, nomeadamente com a talidomida, foi investigado o papel de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) localizados nos genes BSG e SLC16A1 (MCT1). Ora, o BSG ou CD147 controla a exportação de lactato através do transportador de ácidos monocarboxílicos 1 (MCT1). Num estudo de Lacina *et al.* foram analisados oito SNPs (quatro no BSG e quatro no SLC16A1), em 135 pacientes com MM e 135 indivíduos saudáveis. Os alelos rs4919859 C, rs8637 G e o haplótipo CG foram associados a uma pior sobrevivência livre de progressão ($p = 0,006$, $p = 0,017$, $p = 0,002$, respetivamente), enquanto o polimorfismo no rs7556664 A, rs7169 T e rs1049434 A (todos em desequilíbrio de ligação (LD), $r^2 > 0,98$) foram associados a uma melhor sobrevivência ($p = 0,021$). Relações semelhantes foram observadas em pacientes tratados com talidomida. Além disso, foram comparados estes polimorfismos com outros parâmetros clínicos, verificando-se, que o polimorfismo rs4919859 C, rs8637 G, rs8259 A e o haplótipo CG foram mais comuns em pacientes em estágios II e III do ISS ($p < 0,05$), enquanto rs8259 A se correlacionou com níveis mais elevados de β -2-microglobulina e creatinina ($p < 0,05$). Assim, os resultados mostram que estes polimorfismos nos genes BSG e SLC16A1 podem afetar a sobrevivência livre de progressão e a sobrevida global, e correlacionar com vários parâmetros do MM e, portanto, podem desempenhar um papel importante (ver figura 2.1. e 2.2.) (72).

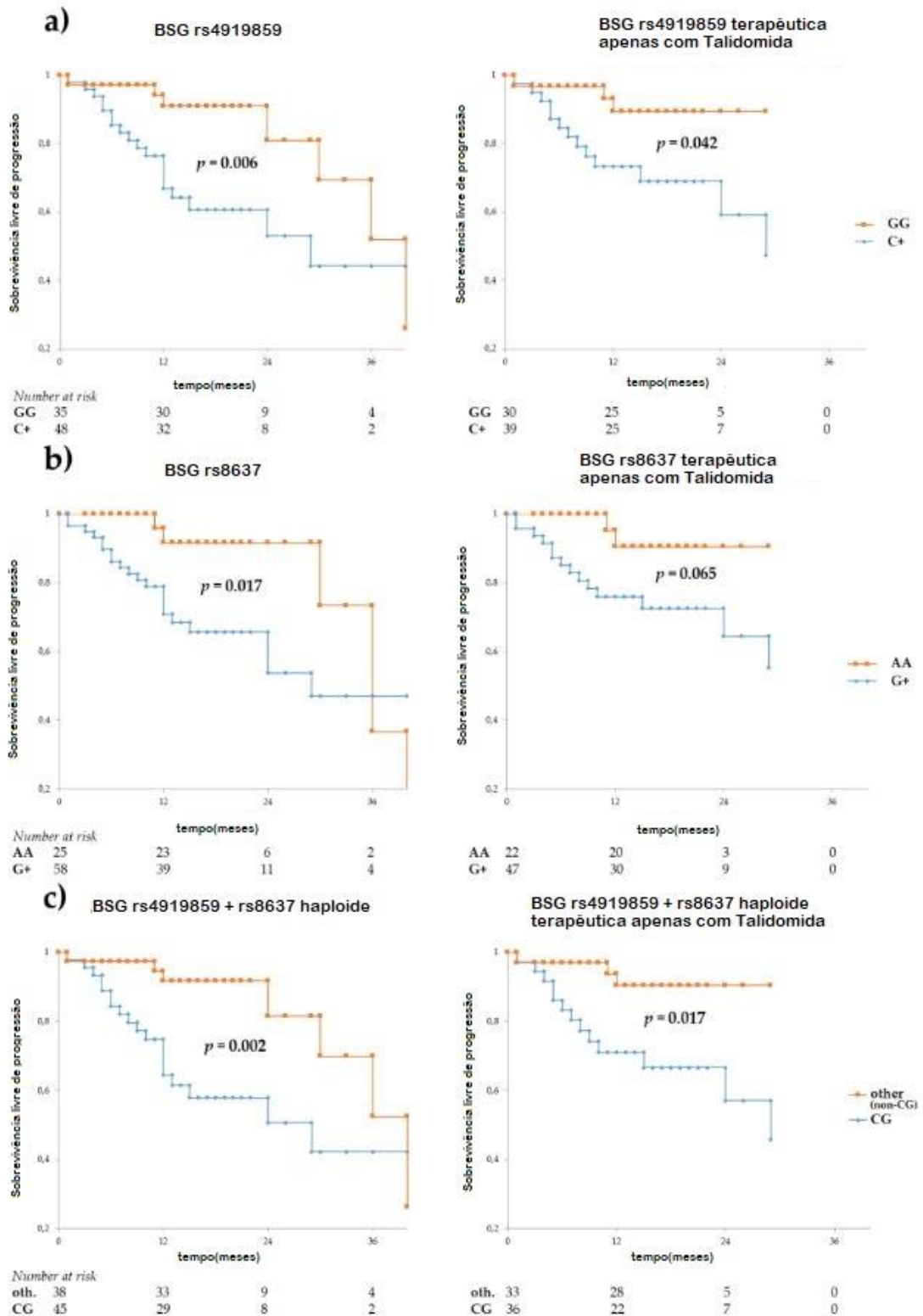


Figura 2.1- Sobrevivência livre de progressão em pacientes com mieloma múltiplo (MM) em relação aos SNPs BSG. Os gráficos (a e b) mostram a sobrevivência para rs4919859 C e rs8637 G, respetivamente. Um haploide rs4919859 C e rs8637 G também foi testado para associação com PFS, e é mostrado no gráfico (c). As curvas à esquerda mostram o PFS calculado para todo o grupo de pacientes, enquanto aquelas à direita mostram PFS calculado para o subgrupo de pacientes tratados com talidomida. O PFS foi calculado usando o Método Kaplan-Meier. Adaptado de (72).

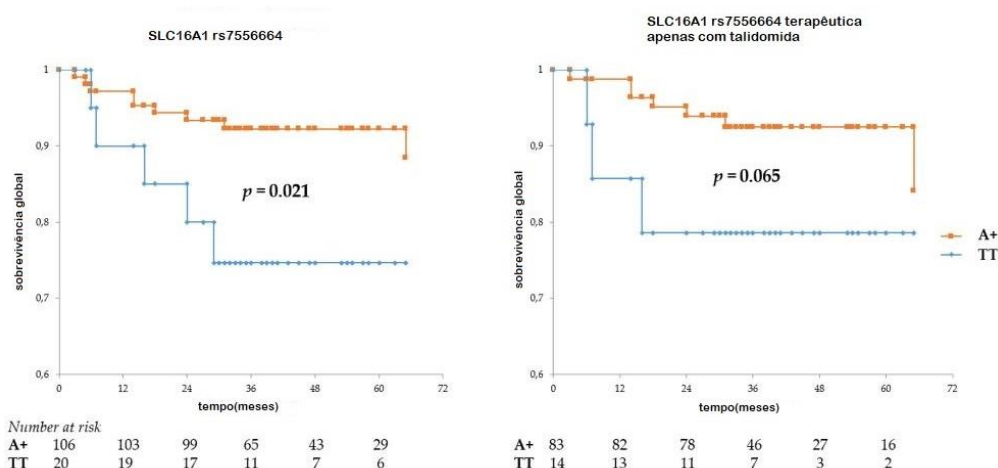


Figura 2.2- Sobrevivência global (OS) em pacientes com MM em relação ao polimorfismo SLC16A1 rs7556664 A. O gráfico à esquerda mostra a OS calculada para todo o grupo de pacientes enquanto à direita mostra a sobrevivência global (OS) calculada apenas para pacientes tratados com talidomida. A OS foi calculada usando o método de Kaplan-Meier. Adaptado de (72).

Como foi referido no capítulo anterior, vários estudos recentes sugeriram que a proteína cereblon (CRBN) é essencial para a atividade antimieloma dos IMiDs, pelo que, a desregulação da via Wnt/catenina pode ser uma das possíveis razões da resistência à lenalidomida. Assim, num estudo de Burtym *et al.* foram estudados os polimorfismos nos genes que codificam a CRBN (rs121918368 C > T) e a catenina (CTNNB1 (rs4135385 A > G; rs4533622 A > C)) a fim de avaliar a sua associação com a suscetibilidade à patologia, progressão e resposta ao tratamento. Foram avaliados 142 pacientes com MM e 123 indivíduos saudáveis, observou-se que a presença do alelo CTNNB1 (rs4533622) A foi detetada com maior frequência nos pacientes com doença em estágio II – III de acordo com o ISS (63/82 vs. 26/44, *p* = 0,043) e critérios de Durie-Salmon (75/99 vs. 14/26, *p* = 0,049). No SNP do gene CTNNB1 (rs4135385) o genótipo

homozigoto AA foi mais frequente nos pacientes com melhor resposta à terapêutica com CTD, ciclofosfamida/talidomida/dexametasona ($p = 0,047$). No polimorfismo no CTNNB1 (rs4533622), os pacientes com genótipo AA obtiveram uma melhor resposta à terapêutica de primeira linha com talidomida ($p < 0,05$). Nenhuma associação significativa foi observada entre o efeito da terapêutica com lenalidomida e os polimorfismos estudados. No entanto, a ocorrência de neutropenia durante esta terapêutica, foi mais frequente, entre os portadores do fenótipo AA para o CTNNB1 (rs4135385) ($p = 0,019$), enquanto o CTNNB1(rs4533622) no fenótipo AA caracterizou pacientes com neutropenia de alto grau (3-4) ($p=0,044$). Por último, nenhuma correlação foi encontrada para o polimorfismo no gene CRBN. Esses resultados sugerem que os polimorfismos no gene CTNNB1 podem afetar o percurso clínico e a resposta à quimioterapia com estes medicamentos nos pacientes com MM (73).

Outro estudo realizado pelos mesmos investigadores, investigou o Fator regulador do interferão 4 (IRF4) e a CRBN, que participam no metabolismo dos IMiDs, para avaliar a associação de dois polimorfismos (rs12203592 e rs872071) dentro do gene IRF4 e dois no gene CRBN (rs711613 e rs1045433) com a suscetibilidade ao MM, a progressão e a resposta ao tratamento. Neste caso foram estudados 144 pacientes com MM e 126 indivíduos saudáveis, onde se observou a presença do polimorfismo IRF4 (rs872071) no alelo G foi detetado com mais frequência em pacientes, do que indivíduos saudáveis (OR 1,78; $p= 0,034$), e esta relação foi especialmente acentuada nas mulheres (OR 2,83; $p= 0,012$). O SNP do CRBN (rs711613) para o alelo A teve uma melhor resposta ao tratamento ($p= 0,012$), em particular para a talidomida, incluindo terapêutica combinada ($p= 0,023$). Além disso, também foi observado que o rs711613 alelo G é muito mais comum em pacientes nos estágios I – II do que os pacientes que estão no estágio III ($p= 0,005$). Esses resultados sublinham a importância dos polimorfismos IRF4 e CRBN nos pacientes com MM (74).

5. Polimorfismos relevantes na terapêutica com daratumumab

Na terapêutica com daratumumab, tal como foi supracitado, este anticorpo monoclonal atua por mecanismos como a ADCC e ADCP, ambas requerem a ativação, através da ligação do fragmento Fc do anticorpo, com o recetor Fc (FcR) das células imunitárias. Van de Donk *et al.* analisou alguns polimorfismos, que regulam as

interações Fc:FcR relevantes na atuação do daratumumab. Foram estudados 96, 94 e 92 pacientes com MM para os polimorfismos FCGR3A -158V/ F, FCGR2A -131H / R e FCGR2B -232I/T, respetivamente. Verificou que os polimorfismos FCGR3A e FCGR2B têm algum impacto na resposta e no PFS, mas não afetam significativamente o OS (ver figura 2.3) (75).

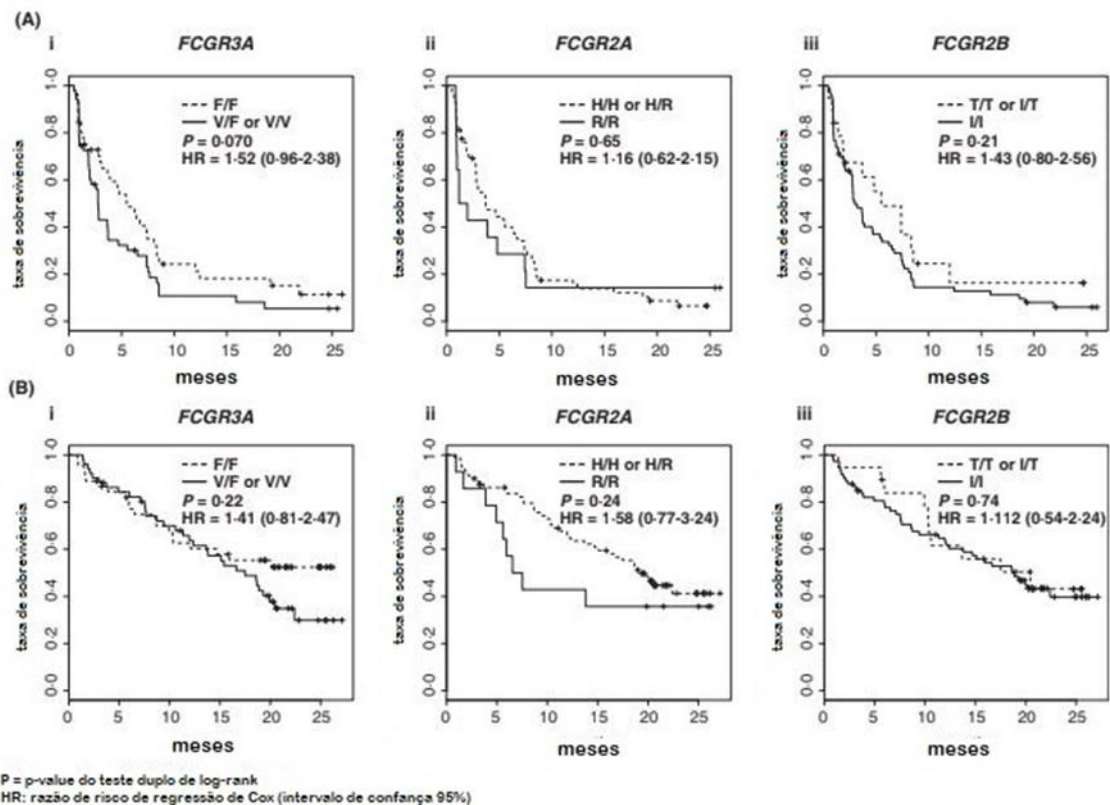


Figura 2.3- Taxa de sobrevivência livre de progressão e taxa de sobrevivência global de acordo com polimorfismos no FcR. (A) taxa de Sobrevivência livre de progressão e (B) taxa sobrevivência global de pacientes tratados com monoterapia com daratumumab de acordo com (i) polimorfismo FCGR3A-158V/F, (ii) polimorfismo FCGR2A-131H/R, ou (iii) Polimorfismo FCGR2B-232 I/ T. Adaptado de (75).

6. Outros polimorfismos envolvidos na suscetibilidade ao MM e na resposta ao tratamento para o MM

O estudo de Niebudek *et al.* teve como objetivo determinar o potencial significado dos SNPs G34A e C421A do gene ABCG2 (*ABC sub-family G member 2*) no desenvolvimento do mieloma múltiplo num total de 181 doentes com MM e 97 pessoas saudáveis. O polimorfismo G34A no exão 2 (rs2231137) resulta na substituição, na posição 12, do aminoácido valina por uma metionina (Val12Met). O polimorfismo C421A no exão 5 (rs2231142) que leva à substituição de glutamina por

lisina, está associado a baixos níveis de expressão de BCRP. Somente o SNP C421A do gene ABCG2 foi significativamente associado com o aumento do risco de desenvolvimento de mieloma múltiplo ($p = 0,0218$). Para o SNP G34A no gene ABCG2 (rs2231137), nenhum dos pacientes ou controlos apresentava o alelo variante (A). Para o SNP C421A (rs2231142), os dados mostraram que 10,5% e 1,1% dos pacientes com mieloma múltiplo tinham genótipos CA e AA, respetivamente, enquanto apenas 2,1% e 0% dos pacientes do grupo de controlo saudável tinham esses genótipos (ver tabela 2.2.) (76).

Tabela 2.2- Incidência dos genótipos dos polimorfismos G34A e C421A no gene ABCG2 em pacientes com MM e indivíduos saudáveis.

ABCG2 SNP	Pacientes com Mieloma Múltiplo, N=181 (%)	Indivíduos saudáveis, N=97 (%)	P (χ^2 Pearson com correção de Yates)	OR (95% CI)
SNP C421A				
CC	160 (88.4)	95 (97.9)	<i>0.0218</i>	1 (-)
CA	19 (10.5)	2 (2.1)		5.64 (1.28–24.75)
AA	2 (1.1)	0 (0.0)		2.97 (0.14–62.62)
C	339 (93.6)	192 (99.0)	<i>0.0040</i>	1 (-)
A	23 (6.4)	2 (1.0)		6.51 (1.52–27.93)
HWE P	0.7537	1.000		
SNP G34A				
GG	181 (100.0)	97 (100.0)	NA*	NA*
GA	0 (0.0)	0 (0.0)		
AA	0 (0.0)	0 (0.0)		
G	362 (0.0)	194 (0.0)	NA*	NA*
A	0 (0.0)	0 (0.0)		
HWE P	NA	NA		

Notas: *P* < 0.05 (escrito em itálico) indica o impacto significativo no risco de desenvolver o mieloma múltiplo. * Devido à distribuição dos genótipos obtidos nos grupos estudados, a análise estatística foi impossível.

Abreviações: HWE, Hardy-Weinberg equilibrium; NA, não aplicável; SNP, single nucleotide polymorphism

O estudo de Campa *et al.* analisou 30 variantes genéticas nos principais genes envolvidos na CSR, usando 2632 pacientes com MM e 2848 controlos do consórcio *International Multiple Myeloma RESEARCH* (IMMENSE). Ora, os genes que atuam no processo de maturação das células B imaturas podem influenciar o risco de desenvolver mieloma múltiplo (MM). Durante a maturação das células B, vários rearranjos genéticos programados ocorrem e a recombinação de troca de classe (CSR) é um dos mais importantes entre esses mecanismos. Deste modo, verificou-se uma associação entre a LIG4 -rs1555902 e a diminuição do risco de MM, observando que os portadores de pelo menos um alelo variante (A) tinham uma diminuição do risco de desenvolver MM em comparação com o genótipo de referência C/C (OR = 0,80; IC de 95% 0,68–0,92; $p = 0,003$). Observou-se, ainda, que o polimorfismo AICDA-rs3794318 ($p = 0,002$) e o polimorfismo AICDA-rs12306110 ($p = 0,016$) e XRCC5-rs6941 ($p = 0,019$) foram associados aos pacientes com melhoria na OS, enquanto os polimorfismos

AICDA- rs3794318 ($p=0,006$), AICDA -rs12306110 ($p=0,004$) e AICDA- rs2580873 ($p=0,008$) mostrou uma associação com PFS. No entanto, os heterozigotos do SNP AICDA- rs3794318 também obtiveram uma melhoria na PFS (IC 95% 0,48–0,87; $p=0,004$) (77).

Num estudo de Macaudo et al. foram analisadas 71 variantes polimórficas dos principais genes que codificam transportadores de fármacos (ABCB1, ABCC2, ABCG2) e seus reguladores (NR1I2/PXR e NR1I3/CAR), em 1365 casos de MM em 5 países europeus, no âmbito do referido consórcio IMMEnSE, tendo sido analisada a sobrevivência livre de progressão e a sobrevivência global. Este estudo é importante, uma vez que a resistência à quimioterapia é um enorme obstáculo para a eficiência do tratamento, podendo esta estar relacionada com os genes envolvidos nas vias metabólicas dos medicamentos. Conclui-se que dois SNPs mostraram uma associação significativa com a sobrevivência dos pacientes com MM, o polimorfismo rs2235013, localizado em ABCB1 [(HR) = 1,52; 95%(IC) = 1,18-1,95; P = 0,00087], e o polimorfismo rs4148388, localizado em ABCC2 (HR = 2,15; 95%IC = 1,44–3,22; P = 0,0001). O ABCC2 desempenha um papel essencial no transporte de vários medicamentos citotóxicos, incluindo vários usados no tratamento do MM, por exemplo, a doxorrubicina, vincristina e vimblastina. Por fim, análises *in silico* sugeriram que os alelos de quatro polimorfismos em desequilíbrio de ligação, no gene ABCC2 estão associados ao aumento da expressão deste gene. A sobreexpressão do ABCC2 aumenta a depuração dos fármacos e, logo, pode induzir mecanismos de resistência aos medicamentos (78).

Conclusão

A farmacogenómica tem demonstrado ser uma ferramenta vantajosa na prática clínica de diversas patologias, sendo a sua aplicação um passo importante para especificar o tratamento, maximizando a eficácia, minimizando a toxicidade e a resistência dos regimes terapêuticos.

O mieloma múltiplo é uma patologia bastante complexa, porém nos últimos anos, tem havido um progresso substancial no desenvolvimento de tratamentos eficazes, existindo uma melhor compreensão da doença e consequentemente uma sobrevida substancialmente melhorada para os pacientes.

Embora a implementação da farmacogenómica seja uma via para melhorar o tratamento do mieloma múltiplo, a sua aplicação na área clínica não é fácil, devido aos custos da implementação dos testes de genotipagem, na fase inicial de utilização. Além disso, na investigação acerca do mieloma múltiplo, existem lacunas nos estudos farmacogenómicos realizados, sendo necessário, amostras maiores e um número maior de estudos.

O principal desafio, para o futuro, será desenvolver terapêuticas personalizadas para subgrupos de pacientes distintos e biologicamente definidos, escolhendo fármacos mais seguros, que tenham menos efeitos adversos sobre o indivíduo específico e que apresentem melhores taxas de resposta.

Assim, é fulcral perceber melhor quais os genes e as vias metabólicas associadas à ação dos fármacos, para que seja possível o desenvolvimento e otimização dos testes adequados para assim implementar a farmacogenómica na prática clínica dos doentes com mieloma múltiplo.

Bibliografia

1. Brigle K, Rogers B. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Semin Oncol Nurs*. 2017;33(3):225–36.
2. Mikulasova A, Smetana J, Wayhelova M, Janyskova H, Sandecka V, Kufova Z, et al. Genomewide profiling of copy-number alteration in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Eur J Haematol*. 2016;97(6):568–75.
3. Prideaux SM, Brien ECO, Chevassut TJ. Review Article The Genetic Architecture of Multiple Myeloma. *Adv Haematol*. 2014;2014:1–16.
4. MD DCRÃ llig, MD SK, MD PMB user. Multiple myeloma. *Lancet* [Internet]. 2015;385(9983):2197–208. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60493-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60493-1)
5. Ribatti D. A historical perspective on milestones in multiple myeloma research. *Eur J Haematol*. 2018;100(3):221–8.
6. Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Natural history in 241 cases. *Am J Med*. 1978;64(5):814–26.
7. KYLE RA. “Benign” Monoclonal Gammopathy—After 20 to 35 Years of Follow-Up. *Mayo Clin Proc*. 1993;68(1):26–36.
8. Kyle R a., Rajkumar SV. Multiple myeloma Robert. *Blood*. 2008;111(6):2962–2972.
9. Boussi L, Niesvizky R. Advances in immunotherapy in multiple myeloma. *Curr Opin Oncol*. 2017;29(6):460–6.
10. João C, Bergantim R, Neves M, Chacim S, Afonso C, Barradas J, et al. Multiple myeloma in elderly patients—a Portuguese multicentric real-life study. *Ann Hematol*. 2019;98(7):1689–701.
11. Bolwell B. Multiple Myeloma Multiple Myeloma. International Agency for Research on Cancer. 2019. p. 1–8.
12. Becker N. Epidemiology of Multiple Myeloma. Moehler T, Goldschmidt H,

- editors. Vol. 183, Recent results in cancer research. Berlin, Heidelberg: Springer Nature; 2011. 25–35 p.
13. International Agency for Research on Cancer [Internet]. [cited 2019 Dec 15]. Available from: <https://gco.iarc.fr>
 14. Martino A, Sainz J, Buda G, Jamroziak K, Reis RUIIM, García-sanz R, et al. Genetics and molecular epidemiology of multiple myeloma : The rationale for the IMMEnSE consortium (Review). 2012;625–38.
 15. Claudio JO, Stewart AK. Advances in myeloma genetics and prospects for pharmacogenomic testing in multiple myeloma. Am J Pharmacogenomics. 2005;5(1):35–43.
 16. Seidl S, Kaufmann H, Drach J. New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. Lancet Oncol. 2003;4(9):557–64.
 17. Shaji K. Kumar, Vincent Rajkumar, Robert A. Kyle, Mark van Duin, Pieter Sonneveld, María-Victoria Mateos FG& KCA. Multiple myeloma. Nat Rev Dis Prim [Internet]. 2017;3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>
 18. Anderson KC, Carrasco RD. Pathogenesis of Myeloma. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2011;6(1):249–74.
 19. Stella F, Pedrazzini E, Agazzoni M, Ballester O, Slavutsky I. Cytogenetic alterations in multiple myeloma: Prognostic significance and the choice of frontline therapy. Cancer Invest. 2015;33(10):496–504.
 20. Hultcrantz M, Morgan GJ, Landgren O. Epidemiology and Pathophysiology of Multiple Myeloma. Hematol Malig. 2018;(9783319255842):1–15.
 21. Wen-Chi Y, Sheng-Fung L. Mechanisms of Drug Resistance in Relapse and Refractory Multiple Myeloma. Biomed Res Int [Internet]. 2015;2015. Available from: [https://search.proquest.com/docview/1737448325?accountid=17215%0Ahttps://limo.libis.be/services/KULeuven?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ%](https://search.proquest.com/docview/1737448325?accountid=17215%0Ahttps://limo.libis.be/services/KULeuven?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ%0A)

- 3Ahealthcompleteshell&atitle=Mechanisms+of+Drug+Resistance+in
22. Heather Fairfield, Carolyne Falank, Lindsey Avery MRR. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. 2016;25(3):289–313.
 23. De Mel S, Lim SH, Tung ML, Chng WJ. Implications of heterogeneity in multiple myeloma. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 24. Dehghanifard A, Kaviani S, Abroun S, Mehdizadeh M, Saiedi S, Maali A, et al. Various Signaling Pathways in Multiple Myeloma Cells and Effects of Treatment on These Pathways. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* [Internet]. 2018;18(5):311–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clml.2018.03.007>
 25. Demchenko YN, Michael Kuehl W. A critical role for the NFκB pathway in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2010;1(1):59–68.
 26. Roy P, Sarkar UA, Basak S. The NF-κB activating pathways in multiple myeloma. *Biomedicines*. 2018;6(2).
 27. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-κB as the matchmaker. *Nat Immunol*. 2011;12(8):715–23.
 28. Leow CCY, Gerondakis S, Spencer A. MEK inhibitors as a chemotherapeutic intervention in multiple myeloma. *Blood Cancer J* [Internet]. 2013;3(3):e105-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bcj.2013.1>
 29. Furqan M, Mukhi N, Lee B, Liu D. Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application. *Biomark Res*. 2013;1(1):1–10.
 30. Piddock RE, Loughran N, Marlein CR, Robinson SD, Edwards DR, Yu S, et al. PI3Kδ and PI3Kγ isoforms have distinct functions in regulating pro-tumoural signalling in the multiple myeloma microenvironment. *Blood Cancer J*. 2017;7(3):1–9.
 31. Han K, Xu X, Chen G, Zeng Y, Zhu J, Du X, et al. Identification of a promising PI3K inhibitor for the treatment of multiple myeloma through the structural optimization. *J Hematol Oncol*. 2014;7(1):1–13.
 32. De Smedt E, Lui H, Maes K, De Veirman K, Menu E, Vanderkerken K, et al. The

- epigenome in multiple myeloma: Impact on tumor cell plasticity and drug response. Vol. 8, *Frontiers in Oncology*. 2018. p. 1–18.
33. Alzrigat M, Párraga AA, Jernberg-Wiklund H. Epigenetics in multiple myeloma: From mechanisms to therapy. Vol. 51, *Seminars in Cancer Biology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 101–15.
 34. Zhu B, Ju S, Chu H, Shen X, Zhang Y, Luo X, et al. The potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in multiple myeloma (Review). *Oncol Lett*. 2018;15(5):6094–106.
 35. Federico C, Sacco A, Belotti A, Ribolla R, Cancelli V, Giacomini A, et al. Circulating microRNAs and Their Role in Multiple Myeloma. *Non-Coding RNA*. 2019;5(2):37.
 36. Caracciolo D, Montesano M, Altomare E, Scionti F, Di Martino MT, Tagliaferri P, et al. The potential role of miRNAs in multiple myeloma therapy. *Expert Rev Hematol* [Internet]. 2018;11(10):793–803. Available from: <https://doi.org/10.1080/17474086.2018.1517041>
 37. Marino S, Roodman GD. Multiple myeloma and bone: The fatal interaction. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(8):1–22.
 38. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014;15(12):e538–48. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)
 39. Bianchi G, Richardson PG, Anderson KC. Promising therapies in multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2017;126(3):300–11. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/126/3/300.full.pdf>
 40. Harding T, Baughn L, Kumar S, Van Ness B. The future of myeloma precision medicine: integrating the compendium of known drug resistance mechanisms with emerging tumor profiling technologies. *Leukemia* [Internet]. 2019;33(4):863–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-018-0362-z>

41. Goldschmidt H, Ashcroft J, Szabo Z, Garderet L. Navigating the treatment landscape in multiple myeloma: which combinations to use and when? *Ann Hematol.* 2019;98(1):1–18.
42. Michels TC, Petersen KE, Army M, Medicine F. *Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment.* 2017;
43. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, Mateos M V., Zamagni E, Avet-Loiseau H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017;28(April):iv52–61.
44. Ludwig H, Sonneveld P, Davies F, Blade J, Boccadoro M, Cavo M, et al. European Perspective on Multiple Myeloma Treatment Strategies in 2014. *Oncologist.* 2014;19(8):829–44.
45. Cherry BM, Korde N, Kwok M, Roschewski M, Landgren O. Evolving therapeutic paradigms for multiple myeloma: Back to the future. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(3):451–63.
46. Burwick N, Sharma S. Glucocorticoids in multiple myeloma: past, present, and future. *Ann Hematol.* 2019;98(1):19–28.
47. Esma F, Salvini M, Troia R, Boccadoro M, Larocca A, Pautasso C. Melphalan hydrochloride for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Pharmacother* [Internet]. 2017;18(11):1127–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14656566.2017.1349102>
48. Ray A, Ravillah D, Das DS, Song Y, Nordström E, Gullbo J, et al. A novel alkylating agent Melflufen induces irreversible DNA damage and cytotoxicity in multiple myeloma cells. *Br J Haematol.* 2016;174(3):397–409.
49. Gentile M, Recchia AG, Mazzone C, Lucia E, Vigna E, Morabito F. Perspectives in the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(SUPPL.1):1–22.
50. Naymagon L, Abdul-Hay M. Novel agents in the treatment of multiple myeloma: A review about the future. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2016;9(1). Available

- from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13045-016-0282-1>
51. Noonan K, Colson K. Immunomodulatory Agents and Proteasome Inhibitors in the Treatment of Multiple Myeloma. *Semin Oncol Nurs* [Internet]. 2017;33(3):279–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soncn.2017.05.005>
 52. Holstein SA, McCarthy PL. Immunomodulatory Drugs in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Clinical Experience. *Drugs*. 2017;77(5):505–20.
 53. Papadas A, Asimakopoulos F. Mechanisms of Resistance in Multiple Myeloma. In: Mandalà M, Romano E, editors. *Handbook of Experimental Pharmacology* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 251–88. Available from: https://doi.org/10.1007/164_2017_10
 54. Okazuka K, Ishida T. Proteasome inhibitors for multiple myeloma. *Jpn J Clin Oncol*. 2018;48(9):785–93.
 55. Richardson PG, Moreau P, Laubach JP, Maglio ME, Lonial S, San-Miguel J. Deacetylase inhibitors as a novel modality in the treatment of multiple myeloma. *Pharmacol Res* [Internet]. 2017;117:185–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.020>
 56. Laubach JP, Moreau P, San-Miguel JF, Richardson PG. Panobinostat for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(21):4767–73.
 57. Danylesko I, Beider K, Shimoni A, Nagler A. Novel strategies for immunotherapy in multiple myeloma: Previous experience and future directions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012(Cdc).
 58. Lansita JA, Mounho-Zamora B. The Development of Therapeutic Monoclonal Antibodies: Overview of the Nonclinical Safety Assessment. *Curr Pain Headache Rep*. 2015;19(3):1–9.
 59. Zagouri F, Terpos E, Kastritis E, Dimopoulos MA. Emerging antibodies for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2016;21(2):225–37.
 60. Sherbenou DW, Mark TM, Forsberg P. Monoclonal Antibodies in Multiple

- Myeloma: A New Wave of the Future. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* [Internet]. 2017;17(9):545–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2017.06.030>
61. Abramson HN. Monoclonal antibodies for the treatment of multiple myeloma: An update. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12).
 62. Moyer AM, Caraballo PJ. The challenges of implementing pharmacogenomic testing in the clinic. *Expert Rev Pharmacoeconomics Outcomes Res* [Internet]. 2017;17(6):567–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14737167.2017.1385395>
 63. Schmidt MA, Schmidt CM, Goodwin TJ. Pharmacogenomics in Spaceflight. *Handbook of Space Pharmaceuticals*. 2019. 1–39 p.
 64. Wheeler HE, Maitland ML, Dolan ME, Cox NJ, Ratain MJ. Cancer pharmacogenomics: Strategies and challenges. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2013;14(1):23–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3352>
 65. Zhang Y, Somtakoune SD, Cheung C, Listiawan M, Feng X. Therapeutic Application of Pharmacogenomics in Oncology. *AAPS J* [Internet]. 2016;18(4):819–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1208/s12248-016-9926-x>
 66. Ehmann F, Caneva L, Prasad K, Paulmichl M, Maliepaard M, Llerena A, et al. Pharmacogenomic information in drug labels: European Medicines Agency perspective. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2015;15(3):201–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/tpj.2014.86>
 67. Giglia JL, White MJ, Hart AJ, Toro JJ, Freytes CO, Holt CC, et al. A single nucleotide polymorphism in SLC7A5 is associated with gastrointestinal toxicity after high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2014;20(7):1014–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.03.022>
 68. Dumontet C, Landi S, Reiman T, Perry T, Plesa A, Bellini I, et al. Genetic polymorphisms associated with outcome in multiple myeloma patients receiving

- high-dose melphalan. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2010;45(8):1316–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2009.335>
69. Velasco R, Alberti P, Bruna J, Psimaras D, Argyriou AA. Bortezomib and other proteasome inhibitors—induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment. *J Peripher Nerv Syst*. 2019;24(S2):S52–62.
70. Magrangeas F, Kuiper R, Avet-Loiseau H, Gouraud W, Guerin-Charbonnel C, Ferrer L, et al. A genome-wide association study identifies a novel locus for bortezomib-induced peripheral neuropathy in European patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2016;22(17):4350–5.
71. Campo C, da Silva Filho MI, Weinhold N, Mahmoudpour SH, Goldschmidt H, Hemminki K, et al. Bortezomib-induced peripheral neuropathy: A genome-wide association study on multiple myeloma patients. *Hematol Oncol*. 2018;36(1):232–7.
72. Łacina P, Butrym A, Mazur G, Bogunia-Kubik K. BSG and MCT1 genetic variants influence survival in multiple myeloma patients. *Genes (Basel)*. 2018;9(5).
73. Butrym A, Rybka J, Łacina P, Gebura K, Frontkiewicz D, Bogunia-Kubik K, et al. Polymorphisms within beta-catenin encoding gene affect multiple myeloma development and treatment. *Leuk Res*. 2015;39(12):1462–6.
74. Butrym A, Łacina P, Rybka J, Chaszczewska-Markowska M, Mazur G, Bogunia-Kubik K. Cereblon and IRF4 Variants Affect Risk and Response to Treatment in Multiple Myeloma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64(1):151–6.
75. van de Donk NWCJ, Casneuf T, Di Cara A, Parren PW, Zweegman S, van Kessel B, et al. Impact of Fc gamma receptor polymorphisms on efficacy and safety of daratumumab in relapsed/refractory multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2019;184(3):475–9.
76. Niebudek K, Balcerczak E, Mirowski M, Pietrzak J, Zawadzka I, Żebrowska-Nawrocka M. The contribution of ABCG2 G34A and C421A polymorphisms to multiple myeloma susceptibility. *Onco Targets Ther*. 2019;12:1655–60.

77. Campa D, Martino A, Macaуда A, Dudziński M, Suska A, Druzd-Sitek A, et al. Genetic polymorphisms in genes of class switch recombination and multiple myeloma risk and survival: an IMMEnSE study. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2019;60(7):1803–11. Available from: <https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1551536>
78. Macaуда A, Castelli E, Buda G, Pelosini M, Butrym A, Watek M, et al. Inherited variation in the xenobiotic transporter pathway and survival of multiple myeloma patients. *Br J Haematol*. 2018;183(3):375–84.