

Catarina Isabel Batista Geraldês dos Santos

# ALTERAÇÕES MOLECULARES E CELULARES NO MIELOMA MÚLTIPLO — IMPLICAÇÕES CLÍNICAS E TERAPÊUTICAS

Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina,  
orientada pelo Senhor Professor Doutor José Manuel Nascimento Costa e pela Senhora Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro,  
e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Novembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FMUC FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# ALTERAÇÕES MOLECULARES E CELULARES NO MIELOMA MÚLTIPLO - IMPLICAÇÕES CLÍNICAS E TERAPÊUTICAS

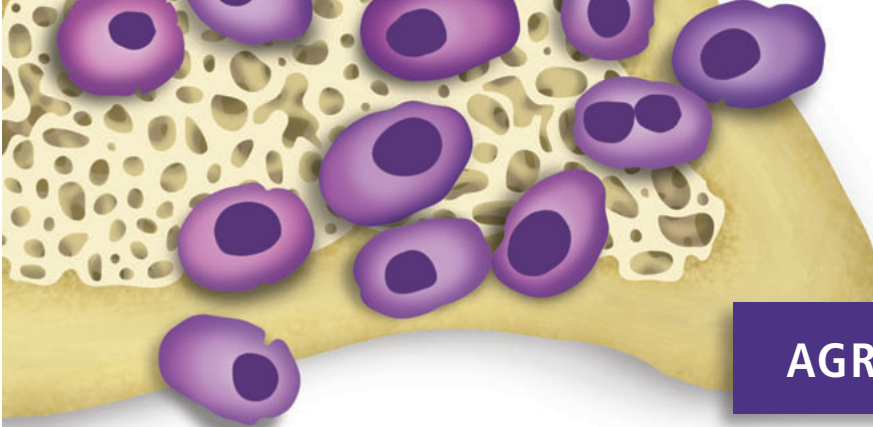
Catarina Isabel Batista Geraldes dos Santos

Coimbra, 2015



Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, Ramo de Medicina, Especialidade de Medicina Interna (Hematologia), orientada pelo Senhor Professor Doutor José Manuel Nascimento Costa e pela Senhora Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro e apresentada na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.





## AGRADECIMENTOS

O mieloma múltiplo representa uma área de eleição da minha atividade assistencial diária e a possibilidade de aprofundar conhecimentos relativos à sua etiopatogenia constituiu um desafio ao qual não poderia resistir. Foram anos longos de trabalho que me possibilitaram a aquisição de novos conhecimentos e o desenvolvimento de um sentido crítico face a aspetos relacionados com a investigação básica, até então um mundo que me era amplamente desconhecido. No entanto, o estudo de uma patologia tão complexa e heterogénea como é o mieloma múltiplo só foi possível com a conjugação de esforços e de conhecimentos de uma equipa unida e estruturada, com diferentes domínios de atividade. Deste modo, destaco as contribuições mais relevantes, expressando o meu profundo e sentido agradecimento.

Aos meus orientadores, o Senhor Professor Doutor José Manuel Nascimento Costa e a Senhora Professora Doutora Ana Bela Sarmento, um agradecimento particular pelo apoio e motivação incondicionais, as críticas construtivas, os comentários enriquecedores e, em suma, todo o tempo que me dedicaram. Os seus percursos profissionais e a sua integridade humana constituem exemplos que procurarei seguir.

Os meus sinceros agradecimentos à Dr.<sup>a</sup> Ana Cristina Gonçalves e à Dr.<sup>a</sup> Raquel Alves por todo o apoio na vertente laboratorial, que foi decisivo na realização desta tese.

Um agradecimento particular à Dr.<sup>a</sup> Adriana Teixeira e à Dr.<sup>a</sup> Isabel Sousa, colegas e amigas que sempre confiaram nas minhas capacidades e me ensinaram a ir em busca do conhecimento.

À Doutora Letícia Ribeiro, Diretora do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, por todo o apoio e incentivo que sempre manifestou.

A todos os colegas do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra que, desde o primeiro momento, me motivaram e confiaram no meu trabalho, referenciando-me os seus doentes de

forma solícita e desinteressada, de modo a que os pudesse estudar, nomeadamente à minha amiga e companheira de doutoramento Emília Cortesão, à Dr.<sup>a</sup> Ana Isabel Espadana, ao Dr. José Pedro Carda, à Dr.<sup>a</sup> Marília Gomes, ao Dr. Rui Afonso, à Dr.<sup>a</sup> Marilene Vivan, ao Dr. Paulo Tavares, à Dr.<sup>a</sup> Emília Magalhães, ao Dr. Carlos Moucho, à Dr.<sup>a</sup> Rosa Maia, ao Dr. Luís Rito, ao Dr. Braz da Luz, à Dr.<sup>a</sup> Paula César, à Dr.<sup>a</sup> Raquel Guilherme, à Dr.<sup>a</sup> Sofia Ramos, à Dr.<sup>a</sup> Mónica Santos, à Dr.<sup>a</sup> Ana Luísa Pinto, à Dr.<sup>a</sup> Lenka e à Dr.<sup>a</sup> Adriana Roque.

À equipa de enfermagem, sempre disponível e pronta a colaborar.

Ao Doutor Artur Paiva, pela realização dos estudos imunofenotípicos e citogenéticos.

À Dr.<sup>a</sup> Teresa Silva e à Dr.<sup>a</sup> Lénia Jorge pela contribuição na análise morfológica.

Ao Professor Doutor Rodrigo Martins e à Dr.<sup>a</sup> Marta Pereira pelos preciosos ensinamentos na área da análise estatística.

Ao Victor Hugo Fernandes, por todo o empenho e pelo sublime trabalho gráfico.

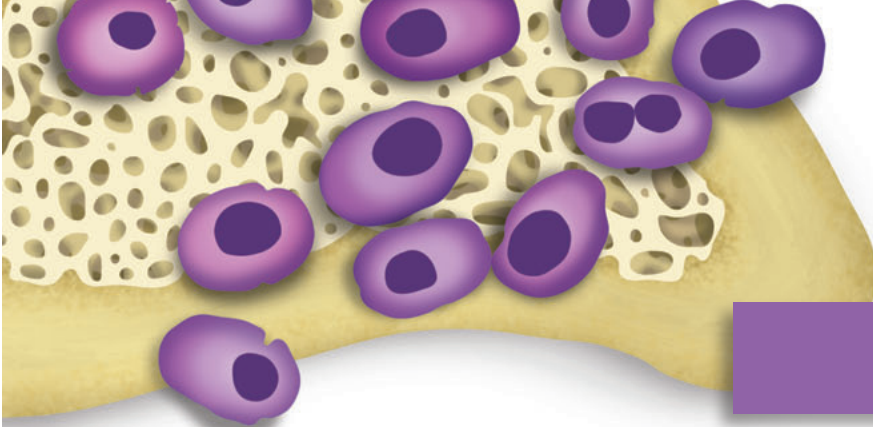
Aos meus amigos, tios e primos, pelo carinho e por estarem sempre presentes.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e por todo o esforço investido na minha formação e educação, que constituem uma fonte de inspiração para a educação que procuro transmitir ao meu filho.

Ao Eduardo e ao Bernardo, os grandes motores da minha vida, que sempre compreenderam o meu trabalho e me motivaram a perseguir os meus objetivos. Só com uma família unida e compreensiva foi possível concretizar este desafio e dar mais este passo no meu percurso profissional. Adoro-vos e espero saber sempre retribuir todo o amor e carinho que me dedicaram. Sem o vosso apoio, estou certa de que não teria conseguido.

A todos os doentes que contribuíram para este trabalho e a todos os que não contribuíram mas que sofrem diariamente com mieloma múltiplo e que constituem a minha principal motivação para prosseguir em frente no estudo desta doença. A presente tese representa apenas o primeiro passo de um caminho que tem como objetivo aprofundar os conhecimentos na área desta doença que destrói a vida de milhares de pessoas em todo o Mundo. Espero conseguir, um dia, contribuir para colocar mais esperança nas suas vidas.

Em suma, agradeço de forma muito sincera e sentida a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que não estão nominalmente mencionados, em particular no que respeita à confiança, à motivação e a toda a ajuda que me foi generosamente concedida.



# ÍNDICE

RESUMO .....	XI
ABSTRACT .....	XV
ABREVIATURAS .....	XIX

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Definições e Evolução Histórica .....	1
1.2. Epidemiologia .....	4
1.3. Etiologia .....	6
1.4. Patogénese .....	7
1.4.1. Anomalias genéticas e citogenéticas .....	7
1.4.1.1. Heterogeneidade intraclonal no mieloma múltiplo .....	7
1.4.1.2. Genética molecular – hiperdiploidia <i>versus</i> não hiperdiploidia .....	9
1.4.1.3. Translocações primárias .....	10
1.4.1.4. Translocações secundárias .....	13
1.4.1.5. Outras alterações citogenéticas .....	14
1.4.2. Desregulação das vias de proliferação e sobrevivência celulares no mieloma múltiplo .....	17
1.4.2.1. A via MAPK ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> ) .....	17
1.4.2.2. A via JAK/STAT ( <i>Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription</i> ) .....	18
1.4.2.3. A via PI3K ( <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i> ) .....	19
1.4.2.4. A via do NFκB ( <i>Nuclear Factor kappa B</i> ) .....	20
1.4.2.5. Desregulação do ciclo celular .....	22
1.4.2.6. Anomalias na reparação do DNA .....	23
1.4.3. O microambiente da medula óssea no mieloma múltiplo .....	23



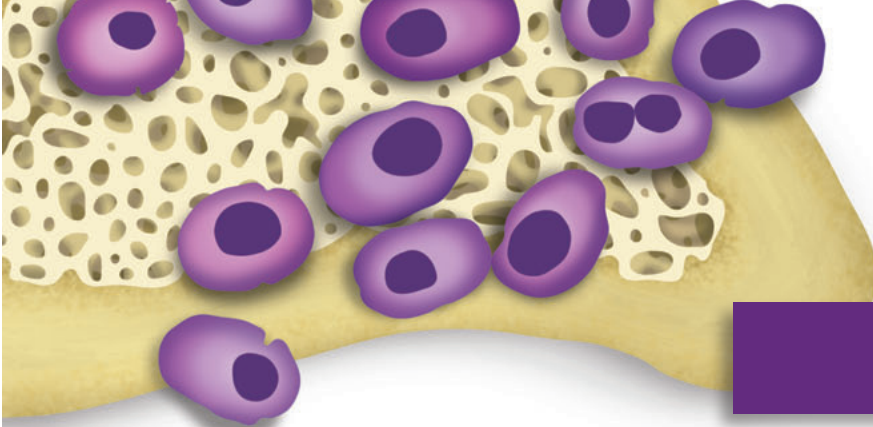
1.4.4. O papel do proteasoma no mieloma múltiplo .....	28
1.4.5. Alterações epigenéticas no mieloma múltiplo – conceitos gerais .....	31
1.4.5.1. A metilação do DNA e as modificações das histonas .....	34
1.4.5.2. A metilação do DNA no mieloma múltiplo .....	36
1.4.5.2.1. Etiologia da metilação aberrante do DNA no mieloma múltiplo .....	38
1.4.5.2.2. Metilação dos genes <i>p15</i> e <i>p16</i> .....	39
1.4.5.2.3. Metilação do gene <i>DAPK</i> ( <i>Death-Associated Protein Kinase</i> ). .....	39
1.4.5.3. As modificações das histonas no mieloma múltiplo .....	40
1.4.5.4. Implicações da metilação do DNA e da desacetilação das histonas para a terapêutica do mieloma múltiplo .....	41
1.4.6. Micro RNAs .....	44
1.4.7. Alterações na expressão de moléculas envolvidas na apoptose ..	44
1.4.7.1. A apoptose fisiológica .....	44
1.4.7.1.1. Os mecanismos de apoptose .....	46
1.4.7.1.2. A via extrínseca .....	48
1.4.7.1.3. A via intrínseca .....	49
1.4.7.1.4. A via efetora .....	52
1.4.7.2. A apoptose patológica .....	53
1.5. Diagnóstico e estadiamento .....	56
1.5.1. Diagnóstico clínico-laboratorial .....	56
1.5.2. Estadiamento do mieloma múltiplo sintomático .....	60
1.6. Tratamento do mieloma múltiplo e avaliação de resposta .....	60
1.7. Mecanismos de resistência à terapêutica no mieloma múltiplo .....	66
1.7.1. Conceitos gerais .....	66
1.7.2. Resistência aos fármacos no mieloma múltiplo .....	67
1.7.2.1. A desregulação das proteínas da família ABC .....	68
1.7.2.2. Os mecanismos antiapoptóticos .....	69
1.7.2.3. O papel do microambiente .....	70
1.8. Como ultrapassar as resistências à terapêutica – os novos fármacos ....	72
1.8.1. Conceitos gerais .....	72
1.8.2. Novos alvos terapêuticos em mieloma múltiplo .....	72
1.8.2.1. Partenolide .....	73
1.8.2.2. Everolimus .....	73

1.8.2.3. Silibinina .....	74
1.8.2.4. Decitabina .....	74
1.8.2.5. Tricostatina A .....	75
1.8.2.6. Ácido gambóxico .....	76
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>77</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>79</b>
3.1. Estudos realizados em doentes com gamapatias monoclonais e em controlo .....	79
3.1.1. Seleção e caracterização dos doentes e dos controlos .....	79
3.1.2. Análise da expressão de moléculas envolvidas na apoptose, na regulação do ciclo celular e nos mecanismos de resistência por citometria de fluxo .....	80
3.1.3. Estudos epigenéticos – avaliação do estado de metilação do DNA nos doentes e nos controlos .....	82
3.1.3.1. Extração e quantificação do DNA genómico .....	82
3.1.3.2. Modificação do DNA genómico com bissulfito de sódio .....	83
3.2. Estudos realizados na linha celular humana de mieloma múltiplo .....	86
3.2.1. Caracterização da linha celular humana NCI-H929 .....	86
3.2.2. Avaliação dos efeitos citotóxicos e citostáticos nas células de mieloma múltiplo tratadas com fármacos antineoplásicos .....	87
3.2.2.1. Determinação da viabilidade celular pelo teste da resazurina – curvas dose-resposta .....	87
3.2.2.2. Análise do tipo de morte celular induzida por fármacos antineoplásicos .....	90
3.3. Análise estatística dos dados .....	93
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>95</b>
4.1. Estudos efetuados na população de doentes com gamapatias monoclonais .....	95
4.1.1. Caracterização da população de doentes .....	95
4.1.2. Avaliação das moléculas envolvidas na morte celular por apoptose .....	99

4.1.3. Análise da expressão de moléculas reguladoras do ciclo celular..	109
4.1.4. Análise da expressão do NF- $\kappa$ B e dos conjugados da ubiquitina..	111
4.1.5. Análise da expressão de moléculas inflamatórias e reguladoras da angiogénese .....	113
4.1.6. Análise das proteínas da família ABC – glicoproteína P e <i>multidrug resistance related protein-1</i> .....	116
4.1.7. Análise do perfil de metilação génica nos doentes com gamapatias monoclonais .....	119
4.1.8. Impacto dos parâmetros clínicos e laboratoriais no prognóstico dos doentes com mieloma múltiplo sintomático .....	122
4.1.9. Associação entre os parâmetros moleculares, o ISS e a citogenética nos doentes com mieloma múltiplo sintomático.....	125
4.1.10. Identificação de potenciais novos biomarcadores moleculares de diagnóstico e de prognóstico .....	127
4.1.11. Associação entre a metilação dos genes <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>p53</i> , <i>DAPK</i> , genes dos recetores do <i>TRAIL</i> , <i>-R1</i> , <i>-R2</i> , <i>-R3</i> , <i>-R4</i> , as características clínico-laboratoriais e o prognóstico em doentes com gamapatias monoclonais .....	138
4.2. Estudos realizados na linha celular de mieloma múltiplo NCI-H929 .....	139
4.2.1. Caracterização da linha celular NCI-H929 .....	139
4.2.2. Estudo dos efeitos antiproliferativos e citotóxicos dos fármacos antineoplásicos .....	139
4.2.2.1. Avaliação da viabilidade celular pelo método da resazurina – curvas dose-resposta .....	139
4.2.2.2. Análise da morte celular induzida pelos fármacos antineoplásicos na linha celular NCI-H929 por citometria de fluxo e por microscopia ótica .....	146
4.2.2.3. Detecção do tipo de morte celular induzida pelos fármacos antineoplásicos por microscopia ótica .....	149
4.2.2.4. Avaliação da expressão de caspases induzida pelos fármacos antineoplásicos .....	150
4.2.2.5. Análise das alterações no ciclo celular induzidas pelos fármacos antineoplásicos nas células NCI-H929 .....	152
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>155</b>
5.1. Estudos realizados em doentes com gamapatias monoclonais .....	157
5.1.1. Caracterização clínica e laboratorial dos doentes com gamapatias monoclonais .....	157

5.1.2. Análise da expressão de moléculas envolvidas na apoptose e na regulação do ciclo celular, do NF- $\kappa$ B e dos conjugados da ubiquitina em doentes com gamapatias monoclonais .....	157
5.1.3. Análise da expressão de fatores de crescimento envolvidos na angiogénese e na inflamação .....	175
5.1.4. Avaliação da expressão de proteínas da família ABC em doentes com gamapatias monoclonais .....	177
5.1.5. Estudo do perfil de metilação de genes nas gamapatias monoclonais .....	181
5.2. Estudos efetuados na linha celular de mieloma múltiplo NCI-H929 .....	189
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>197</b>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	203
ANEXO .....	249





## RESUMO

O mieloma múltiplo sintomático (MM) é uma discrasia de plasmócitos consistentemente precedida por uma entidade pré-neoplásica, designada gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), com uma fase intermédia de mieloma múltiplo indolente (MMI). A expressão de moléculas envolvidas na apoptose, no ciclo celular, na angiogénese e na resistência, nos plasmócitos dos doentes com gamopatias monoclonais (GM), assim como o estado de metilação de genes relacionados com estes mecanismos não estão totalmente conhecidos. O nosso objetivo foi analisar e comparar os parâmetros referidos, nos subgrupos de GM, de modo a identificar novos biomarcadores de diagnóstico e de prognóstico, relevantes na etiopatogenia das GM e na progressão de MGUS para MM. Outro objetivo consistiu em avaliar os efeitos de novos fármacos, dirigidos a alvos moleculares e com mecanismos de ação relacionados, em monoterapia e em associação com o bortezomib, numa linha celular de MM.

Deste modo, estudámos amostras de medula óssea de 142 doentes com GM ao diagnóstico (62 doentes com MM, 12 com MMI, 68 com MGUS), de cinco doentes com MM em recidiva ou refratário (MMRR) e de 11 controlos não neoplásicos. Avaliámos a expressão de proteínas pró-apoptóticas, BAX, TRAIL, TRAIL-R1, -R2, FAS, FAS Ligando, caspase 3, TNF- $\alpha$  e recetor 1 do TNF- $\alpha$ ; proteínas antiapoptóticas, BCL-2, survivina, TRAIL-R3 e -R4; reguladoras do ciclo celular, P53 e ciclina D1; da angiogénese e da inflamação, VEGF, IL-6 e os seus recetores (VEGF-Rec2 e IL-6Rec); conjugados de ubiquitina; NF- $\kappa$ B e proteínas da família ABC, MRP-1 e gp-P, por citometria de fluxo, nos plasmócitos com fenótipos tumoral (CD138+/CD19-) e não tumoral (CD138+/CD19+) de doentes com GM e de controlos. O perfil de metilação das regiões promotoras de genes com funções moduladoras da apoptose (*DAPK*, recetores do TRAIL, *R1*, *R2*, *R3* e *R4*) e reguladoras do ciclo celular (*p15*, *p16* e *p53*) foi avaliado por PCR específico de metilação (MS-PCR). Analisámos os efeitos citotóxicos e antiproliferativos de novos fármacos (partenolide, everolimus, silibinina, ácido gambógico, tricostatina A e decitabina), bem como o seu

potencial efeito sinérgico com o bortezomib recorrendo a uma linha celular de MM, as células NCI-H929. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste da resazurina; o tipo de morte celular, recorrendo à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo, e a expressão de caspases ativadas, foram analisados por citometria de fluxo.

Os nossos estudos mostram que os plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes com GM apresentam, no geral, diminuição da expressão das moléculas pró-apoptóticas, o que pode favorecer a sua resistência à apoptose e contribuir para a mieloma-génese. A análise multivariada identificou o aumento da expressão de TRAIL-R2, P53, VEGF-Rec, MRP-1 membranar e gp-P citoplasmática, assim como a redução de ciclina D1 nos plasmócitos CD138+/CD19+, como marcadores com capacidade preditora independente de diagnóstico de GM, podendo estar implicados na sua etiopatogenia.

Nos doentes com MGUS observámos aumento da expressão de TRAIL-R2, FAS, P53 e VEGF-Rec assim como diminuição de TRAIL-R3 e VEGF nos plasmócitos CD138+/CD19+, relativamente aos tumorais ( $p < 0,05$ ). Nos doentes com MM, verificámos que os plasmócitos CD138+/CD19+ apresentam um aumento da expressão de TRAIL, TRAIL-R2, FAS, Caspase 3, TNF- $\alpha$ , P53 e NF- $\kappa$ B e uma diminuição da expressão de VEGF e de VEGF-Rec, quando comparados com os plasmócitos CD138+/CD19- ( $p < 0,05$ ). Além disso, em análise multivariada, verificámos que a diminuição da expressão de TRAIL-R2, survivina, ciclina D1 e gp-P citoplasmática, bem como o aumento de gp-P membranar nos plasmócitos CD138+/CD19+ de doentes com MM, apresentam potencial discriminatório entre MGUS e MM. Nos plasmócitos CD138+/CD19-, apenas o TRAIL-R2 e o VEGF-Rec apresentam esse potencial. Nestes plasmócitos, o aumento da expressão de caspase 3 nos doentes com MM foi identificado como um marcador de falência de resposta; a diminuição da expressão de VEGF e o aumento da expressão de FAS, FAS ligando, TRAIL e NF- $\kappa$ B foram associados a benefício na sobrevivência global e, no caso do NF- $\kappa$ B, também a melhor resposta ao bortezomib, realçando a importância destas moléculas na agressividade e na evolução do MM.

Os estudos de metilação mostram que 81% dos doentes com GM apresentam, pelo menos, um gene metilado, e 54% dois genes metilados, dos oito estudados; o *TRAIL-R3* é o gene que se encontra mais frequentemente metilado (61%). Não se observaram diferenças entre subgrupos de GM, sugerindo que a metilação anómala, apesar de frequente, não parece ser determinante na progressão de MGUS para MM. Nos doentes com MM, a metilação de *TRAIL-R3* foi associada a maior probabilidade de recidiva, sem impacto na sobrevivência global.

Os estudos *in vitro* para avaliação do potencial terapêutico de novos fármacos dirigidos a alvos moleculares mostram que o everolimus, o partenolide, a silibinina, o ácido gambóxico, a tricostatina A e a decitabina induzem redução significativa na viabilidade das células NCI-H929, dependente da dose e do tempo, e morte celular predominantemente por apoptose com aumento de caspases. Apenas o partenolide incrementou o efeito citotóxico do bortezomib de forma significativa quando administrados em combinação ( $p < 0,01$ ).

Em suma, demonstramos que os plasmócitos não tumorais dos doentes com GM apresentam características moleculares que os diferenciam não apenas dos controlos, mas também dos plasmócitos tumorais destes doentes, parecendo influenciar a etiopatogenia das GM e a progressão de MGUS para MM, enquanto as características moleculares dos plasmócitos tumorais parecem ser mais relevantes na resposta à terapêutica e na sobrevivência. O nosso estudo permitiu a identificação de novos biomarcadores moleculares com potencial diagnóstico e prognóstico nas GM. As análises *in vitro* mostram que a associação do partenolide com o bortezomib poderá contribuir para ultrapassar as resistências a este fármaco e constituir uma nova estratégia terapêutica em doentes com MM.

**Palavras chave:** mieloma múltiplo, gamapatia monoclonal de significado indeterminado, apoptose, epigenética, metilação, resistência, novas terapêuticas.







## ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a plasma cell dyscrasia consistently preceded by a pre-malignant disorder called monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), with an intermediate phase of smoldering myeloma (SMM). The expression of molecules involved in apoptosis, cell cycle, angiogenesis and resistance in plasma cells from monoclonal gammopathies' (MG) patients, as well as the methylation status of genes related with these mechanisms are largely unknown. Our aim was to analyse and compare the mentioned parameters in MG subgroups, in order to identify new diagnostic and prognostic biomarkers, relevant in the etiopathogeny of MG and in the progression from MGUS to MM. Another aim consisted in evaluating the effects of new agents with related mechanisms of action, in monotherapy and in association with bortezomib in a MM cell line.

In order to achieve these aims, we studied bone marrow samples from 142 MG patients at diagnosis (62 MM; 12 SMM; 68 MGUS), from 5 patients with relapsed/refractory MM (RRMM) and from 11 non-neoplastic controls. We evaluated the expression of proapoptotic proteins, BAX, TRAIL, TRAIL-R1, -R2, FAS, FAS Ligand, caspase 3, TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  receptor 1; antiapoptotic proteins, BCL-2, survivin, TRAIL-R3 and -R4; cell cycle modulators, P53 and cyclin D1; angiogenesis and inflammation, VEGF, IL-6 and respective receptors (VEGF-Rec2 and IL-6Rec); ubiquitin conjugates; NF- $\kappa$ B and ABC proteins, Pgp and MRP-1, by flow cytometry, in plasma cells with neoplastic (CD138+/CD19-) and non-neoplastic (CD138+/CD19+) phenotype from MG patients and from controls. Methylation status of promoter regions of apoptosis modulator genes (*DAPK*, TRAIL receptors *R1*, *R2*, *R3* and *R4*) and cell cycle regulator genes (*p15*, *p16* and *p53*) was evaluated by methylation specific PCR (MS-PCR). We analysed the cytotoxic and antiproliferative effects of new agents (parthenolide, everolimus, silibinin, gambogic acid, trichostatin A and decitabine), as well as its potential synergistic effect with bortezomib, in a MM cell line (NCI-H929). Cell viability was assessed by rezasurin assays; the type of cell death (annexin V and propidium iodide stain) and activated caspase expression by flow cytometry.

Our results show a general decrease in proapoptotic molecules expression in CD138+/CD19- plasma cells from MG patients, that may contribute to apoptosis resistance and myelomagenesis. Multivariate data analysis identified the increased expression levels of TRAIL-R2, P53, VEGF-Rec, membrane MRP-1 and cytoplasmic Pgp as well as the decreased expression levels of cyclin D1 as independent predictor biomarkers of MG diagnosis and might be implicated in MG etiopathogenesis.

In MGUS patients, we observed an increased expression of TRAIL-R2, FAS, P53 and VEGF-Rec, as well as a decreased expression of TRAIL-R3 and VEGF in non-neoplastic compared to neoplastic plasma cells ( $p < 0,05$ ). In MM patients, we found that CD138+/CD19+ plasma cells presented increased expression levels of TRAIL, TRAIL-R2, FAS, caspase 3, TNF- $\alpha$ , P53 and NF- $\kappa$ B and decreased expression of VEGF and VEGF-Rec, compared to CD138+/CD19- plasma cells ( $p < 0,05$ ). In CD138+/CD19+ plasma cells, we identified in multivariate analysis that the decreased expression of TRAIL-R2, survivin, cyclin D1 and cytoplasmic Pgp as well as the increased expression of membrane Pgp in MM patients present discriminatory potential between MGUS and MM. In CD138+/CD19-, only TRAIL-R2 and VEGF-Rec presented the same potential. In neoplastic plasma cells from MM patients, increased expression of caspase 3 was identified as a biomarker of treatment failure; the decreased expression of VEGF and the increased expression of FAS, FAS ligand, TRAIL and NF- $\kappa$ B were associated to a better overall survival and concerning NF- $\kappa$ B also to a better response to bortezomib, emphasizing the importance of these molecules in the prognosis of MM patients.

Methylation studies showed that 81% of MG patients present at least one and 54% at least two genes hypermethylated from the eight studied genes; *TRAIL-R3* is the most frequently methylated gene (61%). No differences between MG subgroups were observed, suggesting that aberrant methylation, although frequent does not seem to be relevant in the progression from MGUS to MM. In MM patients, *TRAIL-R3* methylation was associated to an increased risk of relapse; however no impact in overall survival was seen.

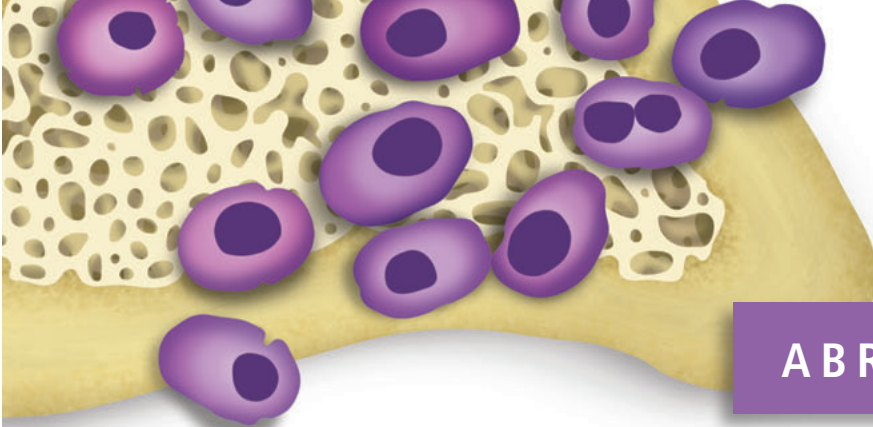
*In vitro* studies to evaluate the therapeutic potential of new agents directed to molecular targets showed that everolimus, parthenolide, silibinin, gambogic acid, trichostatin A and decitabine in high doses induced a significant decrease in NCI-H929 cell viability, time and dose dependent and cell death predominantly due to caspase dependent apoptosis. Parthenolide was the only agent that increased the cytotoxic effect of bortezomib ( $p < 0,01$ ).

In summary, we demonstrate that non-neoplastic plasma cells from MG patients present distinct molecular characteristics from controls and from neoplastic plasma cells of the same patients that may influence the etiopathogenesis of MG and the

progression from MGUS to MM. Molecular characteristics of neoplastic plasma cells seem to be more relevant in treatment response and survival. Our study allowed the identification of new molecular biomarkers with diagnostic and prognostic potential in MG. *In vitro* studies show that the association of parthenolide to bortezomib might overcome bortezomib resistance and represent a new therapeutic strategy.

**Key words:** multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, apoptosis, epigenetics, methylation, resistance, novel therapies.





## ABREVIATURAS

- ABC** – *ATP-binding cassette*
- ABCG2** – *ABC sub-family G member 2*
- AG490** – *JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin*
- AIF** – *apoptosis-inducing factor*
- AKAP12** – *A-kinase anchor protein 12*
- AKT** ou **PKB** – *protein kinase B*
- ANP32E** – *acidic nuclear phosphoprotein 32kDa*
- APAF-1** – *apoptotic protease-activating factor-1*
- APC** – *adenomatous polyposis coli*
- APRIL** – *proliferation-inducing ligand*
- ARF** – *ADP-ribosylation factor*
- ATM** – *ataxia telangiectasia mutated*
- ATP** – *adenosina trifosfato*
- ATPases** – *adenosina trifosfatases*
- AUC** – *área sob a curva*
- BAD** – *BCL2-associated agonist of cell death*
- BAFF** – *B-cell activation factor of the TNF family*
- BAG** – *BCL2-associated athanogene*
- BAK** – *BCL2-associated antagonista/killer 1*
- BAX** – *BCL-2 associated X protein*
- BCL-2** – *B cell CLL/lymphoma-2*
- BCL-9** – *B cell CLL/lymphoma-9*
- BCL-10** – *B cell CLL/lymphoma-10*
- BCL-XL** – *B cell CLL/lymphoma extra large*
- BCRP** – *breast cancer resistance protein*
- $\beta_2$ M** –  *$\beta_2$ -microglobulina*
- BID** – *BH3 interacting domain death agonist*
- BIK** – *BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)*

**BIM** – *BCL2-interacting mediator of cell death*  
**BIRC2** – *baculoviral IAP repeat containing 2*  
**BIRC3** – *baculoviral IAP repeat containing 3*  
**BMI-1** – *B-cell-specific moloney murine leukemia virus insertion site 1*  
**BMSC** – *bone marrow stroma cells*  
**BNIP** – *BCL2/adenovirus E1B protein-interacting protein*  
**BNIP3** – *BCL2/adenovirus E1B protein-interacting protein 3*  
**BRAF** – *B - Raf. proto-oncogene, serine/threonine kinase*  
**CAD** – *caspase-activated DNase*  
**CAM-DR** – *cell-adhesion mediated drug resistance*  
**CCND<sub>1</sub>** – *cyclin D<sub>1</sub> gene*  
**CCND<sub>3</sub>** – *cyclin D<sub>3</sub> gene*  
**CCR1** – *chemokine receptor 1*  
**CD** – *cluster differentiation*  
**CDH-1** – *cadherin-1*  
**CDK** – *cyclin dependent kinase 1, 4, 6 (CDK<sub>1</sub>/CDK<sub>4</sub>/CDK<sub>6</sub>)*  
**CDKI** – *cyclin-dependent kinase inhibitor*  
**CDKN2** – *cyclin-dependent kinase inhibitor 2C*  
**c-FLIP** – *cellular-FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme (FLICE) inhibitory protein*  
**CGREF1** – *cell growth regulator with EF-hand domain 1*  
**CKS1B** – *CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B*  
**CPEB1** – *cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1*  
**CpG** – *citósinas que precedem guaninas*  
**CR** – *resposta completa*  
**CRAB** – *hypercalcemia, renal dysfunction, anemia and bone lesions*  
**CTL** – *linfócitos T citotóxicos*  
**CXCR4** – *chemokine receptor type 4*  
**CYLD** – *cylindromatosis gene*  
**DAC** – *decitabina*  
**DAPK** – *death-associated protein kinase*  
**DcR** – *decoy receptor*  
**DD** – *death domain*  
**DEPTOR** – *DEP domain containing MTOR - interacting protein*  
**DISC** – *death-inducing signaling complex*  
**DKK1** – *dickkopf homolog 1*  
**DLC-1** – *deleted in liver cancer-1*  
**DNA** – *ácido desoxirribonucleico*  
**DNMTs** – *DNA-metiltransferases*  
**DR** – *death receptor*

**E2F** – E2 transcription factor 1  
**ECM** – extracelular matrix  
**EGLN3** – egl-9 family hypoxia-inducible factor 3  
**ERK** – extracelular signal-regulated kinase  
**FADD** – FAS-associated death domain  
**FAM46C** – family with sequence similarity 46, member C  
**FAS** – Fas cell surface death receptor  
**FASL** – Fas cell surface death receptor ligand  
**FDA** – food and drug administration  
**FGFR3** – fibroblast growth factor receptor 3  
**FIF1** – fibroblast growth factor 1  
**FISH** – fluorescence in situ hybridization  
**FITC** – fluoresceína isotiocianato  
**FKHR** – forkhead homolog in rhabdomyosarcoma  
**FLI-1** – friend leukemia integration-site 1  
**FLICE** – FADD-like interleukin-1beta-converting enzyme  
**Flt-1** – fms - related tyrosine kinase  
**FSC** – forward scatter  
**GADD45** – growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha  
**GEM** – grupo espanhol de mieloma  
**GJA1** – gap junction alpha-1 protein  
**GM** – gamapatias monoclonais  
**GMMM** – grupo português de mieloma múltiplo  
**Gp-P cit** – glicoproteína P citoplasmática  
**Gp-P memb** – glicoproteína P membranar  
**GSK-3B** – glycogen synthase kinase 3 beta  
**H3K36me2** – histone H3 lysine 36 dimethylated  
**H3K36me3** – histone H3 lysine 36 trimethylated  
**HATs** – acetiltransferases das histonas  
**HDACI** – inibidor das desacetilases das histonas  
**HIC1** – hypermethylated in cancer 1  
**HMTI** – inibidor da metilação das histonas  
**HMTs** – metiltransferases das histonas  
**HtrA2/Omi** – HtrA serine peptidase 2/Omi  
**IAP1** – proteínas inibidoras da apoptose 1  
**IAP2** – proteínas inibidoras da apoptose 2  
**IC** – intervalo de confiança ou *inhibitory concentration*  
**ICAD** – Inhibitor of caspase-activated DNase  
**ICAM-1** – intercellular adhesion molecule 1  
**ICE** – interleukin-1beta converting enzyme



**Ig** – imunoglobulina  
**IGF-1** – *insulin-like growth factor-1*  
**IGFBP3** – *insulin-like growth factor binding protein 3*  
**IgH** – cadeia pesada de imunoglobulina  
**IKB** – inibidor do *nuclear factor kappa B*  
**IKK** – cinase do IKB  
**IL-1 $\beta$**  – Interleucina-1 beta  
**IL-3** – interleucina-3  
**IL-6** – interleucina-6  
**IL-11** – interleucina-11  
**IMWG** – *international myeloma working group*  
**IP** ou **PI** – iodeto de propídeo  
**IRE1** – inositol-requiring enzyme 1  
**IRF4** – *interferon regulatory factor 4*  
**IRF8** – *interferon regulatory factor 8*  
**ISS** – *international staging system*  
**ITF2357** – inibidor das histonas desacetilases  
**JAK/STAT** – *janus kinase/signal transducer and activator of transcription*  
**JAK2** – *janus kinase 2*  
**JmJC** – *jumonji domain-containing proteins*  
**JNK** – *kinase NH2 - terminal c-jun*  
**JUP** – *junction plakoglobin*  
**KRAS** – *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*  
**LDH** – *lactato desidrogenase*  
**LFA1** – *lymphocyte function - associated antigen 1*  
**LRP** – *lung resistance related protein*  
**LSD1** – *lysin demethylase 1*  
**MAFB** – *avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*  
**MAP** – *mitogen activated protein*  
**MAPK** – *mitogen activated protein kinase*  
**MCL1** – *myeloid cell leukaemia sequence 1*  
**M-CSF** – *macrophage colony-stimulating factor*  
**MDM2** – *murine double minute 2*  
**MDR** – *multidrug resistance*  
**MEK** – *MAP kinase/ERK kinase*  
**MGMT** – *methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase*  
**MGUS** – gamapatia monoclonal de significado indeterminado  
**MIP 1 $\alpha$**  – proteína inflamatória dos macrófagos 1 alfa  
**MiRNA** – micro RNA  
**MM** – mieloma múltiplo sintomático

**MMI** – mieloma múltiplo indolente  
**MMRR** – mieloma múltiplo em recidiva/refratário  
**MMSET** – *myeloma SET domain protein*  
**MR** – resposta mínima  
**MRP-1** – *multidrug resistance protein-1*  
**MS-PCR** – *methylation-specific polymerase chain reaction*  
**mTOR** – *mechanistic target of rapamycin*  
**muc1** – *mucin 1*  
**MYC** ou **c-MYC** – *myelocytomatosis oncogene*  
**NF- $\kappa$ B** – *nuclear factor kappa B*  
**NK** – *natural killer*  
**NOXA** – *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*  
**NRAS** – neuroblastoma RAS  
**NS** – não significativo (estatisticamente)  
**OPG** – osteoprotegerina  
**OR** – *Odd's Ratio*  
**PARP1** – poli ADP-ribose polymerase  
**PBS** – tampão fosfato  
**PCR** – *polymerase chain reaction*  
**PDZK1** – *PDZ domain containing 1*  
**PI3K** – *fosfatidil inositol-3-cinase*  
**PIR** – *proteasoma-inhibitor resistant*  
**PKC $\alpha$**  – proteína cinase C (proteína cinase dependente do cálcio)  
**PR** – resposta parcial  
**PUMA** – *p53 up regulated modelator of apoptosis*  
**RAF** – *RAS function*  
**RANK** – *receptor activator of nuclear factor kB*  
**RANKL** – ligando do RANK  
**RAR $\beta$**  – *retinoic acid receptor, beta*  
**RAS** – *rat sarcoma*  
**RASD1** – *dexamethasone-induced ras-related protein 1*  
**RASSF1A** – *ras association domain-containing protein 1A*  
**RIP** – *receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine protein*  
**RITA** – *reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis*  
**RNA** – ácido ribonucleico  
**RNA<sub>m</sub>** – RNA mensageiro  
**ROC** – *receiver operating characteristic*  
**RUNX/CBFA1** – Runt-related transcription factor/core-binding factor submit alpha1  
**SAHA** – *suberoylanilide hydroxamic acid*  
**SAM** – S-adenosilmetionina

**SD** – doença estável  
**SDF-1 $\alpha$**  – *stromal-cell-derived factor-1 alpha*  
**SFM-DR** – *soluble factor-mediated drug resistance*  
**SFN** – *stratifin*  
**sFRP** – *secreted frizzled-related protein 1, 2, 4, 5*  
**SHP1** – *small heterodimer partner 1*  
**Smac/DIABLO** – *second mitochondria-derived activator of caspase/IAP-binding mitochondrial protein*  
**SOCS1** – *suppressor of cytokine signaling 1*  
**SPARC** – *secreted protein acidic and rich in cysteine*  
**SPSS** – *statistical package for school sciences*  
**SRC** – *sarcoma de rous*  
**SSC** – *side scatter*  
**STAT** – *signal transducer and activator of transcription*  
**SYK** – *spleen tyrosine kinase*  
**TGF $\beta$ R2** – *transforming growth factor beta-receptor 2*  
**TLRs** – *toll-like receptors*  
**TNF** – *tumour necrosis factor  $\alpha$  e  $\beta$*   
**TRAF3** – *TNF receptor-associated factor 3*  
**TRAIL** – *tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*  
**TRAIL-R1/DR4** – *receptor 1 do TRAIL/death receptor 4*  
**TRAIL-R2/DR5** – *receptor 2 do TRAIL/death receptor 5*  
**TRAIL-R3/DcR1** – *receptor 3 do TRAIL/decoy receptor 1*  
**TRAIL-R4/DcR2** – *receptor 4 do TRAIL/decoy receptor 2*  
**TSA** – *tricotatina A*  
**UPR** – *unfolded protein response*  
**USP7** – *ubiquitin-specific protease-7*  
**UV** – *ultravioleta*  
**VCAM-1** – *vascular cell adhesion molecule-1*  
**VEGF** – *vascular endothelial growth factor*  
**VGPR** – *muito boa resposta parcial*  
**VLA4** – *very-late antigen 4*  
**VPN** – *valor preditivo negativo*  
**VPP** – *valor preditivo positivo*  
**WIF1** – *WNT inhibitory factor 1*  
**WIG1** – *WT p53 - induced gene 1*  
**WNT** – *wingless - related MMTU integration site 5A*  
**WWOX** – *WW domain - containing oxireductase gene*  
**XBP-1** – *X-BOX binding protein 1*  
**XIAP** – *X-linked IAP*

## INTRODUÇÃO

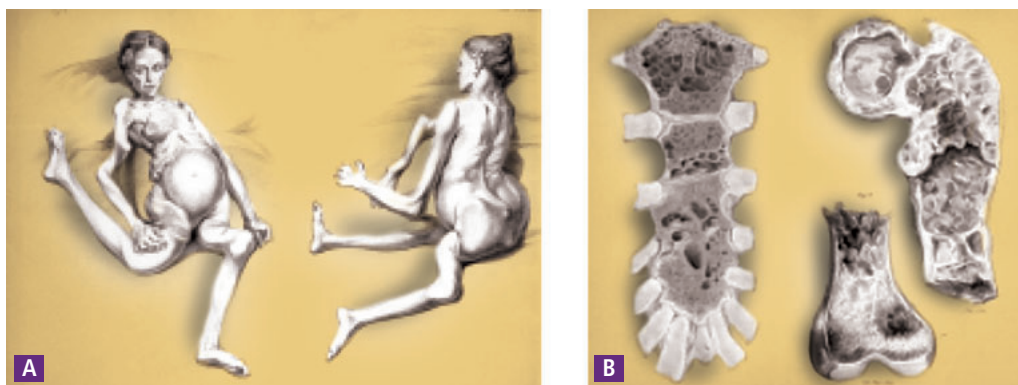
# 1

### 1.1. DEFINIÇÕES E EVOLUÇÃO HISTÓRICA

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia hematológica associada à proliferação de plasmócitos monoclonais que infiltram a medula óssea e secretam paraproteínas, presentes no soro e/ou na urina. Esta discrasia de plasmócitos caracteriza-se, igualmente, pela presença de hipercalcemia (C), disfunção renal (R), anemia (A) e lesões osteolíticas (B), manifestações que constituem os denominados critérios CRAB. As lesões ósseas podem encontrar-se localizadas ou dispersas por todo o esqueleto, com atingimento preferencial dos ossos do crânio, da coluna vertebral, das costelas e da bacia.

Em 1844, Samuel Solly, um distinto cirurgião inglês, fez a primeira descrição detalhada de um doente com MM. Tratava-se de Sarah Newbury, uma mulher com 39 anos de idade, que apresentava um quadro clínico caracterizado por fadiga e dores ósseas associadas a fraturas múltiplas. A autópsia, realizada cerca de 4 anos após o início dos sintomas, revelou uma medula óssea maciçamente infiltrada por uma substância vermelha constituída por células que Solly reconheceu como morfológicamente semelhantes às observadas na autópsia de um outro doente seu, chamado Thomas McBean (Solly, 1844) (Figura 1).

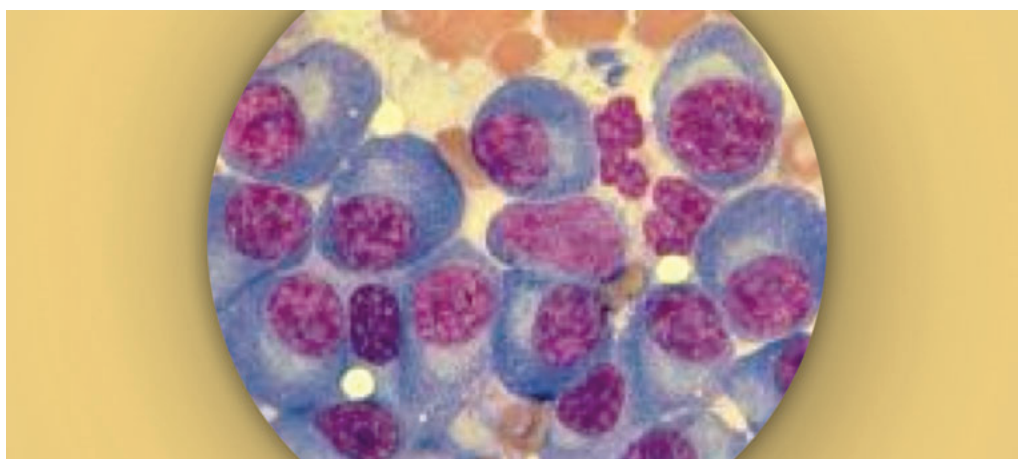
A designação de “plasmócito” foi introduzida por Heinrich Waldeyer-Hartz, anatomista alemão, em 1875 (Waldeyer, 1875), ainda que provavelmente se estivesse a referir a mastócitos tecidulares. Com efeito, foi Ramon e Cajal, anatomista espanhol, em 1890, o primeiro a descrever com rigor o plasmócito e, em 1895, T. von Marschalko, patologista húngaro, publicou uma descrição detalhada destas células, referindo-se às suas principais características: o núcleo excêntrico, a cromatina em grumos, a área peri-nuclear mais pálida (que acreditava incluir o aparelho de Golgi) e o citoplasma irregular (Kyle & Rajkumar, 2008a) (Figura 2).



**FIGURA 1**

**Sarah Newbury foi a primeira doente com mieloma múltiplo descrita de forma minuciosa, em 1844.**

(A) Esboço da doente com fraturas bilaterais do fêmur e úmero direito. (B) Destruição óssea envolvendo o esterno e o fêmur (Solly, 1844).



**FIGURA 2**

**Características morfológicas de plasmócitos presentes na medula óssea de um doente com mieloma múltiplo (coloração Giemsa).**

Wright (Wright, 1900) associou, pela primeira vez, o MM a um tumor de plasmócitos. Bayne-Jones e Wilson descreveram dois grupos de proteínas de Bence-Jones em 1922 e, em 1928, William Perlzweig reconheceu, pela primeira vez, a presença de hiperproteinémia num doente com MM. Um ano mais tarde, Arinkin introduziu o aspirado medular como técnica diagnóstica, o que contribuiu para o diagnóstico do MM. A separação das proteínas séricas por eletroforese foi descrita pelo bioquímico sueco Arne Tiselius em 1930 e, sete anos mais tarde, o mesmo investigador descreveu a separação das globulinas séricas em três componentes proteicos principais, que designou como alfa, beta e gama, de acordo com a sua mobilidade eletroforética. Em 1939, Tiselius e Kabat identificaram, na fração gama, proteínas com atividade de anticorpo e, no mesmo ano, Lewis Longworth, aplicou a eletroforese

no estudo do MM e demonstrou a presença de um pico alto de base estreita que o caracteriza. Um conceito fundamental introduzido por Jan Waldenström, em 1961, consistiu no reconhecimento da diferença entre gamapatia monoclonal e policlonal. Com efeito, Waldenström descreveu doentes com hipergamaglobulinémia e bandas estreitas na eletroforese como tendo uma proteína monoclonal. Muitos destes doentes apresentavam o diagnóstico de MM ou de macroglobulinémia, enquanto outros não tinham evidência de qualquer patologia maligna, pelo que eram considerados portadores de “hipergamaglobulinémia essencial” ou “proteína monoclonal benigna”. Atualmente, a designação eleita é a de “gamapatia monoclonal de significado indeterminado” (MGUS), a qual pode evoluir para MM, macroglobulinémia, amiloidose AL ou distúrbios relacionados. A denominação de MGUS foi introduzida em 1978 (Kyle, 1978) e a de “smoldering myeloma” ou MM indolente (MMI) em 1980 (Kyle RA, 1980). De acordo com um estudo escandinavo recentemente publicado, o MMI representa cerca de 14% de todos os doentes com MM (Kristinsson SY, Holmberg E, 2013), constituindo um estágio clínico intermédio entre a MGUS e o MM sintomático, doravante designado como MM (Kyle RA, 1980).

Em 2003, o *International Myeloma Working Group* (IMWG) elaborou as primeiras definições de MGUS e de MMI. De acordo com este grupo, a MGUS foi definida como uma gamapatia monoclonal (GM) com a presença de proteína monoclonal sérica inferior a 3 g/dL, associada a uma plasmocitose medular inferior a 10%. O MMI foi caracterizado por uma quantidade de proteína monoclonal sérica superior a 3 g/dL e / ou um mínimo de 10% de plasmócitos na medula óssea. Em oposição a estas definições de carácter fundamentalmente laboratorial, o diagnóstico de MM baseia-se numa avaliação essencialmente clínica, relacionada com lesão orgânica terminal, na presença de proteína monoclonal ou plasmócitos monoclonais (*International Myeloma Working Group, 2003*).

Com base nos dados retrospectivos da Clínica Mayo, o risco de progressão de MMI para MM é de 10% ao ano nos primeiros 5 anos, 3% ao ano nos 5 anos seguintes e 1% nos 10 anos subsequentes. A MGUS está associada a um risco anual de progressão para MM de 1% (30% aos 25 anos) (Kyle *et al.*, 2002). Contudo, o risco exato de progressão é afetado por diversos fatores, como o subtipo e a concentração da proteína monoclonal, o *ratio* de cadeias leves livres séricas, a plasmocitose medular, a proporção de plasmócitos fenotipicamente clonais e a presença de imunoparésia (Cesana *et al.*, 2002; Rajkumar *et al.*, 2005; Turesson *et al.*, 2014).

Nos Estados Unidos da América, num ensaio de *screening* de neoplasias do cólon, próstata, pulmão e ovário, foram colhidas amostras séricas de 77 469 dadores não neoplásicos, com idades compreendidas entre os 55 e os 74 anos. Durante um seguimento de 10 anos, entre 1992 e 2001, 71 indivíduos desta população



de doadores não neoplásicos vieram a apresentar o diagnóstico de MM, nos quais foi evidenciada consistentemente a presença de MGUS, nos anos anteriores ao diagnóstico de MM (Prorok *et al.*, 2000; Landgren *et al.*, 2014).

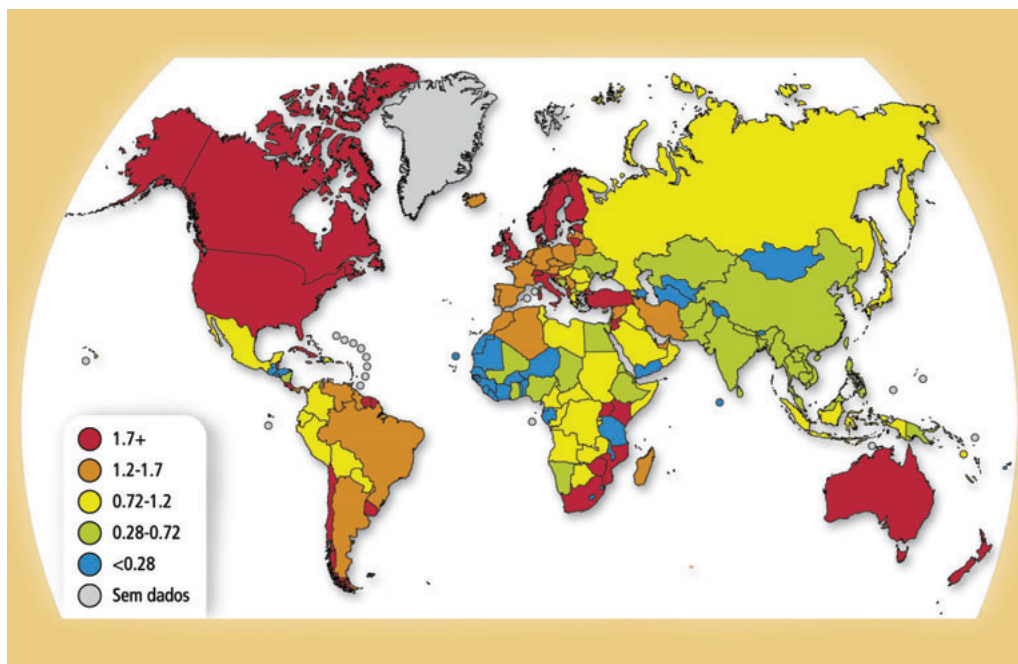
As características clínicas que representam indicadores prognósticos de rápida evolução são conhecidas; contudo, nenhum marcador molecular específico foi identificado. Apesar dos avanços terapêuticos mais recentes, o MM permanece uma doença incurável na generalidade dos casos e a intervenção num estado precursor poderia ser a única oportunidade de alterar a história natural da doença. No entanto, a maioria dos doentes com MGUS nunca irá progredir para MM ao longo da sua vida e tratar estes doentes afigura-se prejudicial e dispendioso, sem benefícios evidentes para os doentes e eticamente inaceitável. O grande desafio da comunidade científica consiste em identificar um subgrupo de doentes numa fase precursora que inevitavelmente evoluisse para MM, nos quais uma intervenção precoce pudesse ter um impacto relevante na evolução e no prognóstico (Agarwal & Ghobrial, 2013).

Os avanços recentes no conhecimento da biologia da MGUS e do MMI ajudaram-nos a compreender melhor a patogénese do MM, como entidade que evolui, na generalidade dos casos, a partir de um estado precursor assintomático (Landgren, 2013). Apesar de largamente desconhecido, o processo de mielomagénesese parece não estar limitado à aquisição linear de alterações, mas a uma transformação heterogénea que inclui múltiplos eventos, em diversas etapas.

## 1.2. EPIDEMIOLOGIA

À escala mundial, estima-se que o MM tenha uma incidência anual de 114 000 novos casos, representado 0,8 a 1% de todos os novos casos de neoplasias malignas e 10% de todas as patologias hemato-oncológicas. Encontram-se descritas cerca de 80 000 mortes por MM, anualmente, o que constitui 0,9% de todas as mortes por cancro. No que respeita a taxas ajustadas para o sexo, observa-se um predomínio no sexo masculino, com uma taxa de incidência anual de 1,7/100 000 indivíduos e no sexo feminino 1,2 /100 000. As taxas de mortalidade representam 1,2/100 000 (homens) e 0,9/100 000 (mulheres) (Becker, 2011; IARC., 2012).

A distribuição geográfica dos doentes com MM é muito díspar a nível mundial, com uma incidência superior nas regiões mais industrializadas da Europa, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia (Becker, 2011) (Figura 3).



**Incidência global de mieloma múltiplo no Mundo (por 100 000 indivíduos).**

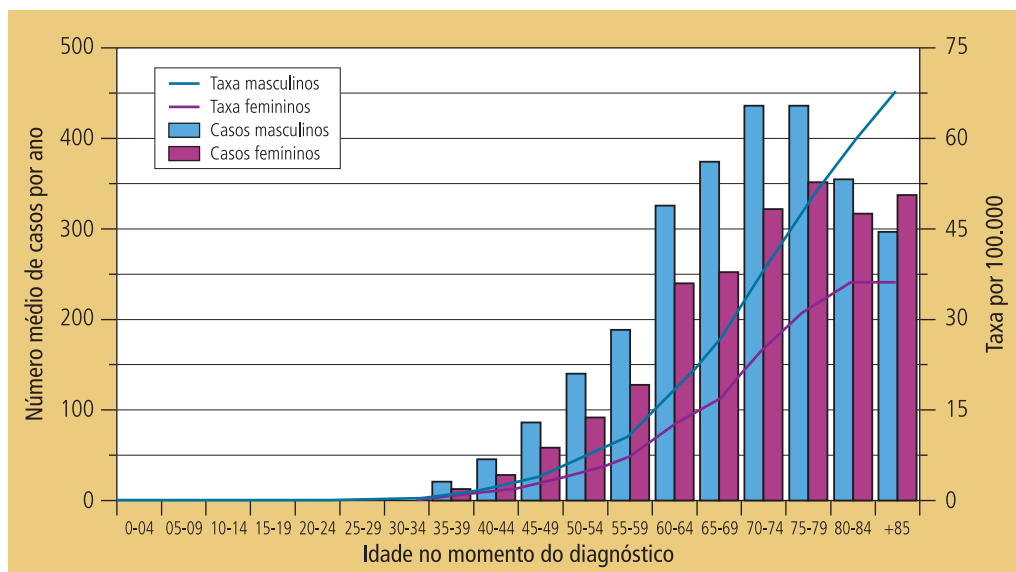
**FIGURA 3**

(Adaptado de GLOBOCAN, WHO 2012).

A comparação entre as várias etnias da população dos Estados Unidos da América revelou uma incidência quase duas vezes superior entre os afro-americanos relativamente aos caucasianos, enquanto a incidência em populações de origem asiática, especialmente chineses e japoneses é muito inferior. Nos países asiáticos, a incidência de doentes com MM tem-se mantido estável apresentando um ligeiro aumento ao longo das décadas entre a população caucasiana dos países ocidentais. Os imigrantes de origem asiática que vivem nos Estados Unidos da América apresentam uma incidência sobreponível à dos respetivos países de origem. As razões que fundamentam as diferenças observadas e a incidência crescente na população caucasiana ocidental são, até ao momento, desconhecidas. Cerca de 39 000 novos casos de MM foram diagnosticados na Europa em 2012 (1% de todas as neoplasias), com a Noruega a apresentar a incidência mais elevada em homens e mulheres; a incidência mais reduzida em homens foi observada na Albânia e em mulheres na Bósnia-Herzegovina (Ferlay *et al.*, 2013).

A idade mediana, ao diagnóstico está compreendida entre os 65 e os 70 anos; menos de 1% dos doentes apresenta idade inferior a 35 anos. Na [figura 4](#), está representado um gráfico que evidencia a distribuição, por idade e por sexo, dos doentes com MM, no momento do diagnóstico. Como se pode observar neste gráfico, o MM atinge maioritariamente indivíduos do sexo masculino e com idade superior a 60 anos.





**FIGURA 4**

**Avaliação da idade e do sexo dos doentes com mieloma múltiplo, ao diagnóstico.**

O gráfico representa o número médio anual de novos casos de mieloma múltiplo e a incidência por sexo e por grupo etário no Reino Unido (2009-2011) (UK, 2013; Cancer Research UK, 2012).

### 1.3. ETIOLOGIA

A etiologia do MM é, até ao presente, maioritariamente desconhecida. Este facto decorre da reduzida frequência desta patologia, o que coloca dificuldades à sua investigação e, ainda, do facto dos fatores de risco que desempenham um papel fundamental na generalidade das doenças malignas, como o consumo de tabaco, de álcool ou a dieta, não terem uma associação estatisticamente significativa com o MM. Com efeito, não foram observadas associações entre o consumo de gordura de origem animal, alimentos fritos ou frutas e vegetais e a probabilidade de desenvolver MM (Boffetta *et al.*, 1989). O mesmo se verificou para agentes físicos, como radiações (Preston *et al.*, 2007), ou químicos, como pesticidas (Beane Freeman *et al.*, 2011) ou solventes orgânicos (Rinsky *et al.*, 2002); não existem dados consistentes que fundamentem o risco acrescido de MM nos trabalhadores da indústria química (Alexander *et al.*, 2007; Greenberg *et al.*, 2001; Massoudi *et al.*, 1997).

Friedman e Herrinton descreveram uma associação entre a obesidade em indivíduos caucasianos e o risco aumentado para o desenvolvimento de MM (Friedman & Herrinton, 1994). Os mesmos autores não encontraram esta associação em mulheres caucasianas nem em homens ou mulheres negros. Por outro lado, doenças relacionadas com a estimulação imune crónica, como patologias autoimunes ou

condições alérgicas não foram consistentemente relacionadas com o MM (Mills *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1994; Alexander *et al.*, 2007).

Estudos prévios indicam que a ingestão etílica ou o consumo de tabaco não se relacionam causalmente com o risco de MM, independentemente do sexo, da raça ou da etnia. Por outro lado, também não foram encontrados padrões consistentes associados a intensidade ou duração dos consumos (Brown *et al.*, 1997; Alexander *et al.*, 2007).

Presentemente, estão a ser desenvolvidos numerosos esforços com o objetivo de identificar fatores etiológicos nas doenças hemato-oncológicas, em geral, e no MM em particular (Becker, 2011).

## **1.4. PATOGÉNESE**

O MM é uma patologia muito heterogénea, não apenas do ponto de vista clínico, mas também a nível genético e molecular, como já anteriormente referido. Com efeito, diversas alterações genéticas e/ou epigenéticas têm sido descritas na MGUS, no MMI, no MM e na leucemia de plasmócitos, que desempenham um papel relevante na mielomagénese.

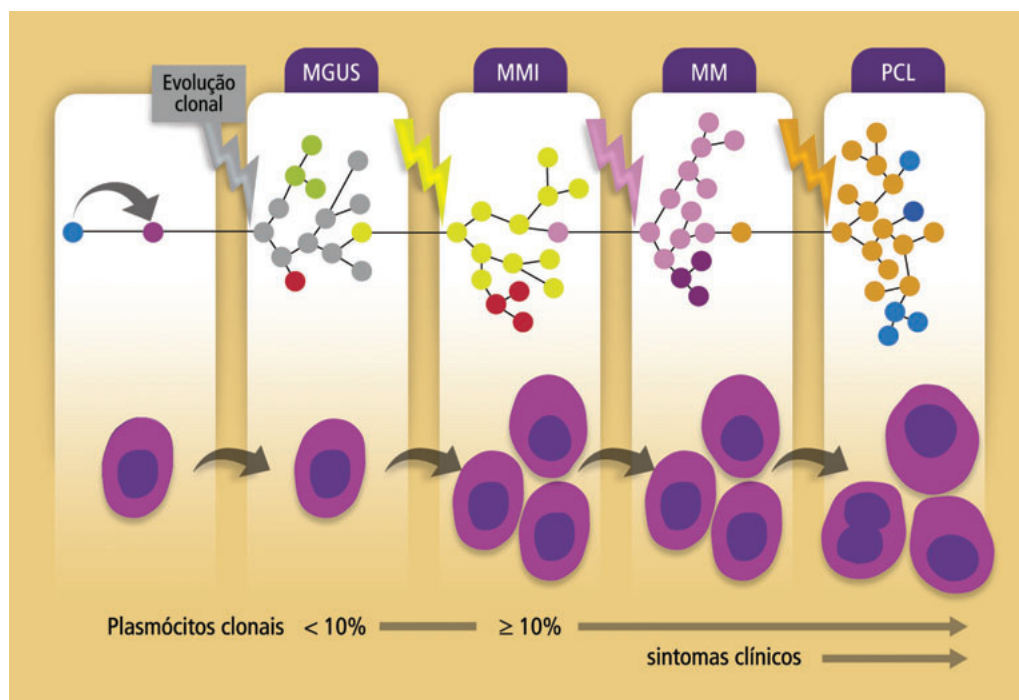
### **1.4.1. Anomalias genéticas e citogenéticas**

#### **1.4.1.1. Heterogeneidade intraclonal no mieloma múltiplo**

Os estudos moleculares contribuíram, não apenas para a caracterização de genes e vias celulares alterados no MM, mas também para a demonstração de que a heterogeneidade intraclonal é uma característica frequente desta patologia (Chapman *et al.*, 2011; Morgan *et al.*, 2012; Egan *et al.*, 2012; Prideaux *et al.*, 2014). Esta heterogeneidade acrescenta complexidade à progressão do MM, uma vez que as alterações genéticas não são adquiridas de forma linear, mas aleatória e seguem diversas vias com ramificações, à semelhança da “Teoria da Evolução das Espécies” de Darwin. Este modelo de evolução do MM através de diferentes e complexos caminhos com múltiplas “ramificações” traduz uma forma simplificada de

representação das inúmeras vias celulares e moleculares que poderão estar envolvidas na progressão do MM e no desenvolvimento de resistência à terapêutica (Morgan *et al.*, 2012; Prideaux *et al.*, 2014) (Figura 5). É importante compreender que os diferentes clones de MM coexistem como parte de um equilíbrio dinâmico e que competem por recursos limitados. A analogia com a teoria darwiniana explica a seleção dos subclones de plasmócitos que apresentam vantagem competitiva na sobrevivência, conferida pelas alterações genéticas e/ou epigenéticas aleatórias que vão sendo adquiridas (Morgan *et al.*, 2012; Prideaux *et al.*, 2014).

O conceito da heterogeneidade intraclonal é fundamental para a compreensão da evolução do MM, uma vez que os estudos genômicos representam as alterações genéticas presentes na população clonal predominante no momento da colheita da amostra. Estes dados têm relevância particular, uma vez que os genes e as vias desregulados na população clonal predominante não são provavelmente comuns às dos outros subclones presentes, justificando as resistências à terapêutica e as recidivas frequentemente observadas nos doentes com MM, resultado da progressão de clones minoritários (Morgan *et al.*, 2012; Prideaux *et al.*, 2014; Anderson *et al.*, 2011).

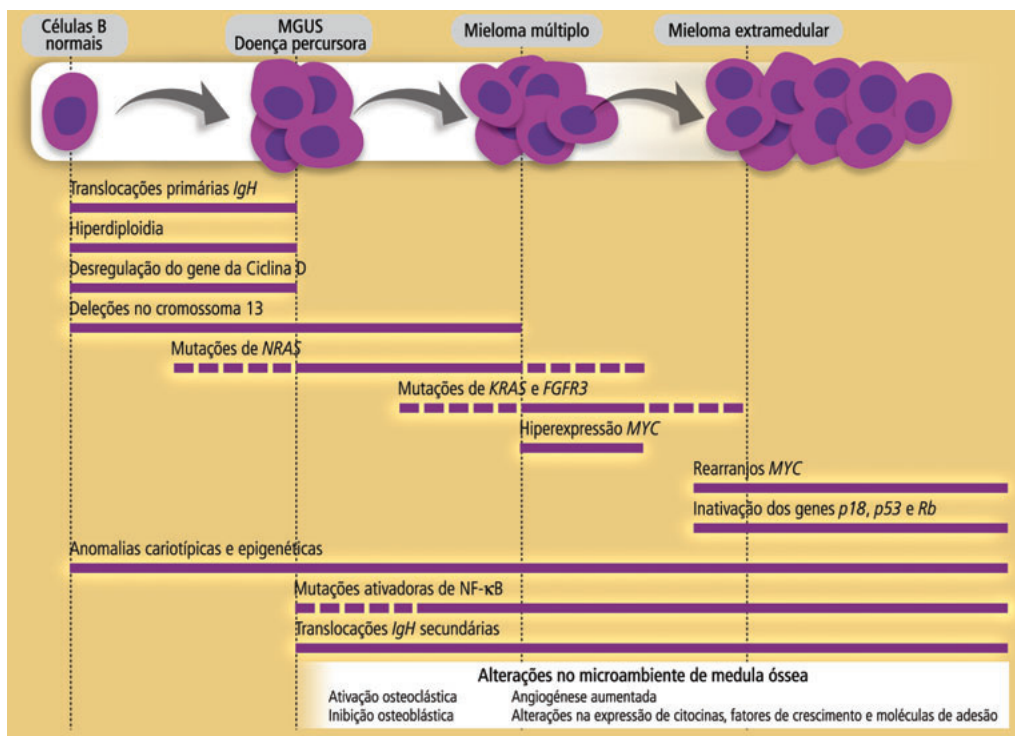


**FIGURA 5** Evolução clonal no mieloma múltiplo.

A figura representa o desenvolvimento da gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) a partir de uma célula progenitora de mieloma múltiplo e a sua progressão para mieloma múltiplo indolente (MMI), mieloma múltiplo sintomático (MM) e leucemia de plasmócitos (PCL), evidenciando a heterogeneidade intraclonal e a vantagem competitiva de alguns subclones tumorais (Adaptado de Morgan *et al.*, 2012).

### 1.4.1.2. Genética molecular – hiperdiploidia *versus* não hiperdiploidia

As alterações genéticas que ocorrem na evolução de MGUS para leucemia de plasmócitos podem ser classificadas como eventos primários, que contribuem para a imortalização do plasmócito, ou secundários, responsáveis pela progressão da doença. Esta classificação facilita a divisão do MM em dois subgrupos que refletem duas vias oncogénicas diferentes de evolução: uma fase primária caracterizada por ganhos cromossómicos (hiperdiploide) e outra por alterações estruturais (não-hiperdiploide) que envolvem, na maioria dos casos, translocações de genes que codificam a cadeia pesada das imunoglobulinas (*IgH*) no locus 14q32 com genes localizados noutros cromossomas (nomeadamente, 4, 6, 11, 16 e 20). Estas translocações ocorrem devido a uma recombinação aberrante da mudança de classe nos centros germinativos dos gânglios linfáticos e conduzem à subsequente desregulação de oncogenes por elementos de controlo do *IgH* (Klein *et al.*, 2011; Kuehl & Bergsagel, 2012; Chesi & Bergsagel, 2013; Avet-Loiseau *et al.*, 2011a; Sawyer, 2011).



Eventos oncogénicos na mielomagenese.

FIGURA 6

A transição inicial de células B do centro germinativo para um clone pré-neoplásico (MGUS) envolve a ocorrência de translocações primárias do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas (*IgH*), hiperdiploidia e deleções no cromossoma 13 que, direta ou indiretamente, conduzem à desregulação do gene da ciclina D. As translocações secundárias que envolvem os genes *MYC* (8q24), *MAFB* (20q12) e *IRF4* (6p25) são frequentes no mieloma múltiplo (MM) e extremamente raras na MGUS. As mutações dos genes *RAS* ou *FGFR3*, a desregulação do gene *MYC* e a inativação dos genes *p18*, *p53* e *Rb* são encontradas apenas no MM. Para além das alterações moleculares, também as interações anómalas entre os plasmócitos tumorais e o microambiente, assim como uma angiogénese aberrante são características da progressão do MM (Adaptado de Kuehl & Bergsagel, 2002 e de Palumbo & Anderson, 2011).

Com efeito, as translocações cromossômicas representam cerca de 40-50% dos eventos primários no MM e influenciam fortemente a forma de apresentação, a resposta à terapêutica e a evolução clínica desta patologia (Kuehl & Bergsagel, 2005; Anderson *et al.*, 2011). A hiperdiploidia está geralmente associada a um prognóstico mais favorável e envolve a trissomia dos cromossomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21, sendo reduzida a prevalência de translocações *IgH* (Sawyer, 2011; Prideaux *et al.*, 2014; Chng *et al.*, 2007a).

Os eventos hiperdiploides ou não-hiperdiploides resultam, direta ou indiretamente, na desregulação da transição G1/S do ciclo celular, através da hiperexpressão de genes da ciclina D ( $D_1$ ,  $D_2$  e/ou  $D_3$ ), uma anomalia molecular precoce e crucial no MM (Bergsagel *et al.*, 2005). Estas alterações genéticas iniciais são invariavelmente seguidas de instabilidade cariotípica, que poderá conduzir a mais deleções e translocações ou mutações secundárias (Sawyer, 2011). A caracterização das diversas anomalias genéticas nos doentes com MM e o seu impacto no prognóstico motivou a proposta de um sistema de classificação baseado no risco e a sugestão de recomendações terapêuticas, por parte de alguns autores (Boyd *et al.*, 2012). Apesar do conhecimento adquirido acerca do papel destas anomalias cromossômicas no prognóstico de doentes com MM, não existem, até ao presente, terapêuticas que tenham como alvo genes ou vias celulares influenciadas por alterações na expressão destes. Os dados de estudos que avaliaram o bortezomib e a lenalidomida demonstraram que os regimes que incluíam estes novos fármacos eram mais eficazes do que abordagens terapêuticas convencionais em doentes com fatores citogenéticos de alto risco. Contudo, os doentes com MM de alto risco citogenético desenvolvem resistências também com estes fármacos, pelo que são necessárias estratégias terapêuticas mais eficazes (Reece *et al.*, 2009; San Miguel *et al.*, 2008a).

### 1.4.1.3. Translocações primárias

O locus *IgH*, localizado na posição 14q32, encontra-se transcripcionalmente ativo nas células B e a translocação de oncogenes para esta região origina a sua subsequente expressão desregulada, o que representa um evento fundamental na patogénese da maioria das neoplasias malignas de células B, incluindo o MM (Nahi *et al.*, 2011). As translocações que envolvem o locus 14q32 foram descritas como eventos genéticos precoces no desenvolvimento do MM, uma vez que a sua presença foi observada em 35-50% dos doentes com MGUS e com MMI (Fonseca *et al.*, 2004; Kuehl & Bergsagel, 2012), ainda que algumas variantes possam estar associadas a progressão ou translocações secundárias no MM (Bergsagel *et al.*, 2005; Decaux *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2009).

As translocações primárias mais frequentemente observadas no MM são a t(4;14) e a t(11;14); as menos comuns incluem a t(14;16), a t(6;14) e a t(14;20). Estas translocações estão associadas à hiperexpressão de oncogenes, que incluem ciclinas do grupo D ( $D_1$ ,  $D_2$  e  $D_3$ ), membros da família MAF (*MAFA*, *MAFB* e *c-MAF*), o *myeloma SET domain protein* (*MMSET*) e o *fibroblast growth factor receptor 3* (*FGFR3*), com influência demonstrada no prognóstico (Decaux *et al.*, 2008; Zhan *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2007).

#### – Translocação t(4;14)

A t(4;14) é observada em cerca de 15 % dos casos de MM ao diagnóstico e tem sido associada a um prognóstico desfavorável, em diferentes séries de doentes com MM (Chang *et al.*, 2004; Moreau *et al.*, 2002; Avet-Loiseau *et al.*, 2010; Kalff & Spencer, 2012). Esta translocação resulta na expressão ectópica do recetor da tirosina cinase em plasmócitos devido à regulação pelo promotor *IgH*, com um papel atualmente incerto na mielomagénese. Caracteriza-se pela hiperexpressão de dois oncogenes: o *FGFR3* e o *MMSET* (Chesi *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 2009). O gene *FGFR3*, localizado no cromossoma 4, codifica um recetor transmembranar de tirosina cinase envolvido na regulação da proliferação, diferenciação e migração celulares, encontrando-se hiperexpresso em muitas neoplasias (Turner & Grose, 2010). No entanto, o papel patogénico do *FGFR3* é questionado pelo facto de cerca de 30% dos tumores com t(4;14) não apresentarem expressão deste gene, apesar de manterem um prognóstico desfavorável (Keats *et al.*, 2003; Santra *et al.*, 2003). Este facto apoia o papel de um segundo gene, o *MMSET*, que codifica um fator importante na remodelação da cromatina com atividade de metiltransferase, e que se encontra também hiperexpresso em tumores com a t(4;14) (Zhan *et al.*, 2006). Ainda que incerto, este gene parece ter um papel importante na regulação epigenética e na reparação do DNA (Martinez-Garcia *et al.*, 2011; Pei *et al.*, 2011). Foram igualmente descritas mutações somáticas adicionais após a translocação que resultam num recetor continuamente ativo, mesmo na ausência de ligando, o que conduz à ativação de vias de sinalização, como a via MAP (*mitogen activated protein kinase*), contribuindo para a mielomagénese (Chesi *et al.*, 2001; Ronchetti *et al.*, 2001). Estudos recentes demonstraram que o tratamento com bortezomib e/ou lenalidomida poderia ultrapassar o prognóstico desfavorável associado à presença da t(4;14) em doentes com MM (Kalff & Spencer, 2012; San Miguel *et al.*, 2008a; Avet-Loiseau *et al.*, 2010). Estudos pré-clínicos com inibidores do *FGFR3* revelaram-se promissores na t(4;14), o que conduziu ao desenvolvimento de ensaios clínicos, cujos resultados irão ajudar a determinar a utilidade clínica destes inibidores em doentes com a t(4;14) (Kalff & Spencer, 2012).

#### – Translocação t(11;14)

A t(11;14) está presente em 15 a 17% dos doentes com MM, sendo uma das translocações mais frequente nestes doentes (Stewart *et al.*, 2007). Como consequência desta translocação envolvendo o locus *IgH*, ocorre hiperexpressão do gene da ciclina D na forma *CCND1*, que codifica a ciclina D1, que se encontra anormalmente expressa em plasmócitos e em células B. Esta ciclina está envolvida na regulação do ciclo celular e, em associação com a CDK4 (*cyclin dependent kinase 4*) e a CDK6 (*cyclin dependent kinase 6*), fosforila e inativa a proteína do retinoblastoma, que controla a transição da fase G1 para a fase S, facilitando a progressão do ciclo celular (Alao, 2007; Tashiro *et al.*, 2007; Bartek & Lukas, 2011). O prognóstico associado a esta translocação é controverso, com referências a impacto favorável, desfavorável ou ausente (Avet-Loiseau *et al.*, 2007; Prideaux *et al.*, 2014). A expressão de ciclina D1 é mais frequente que a t(11;14), sugerindo que outros mecanismos como a amplificação genética ou a trissomia do 11 possam contribuir para a hiperexpressão da ciclina D1.

#### – Translocação t(14;16)

A t(14;16), identificada em cerca de 5 a 10% dos doentes com MM (Zhan *et al.*, 2006; Hurt *et al.*, 2004), é uma translocação que envolve o gene *IgH* e que coloca em justaposição a região de *switch IgH* e o *loci* do gene *c-MAF* na posição 16p23, conduzindo à hiperexpressão da proteína c-MAF (Fonseca *et al.*, 2002; Hurt *et al.*, 2004). Este gene regula a ciclina D2, envolvida na transição G1/S, promovendo a progressão ao longo do ciclo celular. O gene *c-MAF* regula ainda a Integrina B7, uma molécula de adesão que se liga à E-caderina expressa nas células do estroma da medula óssea. Através desta via, a hiperexpressão da proteína c-MAF favorece a interação entre as células de MM e as células do estroma, associando-se ao aumento da secreção de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e ao desenvolvimento de lesões ósseas líticas. Como o VEGF é um potente estimulador da angiogénese, os seus níveis aumentados poderiam promover a progressão tumoral (Hurt *et al.*, 2004; Podar *et al.*, 2007; Yeung & Chang, 2008). Como esta translocação foi também descrita em doentes com MGUS, poderá estar envolvida em estádios precoces do desenvolvimento do MM (Fonseca *et al.*, 2002). Ainda que inicialmente esta translocação tenha sido associada a um prognóstico desfavorável (Fonseca *et al.*, 2003; Yeung & Chang, 2008), uma análise retrospectiva multivariada, afectuada em 1003 doentes com MM *de novo*, não evidenciou impacto no prognóstico (Avet-Loiseau *et al.*, 2011b).



#### – Translocação t(6;14)

A t(6;14) é rara, encontrando-se presente em apenas 2% dos doentes com MM. Resulta no aumento da expressão do gene *CCND3*, através da justaposição com o promotor *IgH* (Zhan *et al.*, 2006; Shaughnessy *et al.*, 2001). Não foi observado impacto no prognóstico (Avet-Loiseau *et al.*, 2007).

#### – Translocação t(14;20)

A t(14;20) é a translocação mais rara que envolve o locus *IgH* e resulta no aumento da expressão do gene *MAFB*. Estudos com *microarrays* demonstraram que a hiperexpressão de *MAFB* resulta num perfil de expressão génica semelhante ao observado com o gene *c-MAF* (Zhan *et al.*, 2006), sugerindo a desregulação de vias comuns. Associa-se a um prognóstico desfavorável, quando presente em doentes com MM e a doença estável a longo prazo em doentes com as entidades precursoras, MGUS e MMI (Ross *et al.*, 2010). Estes dados sugerem a presença de eventos genéticos adicionais à translocação a contribuírem para o prognóstico desfavorável.

#### 1.4.1.4. Translocações secundárias

As translocações secundárias ocorrem, de um modo geral, mais tardiamente na evolução do MM e, ao invés das translocações primárias, são independentes de recombinações relacionadas com mudança de classe das imunoglobulinas. A translocação secundária mais frequente envolve rearranjos no locus 8q24 (Gabrea *et al.*, 2008). O gene tipicamente desregulado nas translocações secundárias é o *c-MYC*, com um papel fundamental no crescimento e na proliferação celulares e, por conseguinte, na tumorigénese (Dang, 2012). A sua hiperexpressão associa-se a um prognóstico desfavorável, a estádios avançados da doença e a elevados níveis de  $\beta$ 2-microglobulina.

Contrariamente às translocações primárias observadas no MM, que consistem, na maioria dos casos, em simples trocas recíprocas de material cromossómico, os rearranjos envolvidos nas translocações *c-MYC*, são frequentemente complexos e envolvem diversos cromossomas (Gabrea *et al.*, 2008; Dib *et al.*, 2008), nomeadamente nas localizações 1p13, 1p21-22, 6p21, 6q12-15, 13q14 e 16q22 (Avet-Loiseau *et al.*, 2001; Mohamed *et al.*, 2007).

A hiperexpressão do oncogene *c-MYC* é muito raramente observada na MGUS, estando presente em cerca de 15% dos doentes com MM ao diagnóstico e em 40-50% na doença avançada (Avet-Loiseau *et al.*, 2001). Estudos recentes revelaram que



alterações na expressão do oncogene *c-MYC* poderiam estar implicadas na progressão de MGUS para MM (Chng *et al.*, 2011).

#### 1.4.1.5. Outras alterações citogenéticas

##### – Anomalias no cromossoma 1

Os ganhos do braço longo do cromossoma 1 (+1q) são eventos identificados em 35 a 40% dos doentes com MM ao diagnóstico e frequentemente observados em associação com perdas do braço curto do mesmo cromossoma (-1p) (Smith *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2010b; Fonseca *et al.*, 2009). A associação das anomalias +1q e/ou -1p a um prognóstico desfavorável foi considerada, por alguns autores, independente do tipo de terapêutica (intensiva ou não intensiva) (Shaughnessy *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2010; Fonseca *et al.*, 2006; An *et al.*, 2014).

Apesar dos dados conhecidos até ao presente, os genes relevantes no braço longo do cromossoma 1 não se encontram claramente identificados. A região 1q21 é a mais consistentemente envolvida e contém diversos oncogenes candidatos: *CKS1B*, *ANP32E*, *BCL-9* e *PDZK1* (Walker *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2010; Zhan *et al.*, 2007). A importância desta região é fundamentada pela demonstração de uma associação forte entre a anomalia +1q21 e a existência de um prognóstico adverso (Smith *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2010; Shaughnessy *et al.*, 2007). Destes genes, o *ANP32E*, um inibidor da proteína fosfatase 2A, com um papel na remodelação da cromatina e na regulação da transcrição, é de particular interesse, uma vez que se demonstrou estar independentemente associado a uma menor sobrevivência (Walker *et al.*, 2010).

De realçar que o ganho 1q21 é raramente encontrado na MGUS, aumentando a sua incidência significativamente no MM em recidiva e na leucemia de plasmócitos, comparativamente ao MM recentemente diagnosticado (Hanamura *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2006). Estes achados justificam a importância desta alteração citogenética (+1q) na patogénese do MM e sugerem que os doentes possam beneficiar de inibidores específicos dos genes e vias alterados.

A deleção da totalidade do braço curto do cromossoma 1 (del 1p) ou deleções parciais de 1p são observadas em cerca de 30% dos doentes com MM e associam-se a um prognóstico desfavorável (Walker *et al.*, 2010; Boyd *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2010a). Foram identificadas duas regiões em 1p (a 1p12 e a 1p32.3) com importância particular na patogénese do MM, quando deletadas. A região 1p12 pode estar deletada de forma hemi ou homozigótica e contém o gene

supressor tumoral *FAM46C*, que estudos de sequenciação revelaram estar envolvido na tradução proteica (Chapman *et al.*, 2011). Este gene foi frequentemente descrito como mutado em doentes com MM e associado a um prognóstico adverso (Walker *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2010b; Boyd *et al.*, 2011; Prideaux *et al.*, 2014). Do mesmo modo, a região 1p32.3 pode estar deletada de forma hemi ou homozigótica e inclui dois genes, o *FIF1* e o *CDKN2C*. Este último é um inibidor da cinase 4 dependente da ciclina (CDK4) e está envolvido na regulação do ciclo celular, enquanto o *FIF1* codifica uma proteína importante no início da apoptose através da via do FAS. A deleção homozigótica da região 1p32.3 tem um impacto prognóstico neutro ou negativo nos doentes com MM (Boyd *et al.*, 2011).

### – Deleção 13/13q

A deleção (del) do cromossoma 13 é descrita em cerca de 50% dos casos de MM e associa-se com frequência a subtipos não-hiperdiplóides. Na maioria dos casos (85%), a deleção do cromossoma 13 constitui uma monosomia ou a perda do braço longo deste cromossoma, enquanto nos outros 15% várias deleções parciais podem ocorrer. Neste contexto, a identificação de genes cruciais para a mielomagenese representa um desafio, uma vez que permanece algum grau de função, resultante do(s) alelo(s) residual(ais) (Prideaux *et al.*, 2014).

Os estudos moleculares revelaram que o gene supressor tumoral *RB1* se encontra significativamente subexpresso na del(13/13q) o que resulta num menor efeito regulador negativo do ciclo celular (Walker *et al.*, 2010). O impacto prognóstico da del(13/13q) é difícil de definir, dada a sua frequente associação com outras alterações de alto risco, como é o caso da t(4;14). Quando a del(13/13q) é identificada por citogenética convencional, a sua associação a uma sobrevivência menor é mais consistente. No entanto, se detetada por FISH e, na ausência de outras alterações citogenéticas de alto risco, não tem impacto prognóstico documentado (Avet-Loiseau *et al.*, 2007).

Na MGUS, foram descritos resultados contraditórios quanto à prevalência da del(13/13q). Com efeito, alguns autores encontraram uma incidência significativamente inferior desta anomalia na MGUS (25%), em comparação com o MM (50%) (Avet-Loiseau *et al.*, 2002), enquanto outros descreveram uma incidência sobreponível nas duas entidades (Königsberg *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2002). Chiecchio *et al.* (2009) descreveram igualmente uma incidência significativamente superior no MM (40%) comparativamente ao MMI (15%) e à MGUS (4%) (Chiecchio *et al.*, 2009). Fonseca *et al.* (2002) demonstraram que quando a del 13q era detetada em doentes com MGUS, ocorria na maioria dos plasmócitos clonais (Fonseca *et al.*, 2002), consistente com o que é normalmente observado no MM (Königsberg *et al.*, 2000).

### – Delecção 17p

As deleções alélicas somáticas (17p) e as mutações pontuais do gene supressor tumoral *p53* (ou *TP53*) são as anomalias genéticas mais frequentemente observadas nas neoplasias malignas humanas (Hollstein *et al.*, 1991; Hainaut & Hollstein, 2000). O gene relevante, que não é expresso na del(17p) é o gene supressor tumoral *p53*, como demonstrado pelos estudos de expressão génica realizados em amostras com del(17p) monoalélica, que expressam significativamente menos *p53* comparativamente às amostras sem deleção (Walker *et al.*, 2010; Lodé *et al.*, 2010). O gene *p53*, localizado na região 17p13, codifica uma proteína com 53kDa (P53), que constitui um fator de transcrição multifuncional envolvido nos seguintes processos celulares: controlo do ciclo celular, morte celular programada, senescência, diferenciação, transcrição, replicação, reparação de DNA e, ainda, manutenção da estabilidade genómica. A proteína P53 é convertida numa forma ativa, em resposta a agentes físicos ou químicos que lesam o DNA, como a radiação ultravioleta, X ou gama, os agentes oxidantes ou os fármacos citotóxicos e atua como fator protetor contra o stresse genotóxico (Hainaut & Hollstein, 2000).

As alterações da proteína P53 são consideradas eventos secundários na progressão do MM. Ainda que a incidência de mutações no gene *p53* seja geralmente reduzida no MM (3%), as deleções hemizigóticas são observadas em cerca de 10% dos doentes ao diagnóstico e numa frequência superior nos estádios mais avançados da doença (Fonseca *et al.*, 2003), constituindo um fator prognóstico desfavorável (Chang *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007b). De facto, a del(17p) representa a alteração molecular mais importante no prognóstico de doentes com MM, uma vez que se associa a um fenótipo agressivo, à presença de doença extramedular ou à leucemia de plasmócitos (Drach *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2012b; Tiedemann *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2003; Avet-Loiseau *et al.*, 2007).

### – Outras deleções

Outras deleções cromossómicas estão descritas em regiões que incluem genes supressores tumorais, o que poderá constituir um fator importante na mielomagénese. A del(14q) é um evento descrito em 38% dos casos de MM e inclui o gene supressor tumoral *TRAF3* (Walker *et al.*, 2010). A del(16q) é outra alteração genética relativamente frequente, descrita em 35% dos casos de MM e associa-se à perda do gene supressor tumoral *CYLD* e *WWOX* (Walker *et al.*, 2010). A del(11q) é observada em 7% dos doentes com MM e relaciona-se com perda dos genes supressores tumorais *BIRC2* e *BIRC3* (Walker *et al.*, 2010). Todos os genes mencionados, com exceção do *WWOX*, que se encontram implicados na apoptose, estão envolvidos na via do NK- $\kappa$ B e demonstram que a ativação desta via de sinalização é

crucial na patogénese do MM (Walker *et al.*, 2010; Annunziata *et al.*, 2007; Keats *et al.*, 2007). A del(6q) e a del(8p) foram descritas em 33 e 19 a 24% dos casos de MM, respetivamente, a primeira sem impacto prognóstico definido e a segunda considerada um fator prognóstico negativo, traduzido numa sobrevivência livre de progressão e numa sobrevivência global inferiores (Walker *et al.*, 2010; Nahi *et al.*, 2011; Neben *et al.*, 2010; Gmidène *et al.*, 2013).

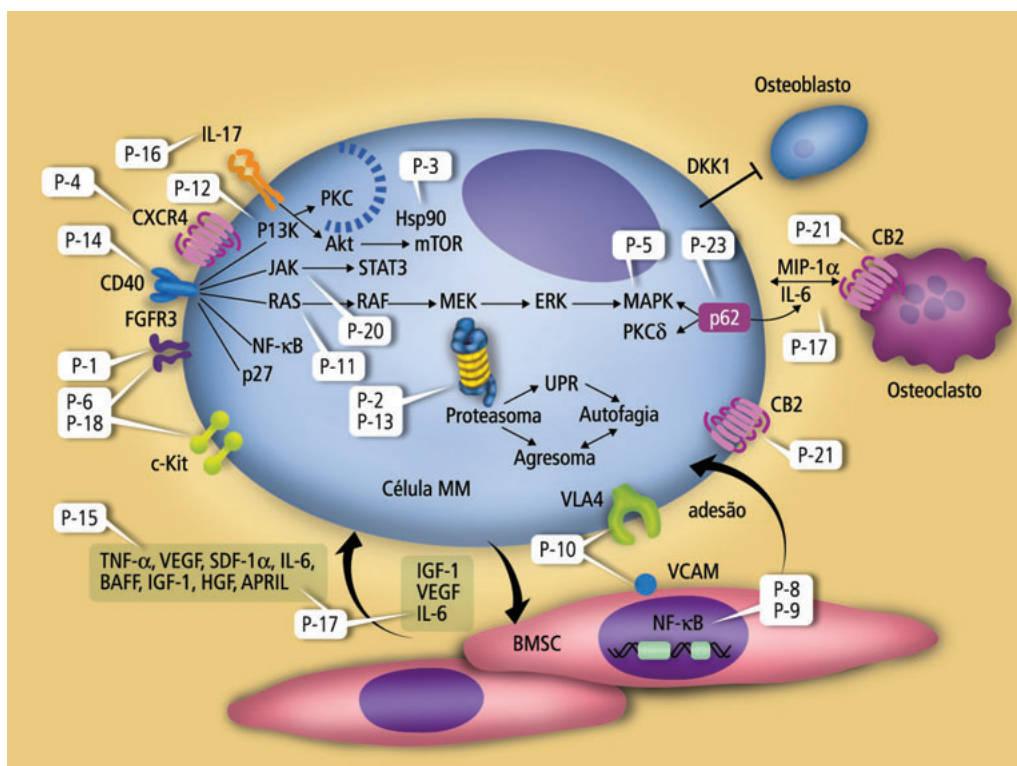
Foi demonstrado que o gene do recetor do *TRAIL* (*tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) está localizado no braço curto do cromossoma 8 e foi proposto que a expressão reduzida deste recetor na del(8p) pudesse diminuir a sensibilidade das células tumorais à apoptose mediada pelo *TRAIL*, o que representa uma vantagem para o clone neoplásico conseguir escapar à vigilância exercida pelas células NK e pelos linfócitos T citotóxicos (Takeda *et al.*, 2002).

## **1.4.2. Desregulação das vias de proliferação e de sobrevivência celulares no mieloma múltiplo**

### **1.4.2.1. A Via MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)**

A via MAPK é uma via de sinalização celular altamente conservada, envolvida na regulação da diferenciação, da proliferação e da sobrevivência nas células normais. Esta via pode ser ativada por fatores de crescimento ou por citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*), a IL-6 (*interleucina 6*) e a IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), que por sua vez ativam uma cascata de cinases, RAS, RAF, MEK e MAPK (Figura 7) e culminam na alteração da expressão génica. Os dois oncogenes que assumem um papel dominante na via MAPK e que se encontram desregulados em diversas neoplasias são o *NRAS* e o *KRAS*. Estes genes estão mutados com frequência no MM, com uma prevalência combinada de 20 a 35% (Chng *et al.*, 2008). As mutações no gene *RAS*, nomeadamente do gene *NRAS* desempenham um papel particularmente importante na progressão do MM, uma vez que são excecionalmente encontradas na MGUS e frequentes em estádios avançados do MM (Rasmussen *et al.*, 2005; Chng *et al.*, 2008), o que apoia a associação destas mutações a eventos relativamente tardios na patogénese das GM.

As mutações neste gene associam-se a fenótipos mais agressivos de MM, conferindo a esta patologia um prognóstico desfavorável e uma menor sobrevivência.



**FIGURA 7** Fatores de crescimento e vias de sinalização envolvidas na patogênese do mieloma múltiplo.

A adesão dos plasmócitos neoplásicos às células do estroma da medula óssea desencadeia mecanismos de sobrevivência, resistência e migração mediados por moléculas de adesão, citocinas e fatores de crescimento. Estes, por sua vez, ativam vias de sinalização, como as vias MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), JAK/STAT (*janus kinase/signal transducer and activator of transcription*); PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) e NF-κB (*nuclear factor kappa B*). Estas vias podem também ser anormalmente ativadas, a nível endógeno, através de anomalias genéticas, como as mutações nos genes *RAS*, *RAF* ou *NF-κB*. Os alvos destas vias de sinalização incluem citocinas, como a IL-6 (*interleucina-6*), o IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) e o VEGF (*vascular endothelial growth factor*); proteínas antiapoptóticas, como BCL-X<sub>L</sub> e MCL1 (*myeloid cell leukaemia sequence 1*) e moduladores do ciclo celular, como a ciclina D, ICAM1; *intercellular adhesion molecule 1*; IGF1, *insulin-like growth factor 1*; LFA1, *lymphocyte function-associated antigen 1*; muc1, *mucin 1*; SDF-1, *stromal-cell-derived factor-1*; VCAM1, *vascular cell adhesion molecule 1*; VLA4, *very-late antigen 4* (Adaptado de Wang, 2014).

Por outro lado, as mutações *KRAS* estão praticamente ausentes na MGUS (Rasmussen *et al.*, 2010). Estudos recentes demonstraram, ainda, que o *KRAS*, não o *NRAS*, poderá influenciar de forma mais marcante o prognóstico (Chng *et al.*, 2008), um achado que poderá vir a ter consequências importantes se as alterações genéticas forem usadas para estratificação de risco e decisão terapêutica (Prideaux *et al.*, 2014).

Um estudo recente de Chapman *et al.* (2011) identificou 4% de doentes com MM que apresentavam uma mutação não previamente observada do gene *BRAF* (Chapman *et al.*, 2011). Este gene codifica uma cinase de serina/treonina que contém mutações ativadoras importantes em diversas neoplasias, como o

melanoma ou a tricoleucemia (Blombery *et al.*, 2012). Este dado pode ter particular relevância, uma vez que os doentes com MM que apresentam mutações *BRAF* podem beneficiar de uma terapêutica dirigida com inibidores *BRAF* recentemente desenvolvidos e já com atividade clínica demonstrada (Patrawala & Puzanov, 2012).

#### **1.4.2.2. A via JAK/STAT (*Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription*)**

A via JAK/STAT encontra-se constitutivamente ativada em 50% das amostras de MM, assim como em células do estroma da medula óssea (Bharti *et al.*, 2004; Catlett-Falcone *et al.*, 1999a). A principal forma de ativação da via JAK/STAT é através da estimulação autócrina e parácrina pela IL-6 (Klein *et al.*, 1989; Kawano *et al.*, 1988). Uma consequência fundamental da ativação desta via é a hiperatividade de STAT3, um fator de transcrição da família STAT, que resulta na expressão elevada da proteína antiapoptótica BCL-XL (Kawano *et al.*, 1988) (Figura 7), uma proteína relacionada com a resistência à quimioterapia em doentes com MM (Tu *et al.*, 1998). Com base nestes dados, a inibição da STAT3 com compostos inibidores como a curcumina ou o inibidor da cinase JAK2, AG490, estão associados à inibição da sobrevivência dos plasmócitos neoplásicos *in vitro* (Bharti *et al.*, 2003; Amit-Vazina *et al.*, 2005; De Vos *et al.*, 2000). Estudos realizados em linhas celulares de MM (as células U266) demonstraram que a inibição de STAT3 sensibiliza estas células para a apoptose induzida por quimioterapia convencional (Alas & Bonavida, 2003). Assim, os inibidores STAT3 poderão, no futuro, vir a ser associados aos fármacos já utilizados no tratamento do MM, melhorando a eficácia destes.

#### **1.4.2.3. A via PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*)**

Múltiplos sinais moleculares, como a IL-6 e o IGF-1, atuando em recetores de tirosina cinase, podem ativar a via PI3K conduzindo à fosforilação de uma cinase específica de serina-treonina, a proteína AKT. Esta cinase ativa, subsequentemente, vários alvos, incluindo o *mTOR*, o *GSK-3B* e o *FKHR*, que influenciam múltiplos processos celulares, entre os quais a proliferação celular e a resistência à apoptose. A desregulação da via PI3K assumiu importância no MM quando 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 (Carroll & Martin, 2013).



Foi, ainda, observado que o *DEPTOR*, um regulador positivo da via PI3K, apresenta aumento da expressão no MM, especialmente nos doentes com translocações *MAF* (Peterson *et al.*, 2009), realçando o envolvimento desta via no MM. Ao contrário da via MAPK, a via PI3K raramente apresenta mutações no MM (Chapman *et al.*, 2011). Como se encontra geralmente ativada nesta patologia, poderá vir a constituir um alvo terapêutico.

#### **1.4.2.4. A via do NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa B*)**

O NF- $\kappa$ B compreende uma família de fatores de transcrição, com um papel crucial na apoptose, na adesão celular, na inflamação e no stresse oxidativo, que se encontra constitutivamente ativado em múltiplos tumores. Muitas das vias de sinalização implicadas no cancro estão, de forma direta ou indireta, ligadas à ativação do NF- $\kappa$ B (Ben-Neriah & Karin, 2011; Chaturvedi *et al.*, 2011; Staudt, 2010; Dolcet *et al.*, 2005a). Esta ativação pode ocorrer durante o stresse celular, quando as células são estimuladas por citocinas, antigénios, estímulos oxidantes, contacto intercelular, podendo ainda ser ativada pela quimioterapia ou pela radioterapia. O seu papel nas células estimuladas resulta na promoção da transcrição de genes, incluindo do seu próprio gene, bem como de outras citocinas, moléculas de adesão celular, moléculas pró-angiogénicas e, ainda, na supressão da apoptose, favorecendo o desenvolvimento e a migração celulares (Myung *et al.*, 2001; Bassères & Baldwin, 2006).

No MM, a via do NF- $\kappa$ B encontra-se constitutivamente ativada em mais de 50% dos casos e representa, provavelmente, um evento relevante para a evolução desta patologia, uma vez que a ativação é significativamente superior em estádios avançados do MM, comparativamente à fase de MGUS (Annunziata *et al.*, 2007; Keats *et al.*, 2007). O NF- $\kappa$ B pode estar hiperexpresso não só nos plasmócitos mas também nas células do estroma da medula óssea. Nestas células de suporte, o NF- $\kappa$ B estimula a libertação de citocinas fundamentais, como a IL-6, a BAFF ou a APRIL, resultando numa estimulação parácrina, através de sinais de sobrevivência críticos para os clones tumorais (Chauhan *et al.*, 1996; Tai *et al.*, 2006) (Figura 7). Estudos recentes de sequenciação do genoma e de sequenciação do exoma expandiram os mecanismos possíveis através dos quais a via NF- $\kappa$ B pode ser ativada, demonstrando 14 novas mutações/rearranjos que afetam 11 genes da via do NF- $\kappa$ B (Chapman *et al.*, 2011). A elevada frequência de desregulação desta via no MM fundamenta a sua inequívoca importância na patogénese desta patologia, ainda que o impacto prognóstico de muitos dos genes implicados não esteja totalmente esclarecido.

Nas células não estimuladas, o inibidor do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) liga-se ao NF- $\kappa$ B e o complexo é sequestrado no citoplasma, impedindo a transcrição génica mediada pelo NF- $\kappa$ B. Em resposta aos estímulos, o I $\kappa$ B é fosforilado, o que resulta na sua ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteasoma. O NF- $\kappa$ B é então libertado e rapidamente transferido para o núcleo, onde promove a transcrição de genes codificadores de citocinas (como o TNF, a IL-1 e a IL-6), fatores de resposta ao stresse (nomeadamente a ciclo-oxigenase-2, o óxido nítrico e a 5-lipoxigenase), reguladores do ciclo celular, de moléculas de adesão celular, nomeadamente a ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*), a VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) e a E-selectina e da apoptose (Wegener & Krappmann, 2008; Medeiros *et al.*, 2007). A ativação do NF- $\kappa$ B aumenta igualmente com a expressão de proteínas antiapoptóticas, nomeadamente a IAP-1 e IAP-2, e algumas proteínas da família Bcl-2 (Karin, 2006; Ben-Neriah & Karin, 2011).

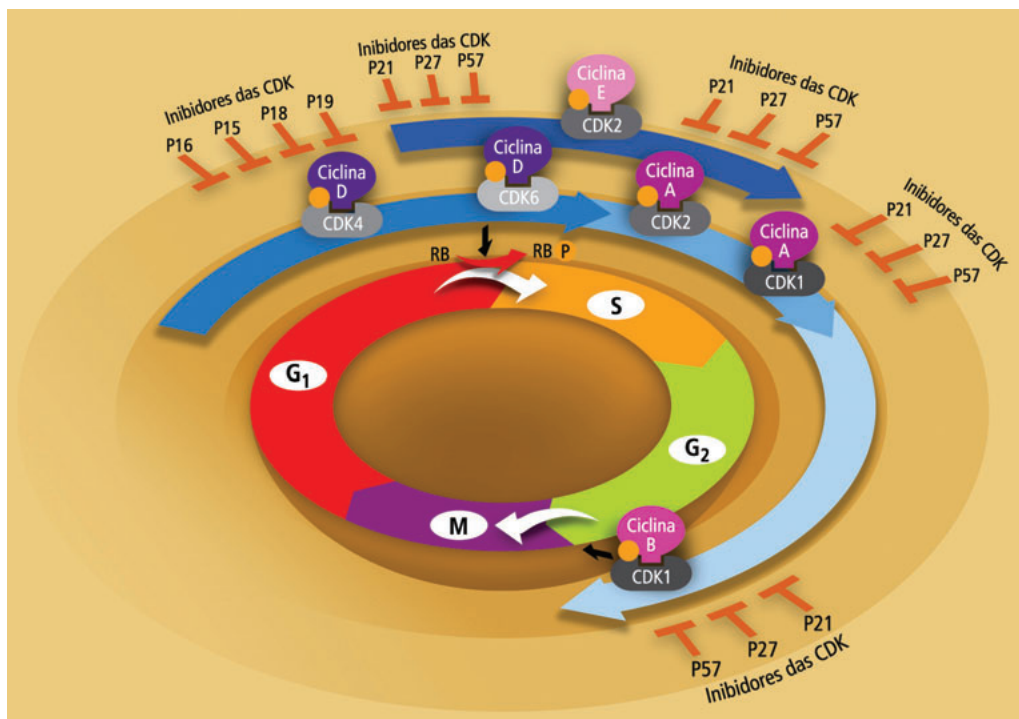
O NF- $\kappa$ B é frequentemente implicado como causa da disparidade de resposta à inibição do proteasoma entre as células normais e as neoplásicas, devido ao seu papel na promoção do tumor, na sobrevivência das células tumorais e na metastização (Cvek & Dvorak, 2008). Diversos estudos propuseram este fator como o elo de ligação entre a inflamação crónica e a tumorigénese (Karin, 2006; Ben-Neriah & Karin, 2011). De facto, a ativação excessiva do NF- $\kappa$ B (motivada por anomalias genéticas) é característica de muitos tumores malignos, como MM (Annunziata *et al.*, 2007). A via do NF- $\kappa$ B necessita do proteasoma para a clivagem do I $\kappa$ B, daí resultando a libertação do heterodímero P50:P65 e a translocação nuclear deste, que conduz à transcrição genética e à promoção e desenvolvimento do cancro (Karin, 2006; Ben-Neriah & Karin, 2011). Decorrente destas observações, o NF- $\kappa$ B requer a atividade do proteasoma, pelo que a inibição deste conduz ao bloqueio da ativação do NF- $\kappa$ B e à morte celular. Como esta via envolve o proteasoma, os inibidores deste complexo proteico foram desenvolvidos com base na evidência de que os tumores dependentes desta via seriam particularmente sensíveis a estes fármacos (Keats *et al.*, 2007).

O NF- $\kappa$ B pode ser ativado por fármacos antineoplásicos, o que constitui uma explicação plausível para a reconhecida capacidade dos inibidores do proteasoma sensibilizarem as células malignas às terapêuticas clássicas (Nakanishi & Toi, 2005; Pham *et al.*, 2007).



### 1.4.2.5. Desregulação do ciclo celular

A perda de função dos genes inibidores do ciclo celular, associada ao aumento da expressão de proto-oncogenes, parece desempenhar um papel relevante na desregulação do ciclo celular. Por exemplo, a redução da expressão do gene *CDKN2C* (*p18*) através da *del(1p)*, ou a inativação do *CDKN2A* (*p16*), através de alterações na metilação do DNA, podem desregular a transição G1/S, uma vez que estes genes codificam inibidores de cinases dependentes das ciclinas (CDKI) (Leone *et al.*, 2008; Gonzalez-Paz *et al.*, 2007). A inativação do gene supressor tumoral *RB1*, um inibidor do ciclo celular, também afeta a transição G1/S e pode ocorrer frequentemente devido à monossomia do cromossoma 13 ou, mais raramente, devido a deleção homocigótica ou inativação mutacional (Walker *et al.*, 2010). Esta proteína está ativa quando desfosforilada por ação da CDKI p21, a qual é ativada pela proteína supressora tumoral P53 (Figura 8). Por outro lado, as translocações envolvendo genes que codificam as ciclinas D estão associadas ao aumento da sua expressão conduzindo à desregulação do ciclo celular, um evento comum no MM, como referido.



**FIGURA 8** Regulação do ciclo celular.

A figura evidencia o papel das ciclinas (A, B e D) e das cinases dependentes das ciclinas (CDK1, CDK4, CDK6) no ciclo celular, bem como dos inibidores das CDK, as proteínas P15, P16, P18, P19, P21, P27 e P57. Estão também representadas as proteínas codificadas pelos genes supressores tumorais, *pRB* e *p53*. (Adaptado de Prideaux *et al.*, 2014).

#### 1.4.2.6. Anomalias na reparação do DNA

A instabilidade cromossômica é uma característica do MM e contribui para a acumulação de anomalias genéticas durante a progressão da doença. Apesar deste dado, as mutações nos genes de reparação do DNA não foram encontradas com frequência, sendo a perda da função da proteína P53, associada à del(17p), descrita em cerca de 10% dos casos, a mais frequente. Outro gene considerado importante nos mecanismos de reparação do DNA no MM é o *PARP1* (*poly ADP ribose polymerase-1*), um gene que codifica a enzima PARP1, que contribui para a reparação das quebras de DNA de cadeia simples. Num estudo recente de expressão gênica, ficou demonstrado que a expressão aumentada de PARP1 se associava a redução da sobrevivência em doentes com MM, enquanto outro estudo identificou este gene como um dos que estariam implicados na definição de MM de alto risco (Neri *et al.*, 2011).

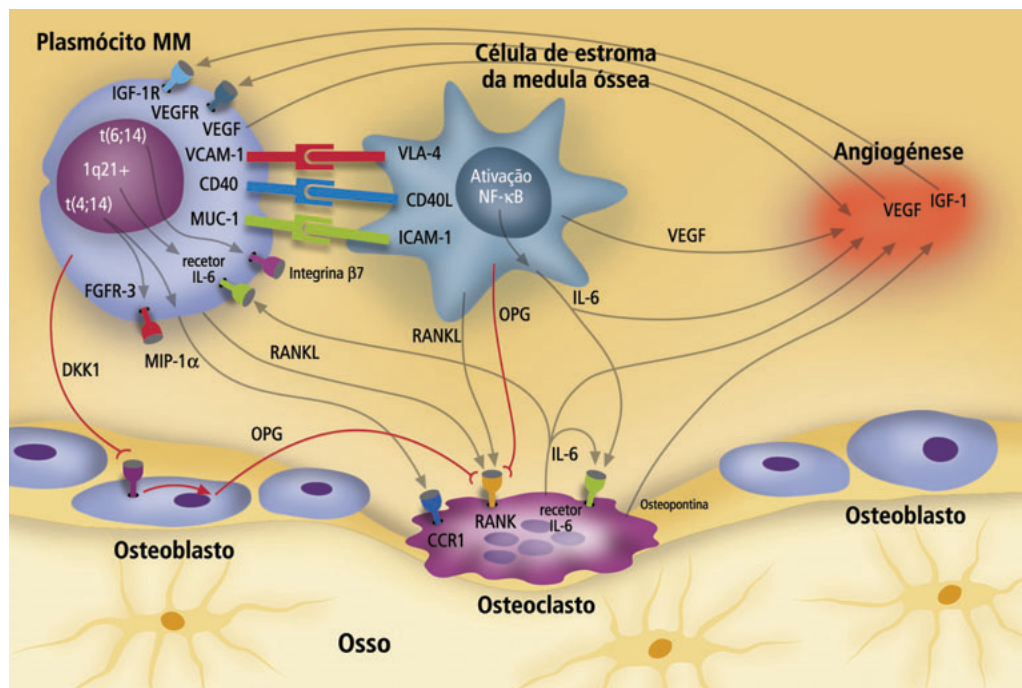
#### 1.4.3. O microambiente da medula óssea no mieloma múltiplo

O microambiente tumoral participa de forma ativa no desenvolvimento, progressão e manutenção dos tumores humanos. Nas últimas três décadas, têm sido múltiplos os esforços para definir a contribuição exata das células do microambiente no comportamento das células malignas. Mais especificamente, diversos estudos mostraram que estas células de suporte, ainda que não malignas *per se*, são funcionalmente e, em alguns casos, geneticamente diferentes das suas equivalentes normais (Marx J., 2008).

Concretamente no MM, considera-se que os plasmócitos malignos dependem diretamente das interações com outras células do microambiente, como os osteoclastos, os osteoblastos, as células endoteliais, os macrófagos e as células do estroma da medula óssea (BMSC) (Hideshima *et al.*, 2007) (Figura 9).

Os plasmócitos neoplásicos aderem às BMSC através da ligação de VCAM-1, localizada nas BMSC e de integrina  $\alpha 4\beta 1$  situada nos plasmócitos. Estas interações diretas através de moléculas de adesão conduzem à secreção de múltiplas citocinas, quimocinas e fatores de crescimento, como IL-6, IL-3, IL-1 $\beta$ , IL-11, M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*), TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , VEGF e SDF-1 $\alpha$  (*stroma-derived factor 1 $\alpha$* ) que estimulam a osteoclastogénese e contribuem para uma comunicação simbiótica que mantém o microambiente favorável para a manutenção dos plasmócitos neoplásicos no MM (Edwards *et al.*, 2008).

Os osteoclastos são células multinucleadas, com origem na linha monócito/macrófago, que desempenham funções de reabsorção óssea, sob estreito controlo dos osteoblastos (Yamashita *et al.*, 2012). Os fatores mais importantes envolvidos na regulação da diferenciação osteoclástica incluem o ligando do RANK (RANKL), a OPG (osteoprotegerina), produzida por osteoblastos e o M-CSF, para além da proteína inflamatória dos macrófagos (MIP1 $\alpha$ ), da IL-6 e da IL-3, já referidas (Yamashita *et al.*, 2012). Estudos recentes demonstraram que a diferenciação osteoclástica é regulada por osteoblastos através de mecanismos independentes da produção de M-CSF, RANKL e OPG. Com efeito, a proteína Wnt5a produzida por osteoblastos, estimula a diferenciação osteoclástica, aumentando a expressão de RANK através da ativação da via Wnt não-canónica. A semaforina 3A, também produzida por osteoblastos, inibe a diferenciação osteoclástica induzida pelo RANKL através da supressão de sinais de ativação baseadas em imunorreceptores de tirosina (Yamashita *et al.*, 2012).



**FIGURA 9** O microambiente da medula óssea do mieloma múltiplo.

A interação entre os plasmócitos tumorais e as células do estroma da medula óssea é mediada por moléculas de adesão celular, como a VCAM-1 (*vascular-cell adhesion molecule 1*) e a VLA-4 (*very-late antigen 4*). Esta interação aumenta a produção de fatores de crescimento e citocinas com atividade angiogénica, como a Interleucina-6 (IL-6) e o VEGF (*vascular endotelial growth factor*), que estimulam os plasmócitos e a angiogénese. O aumento da osteoclastogénese é devido a um desequilíbrio no *ratio* entre o RANK (*receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B*) e a OPG (*osteoprotegerina*), como resultado da produção aumentada do ligando do RANK e da produção diminuída da OPG. Os osteoclastos que são ativados por células do estroma, podem também manter a angiogénese secretando osteopontina. A osteoblastogénese está diminuída pela produção de DKK1 (*dickkopf homolog 1*) pelos plasmócitos tumorais. CCR1 - *Chemokine receptor 1*. MUC-1 - *Mucina 1*. IGF-1 - *fator de crescimento insulina-like 1*. ICAM-1 - *intercellular adhesion molecule*. (Adaptado de Palumbo & Anderson, 2011b).

## – A via RANK/RANKL

A via de sinalização RANK/RANKL constitui um componente fundamental da remodelação óssea, normal ou maligna. O RANK é um recetor de sinalização transmembranar, membro da superfamília de recetores do TNF e encontrado na superfície de precursores de osteoclastos. O RANKL é expresso como uma proteína ligada à membrana nas BMSC e dos osteoblastos e secretado por linfócitos ativados. A sua expressão é induzida por citocinas que estimulam a reabsorção óssea, como a paratormona, a 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e as prostaglandinas. O RANKL liga-se ao recetor RANK nos precursores osteoclásticos e induz a formação de osteoclastos. O RANK induz a reabsorção óssea e o aumento da sobrevivência dos osteoclastos, através da via do NF- $\kappa$ B e da via cinase Jun-terminal (Hsu *et al.*, 1999).

A OPG é um recetor *decoy* solúvel para o RANKL, produzida por osteoblastos e é um membro da superfamília de recetores do TNF que bloqueia as interações do RANKL com o RANK, limitando a osteoclastogénese. Nos indivíduos normais, o ratio RANKL/OPG é muito reduzido (Roux *et al.*, 2002). Pearse *et al.* (2001) foram os primeiros a demonstrar que a expressão de RANKL se encontrava aumentada em biopsias de medula óssea de doentes com MM, enquanto a expressão de OPG se apresentava reduzida (Pearse *et al.*, 2001). Terpos *et al.* (2003) evidenciaram que os níveis circulantes de OPG e de RANKL se correlacionavam com a atividade do MM, a gravidade da doença óssea e o prognóstico desfavorável (Terpos *et al.*, 2003). Diversos estudos mostraram que o bloqueio do RANKL, quer pela forma solúvel do recetor RANK, quer pela OPG, minimiza a destruição óssea e a massa tumoral. Os próprios plasmócitos tumorais também expressam RANKL, o que contribui para exacerbar o processo de destruição óssea.

Estas interações bidirecionais perturbam a dinâmica hematopoiética normal, induzem destruição osteolítica, estimulam a angiogénese e contribuem para a resistência às terapêuticas convencionais (Nimmanapalli *et al.*, 2008). A produção por parte das BMSC de proteínas da matriz e de fatores como a fibronectina (Landowski *et al.*, 2003), o IGF-1 (Mitsiades *et al.*, 2004), o SDF 1 $\alpha$  (*stromal-cell-derived factor-1 $\alpha$* ) (Hideshima *et al.*, 2002a), o TNF $\alpha$ , o VEGF, a família de fatores ativadores de células B (BAFF) e um ligando indutor de proliferação (APRIL), todos estimulam a proliferação dos plasmócitos no MM, assim como a resistência à quimioterapia convencional. Estes achados foram cruciais para o desenvolvimento dos fármacos aprovados nos últimos anos, como o bortezomib e a lenalidomida, que exercem também os seus efeitos anti-MM através do bloqueio das interações entre os plasmócitos malignos e algumas das outras células do microambiente tumoral (Anderson, 2007; Hideshima *et al.*, 2007).

#### – A Interleucina-6 e o VEGF

A IL-6 é, desde há longa data, reconhecida como um fator proliferativo para os plasmócitos, mas não está ainda claramente demonstrado se os níveis de IL-6 se correlacionam com o estado da doença (Solary *et al.*, 1992). Os níveis de IL-6 encontram-se elevados nos doentes com MM com lesões osteolíticas, em comparação com os doentes com MM sem doença óssea, assim como em doentes com MGUS (Sati *et al.*, 1998). A maioria dos estudos apoia a hipótese de que a IL-6 é produzida maioritariamente por BMSC e por osteoclastos, através da interação com os plasmócitos neoplásicos (secreção parácrina), mais do que pelos próprios plasmócitos (secreção autócrina). A produção de IL-6 encontra-se aumentada nos plasmócitos neoplásicos por ativação do CD40 (Urashima *et al.*, 1995) e nas BMSC por adesão destas aos plasmócitos tumorais ou por citocinas, como o TNF $\alpha$ , o VEGF e a IL-1 $\beta$  (Hideshima *et al.*, 2001a; Dankbar *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2001). A produção aumentada de IL-6 por osteoblastos foi também descrita em culturas de osteoblastos humanos com plasmócitos tumorais (Karadag *et al.*, 2000). Os plasmócitos CD45+ foram identificados como os que respondem à IL-6 (Ishikawa *et al.*, 2003). A IL-6 liga-se à gp80 (CD80, IL6R) expressa na maioria dos plasmócitos tumorais de doentes com MM e induz a fosforilação e a homodimerização da gp130 (Matsuda *et al.*, 1995). A fosforilação desta proteína, por sua vez, ativa as vias de sinalização RAS/RAF/MAPK, MEK/ERK, JAK/STAT e PI3-K/AKT e induz o crescimento e a sobrevivência dos plasmócitos neoplásicos, assim como a resistência à terapêutica no MM (Neumann *et al.*, 1996; Tu *et al.*, 2000; Hideshima *et al.*, 2001b).

O VEGF é produzido pelas BMSC e pelos plasmócitos neoplásicos e contribui para a angiogénese aumentada, observada na medula óssea dos doentes com MM (Rajkumar & Greipp, 2001). O VEGF estimula a fosforilação de Flt-1 e a ativação das vias de sinalização MEK/ERK e PI3-K/PKC $\alpha$  nos plasmócitos de doentes com MM, promovendo a proliferação e a migração, respetivamente (Podar *et al.*, 2001b). Estes efeitos diretos do VEGF nos plasmócitos tumorais e na angiogénese da medula óssea fundamentou o desenvolvimento de moléculas inibitórias do recetor do VEGF (Podar *et al.*, 2004).

#### – O NF- $\kappa$ B, o IGF-1 e o SDF-1 $\alpha$

A ligação dos plasmócitos tumorais às BMSC induz a ativação do NF- $\kappa$ B e aumenta a transcrição e a secreção de IL-6 nestas células. Por outro lado, a inibição específica do NF- $\kappa$ B pela cinase I $\kappa$ B (IKK) reduz a secreção constitutiva ou induzida de IL-6 (Hideshima *et al.*, 2002b).

Os fatores de transcrição da família Rel/NF- $\kappa$ B desempenham um papel crucial na patogénese do MM, como já anteriormente descrito (Kyle & Rajkumar, 2008b; Karin, 2006). De facto, a ativação excessiva deste fator de transcrição observada no MM acentua-se ainda mais em resposta a alguns estímulos presentes no microambiente da medula óssea (Keats *et al.*, 2007; Annunziata *et al.*, 2007; Bharti *et al.*, 2004; Mitsiades *et al.*, 2002). Por exemplo, a adesão de linhas celulares de MM à fibronectina resulta numa ligação aumentada do NF- $\kappa$ B ao DNA e correlaciona-se com um aumento da expressão deste factor de transcrição (Landowski *et al.*, 2003).

Outros fatores ativadores bem conhecidos do NF- $\kappa$ B incluem o TNF $\alpha$ , a IL-1 $\beta$ , o BAFF e o APRIL, todos presentes na medula óssea (Hideshima *et al.*, 2007). Consequentemente, as vias de sinalização PI3K/AKT, MEK/ERK, JAK/STAT e NF- $\kappa$ B são ativadas, promovendo a progressão ao longo do ciclo celular, inibindo a apoptose e conduzindo à produção de outros fatores que suportam o crescimento e a sobrevivência dos plasmócitos clonais no MM (Smith *et al.*, 2010).

O IGF-1, que é secretado para o microambiente da medula óssea, induz a ativação do NF- $\kappa$ B nas células de MM e a inibição da ligação do IGF-1 ao seu recetor desencadeia a apoptose destas células (Mitsiades *et al.*, 2004). O IGF-1 desencadeia a fosforilação de FKHR (forkhead transcription factor), aumenta a expressão intracelular de proteínas antiapoptóticas, incluindo a proteína inibitória FLICE (*FADD-like interleukin-1beta-converting enzyme*), a survivina e a XIAP (*X-linked IAP*), ao mesmo tempo que aumenta a atividade de telomerase através da indução das vias de sinalização PI3-K/AKT/NF- $\kappa$ B (Akiyama *et al.*, 2002).

O SDF-1 $\alpha$  é o ligando do recetor de quimocinas CXCR4 e está presente na superfície das BM 5C, enquanto o CXCR4 é expresso nos plasmócitos tumorais. Tal como o IGF-1, induz a ativação transitória do NF- $\kappa$ B. O SDF-1 $\alpha$  é responsável pela adesão dos plasmócitos tumorais, mediada pelo VLA-4, ao microambiente da medula óssea, (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2001) ao mesmo tempo que induz proliferação, migração e resistência à apoptose induzida por dexametasona, através da ativação das vias de sinalização ERK, PI3-K/AKT e NF- $\kappa$ B, respetivamente. O SDF-1 $\alpha$  também induz a secreção de IL-6 e VEGF pelas BMSC, o que contribui para o crescimento das células tumorais e para a resistência à terapêutica (Hideshima *et al.*, 2002a).

#### – A via WNT

A atividade aumentada dos osteoclastos, associa-se a uma atividade significativamente reduzida, ou mesmo ausente, dos osteoblastos nos doentes com MM, uma vez que não se observa regeneração óssea nas lesões líticas ou na sua proximidade.



Com efeito, estudos histomorfométricos revelaram que existe uma descoordenação entre a reabsorção óssea marcadamente aumentada e a formação de osso quase inexistente. Estes factos foram confirmados pela demonstração de níveis séricos muito reduzidos de marcadores de formação de osso, como a fosfatase alcalina e a osteocalcina em doentes com MM e lesões osteolíticas (Hjorth-Hansen *et al.*, 1999). Foi sugerido que, no microambiente da medula óssea de doentes com MM, o elevado nível de citocinas e a interação física entre os plasmócitos tumorais e os osteoblastos conduziu à apoptose acelerada destes e aos defeitos na formação de osso. De facto, Silvestris *et al.* demonstraram que os osteoblastos sofrem apoptose imediata na presença de plasmócitos tumorais de doentes com doença óssea extensa (Silvestris *et al.*, 2004). Um outro estudo mostrou que os plasmócitos tumorais produzem a proteína DKK1, um inibidor da via de sinalização WNT, crucial para a diferenciação osteoblástica. Foi ainda observado no mesmo estudo que os níveis de expressão do gene *DKK1* se correlacionavam com o aumento da osteoclastogénese e com a extensão da doença óssea (Tian *et al.*, 2003). A via de sinalização WNT nos osteoblastos aumenta a expressão de OPG (Glass *et al.*, 2005) e reduz a expressão de RANKL (Spencer *et al.*, 2006), sugerindo um possível mecanismo através do qual a inibição da sinalização WNT nos osteoblastos aumentaria indiretamente a osteoclastogénese (Roodman, 2010). A formação e diferenciação dos osteoblastos a partir das células mesenquimatosas requer a atividade do fator transcripcional Runx2/Cbfa1, cuja função se encontra inibida em doentes com MM e doença óssea. Com efeito, foi demonstrado que a IL-7 bloqueia a atividade deste fator transcripcional e a expressão de marcadores osteoblásticos nas células osteoprogenitoras, o que também contribui para a osteoclastogénese (Giuliani *et al.*, 2005) (Toscani *et al.*, 2015).

#### **1.4.4. O papel do proteasoma no mieloma múltiplo**

Em 1991, Paul Jensen e William Fenical do *Scripps Institution of Oceanography* na Universidade de San Diego, descobriram a *Salinispora trópica* em sedimentos oceânicos das Bahamas, que veio a revelar-se uma “fábrica” de compostos muito promissores, nomeadamente um, designado por salinosporamida A. Este composto, assim como outras  $\beta$ -lactamases de origem bacteriana, é um potente inibidor do proteasoma, que causa a apoptose das células neoplásicas e inibe o crescimento tumoral.

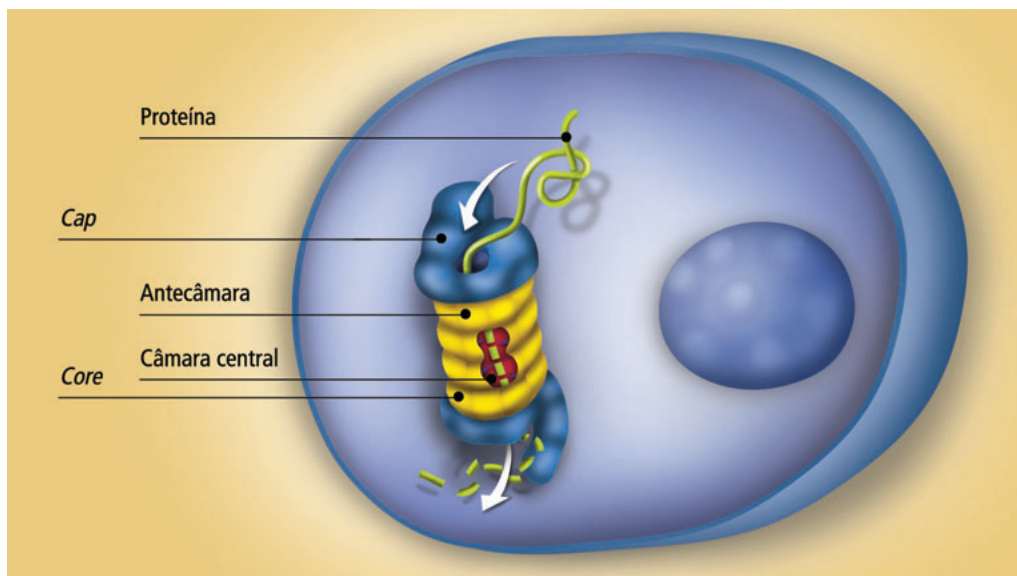
O funcionamento celular normal envolve o processamento de proteínas com funções importantes na regulação do ciclo celular, no crescimento da célula e na apoptose. Os proteasomas são proteases multiméricas e multicatalíticas responsáveis pela principal via não lisossômica de degradação de proteínas intracelulares, pelo que se tornou num alvo importante da terapêutica antineoplásica. O proteasoma atua em articulação com uma proteína marcadora ubíqua, denominada ubiquitina, constituindo a via ubiquitina-proteasoma. Esta via modula a degradação das proteínas desnaturadas, oxidadas ou danificadas, que já não são necessárias nas células, enquanto as proteínas extracelulares ou transmembranares são degradadas pela via agrosoma/lisosoma (Chari *et al.*, 2010). Foi, igualmente, demonstrado que a via ubiquitina-proteasoma desempenha um papel regulador chave no controlo dos níveis intracelulares de uma ampla gama de proteínas, incluindo as proteínas envolvidas na ativação da transcrição e na sinalização celular (como as ciclinas A, B, C, E, as proteínas P21, P27 e P53 ou o NF- $\kappa$ B), mantendo a homeostase intracelular. Os proteasomas são, assim, componentes chave de numerosas vias biológicas, incluindo as relacionadas com o desenvolvimento e a progressão dos tumores (Mani & Gelmann, 2005).

O proteasoma 26S é um complexo enzimático de grandes dimensões, presente no citoplasma e no núcleo de todas as células eucarióticas, constituído por uma subunidade catalítica 20S ligada simetricamente a duas cópias da subunidade reguladora 19S (Figura 10).

A subunidade 19S é responsável pelo reconhecimento das proteínas ubiquitinadas, reciclagem da ubiquitina e desnaturação dos substratos proteicos. O núcleo 20S integra as funções enzimáticas de protease do proteasoma (Nussbaum *et al.*, 1998; Myung *et al.*, 2001; Adams, 2004). Este núcleo 20S é um cilindro composto por quatro anéis proteicos sobrepostos: dois anéis alfa, com papel estrutural e dois anéis beta que compreendem o núcleo catalítico do proteasoma. Os dois anéis beta internos e os dois anéis alfa externos, estão organizados de forma  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ . Os dois anéis beta contêm cada um três subunidades ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_5$ ) que correspondem a locais proteolíticos ativos, um com atividade de tipo quimotripsina ( $\beta_5$ ), outro tipo tripsina ( $\beta_2$ ) e uma protease pós-glutamílica ( $\beta_1$ ), para um total de seis locais de proteólise ativa no interior do núcleo do proteasoma (Myung *et al.*, 2001; Adams, 2003). A inibição da atividade de tipo quimotripsina é suficiente para bloquear toda a atividade catalítica do proteasoma (Kisselev *et al.*, 1999; Bech-Otschir *et al.*, 2009).

Para que uma proteína seja degradada no proteasoma, tem que ser previamente ubiquitinada. Esta sinalização para a destruição envolve a conjugação com uma





**FIGURA 10** Estrutura do proteassoma 26S.

O proteassoma 26S é constituído por duas subunidades reguladoras 19S (ou "Cap"), dispostas nas extremidades e um "core" catalítico 20S, que engloba um sistema interno de câmaras onde as proteínas ubiquitinadas (representadas por uma cadeia de poliubiquitina a verde) sofrem degradação (Adaptado de <http://walz.med.harvard.edu>).

ubiquitina (polipéptido com 76 aminoácidos), através de ligação covalente desta aos resíduos de lisina da proteína alvo. A extremidade reguladora do proteassoma 19S liga-se à cadeia de poliubiquitina, desnatura a proteína numa reação que consome ATP, catalisada pelas 6 ATPases localizadas na base da subunidade 19S e direciona-a para o núcleo proteolítico do proteassoma (Orlowski *et al.*, 2002).

As proteínas selecionadas para degradação pela via ubiquitina-proteassoma são modificadas por ligação covalente a cadeias multiubiquitina, através de um processo enzimático em três passos, altamente controlado, que envolve uma enzima ativadora da ubiquitina (E1), uma enzima conjugadora da ubiquitina (E2) e uma enzima ubiquitina-ligase (E3). A enzima ativadora da ubiquitina (E1) é a primeira enzima envolvida na regulação da ubiquitinação. Esta enzima utiliza energia da adenosina trifosfato (ATP) para ativar a ubiquitina, para que esta se possa ligar a proteínas destinadas à degradação pelo proteassoma (Myung *et al.*, 2001).

Contudo, antes que a ubiquitina ativada se ligue a uma proteína alvo, terá que ser transferida da enzima E1 para uma das dezenas de enzimas ubiquitina conjugase já identificadas (E2). A ubiquitina ligase, ou enzima E3, reconhece e liga-se a uma proteína alvo específica e cataliza a transferência da ubiquitina ativada da E2 para o alvo, diretamente ou através de um intermediário com alta energia. Até à data, foram identificadas mais de uma centena de enzimas E3 específicas;

é esta diversidade de ubiquitina ligases E3, associada às suas interações limitadas a proteínas alvo, que confere especificidade à via ubiquitina-proteasoma (Myung *et al.*, 2001; Kisselev *et al.*, 1999). As cadeias de poli-ubiquitina formam-se através de ligação de moléculas adicionais aos resíduos de lisina das moléculas de ubiquitina previamente conjugadas (Myung *et al.*, 2001). As proteínas marcadas por cadeias de poli-ubiquitina são degradadas pelo proteasoma em cadeias de péptidos com comprimento que variam entre três e 22 aminoácidos (Nussbaum *et al.*, 1998; Myung *et al.*, 2001).

O bloqueio da via de degradação proteasômica resulta na acumulação de proteínas desnecessárias e na morte celular. Como as células tumorais apresentam uma taxa de proliferação muito superior à das células normais, a sua taxa de síntese e de degradação proteicas é também superior. Este conceito conduziu ao desenvolvimento de inibidores do proteasoma como estratégias terapêuticas bem sucedidas em patologias hemato-oncológicas, em particular no MM (Chauhan *et al.*, 2005).

#### **1.4.5. Alterações epigenéticas no mieloma múltiplo – conceitos gerais**

“We are not our genes. Genes are just part of the story. We cannot fully blame our genome for our behaviour and susceptibility to disease.” (Esteller, 2008)

Lehninger encontra uma definição mais precisa: “We are our proteins (and our carbohydrates, fat, and so on)”, que se foca no dogma central da biologia molecular, de que as nossas proteínas são geradas a partir do nosso DNA através de um RNA intermediário. Contudo, algumas moléculas de RNA não codificam proteínas e desenvolveram funções celulares muito específicas e fundamentais para a homeostase da célula. De facto, o nosso legado genético, baseado na sequência de pares de nucleótidos não é suficiente para explicar a funcionalidade das nossas células, as suas alterações na génese e na progressão das neoplasias malignas e de outras doenças complexas ou as características da nossa espécie. Precisamos de algo mais. Parte dessa explicação é dada pela epigenética (Esteller, 2008; Jeltsch, 2011). O termo epigenética foi estabelecido em 1942 por Conrad Waddington e definido, na altura, como “the branch of biology which studies the causal interactions between genes and their products which bring the phenotype into being” (Jablonka & Lamb, 2002). A epigenética refere-se a modificações químicas dinâmicas que ocorrem no nosso DNA e a sua subsequente associação com proteínas reguladoras, sem interferência na sequência de nucleótidos.

Inicialmente, a epigenética referia-se ao estudo da forma como os genes se expressavam e manifestavam. Mais recentemente, o conceito da epigenética centra-se nos mecanismos através dos quais as células se tornam comprometidas com uma função particular e através dos quais o estado funcional e estrutural é transmitido a linhas celulares futuras. A epigenética moderna é importante não só pelo seu interesse prático para a medicina, agricultura e conservação das espécies, mas também pelas suas implicações na forma como entendemos a hereditariedade e a evolução (Jablonka & Lamb, 2002).

Esteller define atualmente a epigenética como “the inheritance of DNA activity that does not depend on the naked DNA sequence” (Esteller, 2008). Ainda que muitas sejam as definições propostas, a que parece mais consensual descreve-a como “as alterações hereditárias coletivas no fenótipo devidas a processos independentes da sequência primária de DNA”. Esta hereditariedade da informação epigenética parecia estar limitada às divisões celulares. Contudo, torna-se agora evidente que os processos epigenéticos podem ser transferidos em organismos de uma geração para outra. Este fenómeno foi inicialmente descrito em plantas, posteriormente em leveduras, *drosophila*, ratinhos e, possivelmente, também ocorrerá em humanos (Jeltsch, 2011). Em particular, o reconhecimento de que existem sistemas hereditários epigenéticos através dos quais variações não relacionadas com o DNA possam ser transmitidas a linhas celulares subsequentes amplia a noção de hereditariedade e desafia o conceito neo-Darwiniano centrado na genética (Jablonka & Lamb, 2002). Os processos epigenéticos ocorrem em diversos organismos e controlam múltiplas funções biológicas que incluem a regeneração de tecidos e órgãos, a inativação do cromossoma X, a diferenciação de células estaminais, o *imprinting* genómico ou o envelhecimento. As alterações epigenéticas estão associadas a muitas patologias, nomeadamente neoplasias malignas, doenças endócrinas e do sistema nervoso ou distúrbios do sistema imunitário (Jeltsch, 2011).

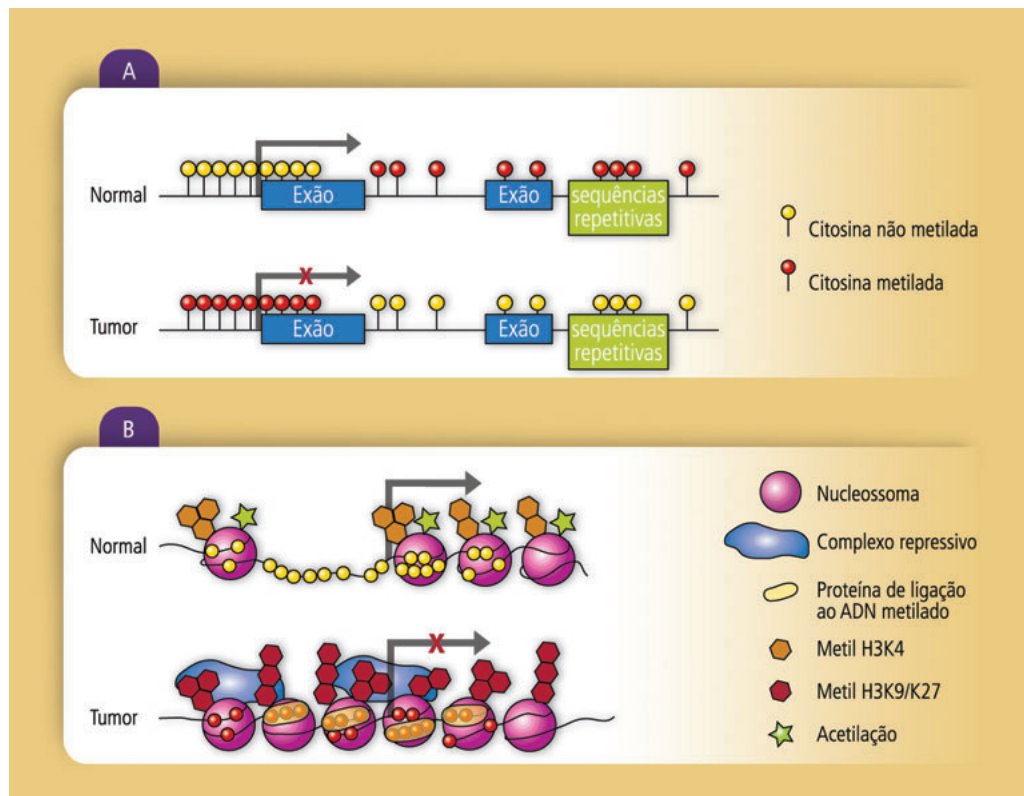
Por todos estes motivos, a epigenética é uma das áreas em expansão mais promissoras do cenário atual da investigação biomédica (Jeltsch, 2011), com extensão gradual não só às neoplasias malignas mais prevalentes, assim como a outras patologias, nomeadamente doenças autoimunes e neurológicas. Com efeito, o interesse na epigenética tem vindo a aumentar nos últimos anos em todos os domínios biomédicos. Inicialmente restrito à investigação na área do cancro, com o conhecimento da hipometilação global do genoma na década de 1980, o interesse cresce com a identificação da hipermetilação dos ilhéus CpG nos genes supressores tumorais na década de 1990, seguida pela aprovação pela FDA (*Food and Drug Administration*) de fármacos hipometilantes do DNA e de inibidores das desacetilases das histonas no início do século XXI (Esteller, 2011).

Os tumores malignos foram tradicionalmente considerados doenças genéticas resultantes da acumulação de múltiplas mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, que conduziam à perturbação das suas funções. Nos últimos anos, os mecanismos epigenéticos que afetam diretamente a expressão dos genes, a organização e/ou a estabilidade genómica sem alterações na sequência primária de bases do DNA são consistentemente reconhecidos como desempenhando um papel crucial na transformação maligna das células (Baylin and Jones 2011; Dawson and Kouzarides 2012; Sandoval and Esteller 2012; You and Jones 2012).

De facto, o contributo da epigenética para o desenvolvimento e a progressão das neoplasias parece ser tão relevante quanto o das alterações genéticas, interagindo de forma estreita na sua patogénese (Lopez *et al.*, 2009) (Esteller, 2007). Enquanto as anomalias genéticas que contribuem para o desenvolvimento de tumores, como a perda ou o ganho de funções de determinados genes, é facilmente interpretada, o papel das alterações epigenéticas afigura-se muito mais complexo e, até ao presente, não inteiramente compreendido. O reconhecimento de que a carcinogénese envolve alterações genéticas e epigenéticas conduziu a uma melhor compreensão das vias moleculares que regulam o desenvolvimento dos tumores e a uma melhoria no diagnóstico e na definição de biomarcadores importantes no prognóstico de vários tipos de neoplasias. A epigenética parece ter um papel central nas neoplasias ao nível da evolução clonal; de facto, os tumores humanos sofrem alterações adaptativas ao longo da sua história natural, podendo metastizar para locais distintos, criar neovasos e eliminar os seus metabolitos. Podem, igualmente, modificar-se em resposta a um tratamento com fármacos, hormonas ou radiação. Neste contexto, o estudo dos mecanismos de regulação epigenética e da sua reversibilidade resultou, ainda, na identificação de novos alvos que poderão ser úteis para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento do cancro (Baylin, 2008). O cenário futuro afigura-se ainda mais fascinante com o crescente conhecimento dos epigenomas de muitas neoplasias humanas que irão constituir a base de novos fármacos e de melhores biomarcadores, abrindo caminho a estratégias diagnósticas, prognósticas e terapêuticas inovadoras (Esteller, 2011; Laird, 2003).

A reversibilidade das alterações epigenéticas sob determinadas circunstâncias, torna estas alterações num ponto frágil dos mecanismos de defesa das células neoplásicas, uma vez que os genes supressores tumorais hipermetilados podem ser reativados e exercer as suas funções normais inibitórias do crescimento. Duas classes de fármacos desenvolvidos com base na epigenética, agentes hipometilantes do DNA e inibidores das histonas desacetiladas, surgiram como promissores nesta área (Esteller, 2008).

As alterações epigenéticas mais estudadas incluem a adição de um grupo metil ao DNA, as modificações pós-tradução das histonas e a regulação dependente de microRNAs (Figura 11). Os epigeneticistas descreveram ainda outros mecanismos que envolvem a formação de estruturas de alta resolução como os complexos DNA-histonas, o posicionamento dos nucleossomas e a atividade de muitos RNAs não codificantes (Melo & Esteller, 2011).



**FIGURA 11** A metilação do DNA (A) e as modificações das histonas (B) como os principais moduladores epigenéticos.

#### 1.4.5.1. A metilação do DNA e as modificações das histonas

A metilação do DNA desempenha um papel fundamental no controlo da atividade dos genes e na arquitetura nuclear. Na maioria dos eucariotas e, concretamente, nos seres humanos, a metilação do DNA, o processo epigenético mais estudado, consiste na transferência de um grupo metil (-CH<sub>3</sub>) a partir da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono-5 da citosina localizada em determinados dinucleótidos CpG (citosinas que precedem guaninas). Esta reação de transferência é catalizada por

DNA-metiltransferases (DNMTs). As três principais DNMTs, presentes em mamíferos, são a DNMT1, a DNMT3A e a DNMT3B. A DNMT1 é responsável pela manutenção da metilação que ocorre durante cada divisão celular quando o DNA é duplicado. As outras DNMTs, 3A e 3B, têm atividade na metilação *de novo*, quando novas 5-metilcitosinas são introduzidas no genoma em locais não previamente metilados (Chen *et al.*, 2012a; Okano *et al.*, 1999). Estes dinucleótidos CpG não se encontram dispersos aleatoriamente no genoma; pelo contrário, estão preferencialmente localizados em determinadas sequências do DNA, conhecidas como ilhéus CpG. Estes ilhéus CpG estão associados à região reguladora 5' de muitos genes e encontram-se predominantemente não metilados em células normais (Deaton & Bird, 2011) (Figura 11). Este estado de não metilação permite aos genes que contêm ilhéus CpG serem transcritos na presença de ativadores transcricionais específicos. Contudo, existe um subgrupo de ilhéus CpG em regiões promotoras de alguns genes que se encontram fortemente metilados e estes estão associados a "*tissue-specific and germline-specific genes, imprinted genes*" (isto é, genes que são expressos apenas a partir de uma cópia, de origem materna ou paterna e genes que sofrem inativação do cromossoma X em indivíduos do sexo feminino). Além destas, as sequências genómicas repetitivas também se encontram, de um modo geral, fortemente metiladas. A manutenção do estado de metilação poderá ter um papel importante na proteção da integridade cromossômica, prevenindo a sua instabilidade. A metilação do DNA não é um marcador epigenético isolado; encontra-se frequentemente associado a modificações químicas da terminação N das histonas. Estas proteínas armazenam informação epigenética através de um conjunto complexo de modificações pós-tradução, como acetilação da lisina, metilação da arginina e da lisina e fosforilação da serina. Foi proposto que padrões distintos de modificações presentes na terminação das histonas forme um código hereditário associado a estas, fundamental para a atividade dos genes, "*the histone code*" (Esteller, 2008).

As anomalias epigenéticas são uma característica das neoplasias humanas. A redução da metilação global do DNA foi a primeira alteração epigenética descrita em tumores humanos, como anteriormente mencionado. Esta redução resulta da hipometilação de sequências repetitivas e desmetilação de regiões codificantes e *introns* de determinados genes. A hipometilação global do DNA contribui para a origem das células neoplásicas através da geração de instabilidade cromossômica, reativação de elementos *transposable* e perda de *imprinting*. Paradoxalmente, existem outras áreas do DNA que se encontram hipermetiladas, como os ilhéus CpG das regiões promotoras de muitos genes supressores tumorais, conduzindo à inativação destes (Esteller, 2008).

A célula neoplásica tem uma capacidade limitada para sofrer alterações genéticas rápidas de forma a conseguir adaptar-se a um microambiente hostil. No entanto, a seleção de células neoplásicas é permitida com a produção de “células adaptadas”, através de alterações epigenéticas rápidas e aleatórias. Cerca de 48 horas após um estímulo externo, os padrões de metilação do DNA e de modificações das histonas das células transformadas podem ser completamente alterados. O exemplo clássico é o que ocorre no glioma, com a metilação do DNA associada à inativação da enzima de reparação do DNA, a 6-metilguanina DNA metiltransferase, que é preditiva de uma boa resposta à quimioterapia. No entanto, após o início da terapêutica, o tumor pode evoluir, selecionando as células que não se encontram metiladas no gene desta enzima, originando quimiorresistência numa base puramente epigenética (Esteller *et al.*, 1999).

Os micro RNAs com funções supressoras tumorais são igualmente silenciados nas células neoplásicas por hipermetilação do DNA. Os tumores humanos podem apresentar modificações nas histonas, como é o caso das leucemias, onde foram identificadas translocações que envolvem genes que codificam acetiltransferases e metiltransferases das histonas (Chuang & Jones, 2007; Sato *et al.*, 2011).

#### **1.4.5.2. A metilação do DNA no mieloma múltiplo**

É hoje largamente aceite pela comunidade científica o conceito de que as anomalias epigenéticas são fundamentais para a iniciação e progressão do MM (Baylin & Jones, 2011; Maes *et al.*, 2013a; Smith *et al.*, 2010).

Os estudos acerca do perfil global de metilação do DNA revelaram que a hipometilação ocorre como um evento precoce na patogénese do MM e que o nível de hipometilação aumenta com a progressão desta patologia, enquanto a hipermetilação parece ser um evento raro (Salhia *et al.*, 2010). Contudo, ainda que rara, a hipermetilação de alguns genes parece associar-se à progressão de MGUS para MM e para leucemia de plasmócitos (Walker *et al.*, 2011). Com base nestes dados, múltiplos estudos foram desenvolvidos em linhas celulares e em amostras primárias de MM e concluíram que a metilação aberrante em *loci* específicos de diversos genes se associava a um prognóstico desfavorável nos doentes com MM; os genes estudados incluíram o *SPARC*, o *BNIP3* (Heller *et al.*, 2008), o *DAPK*, o *RARβ* (Braggio *et al.*, 2010b), o *EGLN3* (Hatzimichael *et al.*, 2010), o *DLC-1* (Song *et al.*, 2006), o *CDH-1* (Seidl *et al.*, 2004), o *TGFβR2* (de Carvalho *et al.*, 2009) e o *p16* (Galm *et al.*, 2004). Outro estudo propôs que a metilação dos genes *p53*, *p15*, *p16* e *ARF* seria um evento precoce na patogénese do MM, uma vez que a hipermetilação em amostras de doentes com MGUS e com MM se mostrou sobreponível.



Ao invés, a metilação do gene *SOCS-1* estava presente em significativamente mais amostras de MM do que de MGUS, sugerindo um envolvimento na progressão de MGUS para MM (Stanganelli *et al.*, 2010). Um outro estudo demonstrou, ainda, que a hipermetilação do gene *RASD1* foi associado à resistência à dexametasona (Nojima *et al.*, 2009).

Todos estes dados realçam a importância da hipermetilação de genes no MM (Tabela 1). Contudo, os mecanismos moleculares subjacentes ao prognóstico desfavorável associado à hipermetilação de determinados genes permanecem grandemente desconhecidos. De acordo com alguns autores, parecem estar relacionados com uma expressão ou atividade alteradas das enzimas DNMTs (Sharma *et al.*, 2010a).

Principais genes metilados no mieloma múltiplo

TABELA 1

Processo biológico	Designação do gene	Frequência de metilação em amostras primárias de MM	Referência bibliográfica
Regulação do ciclo celular	<i>Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B (CDKN2B, p15)</i>	5 – 30%	Braggio <i>et al.</i> , 2010b Seidl <i>et al.</i> , 2004 Galm <i>et al.</i> , 2004 Stanganelli <i>et al.</i> , 2010
	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A, p16)</i>	7 – 53%	Braggio <i>et al.</i> , 2010b Seidl <i>et al.</i> , 2004 Galm <i>et al.</i> , 2004 Stanganelli <i>et al.</i> , 2010 Khong <i>et al.</i> , 2008 Chim <i>et al.</i> , 2007c
Regulação da apoptose	<i>Death-associated protein kinase 1 (DAPK)</i>	5 – 77%	Braggio <i>et al.</i> , 2010b Seidl <i>et al.</i> , 2004 Galm <i>et al.</i> , 2004
	<i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3)</i>	5 – 13%	Heller <i>et al.</i> , 2008 Braggio <i>et al.</i> , 2010b
	<i>B-cell CLL/lymphoma 7C (BCL 7c)</i>	21%	Heller <i>et al.</i> , 2008
	<i>Growth Arrest and DNA Damage inducible y (GADD45)</i>	19%	Heller <i>et al.</i> , 2008
Reparação do DNA	<i>Methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase (MGMT)</i>	2 – 4%	Seidl <i>et al.</i> , 2004 Galm <i>et al.</i> , 2004
Supressão tumoral	<i>Tumor protein 73 (TP73)</i>	12 – 45%	Seidl <i>et al.</i> , 2004 Galm <i>et al.</i> , 2004 Stanganelli <i>et al.</i> , 2010
Transdução de sinal	<i>Suppressor of cytokine signaling 1,3 (SOCS-1, -3)</i>	45 – 50%	Galm <i>et al.</i> , 2004 Stanganelli <i>et al.</i> , 2010 Reddy <i>et al.</i> , 2005 Wilop <i>et al.</i> , 2011
	<i>Spleen tyrosine kinase (SYK)</i>	38%	Reddy <i>et al.</i> , 2005
	<i>Dexamethasone-induced Ras-related protein 1 (RASD1)</i>	8%	Nojima <i>et al.</i> , 2009
	<i>Deleted in liver cancer-1 (DLC-1)</i>	78%	Song <i>et al.</i> , 2006
	<i>Ras association domain-containing protein 1A (RASSF1A)</i>	2 – 15%	Seidl <i>et al.</i> , 2004 Stanganelli <i>et al.</i> , 2010
	<i>Stratifin (SFN)</i>	100%	de Carvalho <i>et al.</i> , 2009
Via Wnt	<i>Wnt inhibitory factor 1 (WIF1)</i>	22%	Chim <i>et al.</i> , 2007c
	<i>Secreted frizzled-related protein 1, 2, 4, 5 (sFRP1, 2, 4, 5)</i>	4 – 50%	Chim <i>et al.</i> , 2007c Jost <i>et al.</i> , 2009
	<i>Dickkopf-related protein 1, 3 (DKK1, 3)</i>	16 – 32%	Chim <i>et al.</i> , 2007c Kocemba <i>et al.</i> , 2012
	<i>Adenomatous polyposis coli (APC)</i>	18%	Chim <i>et al.</i> , 2007c

(cont.)



(cont.)

Processo biológico	Designação do gene	Frequência de metilação em amostras primárias de MM	Referência bibliográfica
Osteogênese	<i>Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC)</i>	8%	Heller <i>et al.</i> , 2008
Sinalização de factor de crescimento	<i>Transforming growth factor beta-receptor 2 (TGFB2)</i>	45%	de Carvalho <i>et al.</i> , 2009
Adesão celular	<i>Cadherin 1 (CDH1, E-cadherin)</i>	30 – 80%	Braggio <i>et al.</i> , 2010b Seidl <i>et al.</i> , 2004 de Carvalho <i>et al.</i> , 2009
	<i>Gap junction alpha-1 protein (GJA1)</i>	23%	Heller <i>et al.</i> , 2008
	<i>A-kinase anchor protein 12 (AKAP12)</i>	13%	Heller <i>et al.</i> , 2008
Repressão de transcrição	<i>Hypermethylated in cancer 1 (HIC1)</i>	70%	de Carvalho <i>et al.</i> , 2009
Regulação da tradução	<i>Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1 (CPEB1)</i>	50%	Heller <i>et al.</i> , 2008
Factor transcrição	<i>Interferon regulatory factor 8 (IRF8)</i>	10%	Tshuikina <i>et al.</i> , 2008

A hipermetilação frequente dos ilhéus CpG nas regiões promotoras de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, da morte celular e da disseminação, com consequente silenciamento destes, confere aos plasmócitos neoplásicos uma vantagem em termos de crescimento e de sobrevivência, o que contribui para a progressão do MM (Galm *et al.*, 2004).

#### 1.4.5.2.1. Etiologia da metilação aberrante do DNA no mieloma múltiplo

A etiologia subjacente às alterações na metilação do DNA no MM não se encontra totalmente esclarecida; diversos estudos associaram a hiper e a hipometilação a alterações na atividade das DNMTs. Os padrões de metilação do DNA são determinados durante a embriogénese pelas três DNMTs ativas: a DNMT1, a DNMT3A e a DNMT3B. Como referido, a DNMT1 atua maioritariamente no DNA hemimetilado e é importante na manutenção da metilação do DNA durante a replicação (Bacolla *et al.*, 2001). A DNMT3A e a DNMT3B são responsáveis pela metilação *de novo* observada nos embriões precoces e, assim, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e nos estados de doença (Okano *et al.*, 1999). Foi demonstrado que as DNMTs se encontram hipo ou hiperexpressas em numerosos tumores; concretamente, a DNMT1 encontra-se hiperexpressa no MM. Alguns autores evidenciaram que a IL-6 induz a ativação de STAT3, iniciando a transcrição do fator transcripcional FLI-1 (*friend leukemia integration-site 1*) que, por sua vez, aumenta a expressão de DNMT1. Um aumento da IL-6 no MM, associada a um aumento na DNMT1, pode contribuir para a etiologia da hipermetilação de alguns genes observada no MM (Hodge *et al.*, 2005).

#### 1.4.5.2.2. Metilação dos genes *p15* e *p16*

Os genes *p15* (INK4B) e *p16* (INK4A) encontram-se frequentemente metilados no MM, como se observa na [Tabela 1](#). Estes genes são membros da família INK4 de inibidores das cinases dependentes da ciclina (CDKs) e, como reguladores do ciclo celular, inibem a progressão da fase G1. O gene *p15* está localizado a 25 kb do gene *p16* no local 9p21 e a proteína P15 partilha áreas significativas de sequências homólogas de aminoácidos com a P16, um alvo fundamental na carcinogénese (Hannon & Beach, 1994; Liggett & Sidransky, 1998). A metilação da região promotora de *p15* e de *p16*, associada ao silenciamento destes genes, causa a ativação do ciclo celular através da hiperexpressão das CDKs 4 e 6, o que resulta na proliferação de plasmócitos e na progressão do MM. O gene *p16* encontra-se metilado em 7-53% dos doentes com MM (Chim *et al.*, 2007b; Galm *et al.*, 2004; Chim *et al.*, 2007a; Braggio *et al.*, 2010a; Seidl *et al.*, 2004; Stanganelli *et al.*, 2010).

A inativação de *p16* é mais frequentemente encontrada no contexto de hipermetilação, uma vez que as deleções e as mutações deste gene são raramente observadas. Ainda que alguns estudos apresentem resultados contraditórios, o *p16* foi consistentemente associado à patogénese do MM. Foi, ainda, demonstrado que os doentes com o gene *p16* metilado apresentavam cerca de três vezes mais plasmócitos em fase S do que os doentes sem metilação deste gene, confirmando as suas funções supressoras tumorais (Mateos *et al.*, 2002, 2001). Com base no aumento significativo da metilação dos ilhéus CpG no MM quando comparado com o MGUS, o silenciamento de *p16* foi também associado à progressão de MGUS para MM. Diversos estudos encontraram uma associação entre o silenciamento do gene *p16* e uma redução na sobrevivência global, assim como níveis séricos elevados de B2M e de proteína C reativa, marcadores de prognóstico desfavorável (Galm *et al.*, 2004; Gonzalez-Paz *et al.*, 2007; Mateos *et al.*, 2002).

#### 1.4.5.2.3. Metilação do gene *DAPK* (*Death-Associated Protein Kinase*)

A *DAPK* é uma cinase de serina/treonina regulada por cálcio/calmodulina com funções pró-apoptóticas. O gene *DAPK* encontra-se metilado em proporções muito variáveis nos doentes com MM (5 a 77%), como demonstrado em diversos estudos (Chim *et al.*, 2007b; Galm *et al.*, 2004; Chim *et al.*, 2007a; Braggio *et al.*, 2010a; Seidl *et al.*, 2004). A metilação *DAPK* foi observada numa frequência semelhante em doentes com MM e MGUS (Chim *et al.*, 2007b; Braggio *et al.*, 2010a). Chim *et al.* demonstraram piores respostas à terapêutica e reduzida sobrevivência global em doentes com hipermetilação de *DAPK* (Chim *et al.*, 2007c).

### 1.4.5.3. As modificações das histonas no mieloma múltiplo

Nos eucariotas, a cromatina é constituída por múltiplos nucleossomas, que consistem num octâmero de histonas, envolvido por duas voltas superhelicoidais de DNA (Shukla *et al.*, 2008). As principais histonas estão representadas por um grupo de genes que codificam variantes de sequências primárias monoalélicas (Wolffe & Pruss, 1996; Malik & Henikoff, 2003).

As suas propriedades biofísicas distintas alteram a arquitetura dos nucleossomas, regulando a ativação ou repressão da transcrição, da replicação e da recombinação. As caudas terminais N e C das histonas constituem uma superfície de exposição para potenciais modificações, incluindo acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação ou sumoilação em diferentes resíduos de aminoácidos, mais frequentemente lisina, arginina e serina. Estas são as modificações que vão construir o código das histonas e permitir a ativação ou o silenciamento de genes. As enzimas que vão mediar as modificações da cromatina incluem as acetiltransferases das histonas (HATs), as desacetilases das histonas (HDACs) e as metiltransferases das histonas (HMTs) (Jenuwein & Allis, 2001; Strahl & Allis, 2000).

A acetilação das histonas, mais frequentemente em resíduos de lisina, reduz a afinidade entre histonas e DNA, tornando a cromatina mais exposta a proteínas que ligam DNA e a fatores de transcrição. Deste modo, a acetilação está mais frequentemente associada a aumento da transcrição enquanto a desacetilação inibe a transcrição. As perturbações no equilíbrio entre as HATs e as HDACs podem conduzir ao desenvolvimento de neoplasias (Sharma *et al.*, 2010a). Os principais locais de metilação das histonas ocorrem nas cadeias laterais dos aminoácidos lisina e arginina (Kouzarides, 2002; Zhang & Reinberg, 2001). Nos mamíferos, a arginina pode ser mono ou dimetilada, enquanto a lisina pode ser encontrada mono, di ou trimetilada. O efeito da metilação das histonas, ao contrário da acetilação, é mais específico do local onde ocorre. Por exemplo, a metilação de H3 na lisina 9 está largamente associada com o silenciamento e a repressão, enquanto a trimetilação de H3 na lisina 4 se associa a transcrição ativa. Estes dados indicam que uma única modificação das histonas pode mediar processos fisiológicos distintos, dependendo do seu contexto (Sharma *et al.*, 2010a). A interação entre as modificações das histonas, em que o estado de modificação de uma histona regula o estado de outra, foi proposto como modelo para explicar a sua ocorrência (Fischle *et al.*, 2003; Latham & Dent, 2007).

Durante muitos anos, pensou-se que a metilação das histonas era um processo irreversível. Contudo, a descoberta recente de duas famílias de desmetilases das histonas, a LSD1 (*lysine demethylase 1*) e a JmjC (*Jumonji domain-containing proteins*), mostraram que este processo é muito mais dinâmico do que previamente considerado

(Shukla *et al.*, 2009). Até à data, pouco é conhecido acerca das modificações das histonas no MM (Maes *et al.*, 2013a). O exemplo mais bem documentado é a translocação t(4;14), presente em cerca de 15% dos doentes com MM e que conduz à hiperexpressão do gene *MMSET*, que codifica uma metiltransferase das histonas (Marango *et al.*, 2008). Os plasmócitos neoplásicos com a translocação t(4;14) apresentam níveis mais elevados de H3K36me2 e níveis mais reduzidos de H3K36me3 em comparação com as células sem a referida translocação (Martinez-Garcia *et al.*, 2011). Os estudos do perfil de expressão génica revelaram que o gene *MMSET* regula outros genes envolvidos na via P53, na apoptose, na regulação do ciclo celular, na reparação do DNA e na adesão. O silenciamento deste gene pode afetar negativamente a sobrevivência e a adesão dos plasmócitos tumorais (Martinez-Garcia *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2009). Em estreita relação com o silenciamento génico, foi identificado um conjunto de genes hipoexpressos com níveis elevados de H3K36me3 em amostras de MM em comparação com indivíduos normais (Kalushkova *et al.*, 2010). A intervenção farmacológica com o inibidor da metilação das histonas (HMTI) deazaneplanocin ou o HDACI, panobinostat (LBH589) conduziu à reexpressão destes genes silenciados e a uma redução na sobrevivência das células de MM, observadas *in vivo* e *in vitro* (Kalushkova *et al.*, 2010). Estes resultados mostram que o gene *MMSET* poderá constituir um alvo terapêutico interessante.

Outro membro do grupo polycomb, o *BMI-1*, encontra-se hiperexpresso nos plasmócitos neoplásicos de doentes com MM, comparativamente a plasmócitos de indivíduos normais. Ao nível funcional, o *BMI-1* regula negativamente a expressão do gene pró-apoptótico *Bim* e, assim, funciona como um oncogene. O silenciamento do *BMI-1* reduz a sobrevivência dos plasmócitos no MM, por hiperexpressão do *Bim* (Jagani *et al.*, 2010), o que demonstra o seu potencial como alvo na terapêutica epigenética.

Relativamente à desacetilação das histonas e apesar de não existirem estudos consistentes que demonstrem a função aberrante das desacetilases das histonas no MM, a sua inibição farmacológica tem sido extensamente estudada nesta patologia.

#### **1.4.5.4. Implicações da metilação do DNA e da desacetilação das histonas para a terapêutica do mieloma múltiplo**

Como foi demonstrado que múltiplos genes se encontram hipermetilados no MM, os inibidores das DNMT, tornaram-se potenciais agentes terapêuticos. A maioria dos dados em que se baseia a eficácia terapêutica destes agentes deriva de estudos *in vitro* que envolveram linhas celulares e examinaram um ou dois genes metilados, demonstrando que a adição de inibidores das DNMTs causava desmetilação e aumento da transcrição do gene em causa. Estes dados foram evidenciados para genes como o

*DAPK*, o *SOCS1*, o *SHP1*, entre outros. Adicionalmente, foi ainda observado *in vitro* que a doxorubicina e o bortezomib, sinergicamente, aumentam a morte celular induzida por 5-azacitidina no MM, o que sugere que a metilação do DNA possa estar também envolvida na resistência à quimioterapia convencional (Kiziltepe *et al.*, 2007). Até à data, nenhum dos agentes hipometilantes do DNA disponíveis, dispõe da capacidade de se direcionar para a metilação aberrante de genes específicos. Serão necessários ensaios clínicos com inibidores das DNMTs e com resultados consistentes para compreendermos a sua possível utilidade na terapêutica do MM.

A desacetilação das histonas representa o segundo fator epigenético mais importante a contribuir para o silenciamento génico. Vários inibidores das HDACs estão a ser testados em ensaios clínicos, quer em monoterapia, quer em associação com agentes com atividade clínica demonstrada no MM. O vorinostat (SAHA), o panobinostat (LBH589), o belinostat (PXD101), a romidepsina (depsipéptido) e o gavinostat (ITF2357) foram investigados em monoterapia em doentes com MM em recidiva ou refratário. A atividade clínica alcançada com estes fármacos em monoterapia foi reduzida, uma vez que apenas uma minoria dos doentes apresentou algum grau de resposta e esta consistiu em resposta mínima ou estabilização da doença (DeAngelo *et al.*, 2013; Niesvizky *et al.*, 2011; Galli *et al.*, 2010; Richardson *et al.*, 2008; Gimsing *et al.*, 2008). Com base nestes resultados, foram desenhados outros ensaios clínicos (alguns ainda a decorrer) que têm como objetivo investigar a combinação de inibidores das HDACs com fármacos convencionais no MM. Os resultados de algumas destas combinações parecem promissores no panorama da terapêutica do MM (Tabela 2).

Diversos estudos revelaram que a metilação do DNA e a modificação das histonas interagem com o objetivo de modular a expressão génica (Fuks, 2005; Kondo, 2009). Deste modo, ter como alvo a metilação do DNA e a acetilação das histonas simultaneamente constitui uma nova estratégia terapêutica dirigida a anomalias epigenéticas (Sharma *et al.*, 2010b). No MM, alguns estudos investigaram os efeitos da combinação de um DNMTI com um HDACI. Com efeito, a tricostatina (TSA) e a decitabina (DAC) isoladas e em combinação induziram alterações na expressão de genes relevantes na patogénese do MM. Alguns destes genes foram regulados por TSA ou DAC isoladamente, mas um grupo adicional de outros genes foi afetado pela combinação dos dois agentes, entre os quais *CDKN1A/p21*, *WIG1*, *BIK*, *CGREF1*, *JUP* e *IGFBP3* (Heller *et al.*, 2008). Este estudo revela que estes dois fármacos podem atuar sinergicamente para reverter o silenciamento epigenético. Um outro estudo realizado numa linha celular de MM (U266) evidenciou que a DAC e o butirato de sódio, um inibidor da desacetilação das histonas apresentaram efeitos sinérgicos no crescimento e na apoptose de plasmócitos neoplásicos; estes dados foram associados a uma interação sinérgica da DAC e do butirato de sódio na reexpressão de *p16* (Du *et al.*, 2002).

Principais ensaios clínicos com moduladores epigenéticos em doentes com MM

TABELA 2

Fármaco	Fase	Combinação com	Doentes com MM	Tipo de resposta	Referência bibliográfica
Vorinostat	I	-	recidiva/refratário (n=13)	1 MR 9 SD	Richardson <i>et al.</i> , 2008
Panobinostat	IIa/II	--	recidiva/refratário (n=12)	1 PR	DeAngelo <i>et al.</i> , 2013
Romidepsin	II	-	recidiva/refratário (n=13)	4 SD	Niesvizky <i>et al.</i> , 2011
Gavinostat	II	-	recidiva/refratário (n=19)	6 SD	Galli <i>et al.</i> , 2010
Vorinostat	I	Bortezomib	recidiva/refratário (n=23)	2 VGPR; 13 PR; 10 SD	Badros <i>et al.</i> , 2009
Vorinostat	I	Bortezomib	recidiva/refratário (n=6)	1 VGPR; 4 MR; 1 SD	Mazumder <i>et al.</i> , 2010
Vorinostat	I	Bortezomib	recidiva/refratário (n=34)	9 PR; 2 MR; 20 SD	Weber <i>et al.</i> , 2012
Vorinostat	I	Lenalidomida Bortezomib Dexametasona	diagnóstico de novo (n=30)	10 CR 15 VGPR	Kaufman <i>et al.</i> , 2010
Vorinostat	I/II	Lenalidomida Bortezomib Dexametasona	recidiva/refratário (n=64)	8 CR; 4 VGPR 22 PR; 9 MR 9 SD	Shah <i>et al.</i> , 2012a
Panobinostat	II	Bortezomib Dexametasona	recidiva/refratário (n=55)	1 CR; 18 PR; 10 MR; 20 SD	Richardson <i>et al.</i> , 2013
Panobinostat	I	Carfilzomib	recidiva/refratário (n=17)	2 VGPR; 6 PR; 1 MR	Shah <i>et al.</i> , 2012b
Panobinostat	I/II	Carfilzomib	recidiva/refratário (n=10)	em curso	Berdeja <i>et al.</i> , 2013
Romidepsina	I/II	Bortezomib Dexametasona	<i>previously treated</i> (n=25)	2 CR; 13 PR 3 MR; 2 SD	Harrison <i>et al.</i> , 2011
Romidepsina	I/II	Bortezomib	recidiva/refratário (a recrutar)	em curso	U.S. National Institutes of Health, 2013
Vorinostat	I/b	Bortezomib	recidiva/refratário (n=143)	em curso	Siegel, D.S.; Dimopoulos <i>et al.</i> , 2011
Vorinostat	III	Bortezomib	recidiva/refratário (n=637)	em curso	Dimopoulos <i>et al.</i> , 2013
Panobinostat	III	Bortezomib	recidiva/refratário (n=672)	em curso	San-Miguel <i>et al.</i> , 2011
Panobinostat	I/II	Lenalidomida Bortezomib Dexametasona	diagnóstico de novo (a recrutar)	em curso	U.S. National Institutes of Health, 2013
Vorinostat	III	Lenalidomida Talidomida Bortezomib	diagnóstico de novo (a recrutar)	em curso	U.S. National Institutes of Health, 2013
Vorinostat	I	Lenalidomida	pós-transplante (n=16)	4 melhorias de resposta	Hofmeister <i>et al.</i> , 2012
Azacitidina	II	Lenalidomida	PR ou plateau (n=14)	3 respostas CTL	Toor <i>et al.</i> , 2012
Azacitidina	I	Lenalidomida	elegíveis para transplante (a recrutar)	em curso	U.S. National Institutes of Health, 2013
Azacitidina	I/II	Lenalidomida Dexametasona	recidiva/refratário (a recrutar)	em curso	U.S. National Institutes of Health, 2013
Decitabina	I	-	recidiva/refratário	em curso	U.S. National Institutes of Health, 2013

Avaliação de resposta de acordo com os critérios do IMWG. CR: resposta completa; VGPR: muito boa resposta parcial; PR: resposta parcial; MR: resposta mínima; SD: doença estável; CTL: linfócitos T citotóxicos CD8+.  
(Adaptado de Maes *et al.*, 2013b).

Foi ainda demonstrado o potencial da combinação de HDACIs e de DNMTIs no aumento das respostas de linfócitos T citotóxicos CD8+ dirigidas contra plasmócitos tumorais *in vivo* (Moreno-Bost *et al.*, 2011).

### 1.4.6. Micro RNAs

Os miRNAs são pequenas porções de RNA não codificante, constituídas por 16-24 pares de bases, que regulam a expressão génica, induzindo a degradação de RNA mensageiro (RNAm) ou inibindo a sua tradução. As suas funções reguladoras encontram-se frequentemente alteradas no cancro. Estudos recentes revelaram uma interação estreita entre os miRNAs e a epigenética. Com efeito, a metilação do DNA e as modificações das histonas não regulam apenas a expressão de genes que codificam proteínas, mas também os miRNAs. De facto, os mecanismos epigenéticos podem ser responsáveis por anomalias no miRNoma (definido como o espectro completo de miRNAs para um genoma específico), observadas no cancro. Concretamente, um grupo específico de miRNAs (definido como epi-miRNAs) podem afetar de forma direta a expressão de reguladores epigenéticos (como os genes que codificam as metiltransferases do DNA, as desacetilases das histonas ou o complexo *polycomb*) e indiretamente influenciar a expressão de genes supressores tumorais, cuja expressão é controlada por fatores epigenéticos. O resultado desta interação é um novo nível de complexidade na regulação génica e a abertura de novos caminhos na compreensão da carcinogénese humana (Fabbri & Calin, 2010; Sato *et al.*, 2011).

### 1.4.7. Alterações na expressão de moléculas envolvidas na apoptose

#### 1.4.7.1. A apoptose fisiológica

A apoptose é um processo fisiológico de destruição celular, através de uma morte celular programada, fundamental para o desenvolvimento e a homeostasia dos tecidos de todos os organismos multicelulares, incluindo os humanos, desde a embriogénese ao envelhecimento. (Green & Reed, 1998). O termo apoptose foi inicialmente usado numa publicação de Kerr, Wyllie e Currie, em 1972, como “a process seen in multicellular organisms, by which specific cells are killed and removed for the benefit of the organism” para descrever uma forma morfológicamente distinta de morte celular, ainda que certos componentes do conceito de apoptose já tivessem sido abordados muitos anos antes (Kerr 1972; Elmore 2007). A nossa compreensão acerca dos mecanismos envolvidos na apoptose advém da investigação da morte celular programada que ocorre durante o desenvolvimento do nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Horvitz, 1999).



Neste organismo, 1090 células somáticas são geradas na formação de um verme adulto, das quais 131 destas células sofrem apoptose. Estas 131 células morrem em momentos particulares durante o processo de desenvolvimento, que é essencialmente invariável entre os vermes, demonstrando uma acuidade e controlo notáveis deste sistema. Desde então, a apoptose é reconhecida como uma forma distinta de morte celular programada que envolve a eliminação de células geneticamente determinada.

Ainda que haja uma grande variedade de estímulos e condições, fisiológicos ou patológicos, que possam desencadear a apoptose, nem todas as células irão sofrer esta forma de morte em resposta aos mesmos estímulos. A radiação ou os fármacos antineoplásicos resultam na lesão do DNA em algumas células que poderão ser conduzidas à morte por apoptose através de uma via dependente da proteína P53. Algumas hormonas, como os corticoesteróides podem levar à apoptose de algumas células, sem afetar outras. A apoptose pode representar também um mecanismo de defesa, como aquele que ocorre nas reações imunes ou na lesão celular provocada por patologias ou agentes nocivos. (Norbury and Hickson, 2001).

É importante explicitar a distinção entre apoptose e necrose, dois processos que podem ocorrer independentemente um do outro, sequencial ou simultaneamente. (Hirsh, 1997; Zeiss, 2003). Na maioria dos casos, é o tipo de estímulo e/ou a graduação do mesmo que determina se as células vão morrer por apoptose ou por necrose. Em doses reduzidas, múltiplos estímulos lesivos às células, como a temperatura elevada, a radiação ultravioleta, a radiação ionizante, a hipóxia, o stresse oxidativo ou os fármacos citotóxicos podem conduzir à apoptose. Contudo, os mesmos estímulos poderão resultar em necrose, se estiverem presentes em doses mais elevadas. A apoptose é um processo coordenado e dependente de energia, na maioria dos casos, que envolve a ativação de um grupo de cisteína proteases, designadas caspases, assim como uma complexa cascata de eventos desde o estímulo inicial à destruição da célula. A morte celular por necrose é um processo passivo, desencadeado externamente, que não envolve expressão genética e resulta na morte da célula, na ausência de qualquer autoenvolvimento metabólico (Franklin *et al.*, 2006).

Durante a apoptose, ocorrem múltiplas alterações morfológicas, nomeadamente, retração de volume, com densificação do citoplasma e compactação dos organelos, picnose (resultado da condensação da cromatina), fragmentação do núcleo e do DNA, formação de "blebbs" extensos na membrana citoplasmática, seguidos por cariorrexis e separação de fragmentos celulares em corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos são subsequentemente fagocitados por macrófagos, células parenquimatosas ou células neoplásicas e degradados em fagolisosomas.



Os macrófagos que captam e digerem células apoptóticas são designados “tingible body macrophages”. Não existe praticamente reação inflamatória associada ao processo de apoptose nem à remoção das células apoptóticas por três motivos essenciais: as células apoptóticas não libertam os seus constituintes celulares para o tecido intersticial circundante; as células apoptóticas são rapidamente fagocitadas pelas células circundantes, prevenindo a necrose secundária e, finalmente, as células fagocitadas não produzem citocinas anti-inflamatórias (Savil e Fadok, 2000; Kurosaka, 2003).

As alterações morfológicas associadas ao processo de necrose são distintas das da apoptose e envolvem a perda da integridade da membrana plasmática, a tumefação celular com formação de vacúolos citoplasmáticos, aumento de volume do retículo endoplasmático, distensão ou rutura da mitocôndria e dos lisosomas, lise e libertação do conteúdo citoplasmático no tecido circundante, conduzindo à reação inflamatória, ausente nas células apoptóticas (Kurosaka *et al.*, 2003).

Recentemente, foi descrito que a lesão do DNA provocada por agentes alquilantes estimula um tipo necrótico de morte celular programada através de polimerases poli ADP-riboses (PARP) e do fator indutor da apoptose (AIF), com algumas características que se assemelham às da apoptose. Estas observações permitem considerar a necrose, em algumas circunstâncias, também como uma forma altamente regulada de morte celular programada (Moubarak *et al.*, 2007; Zong *et al.*, 2004), admitindo que a necrose possa ocorrer de uma forma controlada (Zong & Thompson, 2006; Vanden Berghe *et al.*, 2004). Este conceito, associado a um aprofundamento do estudo das vias de necrose, poderá constituir um novo alvo de destruição das células tumorais resistentes à apoptose (Rastogi, 2009).

#### **1.4.7.1.1. Os mecanismos de apoptose**

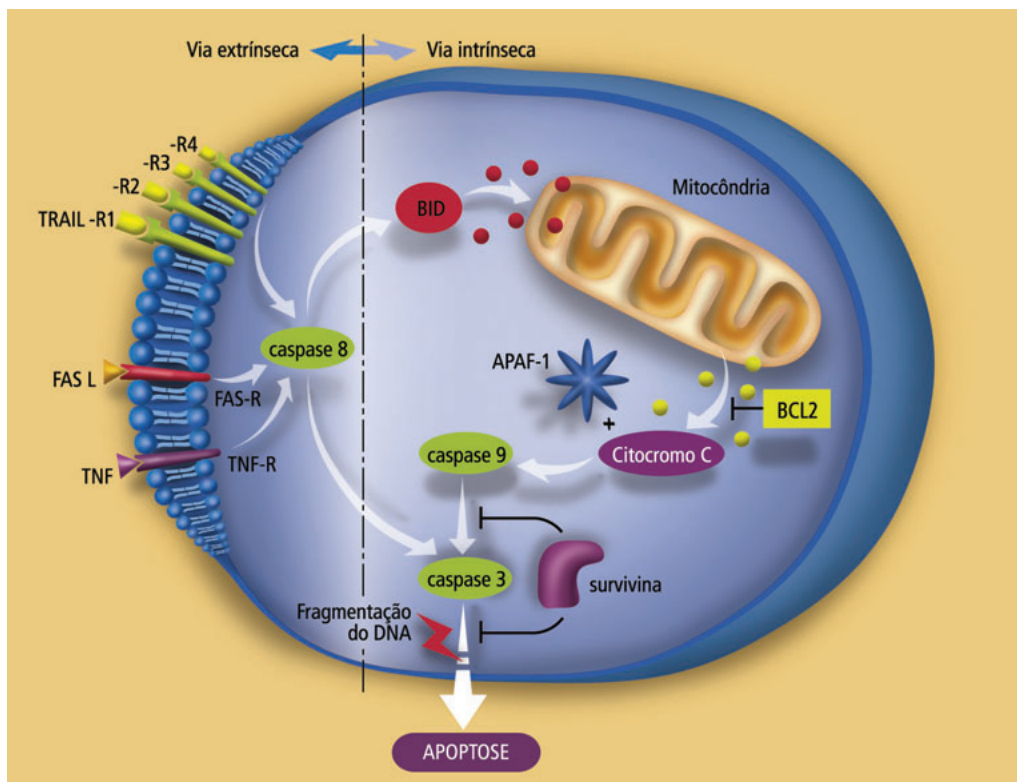
Os mecanismos subjacentes à apoptose são altamente complexos e envolvem uma sequência de eventos moleculares dependentes de energia. Até ao presente, as investigações evidenciaram duas vias apoptóticas principais: a via extrínseca ou via do recetor de morte e a via intrínseca ou mitocondrial. Contudo, existem evidências de que as duas vias estejam relacionadas e que as moléculas de uma via possam influenciar a outra (Igney & Krammer, 2002). Encontra-se descrita ainda uma via adicional que envolve a citotoxicidade mediada por células T e a destruição celular dependente de granzimas e perforinas. A via das perforinas/granzimas poderá induzir apoptose através das granzimas A ou B. As vias intrínseca, extrínseca e da

granzima B convergem na mesma via final, que se inicia com a clivagem da caspase-3 e resulta na fragmentação do DNA, degradação das proteínas nucleares e do citoesqueleto, *cross-linking* de proteínas, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligandos para recetores de células fagocitárias e, finalmente, captação por estas células. A via da granzima A ativa uma via de morte celular paralela, independente das caspases, através da qual a granzima A induz a produção de espécies reativas de oxigénio, a nível mitocondrial, após interferência com a cadeia de transporte de eletrões (Martinvalet *et al.*, 2005).

As caspases encontram-se presentes na maioria das células sob a forma inativa de proenzimas (pró-caspases) e, após ativadas, através de clivagem proteolítica, podem clivar e ativar outras pró-caspases, permitindo o início da cascata de proteases. Algumas pró-caspases podem agregar-se e auto-ativar-se. Esta cascata proteolítica, em que uma caspase pode ativar outras caspases, amplifica a via de sinalização apoptótica conduzindo, assim, a uma rápida morte celular. As caspases têm atividade proteolítica e são capazes de clivar proteínas em resíduos de ácido aspártico, ainda que diferentes caspases tenham diferentes especificidades que envolvem o reconhecimento de aminoácidos situados na proximidade dos resíduos de ácido aspártico (Elmore, 2007). Uma vez ativadas as caspases, parece haver um percurso irreversível em direcção à morte celular. Até ao presente, encontram-se identificadas, em mamíferos, 14 caspases, das quais 10 assumem funções cruciais, que foram classificadas em dois grupos: caspases inflamatórias (caspase-1, -4, -5) e caspases apoptóticas. Com base nas suas estruturas e funções, as caspases apoptóticas foram ainda subdivididas em iniciadoras (caspase-2, -8, -9, -10) e efetoras/executantes (caspase-3, -6, -7) (Chen & Lu, 2011).

Um extenso *cross-linking* proteico é outra das características das células apoptóticas e é alcançado através da expressão e ativação de uma transglutaminase tecidual (Fesus *et al.*, 1996).

Outra característica bioquímica é a expressão de marcadores da superfície celular que resultam no reconhecimento fagocítico precoce das células apoptóticas por parte das células adjacentes, permitindo uma rápida fagocitose, com um compromisso mínimo dos tecidos circundantes. A fosfatidilserina constitui o mais conhecido destes ligandos de reconhecimento, ainda que outras proteínas possam ser expostas na superfície celular durante a *clearance* das células apoptóticas. Estas incluem a anexina I e a calreticulina (Elmore, 2007).



**FIGURA 12** As vias intrínseca e extrínseca da apoptose.

A via mitocondrial (ou intrínseca) da apoptose é desencadeada por estímulos pró-apoptóticos como a lesão do DNA desencadeada pela quimioterapia ou radioterapia. Estes estímulos promovem a permeabilização da membrana mitocondrial e a liberação de citocromo C que, em associação com a proteína APAF-1 e a caspase 9, formam o apoptossoma, com ativação da caspase 3. A via extrínseca inicia-se com a interação dos ligandos de morte (FAS, TNF e TRAIL) aos seus receptores, com ativação subsequente das caspases 8, 1 e 3. A caspase 3 induz fragmentação do DNA e da estrutura nuclear.

#### 1.4.7.1.2. A via extrínseca

A via de sinalização extrínseca que inicia a apoptose envolve interações transmembranares mediadas por um recetor. Estas interações envolvem recetores de morte que são membros da superfamília de genes do recetor do fator de necrose tumoral (TNF) (Locksley *et al.*, 2001).

Os membros da família de recetores TNF partilham domínios extracelulares semelhantes, ricos em cisteína e têm um domínio citoplasmático de cerca de 80 aminoácidos, designado "death domain" (DR) (Ashkenazi & Dixit, 1998). Este domínio de morte desempenha um papel crucial na transdução de sinal a partir da superfície celular para as vias de sinalização intracelulares. Os ligandos mais conhecidos e respetivos recetores de morte incluem: FASL/FAS, TNF- $\alpha$ /TNF- $\alpha$ Rec, TRAIL/TRAIL-DR4 e -DR5 (Elmore, 2007).

Os eventos que definem a via extrínseca da apoptose são melhor caracterizados pelos modelos FASL/FAS e TNF- $\alpha$ /TNFR1. Nestes modelos, existe um conjunto de recetores e ligação aos ligandos triméricos homólogos. A interação entre o ligando FAS e o recetor FAS resulta na ligação a uma proteína adaptadora presente no citosol designada FADD (*FAS-associated death domain*). No caso do ligando TNF e do recetor TNF, a proteína adaptadora designa-se TRADD (*TNF receptor-associated death domain*), com recrutamento das proteínas FADD e RIP (*receptor-interacting serine-threonine protein*). A ligação da proteína FADD à pró-caspase 8 resulta na formação de um complexo de sinalização indutor de morte (DISC, *death-inducing signaling complex*), que conduz à ativação autocatalítica da procaspase-8 (Kischkel *et al.*, 1995). Após a ativação da caspase 8 (também designada FLICE, *FADD-like interleukin-1beta-converting enzyme*), a fase de execução da apoptose é desencadeada (Elmore, 2007).

A apoptose mediada por recetores de morte pode ser inibida por uma proteína designada c-FLIP (Cellular-FLICE inhibitory protein), que se liga à FADD e à caspase-8, tornando-as ineficazes. A proteína inibitória c-FLIP é um regulador antiapoptótico fundamental na inibição da morte celular mediada pelos recetores de morte FAS, DR4, DR5, and TNF-R1 (Kataoka *et al.*, 1998; Scaffidi *et al.*, 1999; Elmore, 2007).

Outro ponto de potencial regulação da apoptose envolve uma proteína designada Toso, que bloqueia a apoptose induzida por FAS em células T através da inibição da ativação da procaspase-8 e -10. A hiperexpressão de c-FLIP foi identificada em diversos tipos de tumores e a sua inibição *in vitro* restaura a apoptose mediada por CD95L e pelo TRAIL. A proteína c-FLIP poderá representar um alvo promissor na terapêutica contra o cancro, reconstituindo uma resposta apoptótica nas células neoplásicas. (Shirley & Micheau, 2013).

#### **1.4.7.1.3. A via intrínseca**

A via intrínseca é ativada por diversos sinais de stresse (lesão do DNA por quimioterapia, radiação ultravioleta, ausência de fatores de crescimento), toxinas, hipóxia, hipertermia, infeções virais e radicais livres. Estes estímulos conduzem a alterações na membrana interna da mitocôndria, que resultam na abertura dos designados poros transitórios na permeabilidade mitocondrial, perda do potencial transmembranar mitocondrial e libertação de dois principais grupos de proteínas pró-apoptóticas, habitualmente sequestradas no espaço intermembranar, para o citosol (Saelens *et al.*, 2004). O primeiro grupo é constituído pelo citocromo c, pelo Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase) (Du *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2007; Garrido *et al.*, 2006) e pela serina protease HtrA2/Omi (van Loo *et al.*, 2002;

Vande Walle *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2004). Estas proteínas ativam a via mitocondrial dependente das caspases.

O citocromo c liga-se e ativa a proteína APAF-1 assim como a procaspase-9 (via citocromo c/APAF-1/caspase-9), formando um "apoptossoma" (Jiang & Wang, 2004; Garrido *et al.*, 2006; Gogvadze *et al.*, 2006). As proteínas mitocondriais Smac/DIABLO e HtrA2/Omi, após serem libertadas para o citosol, promovem a apoptose, inibindo as proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) (van Loo *et al.*, 2002; Vande Walle *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2004), através de inibição direta ou degradação proteasômica de alguns dos seus componentes (Chen & Huerta, 2009). O segundo grupo de proteínas pró-apoptóticas, a flavoproteína intermembranar mitocondrial AIF (*apoptosis-inducing factor*), a endonuclease G e a endonuclease dependente de Magnésio CAD (*caspase-activated DNase*), são libertadas da mitocôndria durante a apoptose, sendo este um evento tardio, que ocorre após a célula estar comprometido com o seu programa de morte programada. A flavoproteína AIF dirige-se até ao núcleo onde desencadeia a fragmentação do DNA em fragmentos de 50-300 kb, assim como a condensação da cromatina nuclear periférica. Esta forma precoce de condensação nuclear é designada como condensação "estádio I" (Daugas *et al.*, 2000; Candé *et al.*, 2002). A endonuclease G também se desloca até ao núcleo, onde cliva a cromatina nuclear para produzir fragmentos de DNA oligonucleossomais. As proteínas AIF e endonuclease G funcionam de uma forma independente das caspases. A nuclease CAD, por seu lado, é subsequentemente libertada da mitocôndria e desloca-se até ao núcleo onde, após clivagem pela caspase-3, conduz à fragmentação do DNA oligonucleossomal e a uma condensação acrescida da cromatina (Enari *et al.*, 1998). Esta última condensação é designada como "estádio II". A fragmentação do DNA é um dos eventos mais característicos das células em apoptose e a nuclease CAD parece ser a principal responsável por esta fragmentação. A CAD forma um complexo com o seu inibidor (ICAD), conduzindo à estabilização da CAD nas células não apoptóticas (Tsuruta *et al.*, 2008). A ativação da apoptose pelas caspases 3 ou 7 resulta na clivagem da subunidade inibidora ICAD e libertação da nuclease CAD ativa (Widlak & Garrard, 2005).

A regulação destes eventos mitocondriais desencadeadores da apoptose está a cargo de membros da família de proteínas BCL-2 (*B cell CLL/lymphoma-2*) (Chao & Korsmeyer, 1998). A via mitocondrial da apoptose constitui uma das principais barreiras de proteção contra a tumorigénese. A família de proteínas BCL-2 inclui os principais participantes nesta via que regula o destino da célula através do controlo da permeabilidade da membrana externa da mitocôndria. A família BCL-2 é constituída por proteínas com atividades pró ou antiapoptóticas (Youle & Strasser, 2008; Chao & Korsmeyer, 1998; Chipuk *et al.*, 2010). As proteínas

com atividade antiapoptótica incluem a BCL-2, a BCL-X, a BCL-XL, a BCL-XS, a BCL-W ou a BAG e com atividade pró-apoptótica a BAX, a BAK, a BID, a BAD, a BIM, a BIK ou a BCL-10. Estas proteínas desempenham um papel crucial, uma vez que determinam se a célula avança para o processo de apoptose ou se rejeita este processo. O principal mecanismo de ação das proteínas da família BCL-2 é a regulação da libertação do citocromo c a partir da mitocôndria através da alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (Elmore, 2007). A lesão mitocondrial na via FAS da apoptose é mediada pela clivagem da proteína BID pela caspase-8. Este é um dos pontos comuns entre as vias intrínseca e extrínseca da apoptose (Igney & Krammer, 2002). A fosforilação da proteína BAD em resíduos de serina está associada à proteína 14-3-3, um membro da família de moléculas multifuncionais que ligam fosfoserina. Quando a proteína BAD se encontra fosforilada, fica sequestrada no citosol; se desfosforilada, desloca-se até à mitocôndria onde desencadeia a libertação de citocromo c. A proteína 14-3-3 desempenha, assim, um papel crítico na regulação da atividade pró-apoptótica da proteína BAD (Zha *et al.*, 1996; Masters *et al.*, 2001). Esta mesma proteína pode igualmente formar heterodímeros com as proteínas BCL-XL ou BCL-2, neutralizando os seus efeitos protetores e promovendo a morte celular (Yang *et al.*, 1995). As proteínas BCL-2 e BCL-XL, quando não sequestradas pela BAD, inibem a libertação de citocromo c a partir da mitocôndria, segundo um mecanismo não completamente esclarecido. Os estudos realizados nesta área mostraram que as proteínas BCL-2 e BCL-XL inibem a morte por apoptose, controlando a ativação das proteases caspases (Newmeyer *et al.*, 2000). Uma outra proteína adicional designada "AVEN" desempenha funções antiapoptóticas potenciando a função da proteína BCL-XL e ligando-se à proteína APAF-1, prevenindo a formação do apoptossoma e a apoptose mitocondrial (Chau *et al.*, 2000; Kutuk *et al.*, 2010; Eibmann *et al.*, 2012). Existem evidências de uma regulação recíproca entre as proteínas BCL-2 e BCL-XL (Elmore, 2007).

Os genes *PUMA* (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) e *NOXA* são dois membros da família *BCL-2* que codificam proteínas envolvidas na estimulação da apoptose. As proteínas PUMA e NOXA desempenham um papel importante na apoptose mediada pela proteína supressora tumoral P53, interagindo com a proteína BCL-2 e desencadeando a libertação de citocromo c e ativação da caspase-9 (Oda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006; Valente *et al.*, 2013). Uma vez que PUMA e NOXA são induzidas por P53, medeiam a apoptose que é desencadeada por lesão genotóxica ou ativação oncogénica. A oncoproteína c-MYC também foi potenciadora da apoptose através de mecanismos dependentes e independentes da proteína P53 (Meyer & Penn, 2008).

#### 1.4.7.1.4. A via efetora

As vias intrínseca e extrínseca culminam na fase de execução, considerada a via final da apoptose, iniciada pela ativação das caspases. As caspases ativam endonucleases citoplasmáticas que degradam o material nuclear e proteases que degradam proteínas do citoesqueleto e nucleares. As caspases-3, -6 e -7 funcionam como caspases efetoras, clivando vários substratos, incluindo citoqueratinas, PARP, a proteína alfa fodrina do citoesqueleto da membrana plasmática e a proteína nuclear NuMA que desencadeiam as alterações morfológicas e bioquímicas observadas nas células apoptóticas (Slee *et al.*, 2001). A caspase-3 é considerada a mais importante das caspases efetoras e é ativada por uma das caspases iniciadoras (caspase-8, caspase-9 ou caspase-10). A caspase-3 especificamente ativa a endonuclease CAD, clivando o seu inibidor (ICAD). Esta endonuclease degrada o DNA cromossómico no núcleo, conduzindo à condensação da cromatina. A caspase-3 induz reorganização do citoesqueleto e desintegração da célula em corpos apoptóticos. A gelsolina, uma proteína que liga actina, foi identificada como um substrato fundamental da caspase-3 ativada. A caspase-3 cliva a gelsolina e os fragmentos clivados, por sua vez, clivam filamentos de actina. Este processo resulta na destruição do citoesqueleto e em alterações no transporte celular, na divisão celular e na transdução de sinal (Kothakota *et al.*, 1997; Silacci *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012).

A captação fagocítica das células apoptóticas é a última etapa da apoptose. A assimetria fosfolipídica e a exteriorização da fosfatidilserina na superfície da célula apoptótica, assim como a sua fragmentação constituem as características desta fase (King & Cidlowski, 1998). Ainda que o mecanismo de translocação da fosfatidilserina para a camada externa da membrana plasmática não esteja inteiramente elucidado, foi associado com a perda de atividade da aminofosfolípido translocase e com movimentos *flip-flop* não específicos de fosfolípidos de várias classes (Bratton *et al.*, 1997; Balasubramanian *et al.*, 2007). As investigações nesta área revelaram que a proteína FAS, assim como a caspases-3 e a caspase-8 estão envolvidas na regulação da exteriorização de fosfatidilserina em eritrócitos sob stresse oxidativo (Mandal *et al.*, 2005). A disposição da fosfatidilserina na camada externa da membrana celular das células apoptóticas facilita o reconhecimento fagocítico não inflamatório e permite a sua captação precoce. Este processo de captação precoce e eficiente sem libertação dos constituintes celulares resulta na resposta não inflamatória que caracteriza a apoptose (Fadok *et al.*, 2001).



#### 1.4.7.2. A apoptose patológica

As anomalias na regulação da morte celular podem contribuir de forma decisiva para inúmeras patologias, como o cancro, as doenças autoimunes e neurodegenerativas, a isquémia ou a infeção HIV. Em algumas destas patologias, observa-se uma diminuição da apoptose, enquanto noutras está excessivamente aumentada (Elmore, 2007).

O cancro constitui um exemplo de uma patologia em que os mecanismos normais de regulação do ciclo celular se encontram disfuncionais, podendo estar presente uma hiperproliferação das células ou uma redução da sua destruição (King & Cidlowski, 1998). De facto, a supressão da apoptose durante a carcinogénese parece representar um papel central no desenvolvimento e progressão de algumas neoplasias. De facto, estão descritos múltiplos mecanismos moleculares usados pelas células tumorais para evitar a apoptose. As células tumorais podem adquirir resistência à apoptose através da expressão de proteínas antiapoptóticas como a BCL-2 ou através da subexpressão ou mutação de proteínas pró-apoptóticas como a BAX. A expressão das proteínas BCL-2 e BAX encontra-se regulada pelo gene supressor tumoral *p53* (Miyashita *et al.*, 1994; Zilfou & Lowe, 2009). Alguns subtipos de linfomas de células B apresentam hiperexpressão de BCL-2. Esta constituiu uma das primeiras e mais fortes evidências de que a falência da morte celular contribuía para o cancro (Vaux *et al.*, 1988). Outra forma de supressão da apoptose no cancro envolve a evasão da vigilância imune (Smyth *et al.*, 2001; Swann & Smyth, 2007).

Certas células do sistema imune (como as células T ou as células *natural killer*) normalmente destroem as células tumorais através da via das perforinas/granzima B ou através da via do recetor de morte. Com o objetivo de evasão do sistema imune, algumas células tumorais diminuem a resposta da via do recetor de morte ao FasL produzido pelas células T. Este fenómeno pode ocorrer segundo múltiplas vias, incluindo a diminuição da expressão do recetor FAS nas células tumorais. Outros mecanismos incluem a expressão do recetor FAS não funcional, a secreção de elevados níveis de uma forma solúvel do recetor FAS que sequestra o FAS ligando ou a expressão de FAS ligando na superfície das células tumorais (Cheng *et al.*, 1994; Elnemr *et al.*, 2001).

De facto, algumas células tumorais são capazes de fazer um contra-ataque mediado por FAS ligando que resulta na depleção apoptótica de linfócitos ativados que infiltram o tumor (Ryan *et al.*, 2005). Alterações em diversas vias de sinalização celular podem resultar na desregulação da apoptose e conduzir ao cancro. O gene supressor tumoral *p53* é um fator de transcrição que regula o ciclo celular e é o gene mais frequentemente mutado na tumorigénese humana (Wang & Harris, 1997).

O papel crítico deste gene é evidenciado pelo facto de se encontrar mutado em mais de 50% de todos os tumores humanos. O gene *p53* ativa proteínas de reparação do DNA em caso de lesão deste, mantém a célula em fase G1/S do ciclo celular e inicia a apoptose se ocorrerem lesões irreversíveis do DNA (Pietenpol & Stewart, 2002). Se o gene *p53* se encontra mutado, a supressão tumoral fica drasticamente reduzida. Diversos fatores poderão induzir mutações no gene *p53*, nomeadamente radiações, químicos ou vírus, como o papilomavírus humano. (HPV). Indivíduos que herdam apenas 1 cópia funcional deste gene terão maior probabilidade de desenvolver a Síndrome de Li-Fraumeni, caracterizada pelo desenvolvimento de tumores em idades precoces (Evans & Lozano, 1997; Palmero *et al.*, 2010).

O gene mutado da ataxia-telangiectasia também está implicado no processo de tumorigénese através da via de sinalização ATM/*p53*. O gene *ATM* codifica uma proteína cinase que atua como um supressor tumoral. A ativação do *ATM*, através de lesão do DNA induzida por radiação ionizante, estimula a reparação do DNA e bloqueia a progressão da célula ao longo do ciclo celular, um processo relacionado com a fosforilação de P53 dependente de *ATM* (Kurz & Lees-Miller, 2004).

A P53 bloqueia o crescimento da célula num ponto crucial para permitir a reparação de lesões do DNA ou desencadear a apoptose se estas lesões são irreversíveis. Este sistema pode também ser inativado por diversos mecanismos que incluem alterações genéticas/epigenéticas e expressão de proteínas oncogénicas virais, como o vírus do papiloma humano, conduzindo à tumorigénese. Outras vias de sinalização celular podem estar envolvidas no desenvolvimento de tumores. Por exemplo, a estimulação da via fosfatidilinositol 3-cinase/AKT nas células tumorais torna-as independentes dos sinais de sobrevivência, contribuindo para o aparecimento de neoplasias. Esta via regula ainda outros processos celulares, como a proliferação, o crescimento e o rearranjo do citoesqueleto (Vivanco & Sawyers, 2002).

### **A inibição da apoptose**

As proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) representam, provavelmente, os principais reguladores da apoptose pelo facto de regularem simultaneamente as vias intrínseca e extrínseca (Deveraux & Reed, 1999). Apesar de terem sido identificadas diversas proteínas IAPs, existem duas que se destacam: a XIAP (*X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein*) e a survivina (Silke *et al.*, 2002). A proteína XIAP liga-se seletivamente e inibe as caspases 3, 7 e 9, (mas não a caspase 8), assim com a proteína mitocondrial smac/DIABLO. Assim, como inibidor de uma parte substancial da apoptose, representa um alvo terapêutico atrativo no tratamento de neoplasias malignas. Os oligonucleótidos antisense dirigidos contra a

proteína XIAP revelaram eficácia *in vitro* e encontram-se atualmente a ser avaliados em ensaios clínicos. (Schimmer *et al.*, 2006; Flanagan *et al.*, 2010). A survivina é uma proteína bifuncional que atua como supressora da apoptose e desempenha um papel central também na divisão celular. Esta proteína encontra-se altamente expressa na maioria das neoplasias humanas e está envolvida na resistência das células tumorais à terapêutica antineoplásica e à radiação ionizante. Deste modo, tem sido considerada, tal como a proteína XIAP, um alvo terapêutico em diversos tumores. Encontram-se em avaliação em ensaios clínicos diversos inibidores da survivina (Pennati *et al.*, 2007; Li, 2005).

Outras proteínas envolvidas na apoptose incluem a proteína ICE (interleukin-1beta converting enzyme), uma cisteína protease responsável pela ativação proteolítica do precursor biologicamente inativo da Interleucina-1beta na citocina pró-inflamatória. As proteases ICE e suas homólogas parecem igualmente mediar a degradação proteica intracelular durante a apoptose. A inibição da ICE constitui uma estratégia anti-inflamatória que se encontra a ser avaliada por inibidores reversíveis e inativadores irreversíveis (Livingston, 1997).

A proteína PARP-1 desempenha funções simultaneamente relacionadas com a reparação do DNA e com a apoptose, sendo considerada um excelente alvo terapêutico contra o cancro. De facto, estudos clínicos demonstraram a suscetibilidade das células tumorais aos inibidores PARP-1 (Cepedaa *et al.*, 2006). Os inibidores PARP que competem com o NAD<sup>+</sup> no local ativo da enzima altamente conservado surgiram como estratégias terapêuticas potenciais de quimio e radiopotenciação, assim como no tratamento de neoplasias com defeitos específicos na reparação do DNA, como terapêutica isolada (Yelamos *et al.*, 2011).

Muitos foram os alvos terapêuticos potenciais encontrados no complexo processo de apoptose, até ao presente. À medida que a complexidade molecular e bioquímica deste processo vai sendo elucidada, muitas outras estratégias terapêuticas poderão vir a ser conhecidas e adotadas como armas eficazes no combate ao cancro.

O desequilíbrio nos níveis de expressão de diversos membros da família de proteínas BCL-2 associa-se a anomalias na apoptose, que resultam num aumento da agressividade dos tumores e na quimioresistência. (Lowe & Lin, 2000). O padrão de expressão dos genes pró-apoptóticos e antiapoptóticos da família Bcl-2 tem sido alvo de múltiplos estudos, nos quais os investigadores demonstraram que níveis aumentados de expressão de BCL-2, BCL-XL e MCL-1 estão associados à sobrevivência aumentada das células de MM, assim como à resistência aos agentes anti-neoplásicos. (Oancea *et al.*, 2004). (Tu *et al.*, 1998; Catlett-Falcone *et al.*, 1999a; Zhang *et al.*, 2002). Por outro lado, foram observados níveis de expressão reduzidos

de BAX no MM (Spets *et al.*, 2002). Foi ainda demonstrado em modelos murinos que a proteína BCL-XL pode contribuir para o desenvolvimento de plasmocitomas (Linden *et al.*, 2004). A expressão de Bcl-XL foi igualmente associada à resistência a fármacos no MM (Bharti *et al.*, 2004).

A hiperexpressão de genes antiapoptóticos foi associada a resistência a diversos agentes antineoplásicos. A expressão aumentada destas proteínas após a exposição de linhas celulares de MM a quimioterapia sugeriu que estes fármacos pudessem contribuir para a quimioresistência adquirida. Assim, a regulação das proteínas antiapoptóticas pode representar uma estratégia importante para a sensibilização das células de MM para vários agentes terapêuticos (Oancea *et al.*, 2004).

O tratamento isolado com oligonucleótidos *antisense* anti-BCL-2 sensibilizava as linhas celulares de MM à dexametasona, enquanto o *antisense* anti-BCL-XL em combinação com a dexametasona não apresentava qualquer efeito (Derenne *et al.*, 2002). O pré-tratamento com anti-BCL-2 *antisense* em doses clinicamente relevantes potenciava a apoptose induzida por dexametasona e por paclitaxel em células de MM resistentes, isoladas a fresco (Liu & Gazitt, 2003). O agente *antisense* anti-BCL-2 mostrou também eficácia em doentes tratados com vincristina e com adriamicina, assim como nos refratários à dexametasona (van de Donk *et al.*, 2003, 2004).

## 1.5. Diagnóstico e estadiamento

### 1.5.1. Diagnóstico clínico-laboratorial

Os critérios de diagnóstico de MGUS, MMI e MM foram recentemente revistos pelo IMWG e encontram-se descritos na [tabela 3](#) (International Myeloma Working Group, 2014).

O diagnóstico de MM deve incluir uma história clínica detalhada com exame objetivo minucioso, exames laboratoriais e imagiológicos.

As principais manifestações clínicas no MM incluem a dor óssea (relacionada com as lesões líticas, as fraturas patológicas ou a osteopenia grave) em cerca de 80% dos doentes ao diagnóstico, os sintomas relacionados com anemia (72% dos doentes), hipercalcémia (13%), insuficiência renal (19%) (critérios CRAB), assim como um risco acrescido de infeções, associado à imunoparésia (Kyle & Rajkumar, 2009a).

A anemia relaciona-se com a infiltração da medula óssea, com a disfunção renal e/ou com a hemodiluição associada à hiperproteinemia. A insuficiência renal resulta maioritariamente da lesão tubular direta provocada pela eliminação excessiva de proteínas, da desidratação, da hipercalcemia e do uso de fármacos nefrotóxicos. Aproximadamente 6-20% dos doentes com MM apresenta-se com doença extra-medular ao diagnóstico (Short *et al.*, 2011; Weinstock & Ghobrial, 2013).

**Critérios de diagnóstico de gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) não-IgM, IgM e de cadeias leves, mieloma múltiplo indolente e mieloma múltiplo sintomático, de acordo com o IMWG**

**TABELA 3**

	Definição
MGUS não-IgM	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Proteína monoclonal sérica (não-IgM) &lt; 30g/L</li> <li>– Plasmocitose medular clonal &lt; 10%</li> <li>– Ausência de lesão orgânica terminal, como hipercalcemia, lesão renal, anemia e lesões ósseas (critérios CRAB) ou amiloidose que possa ser atribuída ao distúrbio proliferativo plasmocitário</li> </ul>
MGUS IgM	<ul style="list-style-type: none"> <li>– IgM sérica &lt; 30g/L</li> <li>– Infiltração linfoplasmocitário medular &lt; 10%</li> <li>– Sem evidência de anemia, sintomas constitucionais, hiperviscosidade, linfadenopatia, hepatoesplenomegália ou outra lesão orgânica que possa ser atribuída à patologia linfoproliferativa subjacente</li> </ul>
MGUS de cadeias leves	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Razão cadeias leves livres (k/λ) anormal (&lt;0,26 ou &gt;1,65)</li> <li>– Ausência de expressão de cadeias pesadas de imunoglobulinas na imunofixação</li> <li>– Ausência de critérios CRAB ou amiloidose</li> <li>– Plasmocitose clonal medular &lt; 10%</li> <li>– Proteína monoclonal urinária &lt; 500mg/24h</li> </ul>
Mieloma Múltiplo Indolente	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Proteína monoclonal sérica (IgG ou IgA) ≥ 30g/L ou proteína monoclonal urinária &gt; 500mg nas 24h e/ou plasmocitose medular clonal entre 10 e 60%</li> <li>– Ausência de eventos definidores de mieloma ou amiloidose</li> </ul>
Mieloma Múltiplo Sintomático	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Plasmocitose medular clonal &gt; 10% ou plasmocitoma extra-medular e, pelo menos, um dos seguintes eventos definidores de mieloma: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evidência de lesão orgânica terminal atribuível à proliferação plasmocitária (critérios CRAB)</li> <li>• ≥ 1 dos seguintes biomarcadores de malignidade: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plasmocitose clonal medular ≥ 60%</li> <li>- Razão cadeias leves livres séricas envolvidas/não envolvidas ≥ 100</li> <li>- &gt; 1 lesão focal na RMN</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>

(Adaptado de *International Myeloma Working Group*, 2014).

Os estudos laboratoriais séricos devem englobar: hemograma, creatinina, cálcio, potássio, proteínas totais, albumina, lactato desidrogenase, eletroforese das proteínas séricas com doseamentos de imunoglobulinas e quantificação do componente monoclonal, imunofixação, determinação da β2-microglobulina e urinários (quantificação das proteinúria de Bence-Jones e imunofixação). A avaliação das cadeias leves livres por nefelometria está recomendada para todos os doentes com o diagnóstico de discrasias plasmocitárias *de novo* (Dispenzieri *et al.*, 2009; Kyle & Rajkumar, 2009a; International Myeloma Working Group, 2014). A quantificação das cadeias leves livres no soro é particularmente importante em doentes com MM não secretor (imunofixação sérica e urinária negativas; representam cerca de 3% dos MM)

e em doentes que secretam quantidades reduzidas de proteína monoclonal no soro e/ou na urina (mieloma oligossecretor), assim como nos mielomas de cadeias leves (Drayson *et al.*, 2001; Shaw, 2006). A determinação das cadeias leves livres pode ser útil também em doentes com plasmocitoma solitário ou MMI, uma vez que um valor anormal se encontra associado a um risco acrescido de progressão para MM (Dingli *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2012). Nos doentes com MGUS, é também recomendada a análise das cadeias leves livres séricas.

O aspirado de medula óssea e/ou a biópsia medular óssea são necessários para demonstrar clonalidade nos plasmócitos. Na medula óssea, devem ser realizados, para além dos estudos morfológico e imunofenotípico, a análise citogenética por FISH (pesquisa das alterações citogenéticas com impacto prognóstico no MM, como a del13/del13q, a t(4;14), a t(11;14), a del17p, a t(14;16) e as anomalias do cromossoma 1). Alguns autores continuam a referir que a análise citogenética pode ser realizada com recurso à análise de metafases. (Rajkumar *et al.*, 2014).

A radiografia do esqueleto permanece o exame de referência na avaliação das lesões ósseas no contexto do MM. No entanto, as áreas sintomáticas que não apresentam alterações na radiografia do esqueleto ou as zonas suspeitas que necessitem de ser clarificadas devem ser avaliadas por técnicas de imagem mais sensíveis, como a tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética nuclear (RMN), a tomografia por emissão de positrões (PET) e a PET-CT. O IMWG recomenda que uma destas técnicas mais sensíveis seja usada na avaliação diagnóstica de doentes com MMI e plasmocitoma solitário (Kyle *et al.*, 2010). A TC e a RMN são igualmente sensíveis. A RMN é o exame de eleição na suspeita de compressão medular. A PET deve ser realizada na suspeita de doença extramedular e para confirmação de plasmocitoma solitário.

Nos critérios de 2003 do IMWG, a lesão terminal de órgão (critérios CRAB) incluiu a presença de hipercalemia (cálcio sérico superior a 11,5 mg/dL), insuficiência renal com creatinina superior a 1,95 mg/dL, sem outra etiologia, anemia (hemoglobina < 10g/dL) e lesões ósseas a nível do esqueleto (lesões líticas na radiografia do esqueleto, osteoporose com fraturas patológicas ou compressão medular) e critérios adicionais de infeções bacterianas recorrentes (dois em 12 meses), amiloidose ou hiperviscosidade sintomática. Na atualização de 2010, os critérios CRAB foram revistos e as alterações registadas foram as seguintes: creatinina sérica superior a 2 mg/dL ou clearance de creatinina estimada inferior a 40 mL/min, anemia normocítica e normocrómica com hemoglobina inferior a 10 g/dL ou 2 g/dL abaixo do limite inferior do normal e lesões ósseas (lesões líticas, osteopenia grave ou fraturas patológicas) (Kyle & Rajkumar, 2009a). Em 2014, o IMWG reviu novamente os critérios de MM e incluiu, para além dos supracitados e como eventos definidores de MM, pelo menos um dos seguintes: percentagem de plasmócitos clonais na medula óssea superior

ou igual a 60% (a clonalidade deve ser estabelecida por restrição de cadeias leves  $\kappa/\lambda$  por imunohistoquímica ou imunofluorescência ou ainda pela demonstração de clonalidade fenotípica por citometria de fluxo; em caso de disparidade no valor da plasmocitose medular entre o aspirado e a biópsia medular óssea, deve ser considerado o valor mais elevado), razão entre as cadeias leves livres séricas envolvidas/não envolvidas superior ou igual a 100 (este valor é baseado na análise sérica *Freelite*, *The Binding Site Group, Birmingham, UK*) e duas ou mais lesões focais na RMN (cada lesão deve ter, no mínimo, um tamanho de 5 mm) (International Myeloma Working Group, 2014). Relativamente ao MMI, os critérios foram igualmente atualizados, passando a considerar-se, uma quantidade de proteína monoclonal sérica (IgG ou IgA) superior a 3 g/dL ou de proteína monoclonal urinária superior ou igual a 500 mg/24h e/ou uma percentagem de plasmócitos monoclonais medulares compreendida entre 10 e 60%, na ausência de eventos definidores de MM (*International Myeloma Working Group, 2014*) (Tabela 3).

A atualização dos critérios de MM de 2014 (International Myeloma Working Group, 2014) retirou a necessidade de demonstração de lesão orgânica terminal como mandatória para a definição de mieloma múltiplo sintomático, passando a incluir os doentes com um risco muito elevado de desenvolverem lesão terminal antes que esta se manifeste clinicamente. Foram identificados alguns marcadores que parecem promissores na estratificação do risco de progressão. A citometria de fluxo é fundamental para distinguir plasmócitos clonais de plasmócitos normais. Nos doentes com MGUS, uma proporção significativa de plasmócitos policlonais persiste, enquanto no MM a maioria (> 95%) são clonais (Pérez-Persona *et al.*, 2010). Os doentes com MMI que apresentam um padrão imunofenotípico idêntico ao do MM têm maior risco de progressão (Mateos *et al.*, 2013a). Os níveis elevados de plasmócitos circulantes, assim como um elevado índice proliferativo identificam também um risco acrescido de progressão. Contudo, não estão ainda padronizados os métodos da citometria de fluxo multiparamétrica para aplicação na prática clínica (Bianchi *et al.*, 2012). As anomalias citogenéticas específicas, nomeadamente a  $t(4;14)$ , os ganhos 1q e a del17p foram também associadas a um risco aumentado de progressão no MMI; contudo necessitam de ser combinadas com outros biomarcadores conhecidos para melhorar o seu valor preditivo (Neben *et al.*, 2013; Rajkumar *et al.*, 2013).

Ainda que a MGUS seja geralmente referida na literatura como uma entidade única, encontram-se descritos atualmente dois subtipos: linfoide (ou linfoplasmocitóide) e plasmocitária (Korde *et al.*, 2011). Em cerca de 15-20% dos casos de MGUS, ocorre secreção de IgM, a maioria tem um fenótipo linfoide ou linfoplasmocitóide e poderá evoluir para macroglobulinémia de Waldenström; em raros casos, a evolução poderá ser para MM (Kyle *et al.*, 2009) (Turesson *et al.*, 2014). Pelo contrário, a maioria dos doentes com MGUS não-IgM apresenta um fenótipo de células plasmocitárias



e o subtipo IgG é o mais frequente (cerca de 60%), seguido dos subtipos IgA e de cadeias leves. Os casos de MGUS IgD e IgE são excepcionais (Landgren, 2013). Da mesma forma, no MM, o subtipo IgG é o mais frequente (52% dos casos), seguido do subtipo IgA (21%) e de cadeias leves (16%) (Kyle & Rajkumar, 2009a)

### 1.5.2. Estadiamento do mieloma múltiplo sintomático

Os atuais critérios de estadiamento do MM, estabelecidos de acordo com o *International Staging System* (ISS) baseiam-se no doseamento dos níveis séricos de albumina e de  $\beta_2$ -microglobulina, com individualização de três estádios, que correspondem a três grupos de risco, com prognósticos distintos (Greipp *et al.*, 2005a) (Tabela 4).

**TABELA 4**

**Estadiamento do mieloma múltiplo sintomático de acordo com o *International Staging System* (ISS) e associação com a sobrevivência global mediana**

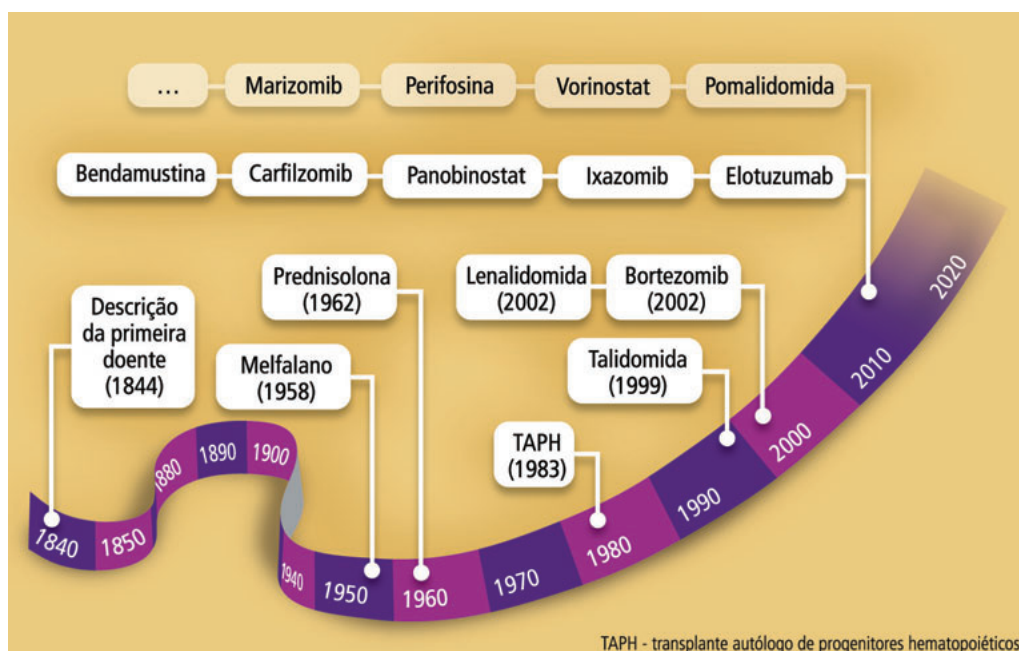
Estádio do mieloma múltiplo	Critérios	Prognóstico (sobrevivência global mediana)
Estádio I	$\beta_2M < 3,5$ mg/L e albumina $\geq 3,5$ g/dL	62 meses
Estádio II	Sem critérios para estágio I ou II	44 meses
Estádio III	$\beta_2M \geq 5,5$ mg/L	29 meses

$\beta_2M$  –  $\beta_2$ -microglobulina.

## 1.6. Tratamento do mieloma múltiplo e avaliação de resposta

Longo e lento foi o caminho percorrido ao longo da evolução terapêutica do MM. Do ruibarbo ao uretano, passando pelas flebotomias, foi necessário esperar mais de 100 anos desde a descrição do primeiro caso de MM até que surgisse uma terapêutica com eficácia clara e vantagem demonstrada na sobrevivência global dos doentes com MM, a associação melfalano e prednisolona (MP), na década de 1960. Após a introdução desta terapêutica, a única inovação relevante nos 30 anos subsequentes foi o melfalano em alta dose seguido do transplante autólogo de progenitores hematopoiéticos para os doentes mais jovens (idade inferior a 65 anos), permanecendo o protocolo MP o tratamento de referência para os

mais idosos. Em contraposição a este cenário, a partir do ano 2000, a revolução no tratamento do MM foi possível com a disponibilidade de novos agentes, com mecanismos de ação distintos: os imunomoduladores talidomida e lenalidomida e o inibidor do proteasoma bortezomib (Stewart *et al.*, 2009) entre muitos outros novos fármacos (Figura 13).



Evolução no tratamento do mieloma múltiplo.

FIGURA 13

O MM deve ser tratado de imediato, enquanto o MMI requer apenas vigilância clínica e analítica, uma vez que não está ainda demonstrado o benefício da terapêutica precoce (Ghobrial & Landgren, 2014). Estão a decorrer ensaios clínicos com o objetivo de avaliar o efeito de fármacos imunomoduladores no adiamento da progressão de MM indolente para sintomático. Com efeito, o grupo espanhol de mieloma (GEM) conduziu um ensaio clínico randomizado de fase III em doentes com MMI com alto risco de progressão para MM, com o intuito de comparar uma estratégia de tratamento precoce com lenalidomida e dexametasona *versus* observação. Os resultados mostraram um atraso significativo na progressão para MM nos doentes sob terapêutica, associado a um benefício na sobrevivência livre de progressão ( $p < 0,001$ ) e na sobrevivência global ( $p = 0,03$ ) (Mateos *et al.*, 2013b).

A definição da estratégia de tratamento tem por base a idade do doente, o estado geral (*fit vs frail*) e as comorbilidades. Os dados atuais apoiam uma combinação de três fármacos (bortezomib, um agente alquilante ou um imunomodulador

e um corticoesteróide) como terapêutica de 1.<sup>a</sup> linha, uma vez que é a estratégia associada a melhores taxas de resposta. Nos doentes com mau *performance status*, uma combinação de dois fármacos (ex. agente alquilante/imunomodulador±corticoesteróide, entre outras) poderá ser a terapêutica de eleição. Nos doentes com idade inferior a 65 a 70 anos, com boa resposta à terapêutica de indução e sem comorbilidades que o contraindiquem, devem realizar terapêutica de consolidação com quimioterapia em dose alta (geralmente melfalano 200 mg/m<sup>2</sup>), seguida de transplante autólogo de progenitores hematopoiéticos. Após a quimioterapia de dose alta, podem ser consideradas outras terapêuticas de consolidação e/ou manutenção, que incluem regimes com bortezomib, talidomida ou lenalidomida. Os doentes não candidatos a transplante autólogo de progenitores hematopoiéticos (idade geralmente superior a 70 anos ou contraindicação para quimioterapia em dose alta) podem realizar terapêutica de manutenção com fármacos imunomoduladores (ex. lenalidomida) ou bortezomib (Engelhardt *et al.*, 2014; Ludwig *et al.*, 2012; Palumbo *et al.*, 2014a; Palumbo *et al.*, 2014b). A qualidade de resposta alcançada com a estratégia terapêutica selecionada correlaciona-se com o prognóstico, que é significativamente mais favorável se alcançada uma resposta completa (Kapoor *et al.*, 2013).

A radioterapia desempenha um papel fundamental no tratamento de áreas localizadas de destruição óssea, de doença extramedular (plasmocitomas) ou no controlo da dor. Os procedimentos cirúrgicos, como a vertebroplastia ou a cifoplastia, devem ser considerados sempre que as lesões líticas localizadas a nível da coluna vertebral apresentem risco de compressão ou de fratura iminentes. Os tratamentos de suporte apresentam uma importância crucial na abordagem do doente com MM, com impacto na qualidade de vida nomeadamente os analgésicos para o controlo da dor, os fármacos dirigidos aos eventos ósseos (bifosfonatos, vitamina D, cálcio, denosumab), os estimulantes da eritropoiese, as profilaxias antibiótica, antivírica e antitrombótica, a transfusão com concentrados eritrocitários/plaquetares, a hemodiálise ou a plasmaférese (Ludwig *et al.*, 2013).

O transplante alogénico de progenitores hematopoiéticos, apesar de ser uma terapêutica potencialmente curativa, a sua utilização no MM permanece controversa devido à elevada taxa de mortalidade relacionada com o transplante, pelo que deve ser realizada no contexto de ensaios clínicos (Nishihori & Alsina, 2011).

### **- Importância do bortezomib no tratamento do mieloma múltiplo**

O bortezomib é um ácido borónico dipeptídico modificado, derivado dos aminoácidos leucina e fenilalanina e formulado como um éster de manitol. Este fármaco inibe a função do proteasoma 26S ao ligar-se, estreitamente e de forma reversível, a um resíduo de treonina no local com atividade de tipo quimotripsina do

complexo enzimático do proteasoma. Esta atividade é suficiente para bloquear todas as restantes atividades catalíticas do proteasoma (atividades de tipo tripsina e pós-glutamil).

Estudos pré-clínicos demonstraram que o bortezomib, quando aplicado a um painel de 60 linhas celulares do *National Cancer Institute* (NCI), inibia de forma potente o crescimento de diversos tipos de tumores, induzindo uma inibição média do crescimento de 50% ( $IC_{50}$  - *inhibitory concentration*), para uma concentração de 7 nM, confirmando-se igualmente a inibição do alvo biológico pretendido. O bortezomib afetou o desenvolvimento de tumores numa grande variedade de modelos de xenotransplante (Hideshima & Anderson, 2002), com melhoria da sobrevivência global (LeBlanc *et al.*, 2002), em particular em ratos xenotransplantados com linhas celulares de MM humano, com cancro prostático humano, carcinoma do pulmão murino e carcinomas do cólon e mama humanos (Hideshima & Anderson, 2002). Nestes estudos, a eficácia do bortezomib em monoterapia foi dependente da dose, sendo mais eficaz quando administrado em dose idêntica ou próxima da dose máxima tolerada, aproximadamente igual a 3 mg/m<sup>2</sup>. Foi desenvolvido um ensaio farmacodinâmico fluorogénico para avaliar as atividades relativas quimotriptica e tríptica do proteasoma em células mononucleares do sangue periférico (Lightcap *et al.*, 2000). Este ensaio demonstrou que a inibição da atividade quimotripsina-like do proteasoma 26S, mediada pelo bortezomib, era dependente da dose e reversível, o que contribuiu para orientar e otimizar o escalonamento da dose nos estudos de fase I. Estudos adicionais utilizando linhas celulares de MM e culturas primárias com esta patologia confirmaram que o bortezomib conduzia, não só a inibição do crescimento tumoral, mas também induzia apoptose destas células e ultrapassava a resistência das mesmas a outros fármacos (Hideshima *et al.*, 2001c).

Apesar dos estudos farmacodinâmicos identificarem e confirmarem o proteasoma como o alvo biológico da terapêutica com bortezomib, o exato mecanismo de ação deste fármaco e todo o potencial terapêutico da inibição do proteasoma não estão, ainda, completamente elucidados. As investigações com vista à compreensão destes mecanismos estiveram centradas no papel exato do fator de transcrição NF- $\kappa$ B; na interação do fator pró-apoptótico NOXA e do oncogene *c-MYC* e, finalmente, na proteína 1 que liga o fator de transcrição *X-BOX binding protein 1* (XBP-1). O foco inicial foi no impacto do bortezomib na inibição do NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição que promove a proliferação e a sobrevivência da célula tumoral, como mencionado. A proteína inibidora I $\kappa$ B liga-se ao NF- $\kappa$ B no citoplasma, tornando-o inativo. Uma variedade de citocinas e outros estímulos celulares conduzem à fosforilação e ubiquitinação do I $\kappa$ B pela ligase E3, direcionando-o para o proteasoma, onde é degradado (Orlowski *et al.*, 2002). O bortezomib, bloqueando este último processo, tem como consequência uma disponibilidade aumentada do I $\kappa$ B

para inibir o NF- $\kappa$ B, o que resulta na inibição do crescimento da célula tumoral (Mulligan *et al.*, 2007).

Estudos conduzidos por Hideshima e colaboradores (2003) revelaram que a ativação do bortezomib era dependente da ativação da cinase NH<sub>2</sub>-terminal c-Jun (JNK) e, subsequentemente, das caspases 8 e 3, induzindo lesão do DNA e apoptose. Simultaneamente, foi observado que o bortezomib se associava a um aumento da expressão da proteína P53 (Hideshima *et al.*, 2003). Estudos mais recentes vieram demonstrar que a atividade anti-MM do bortezomib era independente da proteína P53 e surgiram dúvidas se as alterações observadas no NF- $\kappa$ B ou no JNK seriam uma causa ou uma consequência do processo de morte celular (Qin *et al.*, 2005).

Quando as linhas celulares de mieloma múltiplo são expostas ao bortezomib, o fator pró-apoptótico NOXA é induzido de forma dependente da concentração e acompanhado por uma ativação das caspases. O NOXA é igualmente induzido pela proteína P53 e por outros fatores de transcrição, como o fator 1 induzido por hipóxia (HIF-1) e o E2F-1, consistente com o seu envolvimento na resposta a muitos tipos de stresse celular. O NOXA humano contém o domínio BH3 (homologia 3 do BCL-2), que apresenta uma elevada afinidade pelo fator antiapoptótico MCL-1. Como este fator é um alvo para a ubiquitinação, a inibição do proteasoma conduz ao aumento dos níveis de MCL-1. A indução do NOXA é, assim, essencial, para ultrapassar os elevados níveis de MCL-1 e permitir a ativação da maquinaria apoptótica em resposta ao bortezomib (Nikiforov *et al.*, 2007). A interação do NOXA com membros antiapoptóticos da família BCL-2 conduz a libertação do citocromo c para o citosol, o que desencadeia a ativação das caspases e a indução da apoptose.

Outro aspeto relevante no mecanismo de ação do bortezomib é o facto da estimulação da apoptose/NOXA não ser induzida por agentes quimioterápicos convencionais e ser induzida por outros inibidores do proteasoma, como o MG132 (um péptido aldeído que bloqueia a atividade do proteasoma 26S), sugerindo um possível efeito específico desta classe de fármacos (Jullig *et al.*, 2006).

Por outro lado, o oncogene *c-MYC* surgiu como um candidato mediador de especificidade tumoral. De facto, quando os níveis de *c-MYC* estão diminuídos por RNA de interferência, a indução do NOXA específica da célula tumoral está abolida. O *c-MYC* exógeno também aumenta a sensibilidade das células não malignas à inibição do proteasoma pelo bortezomib (Nikiforov *et al.*, 2007). A interação entre o NOXA e o *c-MYC* concede também um possível racional para os resultados clínicos observados quando os inibidores das histonas desacetilases (HDAC) se combinam com o bortezomib. A atividade transcripcional do *c-MYC* no promotor NOXA pode ser favorecida por proteínas modificadoras ou remodeladoras da cromatina (incluindo as histonas acetiltransferases, com a histona H3 acetilada a ser o cofactor clássico

para o *c-MYC* (Nikiforov *et al.*, 2007). Considera-se que a inibição das HDAC possa interferir com a orientação das proteínas ubiquitinadas através do agrosoma para eventual autofagia/degradação pelo lisosoma, uma via alternativa à degradação mediada pelo proteasoma (Hideshima *et al.*, 2005).

Um outro mecanismo possivelmente implicado na especificidade do bortezomib para as células de mieloma é baseado na *unfolded protein response* (UPR). Os plasmócitos possuem um retículo endoplasmático rugoso e proteínas *chaperone* altamente desenvolvidos que permitem a produção de grande quantidade de anticorpos por segundo. Se se acumulam proteínas disfuncionais no retículo endoplasmático, a via de sinalização UPR é ativada através de um mecanismo sensor, o IRE1 $\alpha$  (Davenport *et al.*, 2007). A cinase IRE1, por sua vez, conduz à remoção de um *intron* a partir do fator de transcrição XBP-1, o que resulta numa forma ativada deste fator (Lee *et al.*, 2003). Curiosamente, o XBP-1 é altamente expresso nos plasmócitos e é um pré-requisito para a transformação de célula B (*antigen selected B cell*) em plasmócito. Uma vez ativada a UPR, as proteínas *unfolded* sofrem alterações conformacionais através do aumento da expressão das moléculas *chaperone* ou são destruídas através de proteasomas 26S citosólicos. Por outro lado, a acumulação de proteínas *unfolded* resulta na apoptose da célula. A inibição do proteasoma desencadeia a apoptose, interferindo com a via UPR, assim como prevenindo a destruição de proteínas *misfolded* (Obeng *et al.*, 2006).

Os critérios atualmente utilizados para a avaliação de resposta à terapêutica nos doentes com MM foram definidos pelo IMWG e incluem as seguintes categorias (Rajkumar *et al.*, 2011):

- A resposta parcial (PR) foi definida como redução  $\geq 50\%$  da proteína monoclonal sérica e redução da proteína monoclonal urinária (24 horas)  $\geq 90\%$  ou  $< 200$  mg em 24 horas. Se proteína monoclonal sérica e urinária não mensuráveis redução  $\geq 50\%$  na diferença entre cadeias leves livres envolvidas/não envolvidas; se proteína monoclonal sérica, urinária e cadeias leves livres não mensuráveis redução  $\geq 50\%$  na plasmocitose medular (se plasmocitose medular  $\geq 30\%$ ); se presentes ao diagnóstico, redução  $\geq 50\%$  nos plasmocitomas;
- A muito boa resposta parcial (VGPR) foi definida como proteína monoclonal sérica de urinária detetável por imunofixação mas não na electroforese ou redução  $\geq 90\%$  na proteína monoclonal sérica e nível de proteína monoclonal urinária  $< 100$  mg nas 24 horas;
- A resposta completa (CR) foi descrita como ausência de imunofixação sérica e urinária e desaparecimento de qualquer plasmocitoma e plasmocitose medular  $\leq 5\%$ ;
- A resposta completa estrita (sCR) inclui os critérios da CR mais rácio de cadeias leves livres normal e ausência de plasmócitos clonais por imunohistoquímica ou por citometria de fluxo de 2 a 4 cores;

- A CR imunofenotípica inclui os critérios da sCR mais ausência de plasmócitos clonais na medula óssea com o mínimo de um milhão de células medulares analisadas por citometria de fluxo multiparamétrica (com mais de 4 cores);
- A CR molecular abrange os critérios de CR mais *allele-specific polymerase chain reaction*.

O MM é uma patologia reconhecidamente heterogênea na resposta à terapêutica. As análises citogenéticas e os estudos do perfil de expressão gênica já evidenciaram a heterogeneidade das células do MM em diversos estudos (Mulligan *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2007; Annunziata *et al.*, 2007; Keats *et al.*, 2007; Kyle & Rajkumar, 2008b); ficou ainda por demonstrar quanta dessa complexidade é devida a diferenças nas interações entre os plasmócitos malignos e as BMSC *in vivo*. A atividade do NF- $\kappa$ B no MM é dependente do microambiente da medula óssea; se a ativação NF- $\kappa$ B nas células de MM e as interações com o microambiente são efetivamente alteradas pelo inibidor do proteasoma bortezomib ainda não está inteiramente esclarecido. Foi previamente demonstrado que as BMSCs provenientes de doentes com MM induziam a atividade NF- $\kappa$ B em algumas células de MM e que esta ativação era largamente resistente ao bortezomib, conferindo resistência à apoptose induzida por este fármaco (Markovina *et al.*, 2008). Foi, posteriormente, demonstrado pelos mesmos autores que as BMSCs provenientes de doente com MM eram funcionalmente diferentes das BMSCs de doentes sem esta patologia na sua capacidade de induzir atividade NF- $\kappa$ B resistente ao bortezomib nas células de MM (Markovina *et al.*, 2010).

## **1.7. Mecanismos de resistência à terapêutica no mieloma múltiplo**

### **1.7.1. Conceitos gerais**

A refratariedade à terapêutica constitui um dos principais obstáculos ao sucesso do tratamento dos tumores malignos, em geral, e do MM, em particular, agravando significativamente o prognóstico dos doentes (Ullah, 2008; Zahreddine & Borden, 2013). Nas últimas décadas, múltiplos mecanismos foram estudados e propostos para explicar esta resistência aos fármacos, nomeadamente, o bloqueio de entrada do fármaco na célula, a extrusão deste logo após a sua entrada; a sua inativação



enzimática *in vivo*, a ocorrência de mutações ou alterações na expressão dos alvos, anomalias nos mecanismos de apoptose e do stresse oxidativo, senescência e reparação do DNA (Higgins, 2007a; Gillet & Gottesman, 2010). Em termos básicos, os tumores são constituídos por uma população heterogênea de células clonais com distintos níveis de sensibilidade à terapêutica. Algumas destas células podem ser rapidamente eliminadas pelo fármaco, enquanto outras se apresentam resistentes *ab initio* (resistência inata ou intrínseca) ou desenvolvem resistências no decurso da terapêutica (resistência adquirida). Em alguns casos, as células tumorais podem tornar-se resistentes a um fármaco e esta resistência ser ultrapassada por uma combinação de fármacos estrutural e funcionalmente diferentes (Ullah, 2008; Gillet & Gottesman, 2010; Lage, 2008) Contudo, as células tumorais podem desenvolver mecanismos de resistência cruzada a vários fármacos, o que conduz a uma situação designada como *multidrug resistance* (MDR). O principal mecanismo que controla esta resistência a múltiplos fármacos é a hiperexpressão de uma bomba de efluxo dependente de ATP, designada glicoproteína P (GlicP ou gp-P) (Higgins, 2007a; Choi, 2005). Esta proteína com 170 KD é codificada pelo gene *MDR1* e foi o primeiro membro conhecido da superfamília de transportadores ABC (ATP-binding cassette). Nas células tumorais com fenótipo MDR, a GlicP encontra-se hiperexpressa e o fármaco é rapidamente direcionado para o exterior da célula, reduzindo a sua concentração intracelular para níveis que o tornam ineficaz (Higgins, 2007a; Wu *et al.*, 2013).

Outros membros da superfamília de transportadores incluem a multidrug resistance protein-1 (MRP-1), a lung resistance related protein (LRP) e a breast cancer resistance protein (BCRP). Nas células que expressam *MDR*, são evidentes alterações noutros mecanismos que controlam a acumulação de fármacos a nível intracelular como, por exemplo, os defeitos nos lípidos que constituem a membrana celular, como as ceramidas, que limitam a captação e aumentam o efluxo do fármaco (Liu *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2008). Como consequência da expressão de *MDR*, ocorre inibição da apoptose (que é um alvo da maioria dos fármacos antineoplásicos), limitação dos processos de reparação de DNA e alterações dos mecanismos de controlo do ciclo celular. As mutações nos genes que codificam transportadores e recetores de fármacos podem igualmente contribuir para o fenótipo *MDR* (Higgins, 2007b; Choi, 2005).

### **1.7.2. Resistência aos fármacos no mieloma múltiplo**

Apesar de dispormos de regimes terapêuticos cada vez mais eficazes no MM, os mecanismos de resistência desenvolvem-se com frequência, não só aos fármacos utilizados na quimioterapia convencional, como aos novos fármacos dirigidos a alvos

moleculares, de que é exemplo o bortezomib. Alguns doentes podem ser intrinsecamente resistentes ao bortezomib ou desenvolver resistência ao longo do tratamento. Apesar dos mecanismos de resistência ao bortezomib não serem totalmente conhecidos, a mutação na subunidade  $\beta 5$  do proteasoma, as alterações nas vias de sobrevivência, de resposta ao stresse e antiapoptóticas parecem estar envolvidas. Apesar de numerosos estudos, desconhecemos por que motivo os doentes com MM recidivam e se tornam refratários às terapêuticas (Abdi *et al.*, 2013b).

O MM é universalmente reconhecido com apresentando um elevado nível de instabilidade genómica e uma composição citogenética complexa, que se traduz em alterações estruturais e numéricas de diversos cromossomas, já descritas em detalhe em secção anterior (Schmidt-Hieber *et al.*, 2012), além de recentemente terem sido identificadas as células estaminais de MM, que podem persistir após as terapêuticas e tornarem-se responsáveis pelas recidivas. (Ghosh & Matsui, 2009).

### 1.7.2.1. A desregulação das proteínas da família ABC

A hiperexpressão de gp-P, o produto do gene *MDR1*, foi observada com frequência no MM e fortemente associada a recidiva da doença e a refractariedade à terapêutica (Epstein *et al.*, 1989; Covelli, 1999; Sonneveld, 1995). Aparentemente, os polimorfismos do gene *MDR1* parecem influenciar a resposta à terapêutica. Contudo, a sua contribuição para a resistência ao bortezomib não está ainda clarificada (Buda *et al.*, 2007; Hawley *et al.*, 2013). A principal limitação relativamente aos marcadores MDR no MM é a sua reduzida expressão ao diagnóstico e hiperexpressão após a quimioterapia. Num estudo realizado em doentes com MM, cerca de 6% ao diagnóstico e 43% após a quimioterapia (vincristina e doxorubicina) apresentavam positividade para a GlicP (Grogan *et al.*, 1993). Vários moduladores de MDR foram ensaiados no MM, mas com benefício clínico reduzido e toxicidade elevada (Dalton *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2003a).

No entanto, foi sugerido que, após o tratamento com moduladores MDR, as células tumorais poderiam aumentar a expressão de proteínas-alvo dos fármacos ou criar mutações que abolissem a interação fármaco-alvo (Yang *et al.*, 2003a).

Uma outra proteína relacionada com os mecanismos de MDR, a BCRP ou ABCG2, parece não desempenhar um papel relevante no MM. Contudo, o gene *ABCG2* foi encontrado metilado e hiperexpresso após quimioterapia (Turner *et al.*, 2006). Por outro lado, foi identificado um gene associado a instabilidade cromossómica, o *NEK2*, cuja hiperexpressão conduz a uma elevação das proteínas gp-P, MRP-1 e BCRP e foi consistentemente associado a resistência a alguns fármacos (bortezomib e doxorubicina), recidiva rápida e prognóstico desfavorável no MM (Zhou *et al.*, 2013).

### 1.7.2.2. Os mecanismos antiapoptóticos

A proteína supressora tumoral P53 é considerada a “guardiã do genoma”, desempenhando funções cruciais no controlo do ciclo celular, na apoptose, na reparação do DNA, na senescência e na autofagia (Zilfou & Lowe, 2009; Farnebo *et al.*, 2010; Saha *et al.*, 2013). 106-109. Esta proteína encontra-se inativada em diversas neoplasias humanas, incluindo 10-12% dos casos de MM (Avet-Loiseau *et al.*, 1999; Chng *et al.*, 2007b). A inativação P53 pode ser o resultado de mutações no domínio de ligação da P53 ao DNA ou através da hiperexpressão da proteína MDM2 (*murine double minute 2*) (Farnebo *et al.*, 2010) Esta proteína é uma ligase E3 de ubiquitina que se liga à P53 promovendo a sua ubiquitinação e tornando-a um alvo para a sua degradação através da via ubiquitina-proteasoma (Piette *et al.*, 1997). A MDM2 foi encontrada hipereexpressa em 58% de amostras de MM e associada a quimiorresistência (Elnenaei *et al.*, 2003; Rayburn *et al.*, 2005). Foi também sugerido que esta proteína possa participar nos mecanismos de multirresistência através do aumento da degradação da proteína P53 ou da interação com o gene *MDR1* (Rayburn *et al.*, 2005).

Outra proteína supressora tumoral, a p14ARF, liga-se à MDM2 e sequestra-a no núcleo para permitir a estabilização da P53 (Wilda *et al.*, 2004). O complexo regulador p14ARF-MDM2-P53 desempenha um papel fundamental no destino da célula em casos de stresse celular, como a lesão do DNA após quimioterapia (Wilda *et al.*, 2004). Como descrito nas células de MM, a perda de função da P53 e da p14ARF ou a hiperexpressão de MDM2 desregularia as vias de sinalização relacionadas com a P53 e, conseqüentemente, os seus alvos, diminuindo a expressão de P21, BAX, NOXA, PUMA, ou seja, de moléculas pró-apoptóticas, favorecendo a resistência à apoptose e, por conseguinte, à terapêutica (Elnenaei *et al.*, 2003).

Pensar na P53 como um alvo terapêutico no MM foi considerada uma estratégia interessante, baseada na restauração das funções desta proteína, em linhas celulares e em amostras de doentes com MM com a mutação no gene *p53*. De facto, tendo como alvo a interação P53-MDM2 e usando nutlin-3 (um antagonista de MDM2) e RITA (*reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis*), uma molécula que se liga a P53 e previne a interação desta com MDM2, foi desencadeada a apoptose nos plasmócitos tumorais e observados efeitos sinérgicos com o bortezomib (Saha *et al.*, 2012). Estes estudos evidenciaram um aumento da proteína P53 e dos seus alvos pró-apoptóticos BAX, PUMA e BAK e diminuição da proteína BCL-2, após modulação terapêutica.

Foi também demonstrado que a molécula RITA tem a capacidade de se ligar à proteína P53 mutada e reativar algumas das suas funções (Zhao *et al.*, 2010).

Um outro estudo recente revelou que esta molécula, em contraste com a *nutlin-3*, induzia apoptose numa subpopulação de plasmócitos, independentemente de P53 (Surget *et al.*, 2014). Estes dados poderão ter particular interesse para doentes com a deleção 17p, que são resistentes às terapêuticas atuais.

Um outro estudo demonstrou que a inibição da USP7 (ubiquitin-specific protease-7), que estabiliza a MDM2, desencadeia apoptose nos plasmócitos tumorais resistentes ao bortezomib, confirmando a ideia da inibição da função P53 como um mecanismo de resistência no MM (Chauhan *et al.*, 2012).

Além do mencionado, o fator de transcrição NF- $\kappa$ B é um interveniente fundamental na biologia e na patogénese do MM, não apenas em termos de proliferação de células tumorais, como previamente descrito, mas também na apoptose e resistência a fármacos (Anderson & Carrasco, 2011; Demchenko *et al.*, 2010; Demchenko & Kuehl, 2010). Com efeito, a via NF- $\kappa$ B é um alvo terapêutico no MM, em particular para fármacos que atuam como inibidores do proteasoma, como o bortezomib ou o carfilzomib (Anderson & Carrasco, 2011; Braun *et al.*, 2006). Por outro lado, foram recentemente identificadas mutações em alguns genes da plataforma NF- $\kappa$ B, o que tem como consequência uma ativação constitutiva desta via e torna os plasmócitos do MM menos dependentes da proteção do microambiente da MO e mais refratários à terapêutica (Chapman *et al.*, 2011; Keats *et al.*, 2007; Annunziata *et al.*, 2007). O fator de transcrição NF- $\kappa$ B pode ainda contribuir para a resistência aos fármacos no MM através da hiperexpressão de alguns membros da família BCL-2, incluindo a proteína BCL-XL (Xiang *et al.*, 2011). Foi igualmente descrito que os plasmócitos tumorais podem desenvolver um fenótipo NF- $\kappa$ B resistente ao bortezomib através da via PIR (*proteasome-inhibitor resistant*) (Markovina *et al.*, 2008). Este dado apoia a utilização do bortezomib em regimes de combinação.

### 1.7.2.3. O papel do microambiente

Os mecanismos mais conhecidos de resistência aos fármacos no MM, mediados pelo microambiente da MO, são o SFM-DR (*soluble factor-mediated drug resistance*) e o CAM-DR (*cell-adhesion mediated drug resistance*). O SFM-DR é explicado pelo envolvimento da IL-6, o principal fator de crescimento e de sobrevivência dos plasmócitos tumorais; enquanto o CAM-DR é mediado pela adesão dos plasmócitos neoplásicos às BMSCs ou às proteínas da matriz extracelular (ECM), envolvendo moléculas de adesão, como as integrinas  $\beta$ 1 (Meads *et al.*, 2009).

A resistência intrínseca (*de novo*) aos fármacos, incluindo o bortezomib, pode ocorrer em alguns doentes com MM, o que foi sugerido aumentar grandemente

devido a CAM-DR (uma forma transitória de resistência aos fármacos apenas durante a adesão célula-célula ou célula-ECM) e, mais importante, pode contribuir para o desenvolvimento de resistência adquirida, no decurso do tratamento (Shain & Dalton, 2001). A adesão dos plasmócitos tumorais às BMSCs conduz à secreção de IL-6, que foi implicada na resistência de plasmócitos tumorais a vários estímulos apoptóticos, incluindo o FAS/APO-1 e a alguns fármacos de quimioterapia. Estas respostas anómalas foram descritas como dependentes da via de sinalização JAK/STAT. Foi ainda demonstrado que os plasmócitos neoplásicos com secreção autócrina de IL-6 são mais resistentes à dexametasona do que os que não apresentam secreção autócrina desta interleucina (Frassanito *et al.*, 2001). Adicionalmente, foi observado que o bloqueio dos recetores da IL-6 com o fármaco CNTO328 aumentava a sensibilidade dos plasmócitos ao bortezomib (Voorhees *et al.*, 2007). Estes dados realçam o papel crucial da IL-6 nos mecanismos de resistência à terapêutica no MM.

A cultura simultânea de linhas celulares humanas de MM (U266 e NCI-H929) com BMSC de doentes com MM conduz a um aumento da expressão de survivina nos plasmócitos tumorais e a uma resistência demonstrada à daunorrubicina (Wang *et al.*, 2010). O bloqueio da survivina foi associado à inibição do crescimento dos plasmócitos neoplásicos e à diminuição da sua resistência à doxorubicina, ao melfalano e da dexametasona (Romagnoli *et al.*, 2007). Foi ainda demonstrado que o CD44, o recetor do ácido hialurónico, mediava a resistência à lenalidomida em plasmócitos tumorais e as células resistentes à lenalidomida adeririam mais fortemente às BMSCs e ao ácido hialurónico, o que implica um papel para o CD44 na CAM-DR (Bjorklund *et al.*, 2014).

As mutações em alguns oncogenes, como o *RAS*, podem afetar a interação dos plasmócitos com as células do microambiente e induzir CAM-DR (Hoang *et al.*, 2006).

As interações dos plasmócitos tumorais com outras células de microambiente da MO podem igualmente determinar quimiorresistência no MM. Concretamente, os osteoclastos conferem resistência à apoptose induzida por doxorubicina nos plasmócitos neoplásicos através da secreção de IL-6 e de osteopontina (Abe *et al.*, 2004). A interação dos plasmócitos tumorais com as células endoteliais da MO pode, igualmente, contribuir para a quimiorresistência, através da indução de citocinas, como a IL-6, o SDF1 $\alpha$ , o MCP-1, o FGF e o TNF- $\alpha$  pelas células endoteliais.

Os macrófagos podem também conferir resistência à apoptose induzida por dexametasona e melfalano, através do contacto direto célula-célula e bloqueando a via das caspases (Zheng *et al.*, 2009).

Finalmente, o microambiente inflamatório da MO onde se encontram os plasmócitos neoplásicos no MM tem um papel importante no desenvolvimento de resistências. Concretamente, os TLRs (*Toll-like receptors*), uma família de recetores que

controla e integra respostas imunes, podem ser um alvo de resistências no MM. Com efeito, a estimulação de células de MM com alguns ligandos de TLRs induz a secreção de IL-6 e confere resistência à dexametasona (Bohnhorst *et al.*, 2006; Jego *et al.*, 2006).

## **1.8. Como ultrapassar as resistências à terapêutica – os novos fármacos**

### **1.8.1. Conceitos gerais**

Apesar de todos os avanços ocorridos no conhecimento da fisiopatologia e no tratamento do MM nos últimos anos, esta patologia permanece incurável. Este facto decorre da constatação de que praticamente todos os doentes recidivam, após um período variável, mesmo os que atingem respostas iniciais de muito boa qualidade. Efetivamente, com a quimioterapia de dose alta seguida do transplante autólogo de progenitores hematopoiéticos, com os avanços na identificação de novos alvos terapêuticos, com a utilização do bortezomib e de imunomoduladores como a talidomida e a lenalidomida, observou-se uma melhoria significativa na sobrevivência global dos doentes e no tempo livre de doença, mas não uma cura com erradicação completa do clone maligno. Deste modo, torna-se imperioso prosseguir na investigação de novos alvos de atuação de moléculas inovadoras com mecanismos de ação específicos que atuem em pontos-chave de todo o processo de desenvolvimento do MM.

Assim, novos inibidores do proteasoma (como o carfilzomib, o ONX 0912, o MLN 9708 ou o marizomib), inibidores da cinase do I $\kappa$ B (partenolide), inibidores das histonas desacetilases (vorinostat, panobinostat) e das DNA metiltransferases (decitabina, 5-azacitidina), novos imunomoduladores (pomalidomida), inibidores das cinases (particularmente, inibidores do mTOR) e das proteínas de choque térmico, como a HSP90, moduladores da apoptose, novas terapêuticas imunomediadas (anticorpos contra o CS-1, o CD38 ou a IL-6) e novos agentes alquilantes (bendamustina) apresentaram eficácia, a maioria destes incluídos em regimes de combinação com fármacos convencionais, avaliados em ensaios clínicos de fase I/II e alguns de fase III, em doentes com MM em recidiva ou refratário (Dimopoulos *et al.*, 2011; Gentile *et al.*, 2013; Misso *et al.*, 2013).

## 1.8.2. Novos alvos terapêuticos em mieloma múltiplo

### 1.8.2.1. Partenolide

O partenolide, uma lactona sesquiterpena extraída de planta medicinal *Tanacetum parthenium*, é um inibidor natural do NF- $\kappa$ B com propriedades anti-inflamatórias e antitumorais. Demonstrou atividade em estudos pré-clínicos envolvendo diversos tipos celulares transformados (Guzman *et al.*, 2005; Zunino *et al.*, 2007) e sensibiliza as células transformadas a vários agentes citotóxicos (Patel *et al.*, 2000; Nakshatri *et al.*, 2004). O partenolide inibe o NF- $\kappa$ B através da ligação e inibição da ativação do IKK (Hehner *et al.*, 1999) e diretamente por alquilação da proteína RelA (um membro da família NF- $\kappa$ B) em resíduos de cisteína (García-Piñeres *et al.*, 2001).

Assim, um importante mecanismo subjacente ao efeito antitumoral do partenolide parece ser a inibição da sinalização NF- $\kappa$ B, que se encontra ativada de forma aberrante e estável em diversas neoplasias (Staudt, 2010). As células tumorais adquirem vantagem seletiva quando a sua via NF- $\kappa$ B se encontra comprometida, uma vez que a ativação desta via bloqueia a apoptose. O NF- $\kappa$ B controla, ainda, múltiplas vias celulares, para além da apoptose, como a proliferação, a angiogénese, a metastização ou a resistência à quimioterapia e à radioterapia (Chaturvedi *et al.*, 2011).

O partenolide não interfere apenas com o NF- $\kappa$ B; parece ainda modificar a regulação das proteínas MAPK e JNK e interferir com o fator de transcrição STAT3, que bloqueia a progressão do ciclo celular (Nakshatri *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2009).

Outro mecanismo antitumoral envolve a transcrição da metaloproteinase 9 da matriz, uma proteína relevante na angiogénese e na adesão celular, a qual é inibida pelo partenolide (Oka *et al.*, 2007; Sweeney *et al.*, 2005).

### 1.8.2.2. Everolimus

O Everolimus é um inibidor do mTOR, bloqueando a tradução de proteínas relacionadas com a sobrevivência e a proliferação celulares. Diversos estudos demonstraram que os inibidores mTOR apresentam atividade antitumoral contra neoplasias da mama, próstata, pâncreas e cérebro, assim como em leucemias, linfomas e mieloma múltiplo (Geoerger *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2006; Frost *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 1995; Muthukkumar *et al.*, 1995). O mTOR é uma serina/treonina kinase



que é um alvo da fosfatidilinositol 3 kinase (PI3K) e da proteína kinase B (AKT/PKB), o que desempenha um papel vital na sobrevivência e na proliferação das células. A ativação da via PI3K-Akt-mTOR induz a fosforilação mTOR que ativa duas importantes proteínas alvo: a proteína 1 de ligação ao fator de iniciação eucariota 4E (4EBP-1) e a proteína ribossômica S6 cinase (S6K). Consequentemente, esta ativação induz um aumento na tradução do mRNA e na síntese proteica, promovendo o crescimento celular e a inibição da apoptose (Oshiro *et al.*, 2004).

### 1.8.2.3. Silibinina

A silibinina é uma flavanona derivada da planta *Silybum marianum* e constitui um fitoquímico usado como suplemento na dieta com propriedades hepatoprotectoras e antineoplásicas. Tem efeitos antiproliferativos e antiangiogénicos potentes (diminui a secreção de VEGF e a formação de capilares *in vitro*) em diversas linhas celulares humanas de neoplasias do cólon (Yang *et al.*, 2003b), pulmão (Cufí *et al.*, 2013), bexiga (Zeng *et al.*, 2011) e próstata (Mora *et al.*, 2002). Inibe o crescimento de diversos tumores em modelos animais (Singh *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2007).

Foi demonstrado que a silibinina inibe a ativação constitutiva da via de sinalização STAT3, ao mesmo tempo que induz a apoptose (Agarwal *et al.*, 2007), interferindo ainda com as vias de sinalização celular JAK-STAT, ERK-MAPK e PI3K-Akt-mTOR (Cheung *et al.*, 2010), com consequente inibição da proliferação de células tumorais. Inibe também a progressão ao longo do ciclo celular, modulando os complexos CDK-ciclinas-CDKI e os seus reguladores (Hogan *et al.*, 2007) e inibe a ativação do NF- $\kappa$ B (Li *et al.*, 2010b). Por outro lado, induz quimiossensibilização, potenciando os efeitos de fármacos citotóxicos, em linhas celulares humanas de tumores do ovário e da mama (Scambia *et al.*, 1996; Giacomelli *et al.*, 2002).

### 1.8.2.4. Decitabina

A decitabina (5-aza-2'-deoxicitidina) é um análogo sintético da citosina que se incorpora nas cadeias de DNA de células em proliferação e atua como um agente modulador epigenético (hipometilante). De facto, este composto inibe a metilação do DNA e aumenta a reexpressão de genes silenciados, através da ligação covalente às regiões promotoras das DNA metiltransferases (DNMT) (Karpf & Jones, 2002; Bender *et al.*, 1998).

Após a entrada da decitabina nas células, a decitabina sofre um processo de fosforilação através de uma desoxicitidina cinase, convertendo-a nas formas trifosfato ativas: 5-azacitidina trifosfato e 5-aza-desoxicitidina trifosfato, que são incorporados no DNA como análogos da citosina (Issa & Kantarjian, 2009; Rius *et al.*, 2009). Quando a DNMT1 tenta metilar análogos da citosina, fica covalentemente retida através da cadeia sulfidril da cisteína catalítica e resulta na proteólise da DNMT1 (Ghoshal *et al.*, 2005; Kuo *et al.*, 2007; Brueckner *et al.*, 2007; Fandy, 2009). Estes factos resultam na hipometilação do DNA durante a replicação, uma vez que reduzidas quantidades de metiltransferase estão disponíveis para metilação das cadeias de DNA recentemente sintetizadas. Quando administrada em baixas doses, na ordem dos nanomolares, induz alterações permanentes na metilação do DNA nas regiões promotoras de determinados genes, reexpressão de genes e alterações em vias reguladoras cruciais envolvidas na tumorigénese, sem induzirem efeitos citotóxicos imediatos, como a lesão do DNA, a apoptose e o bloqueio ao longo do ciclo celular (Tsai *et al.*, 2012). A decitabina é funcionalmente mais específica que a azacitidina, uma vez que não se incorpora no RNA e necessita apenas de fosforilação para 5-azadesoxicitidinatrifosfato para incorporação no DNA. A azacitidina apresenta uma semivida curta de 1,5 a 2,3 horas, comparada com a decitabina, que apresenta semivida de  $20 \pm 5$  horas em soluções aquosas. Devido à sua maior estabilidade, a decitabina é um agente hipometilante mais eficiente do que a azacitidina (Rudek *et al.*, 2005; Momparler, 2005).

A atividade terapêutica da decitabina foi avaliada em doentes com síndrome mielodisplásico e com leucemia aguda, em diversos ensaios clínicos, pela sua excelente capacidade de reativação da expressão de vários genes metilados (Kihslinger & Godley, 2007; Kantarjian *et al.*, 2006; Steensma, 2009). A sua eficácia foi também demonstrada no tratamento de tumores sólidos (Issa & Kantarjian, 2009; Bumber & Issa, 2011).

#### **1.8.2.5. Tricostatina A**

Os inibidores das histonas desacetilases (HDACI), como o vorinostat ou a tricostatina A (TSA) formam outra classe de agentes de modulação epigenética com considerável atividade anti-MM (Maes *et al.*, 2013a). O desenvolvimento dos HDACIs iniciou-se com a descoberta de que os compostos que reconhecidamente induziam diferenciação de linhas celulares leucémicas eram inibidores das HDACs e induziam hiperacetilação das histonas, conduzindo à reexpressão de genes nas células neoplásicas. (Quintás-Cardama *et al.*, 2011). A TSA, como o Vorinostat, é

um pan-HDACI com efeitos na diferenciação terminal, bloqueio do crescimento, apoptose e morte das células transformadas. Os HDACI apresentaram benefício clínico em combinação com agentes convencionais em doentes com MM em recidiva (Dimopoulos *et al.*, 2013; Richardson *et al.*, 2013). Atualmente, estão estabelecidas várias interações entre a acetilação, os HDACI e os mecanismos de reparação do DNA e pensa-se que a acetilação das proteínas influencia o recrutamento e a expressão de proteínas de reparação do DNA, podendo ser usado como alvo para modificar as vias de reparação do DNA em resposta a diferentes agentes de lesão do DNA (Robert *et al.*, 2011).

#### 1.8.2.6. Ácido gambóxico

O ácido gambóxico é uma xantona derivada da resina de *Garcinia hanburryi*, uma planta que cresce maioritariamente no sul da China, Cambodja, Vietname e Tailândia (Zhu *et al.*, 2009). Foi demonstrado que o ácido gambóxico suprime o crescimento de células tumorais de neoplasias, como carcinoma do pulmão de pequenas células (Zhu *et al.*, 2009), carcinoma hepatocelular (Mu *et al.*, 2010), carcinoma da mama (Gu *et al.*, 2009), melanoma (Wang *et al.*, 2009), carcinoma gástrico (Wang *et al.*, 2009) ou leucemia (Pandey *et al.*, 2007). Diversos mecanismos foram implicados na inibição da proliferação e na indução da apoptose das células neoplásicas por parte do ácido gambóxico, nomeadamente, a inibição das proteínas antiapoptóticas BCL-2 (Gu *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2004) e survivina (Wang *et al.*, 2008); a indução de proteínas associadas à apoptose, como a P53 (Rong *et al.*, 2010), a BAX e a pro-caspase-3 (Wang *et al.*, 2009); a ativação das proteínas cinase c-Jun-N-terminal (JNK), p38 e da cinase sintetase do glicogénio 3 beta (GSK3beta) (Li *et al.*, 2009). Outros mecanismos de ação do ácido gambóxico incluem a inibição da topoisomerase II através da ligação ao seu domínio ATPase (Qin *et al.*, 2007) e do NF- $\kappa$ B (Pandey *et al.*, 2007); redução da expressão do oncogene MDM2 e subsequente indução da p21 (Rong *et al.*, 2010). Foi ainda descrita uma ligação direta aos recetores do c-MYC (Yu *et al.*, 2006) e da transferrina (Kasibhatla *et al.*, 2005) e um bloqueio da sinalização do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Lu *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2008). Recentemente, uma abordagem proteómica revelou a supressão da expressão da proteína sigma 14-3-3 pelo ácido gambóxico (Wang *et al.*, 2009).

## OBJETIVOS

# 2

O MM é uma patologia reconhecidamente precedida por uma entidade pré-neoplásica, designada MGUS, com um estado intermédio denominado MMI. Em qualquer destas entidades, coexistem plasmócitos monoclonais e policlonais, em proporções diversas, com aumento dos plasmócitos monoclonais ao longo da mielomagénese. Várias alterações genéticas e epigenéticas têm sido identificadas no MM, embora não esteja ainda clarificada a sua relevância na evolução de MGUS para MM. Além disso, a maioria dos estudos realizados com o objetivo de conhecer a patogénese do MM foram muito centrados nos plasmócitos clonais, desconhecendo-se, em larga medida, a relevância dos plasmócitos com fenótipo normal.

Assim, neste trabalho analisámos o perfil de metilação de alguns genes relevantes na mielomagénese; avaliámos e comparámos a expressão de moléculas relevantes na apoptose, no microambiente e na resistência à terapêutica nos dois subtipos de plasmócitos em doentes com GM, de modo a identificar potenciais biomarcadores de diagnóstico e de prognóstico, bem como novos alvos terapêuticos.

Deste modo, os nossos objetivos específicos consistiram em:

1. Caracterizar as populações de plasmócitos tumorais e não tumorais, no que respeita à expressão de moléculas envolvidas na apoptose, na proliferação, na regulação do ciclo celular e no microambiente. Neste sentido fomos avaliar as proteínas antiapoptóticas, BCL-2, Survivina, TRAIL-R3 e -R4, e pró-apoptóticas BAX, TRAIL, TRAIL-R1, TRAIL-R2, FAS, FAS Ligando, caspase 3, TNF- $\alpha$  e recetor do TNF- $\alpha$ , os fatores de crescimento, VEGF, recetor do VEGF, IL-6 e recetor de IL-6, os reguladores do ciclo celular, ciclina D1 e P53, o fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e os conjugados de ubiquitina.
2. Analisar a expressão de proteínas da família ABC com funções relevantes na resistência à terapêutica, Glicoproteína P e MRP-1, a nível citoplasmático e membranar, nos plasmócitos clonais e não clonais de doentes com GM, esta-

belecendo comparações entre os plasmócitos com os diferentes fenótipos e entre os diversos subgrupos do GM estudados.

3. Avaliar o impacto do perfil de metilação das regiões promotoras de genes supressores tumorais na evolução clonal de MGUS para MM, concretamente dos genes *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK* e dos genes dos recetores do *TRAIL* (*TRAIL-R1*, *-R2*, *-R3* e *R4*); procurar associações entre as alterações na metilação destes genes e as características clínicas e laboratoriais dos doentes com MGUS, MMI e MM, assim como determinar o impacto da metilação aberrante dos genes mencionados na resposta à terapêutica, na sobrevivência livre de progressão e na sobrevivência global de doentes com MM.
4. Estabelecer associações entre as características clínicas e laboratoriais dos doentes com GM e a expressão das moléculas descritas, assim como avaliar a influência da expressão destas moléculas na resposta à terapêutica, na sobrevivência livre de progressão e na sobrevivência global de doentes com MM.
5. Determinar o efeito de fármacos dirigidos a alvos moleculares descritos previamente, numa linha celular de MM (NCI-H929). Os fármacos estudados incluíram inibidores do NF- $\kappa$ B (bortezomib e partenolide), inibidores mTOR (everolimus), indutores da apoptose (silibinina e ácido gambógico) e moduladores epigenéticos (tricostatina A e a decitabina). Foi nosso objetivo estudar o efeito destes fármacos na proliferação e viabilidade celulares, quer em monoterapia quer em diferentes combinações, doses e tempos de administração, de forma a definirmos a estratégia terapêutica mais eficaz.

### 3.1. Estudos realizados em doentes com gamopatias monoclonais e em controlos

#### 3.1.1. Seleção e caracterização dos doentes e dos controlos

Neste estudo, foram incluídos 142 doentes com GM avaliados ao diagnóstico (68 doentes com MGUS, 12 com MMI, 62 com MM) e cinco com MMRR. Foram estudados 10 controlos não neoplásicos.

Os doentes com GM foram avaliados e selecionados no Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pólo Hospitais da Universidade de Coimbra (CHUC, HUC), para onde são referenciados doentes de diversas áreas da região centro de Portugal. Todos os estudos foram realizados em amostras de medula óssea, obtidas no decurso de procedimentos diagnósticos de rotina, em doentes com idade superior a 18 anos.

A avaliação morfológica dos esfregaços de medula óssea de doentes com GM foi realizada após coloração com May-Grünwald-Giemsa e posterior observação por microscopia ótica. Na análise dos esfregaços de medula óssea, foi determinada a percentagem de plasmócitos e descrita a sua morfologia (alterações na nuclearidade, características de imaturidade: plasmablastos). A caracterização imunofenotípica dos plasmócitos presentes na medula óssea de doentes com GM foi realizada por citometria de fluxo, recorrendo aos seguintes marcadores: CD38, CD138, CD19, CD56, CD27, CD28, CD45, CD117 e cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$  intracitoplasmáticas.

Os estudos citogenéticos foram realizados por técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*). A técnica de FISH utiliza sondas fluorescentes e permite



a deteção de translocações, deleções ou amplificações de determinados *loci* dos cromossomas, recorrendo a sondas centroméricas, em células em interfase. As alterações citogenéticas pesquisadas foram: del(13q14) (gene do retinoblastoma), del(17p13.1) (gene *p53*), rearranjo do gene *IgH* (14q32), t(11;14), t(4;14), t(14;16), anomalias do cromossoma 1 (del 1p32 e 1q21+).

Os diagnósticos de MGUS, MMI e MM foram realizados com base nos critérios inicialmente definidos pelo *International Myeloma Working Group* (IMWG) (Kyle *et al.*, 2003) e atualizados em 2014 (*International Myeloma Working Group*, 2014). O estadiamento dos doentes com MM seguiu os critérios do ISS (*International Staging System*) (Greipp *et al.*, 2005b). A avaliação da resposta à terapêutica nos doentes com MM foi efetuada de acordo com os critérios de avaliação de resposta definidos pelo IMWG (Kyle & Rajkumar, 2009b). Os controlos não neoplásicos, sem patologia hematológica conhecida, foram selecionados da consulta externa do Serviço de Hematologia Clínica do CHUC-HUC, após avaliação clínica e analítica.

As amostras dos doentes e dos controlos foram colhidas de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia II, aprovados pela Comissão de Ética local, após consentimento informado assinado pelo doente.

### **3.1.2. Análise da expressão de moléculas envolvidas na apoptose, na regulação do ciclo celular e nos mecanismos de resistência por citometria de fluxo**

As células de doentes com MGUS, MMI, MM ou MMRR e as de controlos não neoplásicos foram marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD138-APC (BD Biosystems) e anti-CD19-PerCP-Cy5.5 (BD Biosystems) com o objetivo de identificar as populações de plasmócitos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19-.

Avaliámos, por citometria de fluxo, a expressão citoplasmática de moléculas envolvidas na morte celular por apoptose com funções pró-apoptóticas (BAX, caspase 3) e antiapoptóticas (BCL-2 e Survivina), na regulação do ciclo celular (ciclina D1 e P53), de proteínas inflamatórias (IL-6), do factor de transcrição NF- $\kappa$ B, de conjugados da ubiquitina e de proteínas da família ABC (Glicoproteína P e MRP-1). Deste modo, aproximadamente  $10^6$  células obtidas de doentes com MGUS, MMI, MM e MMRR e de controlos não neoplásicos foram marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD138-APC (BD Biosystems) e anti-CD19-PerCP-Cy5.5 (BD Biosystems) durante 15 minutos, à temperatura ambiente, na ausência de luz. De seguida, as células foram lavadas com PBS por centrifugação durante 5 minutos a 300 xg e ressus-



pensas em 100 µL de solução A (solução de fixação – IntraCell Kit, ImmunoStep), e incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após este passo, as células foram novamente lavadas com PBS por centrifugação durante 5 minutos a 300 xg. No passo seguinte, as células foram ressuspensas na solução B (solução de permeabilização – IntraCell Kit, ImmunoStep) e incubadas com 1 µg de anticorpos monoclonais, de acordo com a [Tabela 5](#) durante 15 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Finalmente, as células foram lavadas com PBS por centrifugação durante 5 minutos, a 300 xg, ressuspensas em 400 µL de PBS e analisadas no citómetro de fluxo FACSCalibur. Foi realizada a aquisição de um total de 50 000 células usando o programa CellQuest™ e os resultados foram analisados e quantificados usando o programa Paint-a-Gate 3.02.

Os resultados estão expressos em termos de percentagem de células que expressam cada proteína e em média de intensidade de fluorescência (MIF), que representa a expressão citoplasmática/membranar média das proteínas previamente mencionadas, a qual é proporcional ao número de moléculas ligadas ao anticorpo.

As razões entre as moléculas pró e antiapoptóticas (ex: recetores do TRAIL R1+R2/R3+R4) foram calculadas através da razão entre as médias de intensidade de fluorescência apresentadas por cada uma das moléculas.

Analisámos também a expressão membranar de proteínas ativadoras da apoptose, como TRAIL, recetores do TRAIL (R1 ou DR4, R2 ou DR5), recetor 1 do TNF- $\alpha$ , FAS e FAS ligando; proteínas inibidoras da apoptose (recetores do TRAIL R3 ou DcR1 e R4 ou DcR2), proteínas envolvidas na inflamação e na angiogénese da medula óssea (VEGF, recetor 2 do VEGF, recetor da IL-6) e de proteínas da família ABC (Glicoproteína P e MRP-1).

Para a marcação das proteínas membranares, foram adicionados, simultaneamente, os anticorpos monoclonais anti-CD138-APC, anti-CD19-PerCP-Cy5.5 e também 1 µg de anticorpo dirigido às proteínas membranares acima mencionadas, de acordo com a combinação descrita na [Tabela 5](#), durante 10 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após este passo, incubaram-se as células com 2 mL de tampão de lise (BD BioSystems) durante 10 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. De seguida, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS), centrifugadas durante 5 minutos a 300 xg e ressuspensas em 400 µL de PBS e lavadas num citómetro de fluxo FACSCalibur da BD Biosystems.

Os anticorpos monoclonais utilizados na análise das proteínas da família ABC e das moléculas intervenientes na apoptose e na regulação do ciclo celular avaliadas neste estudo, assim como as respetivas combinações encontram-se apresentados na [Tabela 5](#).

TABELA 5

### Descrição das combinações dos anticorpos monoclonais e respetivos fluorocromos

Tubos	APC	PerCP-Cy5.5	PE	FITC
1	CD138 BD Pharmingen	CD19 BD Biosystems	CD117 BD Biosystems	Glicoproteína P BD Pharmingen
2	CD138 BD Pharmingen	CD19 BD Biosystems	FAS Ligando Santa Cruz Ab	CD95 BD Pharmingen
3	CD138 BD Pharmingen	CD19 BD Biosystems	Recetor IL-6 R&D Systems	IL-6 BD Pharmingen
4	CD138 BD Pharmingen	CD19 BD Biosystems	TNF- $\alpha$ BD Pharmingen	Recetor 1 TNF- $\alpha$ Serotec
5	CD138 BD Pharmingen	CD19 BD Biosystems	CD253 BD Pharmingen	MRP1 BD Pharmingen
6	CD138 BD Pharmingen	CD19 BD Biosystems	BAX Santa Cruz Ab	BCL-2 BD Biosystems
7	CD138 BD Pharmingen	CD19 BD Biosystems	TRAIL R1 R&D Systems	Conj. Ubiquitina Santa Cruz Ab
8	CD138 BD Pharmingen	CD19 BD Biosystems	TRAIL R2 R&D Systems	MRP1* BD Pharmingen
9	CD138 BD Pharmingen	CD19 BD Biosystems	TRAIL R3 R&D Systems	Survivina R&D Systems
10	CD138 BD Pharmingen	CD19 BD Biosystems	TRAIL R4 R&D Systems	Caspase 3 BD Pharmingen
11	CD138 BD Pharmingen	CD19 BD Biosystems	Ciclina D1 Santa Cruz Ab	P53 Immunostep
12	CD138 BD Pharmingen	CD19 BD Biosystems	Phospho- NF- $\kappa$ B BD Phosflow	Glicoproteína P* BD Pharmingen
13	CD138 BD Pharmingen	CD19 BD Biosystems	VEGF R&D Biosystems	Recetor 2 VEGF R&D Biosystems

\* Determinação citoplasmática.

APC - alofocianina; PerCP - peridina de clorofila; PE - ficoeritrina; FITC - isotiocianato de fluoresceína.

### 3.1.3. Estudos epigenéticos – avaliação do estado de metilação do DNA nos doentes e nos controlos

O perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK* (Braggio *et al.*, 2010b; Seidl *et al.*, 2004; Stanganelli *et al.*, 2010) e do *TRAIL-R1/DR4*, *TRAIL-R2/DR5*, *TRAIL-R3/DcR1*, *TRAIL-R4/DcR2* (Yeh, 2003) foi analisado utilizando o MS-PCR (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*) (Herman *et al.*, 1996). Como controlo positivo foi usado o *EpiTect PCR Control DNA Set* (Qiagen).

#### 3.1.3.1. Extração e quantificação do DNA genómico

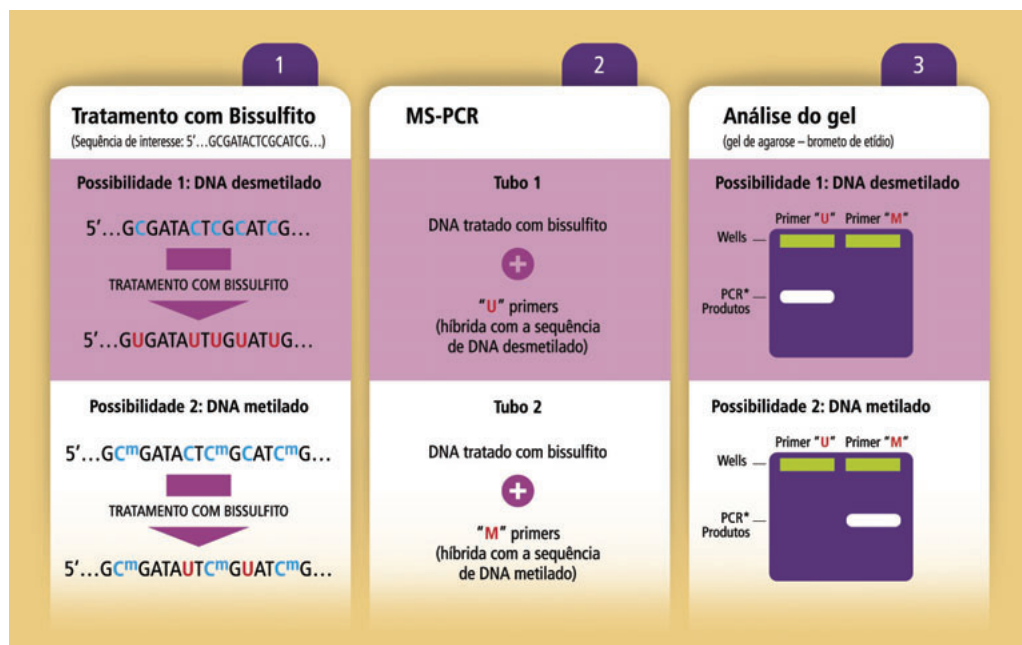
O DNA genómico foi extraído a partir de células da medula óssea de doentes com GM ao diagnóstico (MGUS, MMI, MM), em progressão do MM (MMRR), e de controlos não neoplásicos usando o protocolo de extração de DNA aplicado a amostras de sangue definido por Bartlett & White (Bartlett, 2003).

Para a extração de DNA, de acordo com este método, colocaram-se 500 µL de aspirado de medula óssea num tubo cónico de 10 mL e adicionaram-se 2 mL de solução de lise de eritrócitos, que contém 0,01 M Tris HCl (Tris Base, ULTROL® Grade, Calbioquem®), 320 mM Sucrose (D(+)-Sucrose, AppliChem), 5mM de MgCl<sub>2</sub> e 1% Triton X100 (MP Biomedicals). Esta mistura foi agitada durante 4 minutos à temperatura ambiente, centrifugada a 3 000 xg durante 5 minutos, após o que foi descartado o sobrenadante. Seguidamente, adicionaram-se 160 µL da solução de lise celular, que contém 4 M Tris HCL, 150 mM NaCl, 0,06 M EDTA (EDTA Na<sub>2</sub>, Mp Biomedicals) e 1% de SDS (SDS puré, AppliChem) e a mistura foi incubada num banho aquecido a 65 °C durante 15 a 20 minutos. Após arrefecimento da mesma à temperatura ambiente, adicionaram-se 350 µL de clorofórmio frio e colocou-se numa placa giratória durante 30 a 60 minutos. A mistura foi depois centrifugada a 240 xg durante 2 minutos, recolhido o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL e descartado o *pellet*. Ao sobrenadante, foram adicionados 420 µL de Etanol (MERCK) frio para precipitar o DNA. Com recurso a uma pipeta estéril, colheu-se o novelo de DNA para um novo tubo de 1,5 mL e deixou-se secar à temperatura ambiente para que ocorresse evaporação do etanol. Por fim, ressuspendeu-se o DNA em 100 µL de tampão de eluição (Tris-HCL a 10 mM e EDTA a 1 mM, pH=8). As amostras de DNA genómico foram posteriormente quantificadas e o seu grau de pureza foi avaliado por espectrofotometria de absorção, com recurso ao NanoDrop® 1000 Spectrophotometer. O grau de pureza do DNA foi determinado através da razão entre as densidades óticas avaliadas no comprimento de onda de 260 nm e a 280 nm (260 nm / 280 nm). A determinação da concentração e do grau de pureza das amostras de DNA genómico dos doentes com GM e dos controlos não neoplásicos foi realizada utilizando como referência (branco) o tampão de eluição das amostras no qual o DNA foi dissolvido. Apenas as amostras de DNA com um grau de pureza compreendido entre 1,7 e 1,9 e uma concentração de DNA de 100 a 200 ng/µL foram armazenadas a -80 °C até utilização futura.

### **3.1.3.2. Modificação do DNA genómico com bissulfito de sódio**

O estado de metilação dos genes *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK*, *TRAIL-R1*, *TRAIL-R2*, *TRAIL-R3* e *TRAIL-R4* foi avaliado por PCR específica de metilação (MS-PCR). Inicialmente, procedeu-se à modificação do DNA genómico com bissulfito de sódio, durante a qual os resíduos de citosina não metilados são convertidos em uracilos, de acordo com as instruções do fabricante (*EpiTect Bisulfite Kit* da Qiagen, Chatsworth, USA).

As citosinas metiladas não sofrem qualquer modificação, permitindo a identificação dos genes metilados e não metilados. Para proceder à modificação do DNA, misturaram-se 100 ng de DNA genómico, num volume total de 20 µL e 130 µL de CT *Conversion Reagent*. A referida modificação ocorre através de um ciclo de desnaturação, à temperatura de 98 °C, durante 10 minutos, seguida de um ciclo de conversão pelo bissulfito de sódio, à temperatura de 64 °C, durante 2,5 horas, num termociclador (MyCycler™, Biorad). Após este procedimento, efetuou-se a aplicação do DNA modificado numa coluna de purificação, Zymo-Spin™ IC Column, foram posteriormente adicionados tampões de lavagem e efetuadas centrifugações, com obtenção do DNA modificado puro. Este DNA modificado foi armazenado a -4 °C para posterior utilização.



**FIGURA 14** *Methylation-specific Polymerase Chain Reaction (MS-PCR).*

As reações de MS-PCR para os genes estudados foram realizadas como previamente descrito (Braggio *et al.*, 2010b; Seidl *et al.*, 2004; Stanganelli *et al.*, 2010). O DNA modificado dos doentes e dos controlos foi amplificado através da técnica de MS-PCR, como descrito por Herman JG *et al.* (Herman *et al.*, 1996), com ligeiras modificações.

Nesta análise, foram usadas sequências de *primers* para os alelos metilados (M-MSP) e não metilados (U-MSP), encontrando-se sumarizadas nas Tabelas 6 e 7 as condições de cada reação (Chim *et al.*, 2007b; Herman *et al.*, 1996; Yeh *et al.*, 2003).

**Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP): sequências dos primers e condições das respectivas reações para os genes *p15*, *p16*, *p53* e *DAPK***

**TABELA 6**

Gene	Estado Metilação	Primer	Sequência do primer	Tamanho	Te/MgCl <sub>2</sub>	Referência	
<i>p15</i>	M-MSP	F	5'-GCGTTCGTATTTGCGGTT-3'	148	60 °C / 6.7 mM	Herman <i>et al.</i> (1996)	
		R	5'-CGTACAATAACCGAACGACCGA				
	U-MSP	F	5'-TGTGATGTGTTTGTATTTGTGGTT-3'	154			
		R	5'-CCATACAATAACCAAACAACCAA				
<i>p16</i>	M-MSP	F	5'-TTATTAGAGGGTGGGCGGATCGC-3'	234	65 °C / 6.7 mM	Herman <i>et al.</i> (1996)	
		R	5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA				
	U-MSP	F	5'-TTATTAGAGGGTGGGTTGATTGT-3'	234	60 °C / 6.7 mM		
		R	5'-CAACCCAAACCACAACCATAA				
<i>p53</i>	M-MSP	F	5'-TTCGGTAGCGGATTATTTG-3'	193	60 °C / 6.7 mM	Yeh <i>et al.</i> (2003)	
		R	5'-AAATATCCCCGAAACCCAAC				
	U-MSP	F	5'-TTGGTAGGTGGATTATTTGTTT-3'	247			58 °C / 6.7 mM
		R	5'-CCAATCCAAAAAACATATCAC				
<i>DAPK</i>	M-MSP	F	5'-GGATAGTCGGATCGATTAACGTC-3'	100	63 °C / 2 mM	Chan <i>et al.</i> (2002)	
		R	5'-CCCTCCAAACGCCGA				
	U-MSP	F	5'-GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT-3'	106			
		R	5'-CAAATCCCTCCAAACACCAA-3'				

\* *DAPK*, death-associated protein kinase; M-MSP: methylation-specific polymerase chain reaction para o alelo metilado; U-MSP: MSP para o alelo não metilado; Te, temperatura de emparelhamento. F: forward primer (5'-3'). R: reverse primer).

**Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP): sequências dos primers e condições das respectivas reações para os genes *TRAIL-DcR1*, *TRAIL-DcR2*, *TRAIL-DR4* e *TRAIL-DR5***

**TABELA 7**

Gene	Estado Metilação	Primer	Sequência do primer	Tamanho	Te	Referência	
<i>DcR1</i>	M-MSP	F	5'- TTACGCGTACGAATTTAGTTAAC - 3'	125	60 °C	Van Noesel <i>et al.</i> (2002)	
		R	5'- ATCAACGACCGACCGAAACG - 3'				
	U-MSP	F	5'- GAATTTTTTATGTGTATGAATTTAGTTAAT - 3'	135			
		R	5'- CCATCAAACAACAAAACA - 3'				
<i>DcR2</i>	M-MSP	F	5'- GGGATAAAGCGTTTCGATC - 3'	138	65 °C	Van Noesel <i>et al.</i> (2002)	
		R	5'- CGACAACAAAACCGCG - 3'				
	U-MSP	F	5'- TTGGGGATAAAGTGTGTTGATT - 3'	145	60 °C		
		R	5'- AAACCAACAACAAAACCACA - 3'				
<i>DR4</i>	M-MSP	F	5'- TTCGAATTCGGGAGCGTAGC - 3'	91	60 °C	Van Noesel <i>et al.</i> (2002)	
		R	5'- GTAATTCATCTCCCGCG - 3'				
	U-MSP	F	5'-GTAGTGATTTGAATTTGGGAGGTAGT- 3'	102			58 °C
		R	5'- CTCATAATTCATCCCAACA - 3'				
<i>DR5</i>	M-MSP	F	5'- GAGTAGTGAAAGATTAGTTCGCGTC -3'	199	63 °C	Van Noesel <i>et al.</i> (2002)	
		R	5'- CCGAAACGTTCTATCCCCG -3'				
	U-MSP	F	5'- TGTTTGAGTAGTGAAAGATTAGTTGTGTT - 3'	208			
		R	5'- ACAACCAAACATTCTATCCCCA -3'				

\* M-MSP: methylation-specific polymerase chain reaction para o alelo metilado; U-MSP: MSP para o alelo não metilado; Te, temperatura de emparelhamento. F: forward primer (5'-3'). R: reverse primer).

De forma resumida, a 100 ng de DNA modificado foi adicionado um *primer* direto (*forward* – F) e um *primer* inverso (*reverse* – R), numa concentração de 0,25 µM, uma mistura de dNTP's (desoxirribonucleótidos trifosfatos de adenina, guanina, citosina e timina) 0,2 mM, cloreto de magnésio (NZYtech), tampão [*reaction buffer for Supreme NZY Taq DNA polymerase*; constituição 670 mM Tris-HCL, pH 8.8, 160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 400 mM KCl, 0.1 % Tween 20; volume: 10% do total utilizado na reacção] e 1U de polimerase (*Supreme NZY Taq DNA polymerase*, NZYtech). O ciclo de desnaturação inicial da reacção de PCR teve a duração de 15 minutos, à temperatura de 95 °C e foi seguido por 35 ciclos de desnaturação à mesma temperatura, durante 30 segundos. O emparelhamento decorreu a diferentes temperaturas, como indicado nas Tabelas 6 e 7, durante 30 segundos e a extensão a 72 °C, também durante 30 segundos. A reacção terminou com um ciclo de extensão de 10 minutos à temperatura de 72 °C, no termociclador MyCycler™ BioRad. Em simultâneo, foram igualmente amplificadas três amostras controlo, uma sem DNA, a qual designamos como Branco, o controlo universal metilado e o controlo universal desmetilado (*EpiTect PCR Control DNA Set*, Qiagen). Os produtos da MSP, após a amplificação, foram aplicados num gel de agarose (NZYtech) a 4% em TBE (Tris: 89 mM; EDTA-Na<sub>2</sub>: 2 mM; ácido bórico: 89 mM), corado com GreenSafe (NZYtech) e, subsequentemente, analisados sob luz ultravioleta.

## 3.2. Estudos realizados na linha celular humana de mieloma múltiplo

### 3.2.1. Caracterização da linha celular humana NCI-H929

Na presente investigação, foi utilizada a linha celular humana de MM, NCI-H929, obtida no Instituto alemão de coleções biológicas DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*). Esta linha celular foi estabelecida a partir de células isoladas do líquido pleural de uma doente caucasiana, com 62 anos de idade e o diagnóstico de mieloma múltiplo IgAk em recidiva (Gazdar *et al.*, 1986).

As células NCI-H929 foram mantidas em cultura, em suspensão, em meio RPMI 1640 (SIGMA) contendo L-glutamina 2mM, HEPES-Na 10 mM, NaHCO<sub>3</sub> 1.5 g/L, glicose 4.5g/L, piruvato de sódio 1 mM, penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100 µg/mL e enriquecido com soro fetal bovino a 10% (GIBCO) e pH a 7.3.

As células foram mantidas em cultura numa densidade de 0,5 milhões de células/mL. A mudança de meio foi realizada de 72 em 72 horas, atendendo à velocidade de crescimento e à taxa metabólica das células e de acordo com a curva de crescimento inicialmente realizada. A densidade celular foi avaliada diariamente, por contagem do número de células viáveis num hemocitómetro (ou câmara de Neubauer), recorrendo ao método de exclusão do Azul de Tripano (TB). Para avaliação da densidade celular, 5 µL de suspensão de células foram adicionados a igual quantidade de TB (diluição de 1:1). Após homogeneização da mistura, a suspensão celular foi colocada num hemocitómetro e procedeu-se à contagem das células no microscópio ótico de luz invertida. Para a manutenção da cultura celular, e sempre que justificado, foi realizada a centrifugação das células a 125 xg, durante 5 minutos, de modo a remover o meio. Posteriormente, as células foram novamente ressuspensas num volume de meio, com o objetivo de manter a concentração celular previamente mencionada. A cada passagem das células, foram observados e analisados determinados parâmetros, como a morfologia, a cor do meio, o padrão de crescimento e a densidade celular, anotando-se o número de passagens, com o objetivo de otimizar as condições de crescimento e a manutenção da cultura.

### **3.2.2. Avaliação dos efeitos citotóxicos e citostáticos nas células de mieloma múltiplo tratadas com fármacos antineoplásicos**

Os efeitos citotóxicos e citostáticos decorrentes do tratamento das células NCI-H929 com os fármacos em estudo, em monoterapia ou em combinação, foram avaliados através de curvas dose-resposta. Foram, igualmente, estudados o ciclo celular, o tipo de morte celular (apoptose ou necrose) e os mecanismos envolvidos.

#### **3.2.2.1. Determinação da viabilidade celular pelo teste da resazurina – curvas dose-resposta**

As células de mieloma múltiplo NCI-H929 foram mantidas em cultura nas condições referidas em 3.2.1., na ausência e na presença dos fármacos antineoplásicos descritos na [tabela 8](#).

Todos os fármacos foram avaliados em monoterapia e cada um deles em associação com o bortezomib. Foram, ainda, analisadas diferentes formas de administração da mesma dose (dose única vs doses fracionadas).



TABELA 8

## Fármacos utilizados no tratamento das células NCI-H929

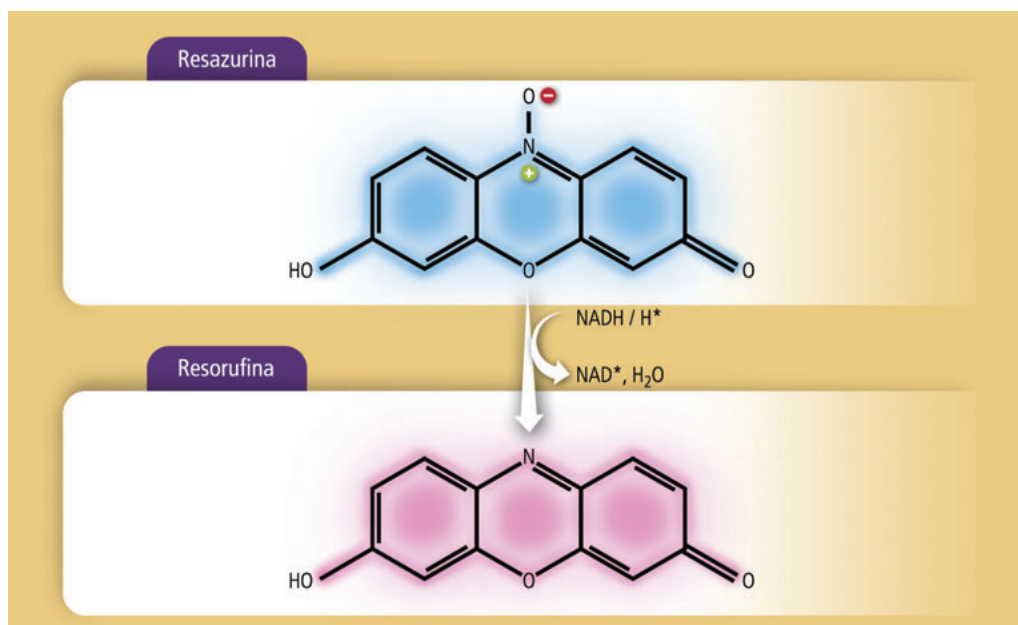
Nome do composto (fabricante)	Mecanismo de ação	Doses utilizadas
Bortezomib (Selleckchem)	Inibidor NF-κB	0,1; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 25 nM
Partenolide (Sigma)	Inibidor NF-κB	5; 12,5; 15; 17,5 e 20 μM
Everolimus (Sigma)	Inibidor mTOR	5; 15; 17,5; 20 e 25 μM
Decitabina (Sigma)	Hipometilante	1; 3; 5; 10; 25 e 50 μM
Tricostatina A (Sigma)	Inibidor das histonas desacetilases	100; 250; 300; 500; 750 e 1000 nM
Silibilina (Sigma)	Efeitos antiproliferativos e antiangiogénicos	2,5; 7,5; 50; 100; 150 e 200 μM
Ácido gambógico (Sigma)	Inibidor BCL-2, Survivina e Topoisomerase II; Ativador P53, BAX e pro-caspase-3	50; 100; 150; 300; 500 e 1000 nM

As incubações com os fármacos referidos foram efetuadas por períodos de 24, 48 e 72 horas, a 37 °C numa incubadora com atmosfera humidificada e com 5% de CO<sub>2</sub>. As suspensões celulares foram mantidas em frascos de cultura com uma área de 75 cm<sup>2</sup>, ou em placas de cultura (Costar), com seis a 24 compartimentos (4 a 1 mL de suspensão celular por compartimentos), dependendo da quantidade de células necessárias aos estudos subsequentes e numa densidade celular inicial de 0.5 x10<sup>6</sup> células / mL.

As células foram incubadas com pequenos volumes das soluções concentradas dos compostos, previamente preparadas a partir de uma solução “stock”, de forma a obter as concentrações finais desejadas, permanecendo estes no meio de cultura durante os períodos de incubação (24, 48 e 72 horas).

A proliferação celular foi avaliada através do ensaio metabólico com resazurina, que envolve a adição de um indicador redox fluorogénico à cultura celular. Quando a resazurina é adicionada à cultura celular, entra no citosol e é reduzida a resorufina por ação de desidrogenases. Esta reação redox é acompanhada de alterações de cor, passando de azul índigo não fluorescente para rosa fluorescente. Esta alteração de cor pode ser facilmente medida por espectrofotometria ou por espectrofluorimetria (Al-Nasiry *et al.*, 2007; O’Brien *et al.*, 2000). Como cada linha celular apresenta propriedades metabólicas únicas e como a redução da resazurina é um processo enzimático, as linhas celulares devem ser caracterizadas individualmente de modo a determinar os parâmetros experimentais ótimos. Estes incluem o tempo de incubação, a diluição da resazurina e a densidade celular; de modo a determinar a gama de densidades celulares em que se observa uma relação linear entre a absorvância ou a fluorescência e a densidade celular (Czekanska, 2011; Rampersad, 2012).

Para verificar se algum destes compostos reduziam espontaneamente a resazurina a resofurina, efetuaram-se estudos preliminares em que se incubou, durante 24 horas, meio de cultura com o correspondente a 5 e 10% deste volume de



**Estrutura química da resazurina e da resorufina.**

**FIGURA 15**

A resazurina (composto azul índigo não fluorescente) é reduzida a resorufina (composto rosa fluorescente) por aceitação de elétrons provenientes do NADPH, FADH, FMNH, NADH e dos citocromos, sendo esta reação catalisada essencialmente por enzimas mitocondriais.

resazurina (Sigma) a 0,1 mg/mL e os fármacos em estudo. A resazurina foi reduzida a resorufina pelos fármacos testados.

Seguidamente, foi avaliado o efeito citotóxico nas células H929 tratadas com os fármacos previamente mencionados, utilizando o mesmo teste metabólico com resazurina. Assim, as células H929 foram incubadas na ausência e na presença destes fármacos, numa densidade celular inicial de  $0.5 \times 10^6$  células/mL, durante 72h. Após cada período de 24h de incubação, adicionou-se às células 10% de resazurina a 0,1 mg/mL e avaliou-se o efeito destes fármacos na viabilidade celular. A leitura da absorvância nos comprimentos de onda de 570 nm e de 600 nm foi efetuada num espectrofotómetro leitor de placas (Synergy™ Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments). Os resultados de cada ensaio representam a média de quatro leituras e foram realizados três a seis ensaios independentes.

O efeito destes fármacos na viabilidade celular foi calculado pela fórmula:

$$\frac{[(A_{570} - A_{600}) \text{ amostra}] - [(A_{570} - A_{600}) \text{ branco}]}{[(A_{570} - A_{600}) \text{ controlo}] - [(A_{570} - A_{600}) \text{ branco}]} \times 100$$

Nesta fórmula,  $A_{570}$  corresponde à absorvância no comprimento de onda de 570 nm e  $A_{600}$  corresponde à absorvância no comprimento de onda de 600 nm.

### **3.2.2.2. Análise do tipo de morte celular induzida por fármacos antineoplásicos**

A morte celular foi avaliada através das características morfológicas por microscopia ótica e recorrendo à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo por citometria de fluxo.

#### **A - Análise da morfologia celular por microscopia ótica**

A morfologia das células em estudo, submetidas ou não a tratamento prévio com os fármacos, nas condições anteriormente descritas, foi analisada por microscopia de luz após realização de esfregaços de células e coloração dos mesmos com May-Grünwald-Giemsa, utilizando um microscópio da marca Zeiss modelo Axioskop2, equipado com câmara fotográfica Zeiss AxioCam ICc3, utilizando o software Axio Vision LE.

Os esfregaços foram preparados a partir da recolha das células previamente incubadas com os fármacos nas condições referidas anteriormente e centrifugadas durante 5 minutos a 200 xg, numa centrifuga de bancada. As células então obtidas foram ressuspensas em meio de cultura para realização de esfregaços e coloração durante 5 minutos com solução de May-Grünwald-Giemsa (preparada em 0.3% de metanol e diluída de 1:1 com água destilada, na altura da utilização), seguida de coloração em solução de Giemsa (1g de corante Giemsa, 66 mL de glicerol e 66 mL de metanol, diluída de 1:8 com água destilada, na altura de utilização). Após lavagem com água destilada, os esfregaços foram secos ao ar e a morfologia das células foi analisada por microscopia ótica.

#### **B- Análise da morte celular por citometria de fluxo após marcação com anexina V e iodeto de propídeo**

A citometria de fluxo é uma técnica que permite analisar e quantificar células ou outras partículas biológicas baseada na dispersão da luz frontal (*forward scatter* – FSC) e lateral (*side scatter* – SSC), emitida por uma fonte de luz (laser de árgon), e pela fluorescência emitida por fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais ou outros compostos (Bernas *et al.*, 2006).

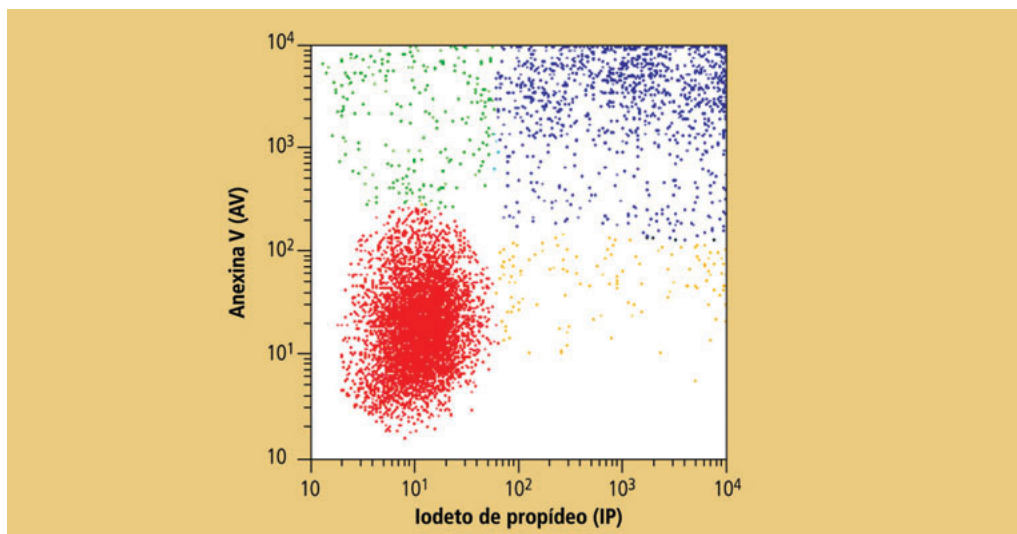
A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo, recorrendo à identificação das células tratadas e não tratadas com os fármacos, nas condições referidas anteriormente, usando o corante Anexina V (ligado à sonda fluorescente alofococianina – Anexina V-APC) em combinação com o iodeto de propídeo (IP). Esta técnica permitiu-nos diferenciar as células viáveis das células não viáveis e, dentro destas, qual o mecanismo que conduziu à morte celular, a apoptose ou a necrose (Gorman, 1997; Darzynkiewicz, 1997).

Uma das características das células em apoptose consiste na alteração da distribuição dos fosfolípidos na bicamada lipídica que constitui a membrana celular. A fosfatidilserina, um fosfolípido de carga negativa, que normalmente se localiza no folheto interno da membrana celular, sofre exteriorização, mantendo-se contudo a integridade da membrana celular. A anexina V é uma molécula com elevada afinidade por fosfolípidos de carga negativa e liga-se especificamente à fosfatidilserina, na presença de cálcio, permitindo determinar a sua localização e fazer a distinção entre células em apoptose e células em necrose (Koopman, 1994; Darzynkiewicz, 1997). Estas últimas são melhor caracterizadas através do aumento de permeabilidade da membrana celular, que permite a entrada na célula do corante iodeto de propídeo que, ao intercalar-se na dupla cadeia de DNA, emite fluorescência e torna possível a identificação dos núcleos das células necróticas (Bartkowiak, 1999). No entanto, a perda da integridade membranar, ou seja, a rutura da membrana celular, ocorre igualmente nas fases mais avançadas da apoptose, permitindo a entrada do iodeto de propídeo.

Quando se expõe uma população celular, simultaneamente a estes dois corantes, anexina V e iodeto de propídeo, as células apoptóticas são coradas (positivas) para a anexina V e não coram (negativas) pelo iodeto de propídeo, as células em apoptose tardia e/ou necrose ficam coradas (positivas) para ambos os fluorocromos, enquanto as células vivas não coram (negativas) com nenhum dos corantes. As células que evoluíram diretamente para necrose coram (positivas) para o iodeto de propídeo e não são coradas para a anexina V (negativas) (Gorman *et al.*, 1997; Aubry *et al.*, 1999; Pozarowski *et al.*, 2003).

Assim, nas células H929 incubadas durante 72 horas na presença dos fármacos nas condições descritas anteriormente, foi avaliada a viabilidade e o tipo de morte celular induzida por estes compostos. Recolheu-se 1 mL de suspensão celular contendo 1 milhão de células e lavou-se com tampão fosfato (PBS) por centrifugação durante 5 minutos a 1000 xg. O sedimento obtido foi processado de acordo com as instruções do kit de deteção de morte celular da Immunotech. O sedimento foi colocado em gelo e ressuspenso em 100 µL de tampão de ligação frio e incubado com 1 µL de anexina V-APC (BD) e 5 µL de iodeto de propídeo (Biolegend), durante 15 minutos ao abrigo da luz. Adicionou-se mais 400 µL de tampão de ligação e procedeu-se à análise num citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com um laser de árgon utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525 nm e de 640 nm, respetivamente para a anexina V e para o iodeto de propídeo.

Foram adquiridas 10 000 células através do programa CellQuest™ e os dados obtidos analisados usando o programa Paint-a-Gate 3.02. Os resultados são expressos em percentagem de células de cada uma das subpopulações identificadas com base na positividade e / ou negatividade de marcação para a anexina V e para o iodeto de propídeo (Sarmiento-Ribeiro A.B., 2000) (Figura 16).



**FIGURA 16** *Dot Plot* representativo da avaliação de morte celular por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com anexina V/iodeto de propídeo.

A vermelho, estão as células viáveis (AV-/IP-); a verde, as células em apoptose inicial (AV+/IP-); a azul, as células em apoptose tardia/necrose (AV+/IP+) e a amarelo, encontram-se representadas as células em necrose (AV-/IP+).

### C - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A aplicação da citometria de fluxo à avaliação da quantidade de DNA celular permite-nos conhecer, num determinado momento, a distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular, G0/G1, S e G2/M. Assim, é possível identificar dois grupos de células, um com menor quantidade de DNA, que corresponde ao pico G0/G1 do histograma de DNA e outro com maior quantidade de DNA, com uma fluorescência dupla da do primeiro grupo, e que corresponde às células em fase G2/M. Entre estes dois grupos, existe um terceiro, com uma quantidade de DNA intermédia e que corresponde às células em fase de síntese deste ácido nucleico (S) (Órfão *et al.*, 1996).

Para avaliar a influência dos fármacos nas condições referidas em 3.2.3., na distribuição das células em estudo pelas diferentes fases do ciclo celular, determinou-se o conteúdo em DNA celular, através da marcação prévia deste com uma sonda fluorescente, iodeto de propídeo, recorrendo ao kit PI/RNase (ImmunoStep) (Krishan, 1975; Riccardi & Nicoletti, 2006).

Esta técnica baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo se intercalar na estrutura do DNA e, quando excitado, com luz de comprimento de onda de 480 nm, fluorescer com um máximo de emissão a 623 nm. A intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA ligado, sendo assim possível avaliar o conteúdo celular em DNA (Krishan, 1975; Riccardi & Nicoletti, 2006).

Assim, recolheu-se  $0,5 \times 10^6$  células da suspensão celular e lavou-se com PBS durante 5 min a 160 xg. O *pellet* foi ressuspensão em 200  $\mu$ L de etanol a 70% frio, enquanto agitado no vórtex, sendo incubado durante 30 minutos no frio, com o objetivo de fixar as células. De seguida, as células foram lavadas novamente com PBS nas mesmas condições de centrifugação. Por fim, colocou-se 300  $\mu$ L de PI/RNase e as células foram analisadas com o mesmo equipamento anteriormente descrito, com comprimentos de onda de emissão de 617 nm e de excitação de 488 nm, recorrendo a um laser de Árgon. Foram adquiridas 25 mil células através do programa CellQuest™ e os dados analisados com recurso ao programa Modfit™. Os resultados representam a média da percentagem de células que se encontram em cada fase do ciclo celular, representando a média  $\pm$  erro-padrão de três a seis ensaios independentes.

### 3.3. Análise estatística dos dados

No presente estudo piloto, realizámos uma análise exploratória com o objetivo de comparar a expressão de moléculas indutoras e inibidoras da apoptose, reguladoras do ciclo celular, fatores de crescimento, proteínas associadas a resistência, assim como alterações na metilação do DNA de diversos genes, entre plasmócitos com fenótipos tumoral e não tumoral de doentes com GM. Pesquisámos associações entre os parâmetros mencionados e as características clínicas, a resposta à terapêutica e a sobrevivência dos doentes com MM. Comparámos o efeito citotóxico de diversos fármacos numa linha celular de MM, *in vitro*, bem como os seus efeitos no ciclo celular e na ativação das caspases.

Nos estudos acima mencionados, foram utilizados testes de normalidade para análise da distribuição das variáveis descritas. De acordo com os resultados, utilizaram-se testes paramétricos nas variáveis com distribuição normal e testes não paramétricos nas outras variáveis.

1. Compararam-se variáveis categóricas com recurso ao teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) e /ou ao teste exato de Fisher, respetivamente.
2. Para comparação de variáveis contínuas, aplicaram-se testes de correlação, segundo os métodos de Pearson (testes paramétricos) e/ou de Spearman (testes não paramétricos).
3. Na comparação entre variáveis contínuas e categóricas, utilizaram-se o teste t

de Student, o teste de Wilcoxon, a ANOVA e a regressão logística.

4. Nas análises de sobrevivência, aplicou-se o método de Kaplan-Meier, com o teste de Log Rank.
5. Para a identificação de *cut-off* ótimo discriminativo nas variáveis contínuas, aplicaram-se testes de sensibilidade e de especificidade, assim como a sua análise pela área sob a curva, através das curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*).
6. Em todos os testes, considerou-se como tendo significado estatístico um valor de  $p$  inferior a um alfa de 0,05.



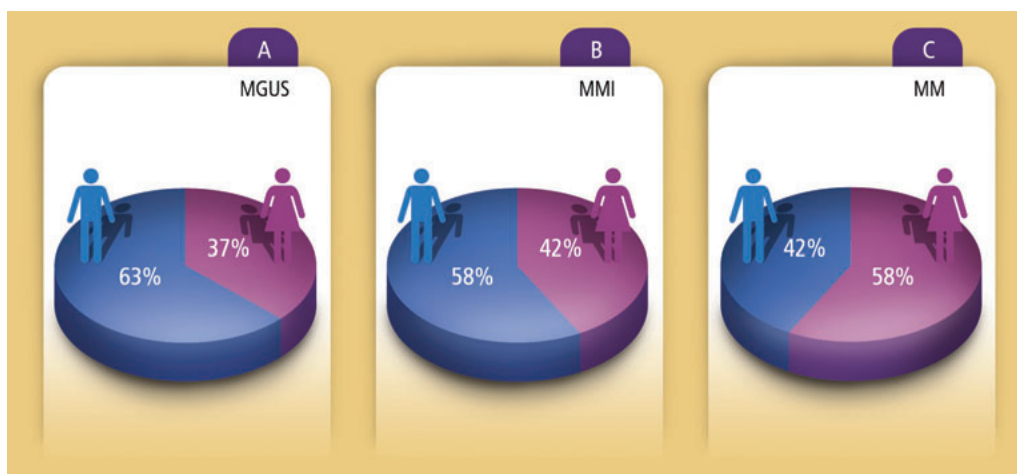
## 4.1. Estudos efetuados na população de doentes com gamopatias monoclonais

### 4.1.1. Caracterização da população de doentes

A população avaliada neste trabalho é constituída por 145 doentes, de raça caucasiana, com GM, dos quais 142 foram estudados ao diagnóstico, estabelecido de acordo com os critérios definidos e revistos pelo IMWG para a classificação de GM (*International Myeloma Working Group, 2014*). Avaliámos também cinco doentes com mieloma múltiplo em recidiva ou refratário (MMRR), dois dos quais já tinham sido estudados ao diagnóstico. Todos os estudos foram realizados em amostras de medula óssea colhida antes de qualquer intervenção terapêutica específica, ao longo de um período de 56 meses (abril de 2010 a novembro de 2014).

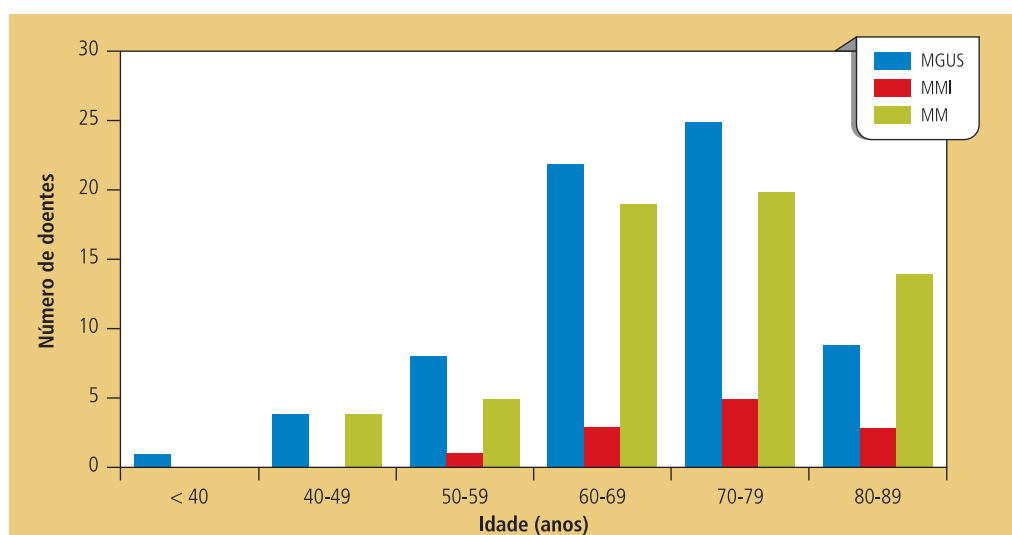
A amostra de 142 doentes com GM, estudados ao diagnóstico, incluiu 62 (44%) doentes com MM, 12 (8%) doentes com MMI e 68 (48%) doentes com MGUS. As análises da distribuição por sexo e por subgrupo etário, ao diagnóstico, estão apresentadas nas [figuras 17 e 18](#), respetivamente.

A análise da distribuição por sexo revelou um predomínio do sexo masculino entre os doentes com MGUS e MMI (63% e 58%, respetivamente) ([Figura 17-A e B](#)), o inverso do observado nos doentes com MM (42% do sexo masculino) ([Figura 17-C](#)). A razão masculino/feminino global é de 1,1. No que respeita à distribuição etária, a [figura 18](#) evidencia uma incidência mais elevada de doentes com MM, MMI e MGUS na década de 70 a 79 anos. Os doentes apresentam uma mediana etária global de 70 anos (39-89). A mediana etária dos doentes com MGUS é de 70 (39-86), com MMI de 73 (58-89), com MM de 70 (41-86) e com MMRR de apenas 56 (44-73) anos.



**FIGURA 17** Distribuição de doentes com gamopatias monoclonais estudados ao diagnóstico, de acordo com o sexo.

Em **A**, doentes com gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS); em **B**, doentes com mieloma múltiplo indolente (MMI) e em **C**, doentes com mieloma múltiplo sintomático (MM).



**FIGURA 18** Distribuição dos doentes com gamopatias monoclonais estudados ao diagnóstico de acordo com o grupo etário.

A verde, estão representados os doentes com mieloma múltiplo sintomático (MM), a vermelho, os doentes com mieloma múltiplo indolente (MMI) e a azul os doentes com gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS).

As características clínicas e analíticas dos doentes com GM encontram-se descritas na [tabela 9](#) e referem-se ao momento do diagnóstico para os subgrupos MGUS, MMI e MM. No caso dos doentes com MMRR, a avaliação foi realizada na recidiva em quatro doentes e após refractariedade à terceira linha terapêutica num doente. Analisámos 11 controlos não neoplásicos (45% do sexo masculino), com uma mediana etária de 64 (52-85) anos.

## Características clínico-laboratoriais dos doentes com gamopatias monoclonais

TABELA 9

		MGUS	MMI	MM	MMRR
Número de doentes, N		68	12	62	5
Sexo M/F, n (%)		43/25 (63/37)	7/5 (58/42)	26/36 (42/58)	0/5 (0/100)
Mediana etária em anos (mín.-máx.)		70 (39-86)	73 (58-89)	70 (41-86)	56 (44-73)
Subtipo de imunoglobulina	IgG, n (%)	45 (66)	8 (67)	31 (50)	3 (60)
	IgA, n (%)	17 (25)	3 (25)	21 (34)	1 (20)
	IgM, n (%)	6 (9)	0	0	0
	IgD, n (%)	0	0	1 (1,5)	0
	Cadeias leves $\kappa$ , n (%)	0	0	6 (10)	1 (20)
	Cadeias leves $\lambda$ , n (%)	0	1 (8)	2 (3)	0
	Não secretor, n (%)	0	0	1 (1,5)	0
Alterações na relação K/L, n (%)		43 (64)	10 (83)	61 (98)	5 (100)
ISS	I, n (%)	NA	NA	30 (48)	NA
	II, n (%)	NA	NA	17 (28)	NA
	III, n (%)	NA	NA	15 (24)	NA
Plasmocitose medular média, % (mín.-máx.)		5 (1-9)	11 (10-19)	28 (3-95)	38 (15-64)
Doença óssea, n (%)		0	0	42 (68)	5 (100)
Hemoglobina sérica média, g/dL (mín.-máx.)		14 (11,2-16)	13,2 (11,6-15,2)	10,3 (7,2-16,1)	11,4 (7,9-12,8)
Anemia presente, n (%)		0	0	45 (73)	2 (40)
Cálcio sérico médio, mg/dL (mín.-máx.)		9,6 (8,7-11,2)	9,5 (8,8-10,5)	9,6 (7,7-13,8)	9,3 (8,6-9,9)
Hipercalecémia presente, n (%)		0	0	7 (11)	0
Albumina sérica média, g/dL (mín.-máx.)		4,4 (3,6-5,1)	4,3 (3,4-4,9)	3,6 (1,9-4,9)	4,1 (3,2-4,5)
Creatinina sérica média, mg/dL (mín.-máx.)		0,9 (0,5-1,7)	1 (0,5-2)	2 (0,3-19,2)	0,7 (0,5-0,8)
Insuficiência renal presente, n (%)		0	0	9 (15)	0
LDH sérica elevada, n (%)		0	0	6 (10)	2 (40)
$\beta$ 2-microglobulina sérica média, $\mu$ g/mL (mín.-máx.)		2,7 (1,3-5,7)	3,2 (1,3-6,2)	10,2 (1,6-69)	2,3 (1,4-3,2)
Doença extramedular, n (%)		0	0	8 (13)	2 (40)

\* MGUS - gamatia monoclonal de significado indeterminado; MMI - mieloma múltiplo indolente; MM - mieloma múltiplo sintomático; MMRR - mieloma múltiplo em recidiva/refratário; NA - não aplicável. n - número de doentes.

Como se pode constatar após a observação da [tabela 9](#), o subtipo de GM predominante foi IgG (50 a 67%), seguido de IgA (20 a 34%); apenas foi estudado um doente com MM IgD e outro com MM não secretor. Dez doentes (oito MM, um MMI e um com MMRR) apresentam GM de cadeias leves, sendo o componente monoclonal  $\kappa$  o mais frequente. Relativamente ao estadiamento, realizado de acordo com os critérios estabelecidos no *International Staging System* (ISS), a maioria dos doentes com MM encontra-se no estágio I (48%), 28% no estágio II e 24% no estágio III. A análise dos critérios CRAB presentes nos doentes com MM ao diagnóstico permite verificar que o mais frequente foi a anemia, em 73% dos casos, seguido das lesões ósseas, em 68% dos doentes. A insuficiência renal e a hipercalecémia foram observadas numa reduzida proporção de doentes com MM

(15% e 11%, respetivamente). A doença extramedular foi documentada em 13% dos doentes com MM ao diagnóstico e em 40% com MMRR (Tabela 9).

A tabela 10 mostra as alterações citogenéticas e as características imunofenotípicas observadas nos doentes com GM. As alterações citogenéticas foram observadas em maior número de doentes com MM relativamente a MGUS (59% vs 26%;  $p=0,001$ ). A anomalia citogenética mais frequentemente encontrada nos doentes com MM e MMI foi a t(14q32), em 40% e 50% dos casos, seguida da del13/13q, em 28% e 25% dos doentes, respetivamente. Nos doentes com MGUS observámos a del13/13q em 16% e a t(14q32) em 10% deste subgrupo. As anomalias do cromossoma 1 (del1p32 e 1q21+) foram observadas em 15% e 20% dos doentes com MM e MMRR, respetivamente. A del17p13.1 foi encontrada em 9% dos doentes com MM, 13% com MMI e 3% com MGUS. Da amostra estudada neste trabalho, apenas 9% dos doentes apresentavam a t(4;14), todos com MM.

A avaliação dos marcadores imunofenotípicos com implicações no prognóstico de doentes com MM mostrou que o CD56 e o CD117 são expressos num elevado número de doentes com GM (80% e 60% dos doentes com MM e 65% e 68% com MGUS, respetivamente). O CD28 é o marcador menos frequentemente encontrado em qualquer dos subtipos de GM estudadas ao diagnóstico (30 a 32%). Para cada marcador imunofenotípico analisado, as diferenças observadas entre os diferentes subgrupos de GM não foram significativas (Tabela 10).

**TABELA 10** Alterações citogenéticas e marcadores imunofenotípicos observados nos doentes com gamopatias monoclonais

	MGUS	MMI	MM	MMRR
<b>Alterações citogenéticas</b>				
Presentes, n/N (%)	8/31 (26)	6/8 (75)	43/58 (59)	4/5 (80)
t(14q32), n/N (%)	3/31 (10)	4/8 (50)	23/58 (40)	3/5 (60)
Del13/13q, n/N (%)	5/31 (16)	2 (25)	16/58 (28)	2/5 (40)
t(11;14), n/N (%)	2/31 (6)	1 (13)	9/58 (16)	1/5 (20)
Alterações no cromossoma 1, n/N (%)	NE	NE	8/55 (15)	1/5 (20)
Delecção 17p13.1, n/N (%)	1/31 (3)	1 (13)	5/58 (9)	1/5 (20)
t(4;14), n/N (%)	0	0	5/58 (9)	0
<b>Marcadores imunofenotípicos</b>				
CD27+, n/N (%)	17/22 (77)	8/10 (80)	25/48 (52)	2/5 (40)
CD28+, n/N (%)	7/22 (32)	3/10 (30)	15/48 (31)	0
CD56+, n/N (%)	29/48 (60)	8/11 (73)	44/55 (80)	3/5 (60)
CD117+, n/N (%)	15/22 (68)	8/10 (80)	31/48 (65)	1/5 (20)

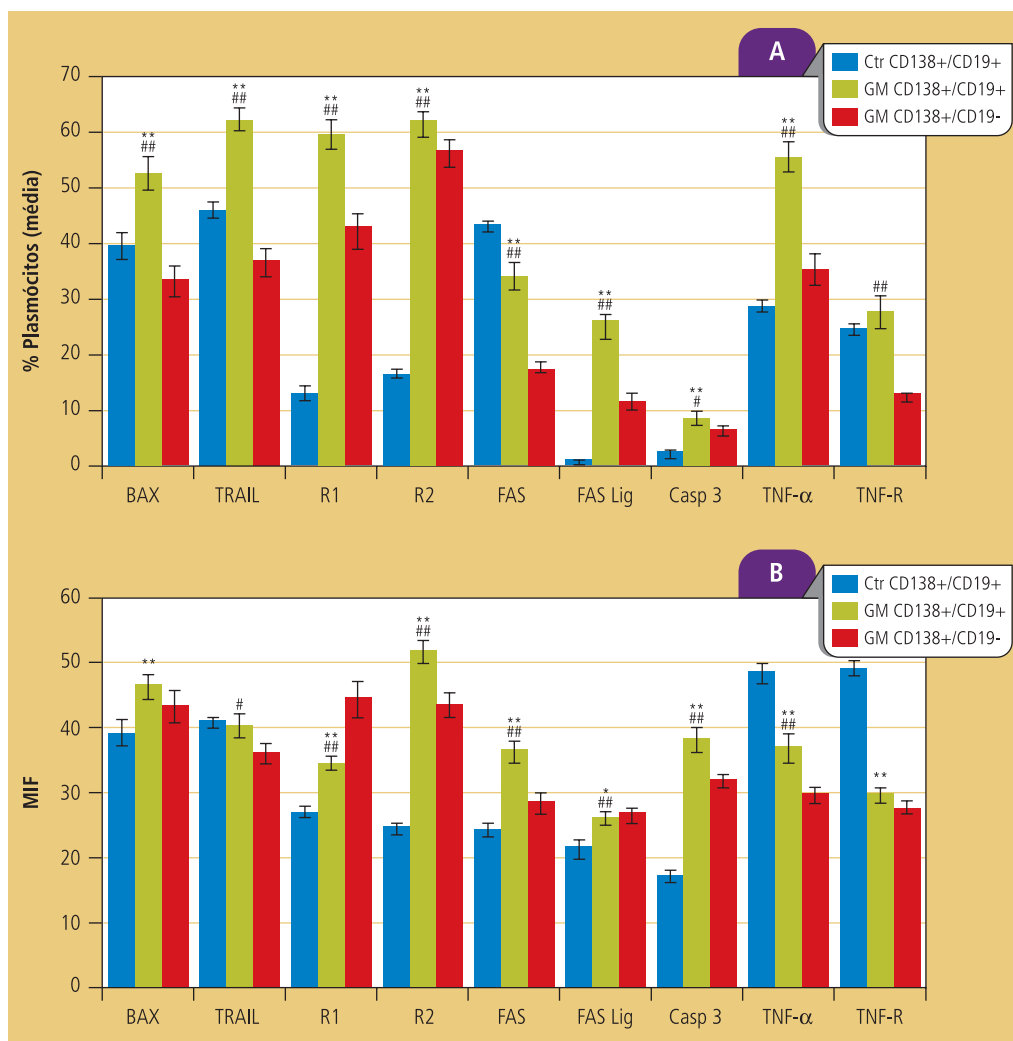
\* MGUS - gamatia monoclonal de significado indeterminado; MMI - mieloma múltiplo indolente; MM - mieloma múltiplo sintomático; MMRR - mieloma múltiplo em recidiva/refratário; n - número de doentes que apresentam alteração citogenética e/ou marcadores imunofenotípicos; N - número de doentes em que foi efetuado o estudo; NE - não efetuado.

#### 4.1.2. Avaliação das moléculas envolvidas na morte celular por apoptose

A apoptose é um mecanismo de morte celular geneticamente programado, que ocorre sob a influência de múltiplas condições fisiológicas e patológicas. A análise das proteínas com funções determinantes na apoptose incluiu proteínas com funções pró-apoptóticas membranares (TRAIL, TRAIL-R1, TRAIL-R2, FAS ligando, FAS, TNF- $\alpha$ , recetor 1 do TNF- $\alpha$ ) e citoplasmáticas (BAX, caspase 3), assim como antiapoptóticas membranares (TRAIL-R3, TRAIL-R4) e citoplasmáticas (BCL-2, survivina). Analisámos, por citometria de fluxo, a percentagem de plasmócitos com os fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- que expressam as proteínas mencionadas, assim como os respetivos níveis de expressão, avaliados em média de intensidade de fluorescência (MIF). Estes resultados traduzem a média das intensidades de fluorescência observadas nas células, a qual é proporcional ao número de moléculas ligadas ao anticorpo. As análises foram realizadas na população de doentes com GM considerada na globalidade comparativamente aos controlos não neoplásicos (Tabelas A1 e A2 do Anexo), assim como nos diversos subgrupos de doentes com GM (MGUS, MMI, MM e MMRR), considerados individualmente, comparados entre si e com os controlos.

No estudo comparativo da expressão das proteínas indutoras da apoptose nos plasmócitos com o fenótipo CD138+/CD19+ entre os doentes com GM e os controlos não neoplásicos, constatámos que, de um modo geral, a percentagem destes plasmócitos que expressa as referidas proteínas é significativamente superior nos doentes relativamente aos controlos não neoplásicos ( $p < 0,05$ ). De igual modo, os níveis de expressão destas proteínas são, na maioria dos casos, superiores nos plasmócitos dos doentes com GM em relação aos controlos ( $p < 0,05$ ), com exceção do TNF e do seu recetor, em que foram encontrados níveis de expressão inferiores nos doentes ( $p < 0,05$ ).

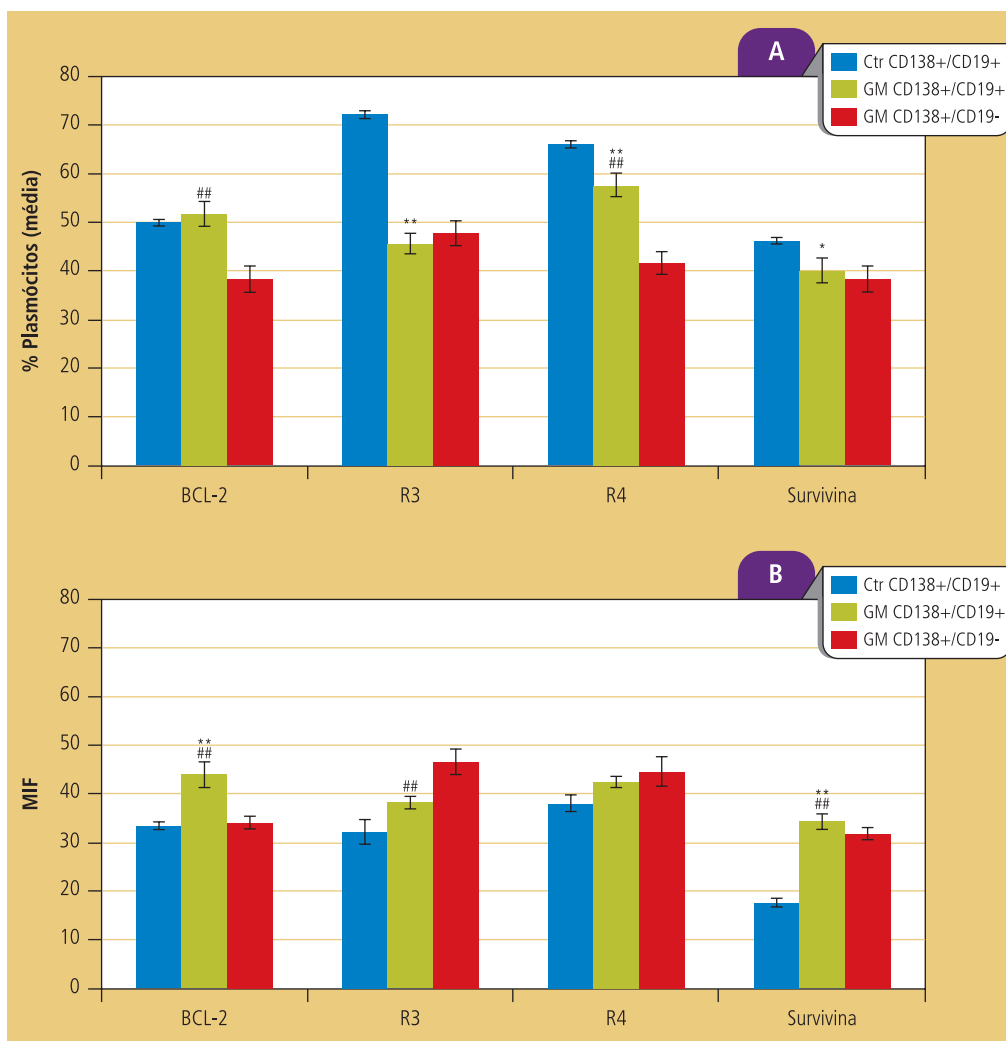
Posteriormente, avaliámos e comparámos, nos doentes com GM, a percentagem de células (Figura 19-A e Tabela A1 do Anexo) e os níveis de expressão (Tabela A1 e Figura 19-B) das proteínas indutoras da apoptose, nas duas populações de plasmócitos com fenótipos distintos. Verificámos que existe uma percentagem significativamente inferior de plasmócitos com o fenótipo considerado patológico (CD138+/CD19-) a expressar qualquer uma das proteínas pró-apoptóticas estudadas relativamente aos plasmócitos com o fenótipo normal (CD138+/CD19+). Além disso, estes plasmócitos apresentam níveis de expressão superiores destas moléculas, com exceção do TRAIL-R1 e do FAS ligando, em que observámos um nível de expressão inferior (Figura 19 e Tabela A1 do Anexo).



**FIGURA 19** Expressão de moléculas pró-apoptóticas em doentes com gamapatias monoclonais e em controlos não neoplásicos.

Em **A**, está representada a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19+ em doentes com gamapatias monoclonais (GM) e em controlos não neoplásicos (Ctr), bem como a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19- em doentes com GM que expressam as proteínas pró-apoptóticas BAX, TRAIL, os recetores de morte do TRAIL, R1 e R2, FAS, FAS ligando (FAS Lig), caspase 3 (Casp 3), TNFα e o seu recetor (TNF-R). Em **B**, estão representados os níveis de expressão das referidas proteínas em cada subtipo de plasmócitos de doentes com GM e em controlos não neoplásicos. Ctr vs GM-CD138+/19+ (\*p<0,05; \*\*p<0,01) e GM-CD138+/CD19- vs GM-CD138+/CD19+ (# p<0,05; ## p<0,01).

No que respeita às proteínas antiapoptóticas TRAIL-R3, TRAIL-R4 e survivina encontramos, nos doentes com GM, uma percentagem inferior de plasmócitos CD138+/CD19+ a expressar estas proteínas relativamente aos controlos, com resultados estatisticamente significativos em todos os casos (p<0,05). Contudo, observamos um aumento significativo dos níveis de expressão das proteínas BCL-2 e survivina nos plasmócitos CD138+/CD19+ dos doentes comparativamente aos controlos (p=0,0001) (Figura 20; Tabela A2 do Anexo).



**Expressão de moléculas antiapoptóticas em doentes com gamapatias monoclonais e em controlos não neoplásicos.**

**FIGURA 20**

Em **A**, está representada a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19+ em doentes com gamapatias monoclonais (GM) e em controlos não neoplásicos (Ctrl) bem como a percentagem de PC CD138+/CD19- em doentes com GM que expressam as proteínas antiapoptóticas BCL-2, os recetores do TRAIL, R3 e R4, e a survivina. Em **B**, estão representados os níveis de expressão das referidas proteínas em cada subtipo de plasmócitos de doentes com GM e em controlos não neoplásicos. Ctrl vs GM-CD138+/19+ (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ) e GM-CD138+/CD19- vs GM-CD138+/CD19+ (#  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ).

Quando analisadas as diferenças entre os plasmócitos com os fenótipos estudados nos doentes com GM, constatámos que existe uma percentagem superior de plasmócitos CD138+/CD19+ que expressa as proteínas BCL-2 e TRAIL-R4 ( $p = 0,0001$ ) (Figura 20-A), evidenciando níveis de expressão igualmente superiores de BCL-2 e de survivina ( $p = 0,0001$ ) e inferiores de TRAIL-R3 ( $p = 0,001$ ) (Figura 20-B e Tabela A2 do Anexo 1).

Após a avaliação inicial das proteínas reguladoras da apoptose, nos doentes com GM em geral, analisámos e comparámos a média da percentagem de plasmócitos



CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- que expressa estas proteínas bem como os respetivos níveis de expressão em doentes com os diferentes subgrupos de GM (Tabelas 11 e 12, Figuras 21, 22).

Nos plasmócitos com fenótipo CD138+/CD19- dos doentes com MGUS, observámos uma diminuição significativa da percentagem de células que expressa a proteína BAX (26,3±3,5%), relativamente aos doentes com MM (38,1±4,2%) e com MMI (49,5±9,4%) (p<0,01 e p<0,05, respetivamente) (Tabela 11-A). De salientar que estes plasmócitos, nos doentes com MM, evidenciam diminuição dos níveis de

**TABELA 11** Avaliação da percentagem (%) e dos níveis de expressão de moléculas pró (A) e antiapoptóticas (B) nos plasmócitos com fenótipo CD138+/CD19- de doentes com MGUS, MMI, MM e MMRR.

	MGUS Média ± EP	MMI Média ± EP	MM Média ± EP	MMRR Média ± EP
<b>A</b> Moléculas pró-apoptóticas				
BAX (%)	26,3 ± 3,5 * ††	49,5 ± 9,4 ††	38,1 ± 4,2 *	33,3 ± 16,3
BAX (MIF)	36,4 ± 1,5 *	43,5 ± 8,1	53,4 ± 5,3 *	46,8 ± 18,4
Caspase 3 (%)	9,3 ± 1,6	5,2 ± 0,8	5,1 ± 0,3	4,9 ± 0,8
Caspase 3 (MIF)	29,9 ± 1,3	39,1 ± 3,2	32,7 ± 1,6	33,6 ± 6,4
TRAIL (%)	37,7 ± 3,2	33,6 ± 9,4	38,1 ± 4	38,2 ± 12,7
TRAIL (MIF)	43,8 ± 2,5 ** ††	32,3 ± 3,9 ††	27,8 ± 1,5 **	28,6 ± 2,7
TRAIL-R1 (%)	40,5 ± 4,6	56,2 ± 10,1	45,7 ± 4,3	41,2 ± 16,1
TRAIL-R1 (MIF)	50,0 ± 4,9	41,4 ± 5,2	46,7 ± 3,9	55,6 ± 17,1
TRAIL-R2 (%)	58,5 ± 4,8	61,4 ± 6,6	58,1 ± 2,8	47 ± 11,0
TRAIL-R2 (MIF)	52,8 ± 2,4 ** ††	37,4 ± 2,7 ††	32,7 ± 1,9 **	36,8 ± 7,2
FAS (%)	19,9 ± 1,7	19,9 ± 4,8	16,2 ± 1,3	19,6 ± 1,7
FAS (MIF)	30 ± 2,1 **	25,7 ± 2,4	24,1 ± 1,4 **	24,4 ± 3,2
FAS Lig (%)	13,3 ± 1,8 **	9,6 ± 4,0	4,9 ± 0,9 **	2,9 ± 1,0
FAS Lig (MIF)	29 ± 1,7 **	25 ± 2,5	23,1 ± 1,0 **	22,4 ± 3,4
TNF-α (%)	34,1 ± 3,5	49,1 ± 7,8	34,5 ± 4,3	30,0 ± 15,6
TNF-α (MIF)	33,1 ± 1,0 **	29,3 ± 3,0	27,6 ± 1,3 **	29,8 ± 4,4
TNF-α Rec (%)	15 ± 0,8 **	14,2 ± 1,8	11,2 ± 0,9 **	10,4 ± 3,0
TNF-α Rec (MIF)	31,6 ± 1,6	26,3 ± 2,3	25,4 ± 0,9	27,4 ± 2,7
<b>B</b> Moléculas antiapoptóticas				
BCL-2 (%)	32,1 ± 3,8	51,8 ± 9,9	39,6 ± 4,5	32,7 ± 15,4
BCL-2 (MIF)	32,2 ± 2,3	34,8 ± 3,8	33,9 ± 1,6	29,2 ± 4,5
Survivina (%)	31,7 ± 3,9	50,4 ± 11,1	39,3 ± 4,9	33,9 ± 17,6
Survivina (MIF)	35,9 ± 2,2 **	28,3 ± 2,6	27,2 ± 1,3 **	25,8 ± 3,1
TRAIL-R3 (%)	50,2 ± 4	63,3 ± 8,6	47,4 ± 4,2	45,3 ± 14,4
TRAIL-R3 (MIF)	64 ± 4,6 ** ††	32,1 ± 3,7 ††	32,9 ± 3,4 **	44 ± 19,2
TRAIL-R4 (%)	42,9 ± 3	52,7 ± 9,6	42,3 ± 4,5	43,3 ± 15,4
TRAIL-R4 (MIF)	57,9 ± 6,3	31,2 ± 3,4	39,1 ± 4	51,6 ± 23,2

Os valores apresentados representam a média da percentagem (%) ± o erro-padrão (EP) de moléculas pró-apoptóticas (A) e antiapoptóticas (B) citoplasmáticas (BAX, caspase 3; BCL-2 e survivina, respetivamente) e membranares (TRAIL, receptores de morte do TRAIL, R1 e R2, FAS, FAS ligando (FAS lig), TNF-α e seu recetor (Rec); Receptores decoy do TRAIL, R3 e R4), assim como os respetivos níveis de expressão, expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) em plasmócitos com o fenótipo CD138+/CD19- de doentes com gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), com mieloma múltiplo indolente (MMI), com mieloma múltiplo sintomático ao diagnóstico (MM), e com mieloma múltiplo em recidiva/refratário (MMRR), de acordo com o descrito na secção *Materiais e Métodos*. MM vs MGUS: \* p<0,05; \*\* p<0,01. MM vs MMI: ¥ p<0,05; ¥¥ p<0,01. MGUS vs MMI: † p<0,05; †† p<0,01.

expressão da maior parte das moléculas pró-apoptóticas avaliadas relativamente aos doentes com MGUS, sendo esta diferença particularmente significativa para o TRAIL, TRAIL-R2, FAS, FAS ligando e TNF- $\alpha$ , ( $p < 0,01$ ) (Tabela 11-A). Além disso, os mesmos plasmócitos nos doentes com MM apresentam também menor expressão das proteínas antiapoptóticas TRAIL-R3 e survivina, quando comparados com os doentes com MGUS ( $32,9 \pm 3,4$  vs  $64 \pm 4,6$  MIF e  $27,2 \pm 1,3$  vs  $35,9 \pm 2,2$  MIF, respetivamente,  $p < 0,01$ ) (Tabela 11-B). Não foram observadas diferenças na percentagem de plasmócitos CD138+/CD19- que expressa moléculas reguladoras da apoptose nem nos seus níveis de expressão entre doentes com MM e com MMI.

**Análise da percentagem (%) e dos níveis de expressão de moléculas pró (A) e antiapoptóticas (B) nos plasmócitos com fenótipo CD138+/CD19+ de doentes com MGUS, MMI, MM, MMRR e em controlos não neoplásicos**

**TABELA 12**

	Controlos Média $\pm$ EP	MGUS Média $\pm$ EP	MMI Média $\pm$ EP	MM Média $\pm$ EP	MMRR Média $\pm$ EP
<b>A Moléculas pró-apoptóticas</b>					
BAX (%)	39,8 $\pm$ 2,5 ##	37,4 $\pm$ 4,1 **	49,6 $\pm$ 7,9	66,2 $\pm$ 4 ## **	59,8 $\pm$ 16,9
BAX (MIF)	40,2 $\pm$ 1,8	51,5 $\pm$ 3,2 *	42,8 $\pm$ 3,7	43,1 $\pm$ 2,3 *	47,4 $\pm$ 12,2
Caspase 3 (%)	2,5 $\pm$ 0,3 §§ ff ##	8,2 $\pm$ 0,9 §§ **	11,8 $\pm$ 2,6 ff	10,4 $\pm$ 1,2 ** ##	6,3 $\pm$ 1,2
Caspase 3 (MIF)	17,4 $\pm$ 0,1 §§ ff ##	31,7 $\pm$ 2 ** †† §§	45,8 $\pm$ 5,1 †† ff	45,3 $\pm$ 3,1 ** ##	39,6 $\pm$ 12,1
TRAIL (%)	46,7 $\pm$ 0,9 f ##	54,2 $\pm$ 3,1 **	64,1 $\pm$ 6,7 f	72,2 $\pm$ 2,5 ** ##	73,5 $\pm$ 7,7
TRAIL (MIF)	41,5 $\pm$ 0,65	34,9 $\pm$ 1,5	38,8 $\pm$ 5,02	45,2 $\pm$ 3,4	43,2 $\pm$ 11,8
TRAIL-R1 (%)	13 $\pm$ 1 §§ ff ##	44,4 $\pm$ 4,2 §§ **	69,3 $\pm$ 3,9 ff	72,2 $\pm$ 2,5 ** ##	64,3 $\pm$ 10,2
TRAIL-R1 (MIF)	27,6 $\pm$ 0,7	37,1 $\pm$ 1,7	33,8 $\pm$ 2,7	32,6 $\pm$ 1,1	35,4 $\pm$ 3,8
TRAIL-R2 (%)	17,1 $\pm$ 0,5 §§ ff ##	56,7 $\pm$ 4 §§	63,3 $\pm$ 5,8 ff	64,9 $\pm$ 3,2 ##	55,8 $\pm$ 12,2
TRAIL-R2 (MIF)	24,4 $\pm$ 0,7 §§ f ##	61,6 $\pm$ 1,9 §§ ** ††	41,8 $\pm$ 4,8 f ††	43,7 $\pm$ 2,2 ## **	46,4 $\pm$ 8,7
FAS (%)	43,4 $\pm$ 0,8	25,6 $\pm$ 2 **	32,5 $\pm$ 7,0	44,3 $\pm$ 4 **	40,3 $\pm$ 13,5
FAS (MIF)	24,6 $\pm$ 0,9 #	38,5 $\pm$ 2,5	37,4 $\pm$ 5,4	35,5 $\pm$ 2,1 #	35,6 $\pm$ 6,4
FAS Lig (%)	1,1 $\pm$ 0,4 §§ ff ##	20,1 $\pm$ 1,8 §§	25,9 $\pm$ 6,6 ff	30,6 $\pm$ 3,7 ##	24,8 $\pm$ 12
FAS Lig (MIF)	21,7 $\pm$ 1,4	27,3 $\pm$ 1,2	25,4 $\pm$ 2,3	25,5 $\pm$ 1,1	22,8 $\pm$ 2,8
TNF- $\alpha$ (%)	28,3 $\pm$ 0,6 § ff ##	48,3 $\pm$ 4,2 §	65 $\pm$ 6,6 ff	62,1 $\pm$ 2,5 ##	53,7 $\pm$ 13,3
TNF- $\alpha$ (MIF)	48,8 $\pm$ 1,7 ## §§	32,6 $\pm$ 2,5 §§ **	47,1 $\pm$ 8,5	40,5 $\pm$ 3,5 ## **	38,8 $\pm$ 11,9
TNF- $\alpha$ Rec (%)	25,4 $\pm$ 0,8 # §	28,7 $\pm$ 3,8 § *	38,1 $\pm$ 11,4	26,1 $\pm$ 4,4 # *	23,1 $\pm$ 15,6
TNF- $\alpha$ Rec (MIF)	50 $\pm$ 1 §§ f ##	29 $\pm$ 1,6 §§	34,3 $\pm$ 4,1 f	29,6 $\pm$ 1,7 ##	28 $\pm$ 5,4
<b>B Moléculas antiapoptóticas</b>					
BCL-2 (%)	50 $\pm$ 0,7	46,4 $\pm$ 4,8	61,1 $\pm$ 6,2	54,7 $\pm$ 3,9	43,5 $\pm$ 15,3
BCL-2 (MIF)	33,6 $\pm$ 0,9	37,3 $\pm$ 2,9 *	42,9 $\pm$ 6,9	47,4 $\pm$ 4 *	38,4 $\pm$ 12,2
Survivina (%)	46,2 $\pm$ 0,75 §§	31,7 $\pm$ 3,1 §§ †	55,8 $\pm$ 10,4 †	43,9 $\pm$ 4,5	37,2 $\pm$ 17,2
Survivina (MIF)	17,8 $\pm$ 1 ## ff §§	40,8 $\pm$ 2,9 §§ **	30,7 $\pm$ 2,7 ff	29,1 $\pm$ 1,9 ## **	27,6 $\pm$ 1,4
TRAIL-R3 (%)	72,5 $\pm$ 0,7 §§	27,4 $\pm$ 2,1 §§ ** ††	51,4 $\pm$ 6,5 ††	61,1 $\pm$ 3 **	55,7 $\pm$ 11,7
TRAIL-R3 (MIF)	32,2 $\pm$ 2,6	38,8 $\pm$ 2	39,7 $\pm$ 4,4	35,4 $\pm$ 1,9	30,8 $\pm$ 5,5
TRAIL-R4 (%)	66,2 $\pm$ 0,8 §§	38 $\pm$ 3 §§ ** ††	66,9 $\pm$ 6,2 ††	74 $\pm$ 2,6 **	67,1 $\pm$ 12,9
TRAIL-R4 (MIF)	37,6 $\pm$ 1,8	41,7 $\pm$ 1,6	46,3 $\pm$ 5,9	43 $\pm$ 1,7	39,2 $\pm$ 6,2

Os valores apresentados representam a média da percentagem (%)  $\pm$  o erro-padrão (EP) de moléculas pró-apoptóticas (A) e antiapoptóticas (B) citoplasmáticas (BAX, caspase 3; BCL-2 e survivina, respetivamente) e membranares (TRAIL, recetores de morte do TRAIL, R1 e R2, FAS, FAS ligando (FAS Lig), TNF- $\alpha$  e seu recetor (Rec); Recetores decoy do TRAIL, R3 e R4), assim como os respetivos níveis de expressão, expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) em plasmócitos com o fenótipo CD138+/CD19+ em doentes com gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), com mieloma múltiplo indolente (MMI), com mieloma múltiplo sintomático ao diagnóstico (MM), com mieloma múltiplo em recidiva/refratário (MMRR) e em controlos não neoplásicos, de acordo com o descrito na secção *Materiais e Métodos*. MM vs MGUS: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . MM vs Controlo: #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ . MM vs MMI: ¥  $p < 0,05$ ; ¥¥  $p < 0,01$ . MGUS vs MMI: †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ . MGUS vs Controlo: §  $p < 0,05$ ; §§  $p < 0,01$ . MMI vs Controlo: f  $p < 0,05$ ; ff  $p < 0,01$ .

Pelo contrário, nos plasmócitos com fenótipo CD138+/CD19+ dos doentes com MM observa-se, em geral, aumento da percentagem e/ou dos níveis de expressão destas moléculas relativamente aos controlos ( $p < 0,01$ ), com exceção dos níveis de expressão de TNF- $\alpha$  e do seu recetor (TNF- $\alpha$  Rec), que são inferiores nos doentes com MM e com MGUS, em relação aos controlos ( $p < 0,01$ ) (Tabela 12-A). Verificámos também que a percentagem destes plasmócitos que expressa TRAIL, os recetores de morte TRAIL-R1 e -R2, FAS ligando, caspase 3 e TNF- $\alpha$  é significativamente superior nos doentes com MM e com MMI comparativamente aos controlos ( $p < 0,01$ ) (Tabela 12-A).

Quando comparámos a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19+ e/ou os respectivos níveis de expressão entre os doentes com GM, verificámos que as proteínas BAX, caspase 3, FAS, TRAIL e TRAIL-R1 apresentam valores superiores nos doentes com MM relativamente aos doentes com MGUS ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, e tal como mencionado em relação aos plasmócitos tumorais, não foram encontradas diferenças na expressão das moléculas reguladoras da apoptose nos plasmócitos CD138+/CD19+, entre a população com MM e com MMI (Tabela 12).

Em suma, a análise das tabelas 11 e 12 permite constatar que, nos plasmócitos com fenótipo considerado normal (CD138+/CD19+), se observam maiores diferenças na expressão de moléculas reguladoras da apoptose, entre doentes com GM (principalmente entre MM e MGUS) e destes em relação aos controlos, do que no caso dos plasmócitos CD138+/CD19-.

Após a avaliação individual das moléculas reguladoras da apoptose em cada subtipo fenotípico de plasmócitos, prosseguimos o nosso trabalho com a análise comparativa da expressão destas proteínas entre plasmócitos com os fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19-, nos diferentes subgrupos de GM e entre os plasmócitos neoplásicos dos doentes e os dos controlos, como demonstrado nas figuras 21 e 23. Nestas figuras, estão apenas representadas as moléculas que apresentaram resultados estatisticamente significativos em, pelo menos, um subgrupo de GM.

Como se pode verificar na figura 21, a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19- que expressa os ligandos indutores de morte da família do TNF e os respectivos níveis de expressão apresentam valores, de um modo geral, inferiores aos encontrados nos plasmócitos CD138+/CD19+, nos diversos subgrupos de GM, atingindo significado estatístico maioritariamente nos doentes com MM e com MGUS ( $p < 0,01$ ). Podemos observar ainda, na mesma figura, que nos doentes com MM, a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19- que expressa caspase 3, assim como os seus níveis de expressão são inferiores aos observados nos plasmócitos CD138+/CD19+ ( $p < 0,05$ ). À semelhança do descrito para esta molécula, também a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19+ com expressão de BAX e de FAS ligando é superior à de plasmócitos CD138+/CD19-, nos doentes com MM e com MGUS ( $p < 0,01$ ) (Figura 21).

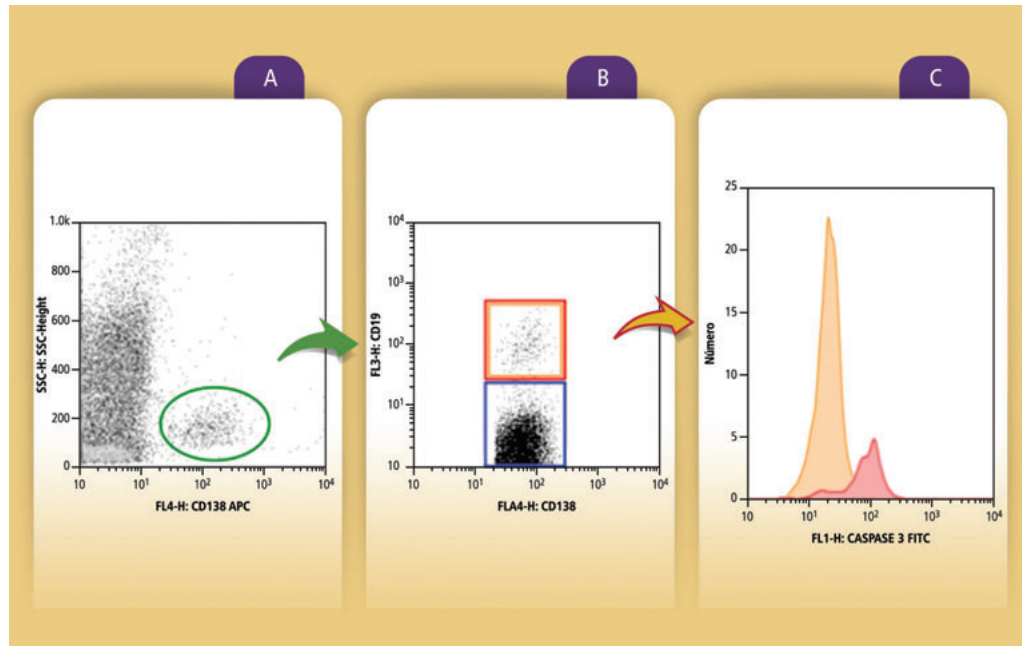


**Avaliação de ligandos de morte da família do TNF, de caspase 3 e de BAX nos plasmócitos com fenótipo normal e neoplásico em doentes com gamopatias monoclonais e em controlos não neoplásicos, por citometria de fluxo.**

**FIGURA 21**

Está representada a média ± EP da percentagem de células (%) que expressam TRAIL, FAS, FAS Ligando, TNF-α, caspase 3 e BAX e dos níveis de expressão respetivos, expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF). As moléculas referidas na figura foram avaliadas nos plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ (a verde) e CD138+/CD19- (a vermelho), em doentes com MGUS, MMI, MM, MMRR e controlos (Ctr), de acordo com o descrito na secção de *Materiais e Métodos*. Estão representadas apenas as moléculas com diferenças estatisticamente significativas entre plasmócitos com os dois fenótipos nos doentes com gamopatias monoclonais (GM) (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01) e entre os plasmócitos dos controlos e os plasmócitos CD138+/CD19- de doentes com GM. Ctr vs MM: # p < 0,05; ## p < 0,01. Ctr vs MGUS: § p < 0,05; §§ p < 0,01. Ctr vs MMI: f p < 0,05; ff p < 0,01.

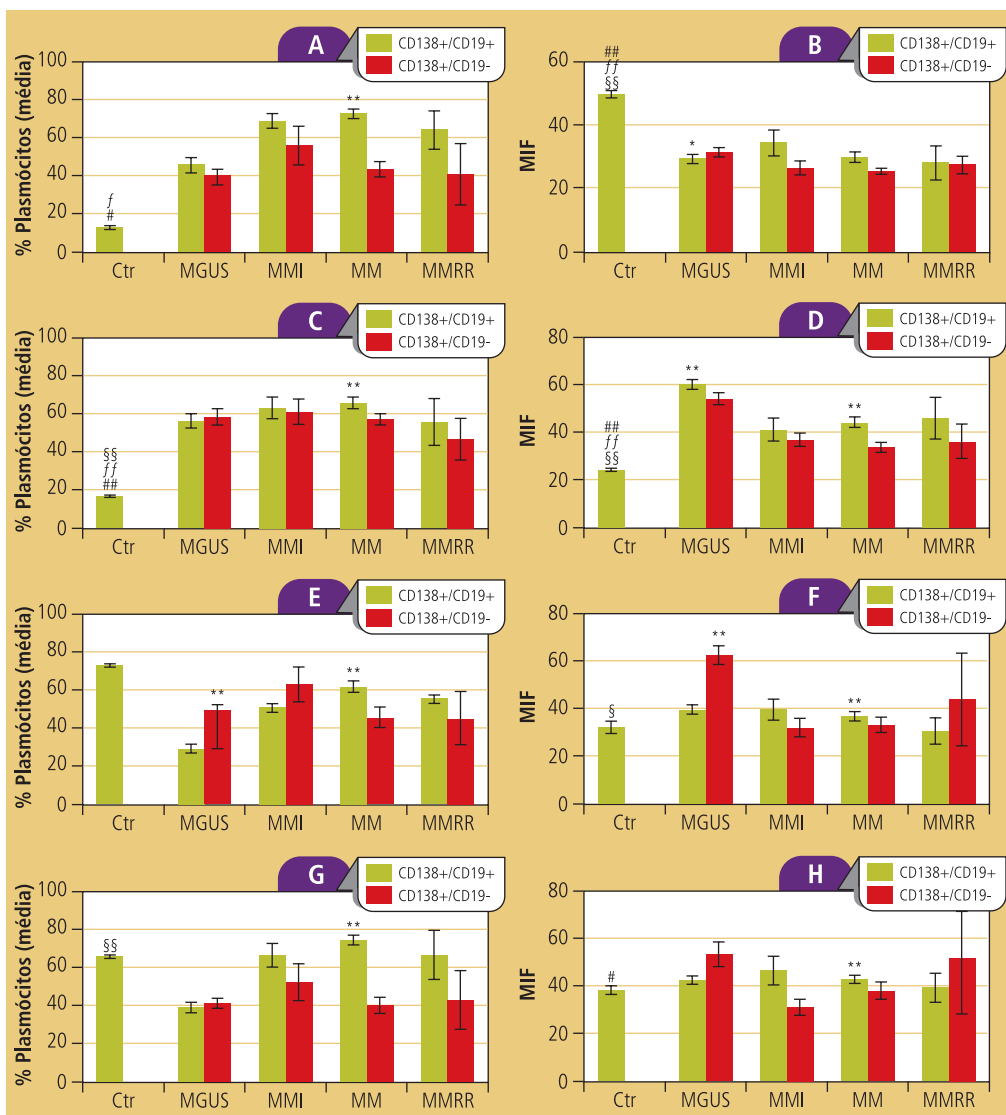
Na [figura 22](#), apresenta-se um exemplo de dois *dot plots* e de um histograma representativos da análise da expressão de caspase 3, por citometria de fluxo, nos plasmócitos CD138+/CD19+ de um doente com MM e de um controlo não neoplásico.



**FIGURA 22** Avaliação da expressão de caspase 3 num doente com MM e num controlo não neoplásico por citometria de fluxo.

Em **A**, mostra-se a seleção da população de plasmócitos (círculo verde) e em **B**, o *gate* nos plasmócitos não neoplásicos, CD138+/CD19+ de um doente com MM (quadrado vermelho) e de um controlo (quadrado interior laranja) e neoplásicos do mesmo doente, CD138+/CD19- (quadrado azul). Em **C**, está representada a expressão de caspase 3 na população de plasmócitos com fenótipo normal do doente com MM (a vermelho) e do controlo (a laranja).

Nos doentes com MM, a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19- que expressa os recetores do TRAIL, R1, R2, R3 e R4, assim como os níveis de expressão de R2, R3 e R4 são significativamente inferiores em relação aos dos plasmócitos CD138+/CD19+ dos doentes ( $p < 0,01$ ) e superiores aos dos controlos, apenas para a percentagem de plasmócitos que expressa R1 e R2 ( $p < 0,05$ ), como podemos observar na [figura 23](#). No subgrupo com MGUS, os níveis de expressão de R2 e R3 nos plasmócitos CD138+/CD19- são superiores aos dos controlos; quando comparamos os subtipos de plasmócitos, verificamos que a expressão de R2 é inferior nos plasmócitos CD138+/CD19- relativamente aos CD138+/CD19+ dos doentes, observando-se o oposto para o recetor R3 do TRAIL ( $p < 0,05$ ).



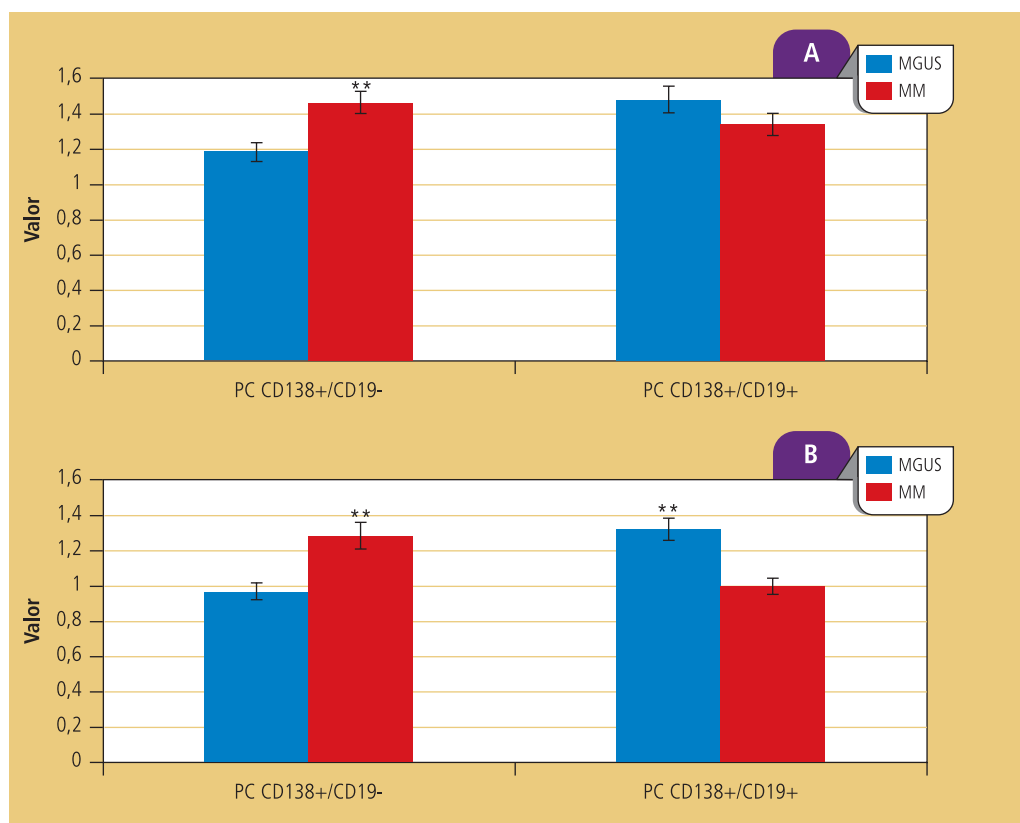
**Avaliação de recetores do TRAIL nos plasmócitos com fenótipo normal e neoplásico em doentes com gamapatia monoclonal e em controlos não neoplásicos por citometria de fluxo.**

**FIGURA 23**

Em **A, C, E e G** está representada a percentagem de células (%) que expressam os recetores do TRAIL, R1, R2, R3 e R4 e em **B, D, F e H**, os respetivos níveis de expressão avaliados em média de intensidade de fluorescência (MIF). As moléculas referidas na figura foram avaliadas nos plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ (a verde) e CD138-/CD19- (a vermelho), em doentes com MGUS, MMI, MM, MMRR e controlos (Ctr), de acordo com o descrito na secção de *Materiais e Métodos*. Estão representadas apenas as moléculas com diferenças estatisticamente significativas entre plasmócitos com os dois fenótipos nos doentes com gamopatias monoclonais (GM) (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) e entre os plasmócitos dos controlos e os plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes (Ctr vs MM: #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ . Ctr vs MGUS: §  $p < 0,05$ ; §§  $p < 0,01$ . Ctr vs MMI: f  $p < 0,05$ ; ff  $p < 0,01$ ).

Em suma, os plasmócitos com fenótipo característico de malignidade (CD138+/CD19-) dos doentes com GM evidenciam uma menor tendência para a apoptose, traduzida numa diminuição da expressão de moléculas pró-apoptóticas, nomeadamente de TRAIL, TRAIL-R2, FAS, caspase 3 e TNF- $\alpha$  (24,1 a 39,8 MIF) relativamente aos plasmócitos com fenótipo CD138+/CD19+ (35,5 a 45,9 MIF), nos doentes com MM e de BAX, TRAIL-R2, FAS e TNF- $\alpha$ , nos doentes com MGUS ( $p < 0,05$ ) (Figuras 21 e 23).

Uma vez que a sensibilidade e/ou a resistência das células à morte é influenciada pelo balanço entre as moléculas pró e antiapoptóticas, para além do estudo individual de cada uma das proteínas, analisámos a razão entre os níveis de expressão das moléculas indutoras e inibidoras da apoptose que evidenciaram significado estatístico nos nossos estudos prévios. Como podemos observar na [figura 24-A](#), a razão entre as moléculas BAX+caspase3+R1+R2+FAS e BCL-2+R3+R4+survivina evidenciou diferenças significativas nos plasmócitos CD138+/CD19- entre os subgrupos de GM, sendo mais elevada nos doentes com MM ( $1,47 \pm 0,06$ ) relativamente aos doentes com MGUS ( $1,19 \pm 0,04$ ;  $p=0,008$ ). A análise da razão entre os recetores pró e antiapoptóticos do TRAIL (R1+R2/R3+R4) mostram diferenças entre os doentes com MM e com MGUS nos dois subtipos de plasmócitos ( $p < 0,01$ ) ([Figura 24-B](#)).



**FIGURA 24** Avaliação da razão entre as moléculas pró-apoptóticas e antiapoptóticas citoplasmáticas e membranares nos plasmócitos com fenótipos normal e neoplásico em doentes com gamapatia monoclonal e em controlos não neoplásicos.

Em **A**, está representada a razão entre a média de intensidade de fluorescência (MIF) de BAX+caspase3+R1+R2+FAS/BCL-2+survivina+R3+R4; e em **B**, a razão entre os recetores do TRAIL pró-apoptóticos (R1 e R2) e antiapoptóticos (R3 e R4). Os resultados representam a média  $\pm$  EP das razões entre os níveis de expressão das moléculas representadas na figura avaliadas nos plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ (a azul) e CD138+/CD19- (a vermelho), em doentes com MGUS e MM. \*\*  $p < 0,01$ .



### 4.1.3. Análise da expressão de moléculas reguladoras do ciclo celular

As proteínas P53 e ciclina D1 desempenham funções reguladoras do ciclo celular, entre outras, e a sua expressão encontra-se frequentemente alterada no MM.

Quando analisámos os doentes com GM em geral, verificámos que a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19+ que expressa ciclina D1 e P53, assim como os seus níveis de expressão, são significativamente superiores em relação aos plasmócitos CD138+/CD19- ( $p=0,0001$ ), sendo o nível de expressão de ciclina D1 inferior e o de P53 superior ao dos controlos ( $p=0,03$  e  $p=0,008$ , respetivamente) (Tabela A3, Anexo).

Os resultados da análise das proteínas supracitadas nos subgrupos de doentes com GM encontram-se descritos detalhadamente na [tabela 13](#) e representados graficamente para uma melhor visualização das diferenças na expressão das referidas moléculas entre os plasmócitos com os fenótipos estudados na [figura 25](#).

Na [tabela 13](#), podemos verificar que, nos doentes com MM, a ciclina D1 e a P53 apresentam um nível de expressão inferior ao observado nos doentes com MGUS, nos dois subtipos de plasmócitos analisados ( $p<0,01$ ). Nos doentes com MMI, a percentagem destes plasmócitos que expressa ciclina D1 é superior à encontrada nos doentes com MGUS ( $p<0,01$ ) e inferior à dos doentes com MM, neste caso apenas nos plasmócitos não tumorais ( $p<0,05$ ). Pelo contrário, os níveis de expressão desta molécula, no mesmo subtipo de plasmócitos, foi inferior nos doentes com MMI comparativamente aos doentes com MGUS ( $p<0,01$ ).

**Avaliação da percentagem (%) e dos níveis de expressão (MIF) de ciclina D1 e de P53 nos plasmócitos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- de doentes com MGUS, MMI, MM, MMRR e de controlos não neoplásicos**

**TABELA 13**

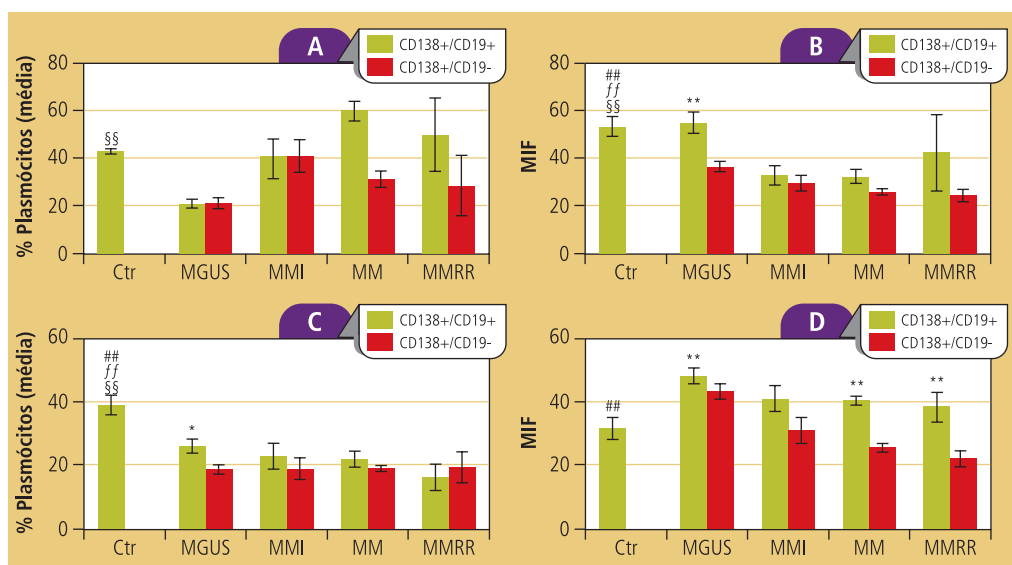
	Controlos Média ± EP	MGUS Média ± EP	MMI Média ± EP	MM Média ± EP	MMRR Média ± EP
<b>Plasmócitos PC-CD138+/CD19+</b>					
Ciclina D1 (%)	43 ± 1 §§	20 ± 1,8 §§ **	39,9 ± 8,5 ¥	58,5 ± 4,3 ¥ **	50,3 ± 15,7
Ciclina D1 (MIF)	54,9 ± 4,2	54,3 ± 4,1 ** ††	32,7 ± 4 ††	31,8 ± 3 **	42,4 ± 16,3
P53 (%)	38,2 ± 3,2 § ff ##	24,2 ± 2 §	22,8 ± 4,2 ff	18,9 ± 1,5 ##	16,1 ± 4,2
P53 (MIF)	32,4 ± 3,9 ## §	46,8 ± 2,5 ** §	40,1 ± 4,1	40,2 ± 1,4 ** ##	38,4 ± 4,8
<b>Plasmócitos PC-CD138+/CD19-</b>					
Ciclina D1 (%)	–	21,5 ± 2,7 †	41,1 ± 7,1	32,8 ± 3,4	28,5 ± 12,7
Ciclina D1 (MIF)	–	35 ± 1,8 **	29,5 ± 3,3	25,3 ± 1,1 **	24,4 ± 2,6
P53 (%)	–	17,4 ± 1,3	18,7 ± 3,4	17,9 ± 1,5	19,2 ± 4,9
P53 (MIF)	–	39,3 ± 2,6 **	30,9 ± 4,1	25,2 ± 1,3 **	22 ± 2,49

Os valores referidos representam a média da percentagem (%) ± o erro-padrão (EP) de moléculas reguladoras do ciclo celular (ciclina D1 e P53), assim como os respetivos níveis de expressão, expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) em plasmócitos com os fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- em doentes com gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), com mieloma múltiplo indolente (MMI), com mieloma múltiplo sintomático ao diagnóstico (MM), com mieloma múltiplo em recidiva/refratário (MMRR) e em controlos não neoplásicos (Ctr), de acordo com o descrito na secção *Materiais e Métodos*. MM vs MGUS: \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ . MM vs Controlo: #  $p<0,05$ ; ##  $p<0,01$ . MM vs MMI: ¥  $p<0,05$ ; ¥¥  $p<0,01$ . MGUS vs MMI: †  $p<0,05$ ; † †  $p<0,01$ . MGUS vs Ctr: §  $p<0,05$ ; § §  $p<0,01$ . MMI vs Ctr: f  $p<0,05$ ; ff  $p<0,01$ .

Além disso, os níveis de expressão de P53 nos plasmócitos CD138+/CD19+ dos doentes com MM e MGUS são superiores aos observados nos controlos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 13).

Em suma, as maiores diferenças na expressão da ciclina D1 e da proteína P53 foram observadas essencialmente ao nível dos plasmócitos com fenótipo não clonal que, para além de serem diferentes entre os doentes com os vários subtipos de GM, como referido, são igualmente diferentes dos plasmócitos com igual fenótipo, mas de controlos não neoplásicos (Tabela 13, Figura 25).

Quando comparamos a ciclina D1 e a P53 nos dois subtipos fenotípicos de plasmócitos de doentes com GM, verificamos que, em geral, a percentagem de plasmócitos com fenótipo CD138+/CD19- que expressa estas proteínas, bem como os níveis de expressão, são tendencialmente inferiores em comparação com o observado nos plasmócitos com fenótipo CD138+/CD19+, quer dos doentes quer dos controlos não neoplásicos, sendo significativo em relação a estes últimos ( $p < 0,01$ ) (Figura 25).



**FIGURA 25**

**Análise comparativa de moléculas reguladoras do ciclo celular nos plasmócitos com fenótipo normal e neoplásico em doentes com gamapatia monoclonal e em controlos não neoplásicos por citometria de fluxo.**

Em **A** e **C** está representada a percentagem de células (%) que expressam ciclina D1 e P53 e, em **B** e **D**, os seus níveis de expressão expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) respetivamente. Os resultados representam a média  $\pm$  EP da percentagem de plasmócitos com fenótipo CD138+/CD19+ (a verde) e CD138+/CD19- (a vermelho) que expressam as moléculas representadas e os respetivos níveis de expressão, em doentes com MGUS, MMI, MM, MMRR e em controlos (Ctr), de acordo com o descrito na secção de *Materiais e Métodos*. Estão representadas as diferenças estatisticamente significativas entre plasmócitos com os dois fenótipos nos doentes (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) e entre os plasmócitos dos Ctr e os plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes (Ctr vs MM: #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ . Ctr vs MGUS: §  $p < 0,05$ ; §§  $p < 0,01$ . Ctr vs MMI: f  $p < 0,05$ ; ff  $p < 0,01$ ).

#### 4.1.4. Análise da expressão do NF-κB e dos conjugados da ubiquitina

Os proteasomas são proteases multicatalíticas responsáveis pela principal via não lisosómica de degradação de proteínas intracelulares, nomeadamente proteínas desnaturadas, oxidadas ou danificadas, que já não são necessárias nas células. Além disso regula, entre outras funções, os níveis intracelulares de proteínas envolvidas na ativação da transcrição, como o fator transcripcional NF-κB. As proteínas degradadas na via ubiquitina-proteasoma têm que ser previamente conjugadas com uma proteína de baixo peso molecular, a ubiquitina. Neste sentido, fomos avaliar os níveis de NF-κB e de proteínas ubiquitinadas nos doentes com GM e nos controlos não neoplásicos (Tabela 14 e Figura 26).

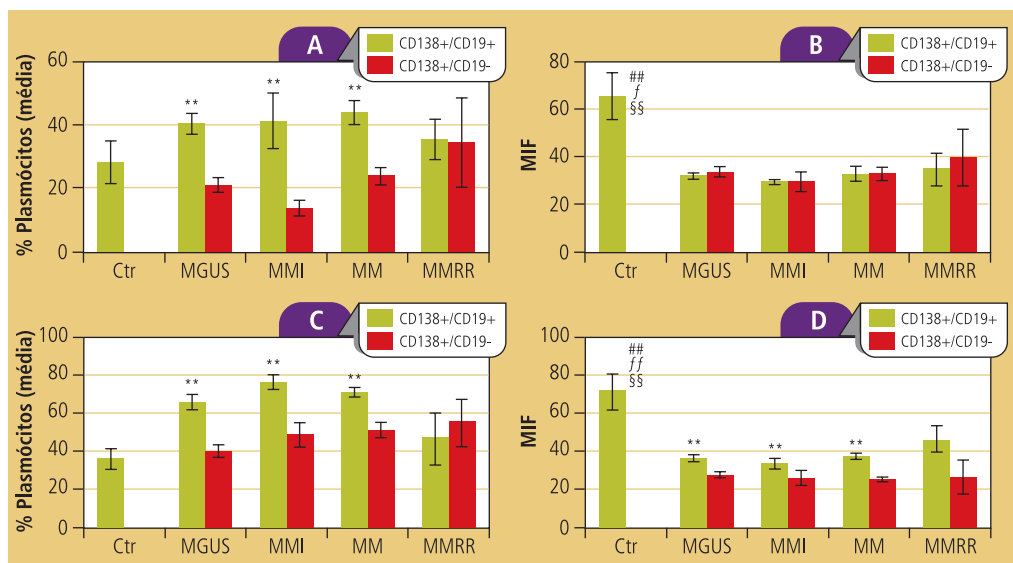
Como se pode observar na tabela A4 (Anexo), os níveis de expressão dos conjugados de ubiquitina (UBQ) e do NF-κB são inferiores (cerca de 50%) nos plasmócitos CD138+/CD19+ dos doentes com GM em geral em relação aos controlos ( $p=0,008$  e  $p=0,004$ , respetivamente). Além disso, na população de doentes com GM, existe uma maior percentagem de plasmócitos CD138+/CD19+ que expressa UBQ e NF-κB, relativamente aos plasmócitos CD138+/CD19- e, no caso do NF-κB, também em relação aos controlos ( $p=0,0001$ ). No entanto, entre os subgrupos de doentes com GM, não encontramos diferenças significativas na percentagem de plasmócitos que expressa UBQ ou NF-κB nem nos respetivos níveis de expressão. Em relação aos controlos, observámos uma percentagem superior de plasmócitos CD138+/CD19+ que expressam NF-κB nos doentes com MGUS, MMI e MM ( $p<0,05$ ) (Tabela 14).

**Avaliação da expressão dos conjugados de ubiquitina (UBQ) e do fator NF-κB em plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- em doentes com MGUS, MMI, MM, MMRR e em controlos**

**TABELA 14**

	Controlos Média ± EP	MGUS Média ± EP	MMI Média ± EP	MM Média ± EP	MMRR Média ± EP
<b>Conjugados de Ubiquitina e NF-κB PC-CD138+/CD19+</b>					
UBQ (%)	29,4 ± 7,1	42 ± 3,6	40,8 ± 8,6	42 ± 3,7	41,6 ± 12
UBQ (MIF)	64,5 ± 10,7 ## f §§	31,8 ± 1,5 §§	29,4 ± 1,2 f	32,9 ± 2,8 ##	35,2 ± 6,3
NF-κB (%)	37,4 ± 6 ## ff §§	67,1 ± 3,2 §§	76,2 ± 3,3 ff	69,9 ± 2,9 ##	47,2 ± 13,2
NF-κB (MIF)	69,6 ± 10,2 ## f §§	36 ± 1,5 §§	33,3 ± 1,9 f	38,9 ± 1,5 ##	46 ± 7,4
<b>Conjugados de Ubiquitina e NF-κB PC-CD138+/CD19-</b>					
UBQ (%)	–	21,3 ± 2,8	13,7 ± 2,5	21,5 ± 2,6	34,1 ± 13,9
UBQ (MIF)	–	33,5 ± 2,5	29,5 ± 4,2	33,5 ± 3	40 ± 11,4
NF-κB (%)	–	40,2 ± 3,3	48,7 ± 5,7	53,5 ± 3,2	55,7 ± 12,7
NF-κB (MIF)	–	27,8 ± 1,5	25,9 ± 2,4	25 ± 1,3	26 ± 4,1

Os valores referidos representam a média da percentagem (%) ± o erro-padrão (EP) de conjugados de ubiquitina (UBQ) e de NF-κB, assim como os respetivos níveis de expressão, expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) em plasmócitos com os fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- em doentes com gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), com mieloma múltiplo indolente (MMI), com mieloma múltiplo sintomático ao diagnóstico (MM), com mieloma múltiplo em recidiva/refratário (MMRR) e em controlos não neoplásicos (Ctr), de acordo com o descrito na secção *Materiais e Métodos*. MM vs MGUS: \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ . MM vs Controlo: #  $p<0,05$ ; ##  $p<0,01$ . MM vs MMI: ¥  $p<0,05$ ; ¥¥  $p<0,01$ . MGUS vs MMI: ‡  $p<0,05$ ; ‡‡  $p<0,01$ . MGUS vs Ctr: §  $p<0,05$ ; §§  $p<0,01$ . MMI vs Ctr: f  $p<0,05$ ; ff  $p<0,01$ .



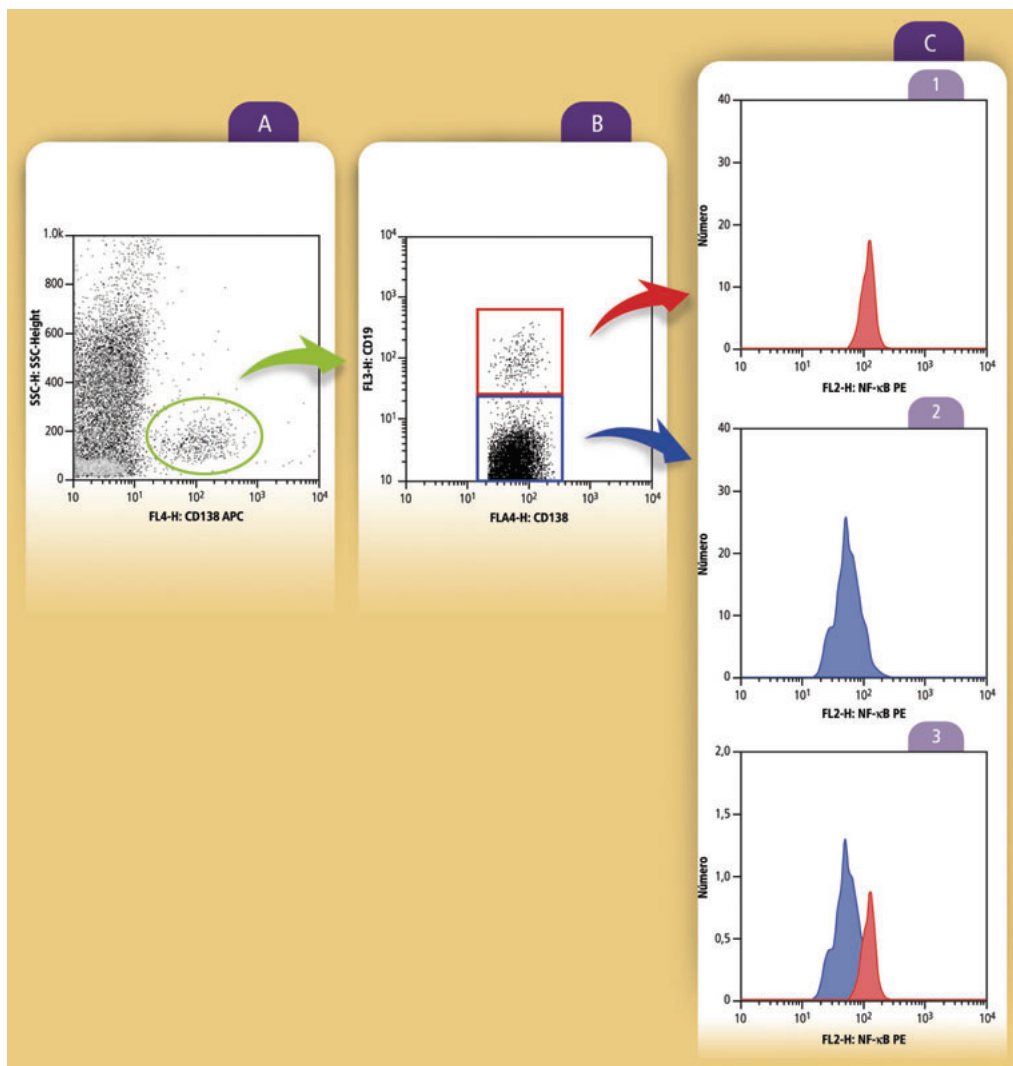
**FIGURA 26** Análise dos conjugados de ubiquitina (UBQ) e do fator de transcrição NF-κB nos plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19-.

Em **A** e **C** está representada a percentagem de células (%) que expressam UBQ e NF-κB; em **B** e **D**, os seus níveis de expressão avaliados em média de intensidade de fluorescência (MIF), respetivamente. Os resultados representam a média ± erro-padrão referente às moléculas representadas na figura e avaliadas nos plasmáticos com fenótipo CD138+/CD19+ (a verde) e CD138+/CD19- (a vermelho), em doentes com MGUS, MMI, MM, MMRR e em controlos (Ctr), de acordo com o descrito na secção de *Materiais e Métodos*. Estão representadas as diferenças estatisticamente significativas entre os plasmócitos com os dois fenótipos nos doentes (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) e entre os plasmócitos dos Ctr e os plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes (Ctr vs MM: #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ . Ctr vs MGUS: §  $p < 0,05$ ; §§  $p < 0,01$ . Ctr vs MMI: f  $p < 0,05$ ; ff  $p < 0,01$ ).

No que respeita aos níveis de expressão de NF-κB e de UBQ neste subtipo fenotípico, estes são inferiores nos doentes com MM, MMI e MGUS relativamente aos controlos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 14).

O estudo comparativo entre os plasmócitos com os dois fenótipos analisados, representado na figura 26 revelou que, nos doentes com MM, MMI e MGUS, a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19+ que expressa UBQ e NF-κB é significativamente superior à observada para os plasmócitos CD138+/CD19- ( $p < 0,01$ ), tal como os níveis de expressão, apenas para o caso do NF-κB ( $p < 0,05$ ). A figura 26 evidencia ainda que os níveis de expressão de UBQ e de NF-κB são significativamente inferiores nos plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes acima mencionados, relativamente aos controlos não neoplásicos ( $p < 0,05$ ).

Na figura 27, observa-se um exemplo representativo da análise da expressão de NF-κB, por citometria de fluxo, nos plasmócitos CD138+/CD19- e CD138+/CD19+ de um doente com MM.



**Avaliação da expressão de NF- $\kappa$ B num doente com MM por citometria de fluxo.**

**FIGURA 27**

Em **A**, mostra-se a seleção da população de plasmócitos (círculo verde) e em **B**, o *gate* nos plasmócitos neoplásicos, CD138+/CD19- (quadrado azul) e não clonais, CD138+/CD19+ (quadrado vermelho). Em **C1** e **C2**, está representada a expressão de NF- $\kappa$ B referente a cada uma das populações de plasmócitos e em **C3** a expressão conjunta nas duas populações.

#### 4.1.5. Análise da expressão de moléculas inflamatórias e reguladoras da angiogénese

A inflamação e a angiogénese medular desempenham um papel crucial na etiopatogenia do MM. Deste modo, analisámos a expressão de moléculas inflamatórias (IL-6 e o seu recetor) e reguladoras da angiogénese (VEGF e o seu recetor) nos plasmócitos com os dois fenótipos já descritos.

Na avaliação global dos doentes com GM, verificámos que a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19+ que expressa IL-6, VEGF, os recetores destas duas proteínas, assim como os respetivos níveis de expressão são significativamente superiores nos doentes relativamente aos controlos ( $p < 0,05$ ) (Tabela A5, Anexo).

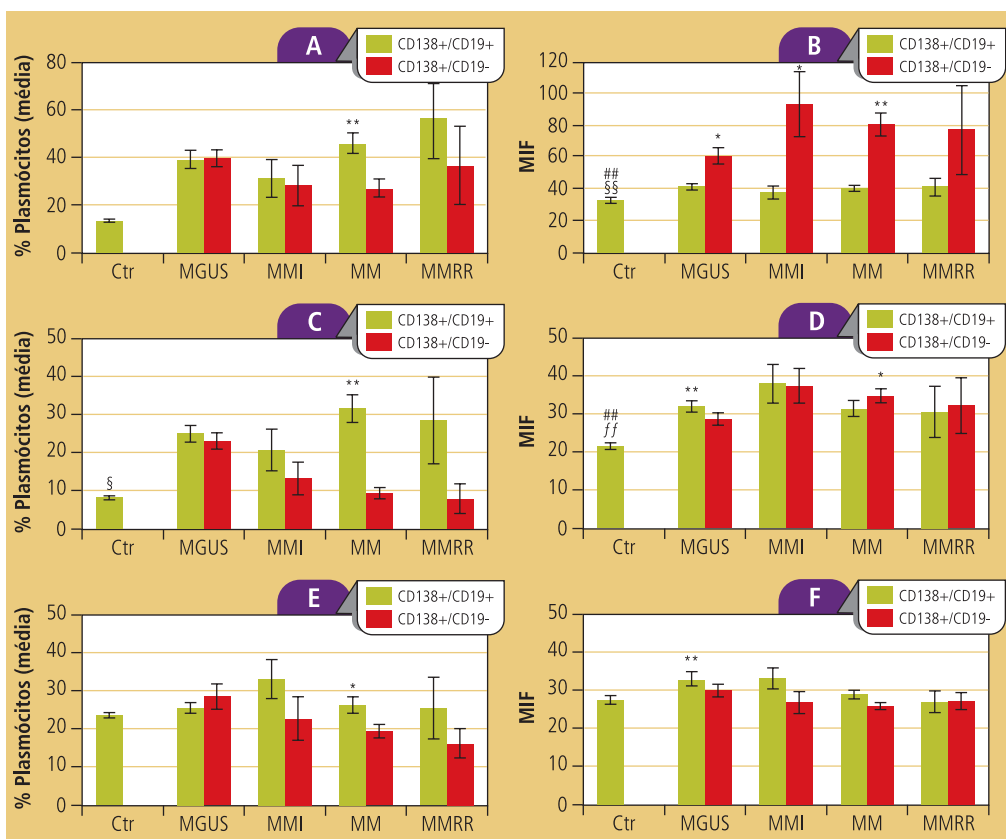
Quando analisámos os diversos subgrupos de doentes com GM, verificámos que apenas nos plasmócitos CD138+/CD19- se observam diferenças significativas. Com efeito, os níveis de expressão de VEGF nestes plasmócitos são superiores nos doentes com MM ( $80 \pm 7,5$  MIF) relativamente aos doentes com MGUS ( $61,7 \pm 6,2$  MIF) ( $p < 0,05$ ), bem como significativamente superiores nestes dois subgrupos em relação ao observado nos controlos ( $32,8 \pm 1,5$  MIF) ( $p < 0,05$ ) (Figura 28-B). De salientar que, nos doentes com MGUS, foi observada uma percentagem superior de plasmócitos CD138+/CD19- a expressarem o recetor do VEGF comparativamente aos doentes com MM ( $20,9 \pm 2,4$  MIF vs  $8,9 \pm 1,5$  MIF;  $p < 0,01$ ) (Tabela 15A).

**TABELA 15** Avaliação da percentagem (%) de plasmócitos CD138+/CD19- (A) e CD138+/CD19+ (B) que expressam VEGF, VEGF-R, IL-6, IL-6 R e respetivos níveis de expressão, por citometria de fluxo

	Ctr Média ± EP	MGUS Média ± EP	MMI Média ± EP	MM Média ± EP	MMRR Média ± EP
<b>A</b> Plasmócitos CD138+/CD19-					
VEGF (%)	–	42,5 ± 4,1	28,2 ± 8,4	28,7 ± 4	36,4 ± 16,4
VEGF (MIF)	–	61,7 ± 6,2 *	92,5 ± 20,2	80 ± 7,5 *	76,6 ± 27,4
VEGF - Rec (%)	–	20,9 ± 2,4 **	13,2 ± 4,3	8,9 ± 1,5 **	7,9 ± 3,8
VEGF - Rec (MIF)	–	27,9 ± 1,8 **	37,3 ± 4,5	34,8 ± 1,9 **	32,2 ± 7,4
IL-6 (%)	–	29,3 ± 3,8	22,7 ± 5,6	19,5 ± 2	16,1 ± 3,8
IL-6 (MIF)	–	30,9 ± 1,8	26,9 ± 2,6	26,1 ± 1	27,4 ± 2,1
IL-6 Rec (%)	–	63,9 ± 4,2	76,4 ± 6,6	64,4 ± 3,6	55 ± 15,6
IL-6 Rec (MIF)	–	63,3 ± 5,3	44,5 ± 3,7	45,7 ± 3,6	59,2 ± 20,1
<b>B</b> Plasmócitos CD138+/CD19+					
VEGF (%)	13,5 ± 0,5 ## §	39,4 ± 4 §	31,1 ± 7,9	46,7 ± 4,5 ##	55,9 ± 16,6
VEGF (MIF)	32,8 ± 1,5	41,2 ± 1,9	37,4 ± 3,9	39,9 ± 1,7	41,2 ± 5,6
VEGF - Rec (%)	8,1 ± 0,5 ## §	24,9 ± 2,2 §	20,6 ± 5,4	31,5 ± 3,7 ##	28,3 ± 11,3
VEGF - Rec (MIF)	21,7 ± 0,8 §§	31,6 ± 1,6 §§	38 ± 5,1	31,7 ± 2,2	30,6 ± 6,7
IL-6 (%)	23,2 ± 0,7	25,3 ± 1,5	33,1 ± 5,1	26,9 ± 2,2	25,4 ± 8,2
IL-6 (MIF)	27,8 ± 1,3	33,6 ± 1,9	33,4 ± 2,6	29,1 ± 1,2	27,2 ± 2,9
IL-6 Rec (%)	17,3 ± 0,5	76,5 ± 1,4	79,7 ± 2,7	79 ± 1	76,7 ± 3,4
IL-6 Rec (MIF)	33,3 ± 0,9	40,1 ± 2,3	50,4 ± 6,6	44,8 ± 3,2	43,2 ± 11,9

Os valores referidos representam a média da percentagem (%) ± o erro-padrão (EP) de moléculas inflamatórias e reguladoras da angiogénese (VEGF e IL-6) e seus recetores, assim como os respetivos níveis de expressão, apresentados em média de intensidade de fluorescência (MIF), em plasmócitos com os fenótipos CD138+/CD19- (A) e CD138+/CD19+ (B) de doentes com gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), com mieloma múltiplo indolente (MMI), com mieloma múltiplo sintomático ao diagnóstico (MM), com mieloma múltiplo em recidiva/refratário (MMRR) e em controlos não neoplásicos (Ctr), de acordo com o descrito na secção *Materiais e Métodos*. VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*; VEGF-Rec - Recetor do VEGF; IL-6 - Interleucina 6; IL-6 Rec - Recetor da IL-6. MM vs Ctr: #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ . MGUS vs Ctr: §  $p < 0,05$ ; §§  $p < 0,01$ .

Quando comparamos os níveis de expressão de VEGF/VEGF-Rec e IL-6/IL-6 Rec, entre os dois subtipos fenotípicos de plasmócitos, CD138+/CD19+ e CD138+/CD19-, verificamos que as diferenças encontradas são mais relevantes para o VEGF (Figura 28). Assim, em todos os subgrupos de GM, incluindo nos doentes com MMRR, os níveis de expressão deste fator angiogénico estão aumentados nos plasmócitos CD138+/CD19- relativamente aos plasmócitos CD138+/CD19+ (Figura 28-B), enquanto a percentagem de plasmócitos com este fenótipo que expressa VEGF é significativamente superior à dos plasmócitos tumorais, nos doentes com MM ( $p < 0,01$ ) (Figura 28-A).



**Análise comparativa dos níveis de VEGF, recetor do VEGF e de IL-6 nos plasmócitos com fenótipos normal e patológico em doentes com gamapatia monoclonal e em controlos não neoplásicos.**

**FIGURA 28**

Em **A**, **C** e **E** está representada a percentagem de células (%) que expressam VEGF, recetor do VEGF (VEGF-Rec) e IL-6; em **B**, **D** e **F**, os seus níveis de expressão, em média de intensidade de fluorescência (MIF) respetivamente. Os resultados representam a média  $\pm$  erro-padrão relativos às moléculas representadas, avaliadas nos plasmócitos com fenótipo CD138+/CD19+ (a verde) e CD138+/CD19- (a vermelho), em doentes com MGUS, MMI, MM, MMRR e em controlos não neoplásicos (Ctr), de acordo com o descrito na secção de *Materiais e Métodos*. Estão representadas as diferenças estatisticamente significativas entre plasmócitos com os dois fenótipos nos doentes ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ) e entre os plasmócitos dos Ctr e os plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes (Ctr vs MM: #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ . Ctr vs MGUS: §  $p < 0,05$ ; §§  $p < 0,01$ . Ctr vs MMI: f  $p < 0,05$ ; ff  $p < 0,01$ ).



#### 4.1.6. Análise das proteínas da família ABC – glicoproteína P e *multidrug resistance related protein-1*

Depois de avaliadas as moléculas que desempenham um papel relevante na apoptose, no ciclo celular, na inflamação e na angiogénese da medula óssea, analisámos os mecanismos envolvidos na refractariedade à terapêutica, em particular as proteínas da família ABC, glicoproteína P (gp-P) e *multidrug resistance related protein-1* (MRP-1) a nível citoplasmático e membranar, em doentes com GM e em controlos.

Tal como nas análises anteriores, foram estudados a percentagem de plasmócitos com os fenótipos CD138+/CD19+ (Tabela 16-A) e CD138+/CD19- (Tabela 16-B) que expressam gp-P e MRP-1 e os respetivos níveis de expressão, como descrito na secção de *Materiais e Métodos*. Numa primeira análise, foram considerados os doentes com GM em geral (Tabela A6, Anexo) e, numa avaliação subsequente, foram estudados e comparados os subgrupos de GM individualmente e, dentro destes, procedemos à análise comparativa entre os dois subtipos fenotípicos de plasmócitos (Tabela 16 e Figura 29, respetivamente).

Assim, nos doentes com GM em geral, observámos um aumento da expressão de MRP-1 citoplasmática e membranar nos plasmócitos CD138+/CD19+ relativamente aos plasmócitos CD138+/CD19- e aos controlos ( $p < 0,01$ ). No caso da gp-P, os plasmócitos CD138+/CD19- apresentam níveis de expressão superiores de gp-P citoplasmática e inferiores de gp-P membranar relativamente aos encontrados nos plasmócitos CD138+/CD19+ e nos controlos ( $p < 0,01$ ) (Tabela A6, Anexo).

A análise dos subgrupos de GM evidenciou que os plasmócitos com fenótipo CD138+/CD19+ dos doentes com MGUS são os que apresentam níveis de expressão de MRP-1 membranar e de gp-P citoplasmática mais elevados ( $48,1 \pm 3,6$  MIF;  $69,1 \pm 3$  MIF, respetivamente) quando comparados com os doentes com MMI ( $29,7 \pm 3,7$  MIF;  $57,4 \pm 4,9$  MIF), com MM ( $32,7 \pm 2,3$  MIF;  $52,1 \pm 3,4$  MIF) ( $p < 0,05$ ) e com os controlos ( $23 \pm 1$  MIF;  $23,9 \pm 0,7$  MIF) ( $p < 0,01$ ). No mesmo subtipo de plasmócitos, verificamos que os doentes com MM são os que apresentam níveis de expressão mais elevados de gp-P membranar, embora apenas significativo em relação aos doentes com MGUS ( $p < 0,01$ ). No entanto, os controlos evidenciam níveis ainda mais elevados desta glicoproteína ( $p < 0,05$ ), ao invés do observado com a expressão de gp-P citoplasmática ( $p < 0,05$ ) (Tabela 16-A).

Nos plasmócitos CD138+/CD19-, verificamos que os doentes com MMI são os que apresentam uma percentagem de células que expressa MRP-1 citoplasmática e/ou níveis de expressão significativamente superiores ( $29,3 \pm 3,6\%$ ;  $36,6 \pm 5,1$  MIF)

em relação aos doentes com MGUS ( $19,1 \pm 1,9\%$ ;  $29,2 \pm 2,3$  MIF, respetivamente;  $p < 0,05$ ) e com MM ( $29,6 \pm 2,1$  MIF), não se observando diferenças relevantes na gp-P (Tabela 16-B).

Quando comparámos os níveis de expressão destas glicoproteínas nos plasmócitos CD138+/CD19+ vs CD138+/CD19-, constatámos diferenças estatisticamente significativas para MRP-1 e gp-P citoplasmáticas. Assim, como podemos observar na figura 29-A e B, nos doentes com MM, MMI e MGUS, a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19- que expressa MRP-1 citoplasmática é significativamente inferior à dos plasmócitos CD138+/CD19+ ( $p < 0,01$ ), dados estes sobreponíveis no que respeita aos níveis de expressão, mas apenas para os doentes com MM e com MGUS ( $p < 0,01$ ). Pelo contrário, os níveis de expressão de gp-P citoplasmática são significativamente superiores nos plasmócitos com fenótipo característico de malignidade em relação aos que apresentam um fenótipo “normal” de doentes e de controlos ( $p < 0,01$ ) (Figura 29-F).

**Estudo da expressão de MRP-1 e de glicoproteína P (citoplasmáticas e membranares) nos plasmócitos CD138+/CD19+ (A) e CD138+/CD19- (B), em doentes com MGUS, MM, MMI e MMRR e em controlos**

**TABELA 16**

	Ctr Média ± EP	MGUS Média ± EP	MMI Média ± EP	MM Média ± EP	MMRR Média ± EP
<b>A</b> Plasmócitos CD138+/CD19+					
MRP1 cit (%)	21,2 ± 3,1	60 ± 3,4	57,4 ± 7,2	51 ± 4	42,1 ± 11,2
MRP1 cit (MIF)	27,7 ± 1,7	34,7 ± 1,4	30,8 ± 1,5	37,3 ± 2,1	36,2 ± 6,6
MRP1 memb (%)	36,7 ± 1,1	18,9 ± 2,7	29,7 ± 9,8	25,9 ± 4	24,4 ± 14,1
MRP1 memb (MIF)	23 ± 1 ## §§	48,1 ± 3,6 §§ ** †	29,7 ± 3,7 †	32,7 ± 2,3 ## **	40,2 ± 13,3
Gp-P cit (%)	81,1 ± 1,4	55,3 ± 3,1	44,2 ± 7,4	46 ± 3,5	56,8 ± 12,1
Gp-P cit (MIF)	23,9 ± 0,7 ## ff §§	69,1 ± 3 §§ **	57,4 ± 4,9 ff	52,1 ± 3,4 ## **	53,4 ± 9,0
Gp-P memb (%)	37,3 ± 3,5	14,1 ± 1,1 *	17,7 ± 2,2	23,6 ± 2,4 *	34,3 ± 9,6
Gp-P memb (MIF)	48,2 ± 7,3 # f §	29,7 ± 1,1 § ** †	35,8 ± 1,9 f †	37,8 ± 1,2 # **	33,8 ± 5,9
<b>B</b> Plasmócitos CD138+/CD19-					
MRP1 cit (%)	–	19,1 ± 1,9 ** †	29,3 ± 3,6 †	27,2 ± 2,6 **	20,3 ± 8,1
MRP1 cit (MIF)	–	29,2 ± 2,3 †	36,6 ± 5,1 ¥ †	29,6 ± 2,1 ¥	27,4 ± 4,4
MRP1 memb (%)	–	9,7 ± 0,5	10,3 ± 1,6	7,7 ± 0,5	8 ± 2,1
MRP1 memb (MIF)	–	45,2 ± 3,3	27,8 ± 2,6	30,6 ± 2,1	38,8 ± 10,7
Gp-P cit (%)	–	65,9 ± 3,4	68,4 ± 6,9	57 ± 4	53,1 ± 14,8
Gp-P cit (MIF)	–	132,9 ± 5,8	132,7 ± 11,3	115,1 ± 8,4	107 ± 32,57
Gp-P memb (%)	–	13,2 ± 2	11,1 ± 2,2	11,7 ± 1,1	9,4 ± 3
Gp-P memb (MIF)	–	27,5 ± 1,2	32,8 ± 3,2	29,3 ± 1,3	31,8 ± 5,3

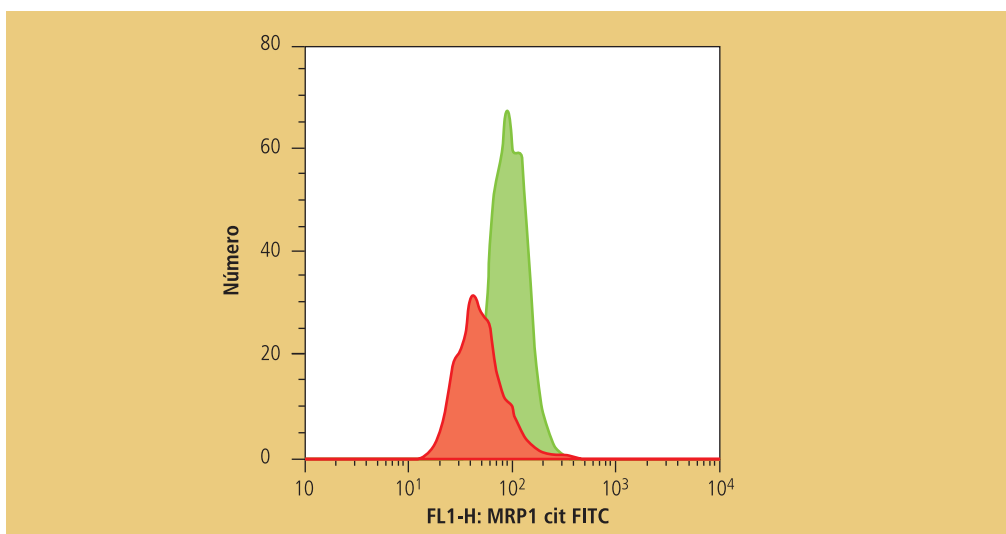
Os valores apresentados representam a média da percentagem (%) ± o erro-padrão (EP), de MRP1 (MDR related protein-1) e gp-P (glicoproteína P) membranares (memb) e citoplasmáticas (cit), assim como os respetivos níveis de expressão, expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF), em plasmócitos com os fenótipos CD138+/CD19+ (A) e CD138+/CD19- (B) de doentes com gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), com mieloma múltiplo indolente (MMI), com mieloma múltiplo sintomático ao diagnóstico (MM), com mieloma múltiplo em recidiva/refratário (MMRR) e em controlos não neoplásicos (Ctr), de acordo com o descrito na secção *Materiais e Métodos*. MM vs MGUS: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . MM vs Ctr: #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ . MM vs MMI: ¥  $p < 0,05$ ; ¥¥  $p < 0,01$ . MGUS vs MMI: †  $p < 0,05$ ; ††  $p < 0,01$ . MGUS vs Ctr: §  $p < 0,05$ ; §§  $p < 0,01$ . MMI vs Ctr: f  $p < 0,05$ ; ff  $p < 0,01$ .



**FIGURA 29** Estudo comparativo da expressão de glicoproteínas da família ABC em plasmócitos CD138+/CD19- e CD138+/CD19+ de doentes com GM e de controlos.

Em **A** e **C**, está representada a percentagem de células (%) que expressa MRP-1 citoplasmática e membranar e em **B** e **D**, os seus níveis de expressão respetivamente. Em **E** e **G** a percentagem de plasmócitos que expressa glicoproteína P citoplasmática e membranar e, em **F** e **H**, os seus níveis de expressão respetivamente, avaliados em média de intensidade de fluorescência (MIF). Os resultados representam a média  $\pm$  erro-padrão relativo às moléculas representadas na figura e avaliadas nos plasmócitos com fenótipo normal, CD138+/CD19+ (a verde) e neoplásico, CD138+/CD19- (a vermelho), em doentes com MGUS, MMI, MM, MMRR e em controlos (Ctr), de acordo com o descrito na secção de *Materiais e Métodos*. Estão representadas as diferenças estatisticamente significativas entre plasmócitos com os dois fenótipos nos doentes (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) e entre os plasmócitos dos Ctr e os plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes (Ctr vs MM: #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ . Ctr vs MGUS: §  $p < 0,05$ ; §§  $p < 0,01$ . Ctr vs MMI: f  $p < 0,05$ ; ff  $p < 0,01$ ).

A figura 30 mostra um histograma representativo dos níveis de expressão de MRP-1 citoplasmática nos plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19- e CD138+/CD19+, como exemplo dos resultados apresentados na figura 29-B.



**Avaliação da expressão de MRP-1 citoplasmática num doente com MM por citometria de fluxo.**

**FIGURA 30**

Está representada a expressão de MRP-1 citoplasmática (cit) referente aos plasmócitos CD138+/CD19- (a vermelho) e CD138+/CD19+ (a verde).

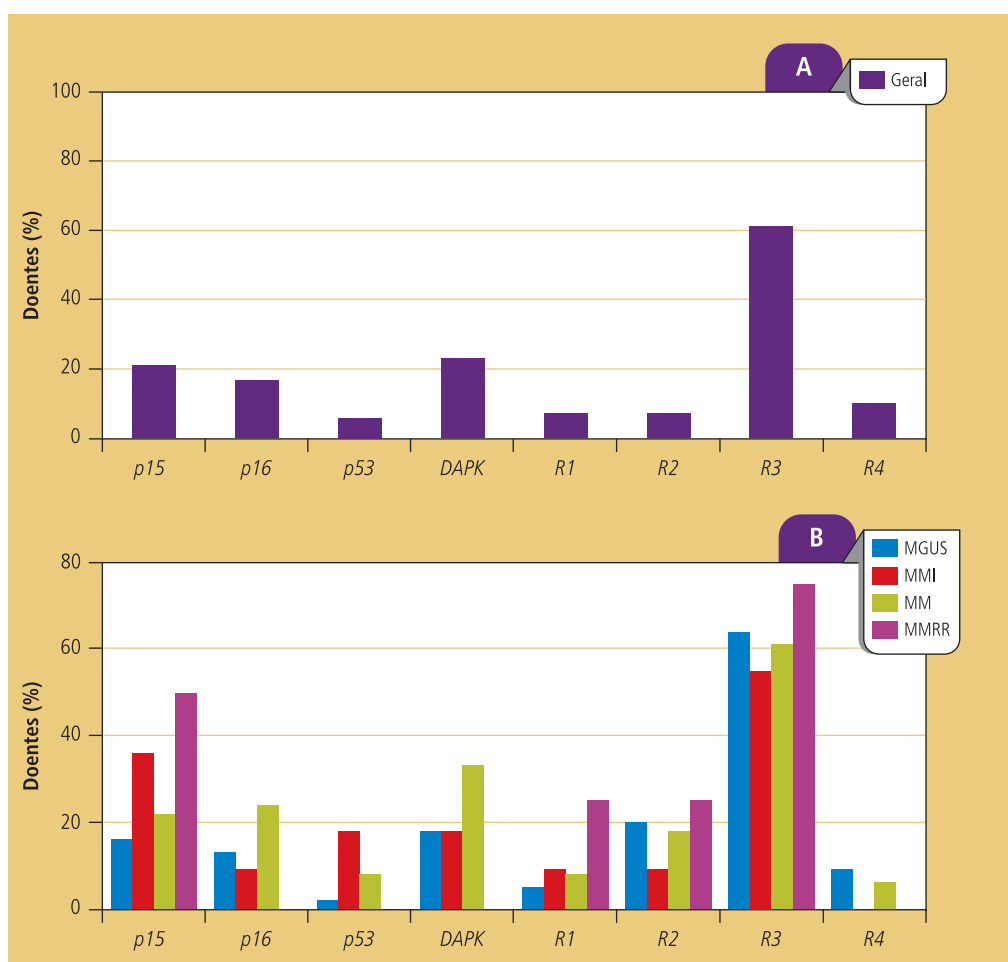
#### 4.1.7. Análise do perfil de metilação génica nos doentes com gamopatias monoclonais

O perfil de metilação dos genes reguladores da apoptose e/ou do ciclo celular (*p15*, *p16*, *p53*, *DAPK*), bem como dos genes dos recetores do TRAIL (*TRAIL-R1*, *TRAIL-R2*, *TRAIL-R3* e *TRAIL-R4*) foi analisado em amostras de medula óssea de 120 doentes com GM, dos quais 116 foram estudados ao diagnóstico (56 com MGUS, 11 com MMI e 49 com MM), quatro foram analisados na recidiva (MMRR) e de oito controlos não neoplásicos.

Considerando a coorte de doentes com GM, 81% apresentava, pelo menos, um gene metilado dos oito genes analisados (77% dos doentes com MGUS, 82% com MMI, 86% com MM e 75% com MMRR;  $p=NS$ ). Pelo menos dois genes simultaneamente metilados foram observados em 54% dos doentes com GM (44% dos doentes com MGUS, 64% com MMI, 61% com MM e 75% com MMRR;  $p=NS$ ). A metilação anómala de um, dois ou mais genes foi detetada em 24%, 39% e 14% dos doentes com MM e em 33%, 26% e 14% dos doentes com MGUS, respetivamente ( $p=NS$ ). A metilação de quatro ou mais genes estudados foi identificada em apenas seis doentes com GM (5%), dos quais quatro doentes tinham o diagnóstico de MM e dois apresentavam MGUS. Em nenhum doente foi encontrada metilação de mais de seis dos oito genes estudados. De salientar que nenhum dos oito controlos não neoplásicos apresenta metilação dos genes analisados e que a

metilação dos genes estudados foi observada em heterozigotia em todos os casos. Na figura A1 (Anexo), está indicado o estado de metilação dos genes analisados para cada doente com GM e cada controlo incluídos no estudo.

A análise da figura 31 mostra que o gene do recetor antiapoptótico R3 do TRAIL (*TRAIL-R3* ou *TRAIL-DcR1*) é o que se encontra mais frequentemente metilado nos doentes com GM (64% dos doentes com MGUS, 55% com MMI, 61% com MM e 75% com MMRR). Relativamente aos genes dos outros recetores do TRAIL, as frequências de metilação são muito reduzidas em qualquer um dos subgrupos de GM, não ultrapassando os 25% e também sem diferenças significativas entre eles. No caso do gene do recetor R4, não foi observada metilação em nenhum doente com MMI e MMRR (Figura 31-A e B).

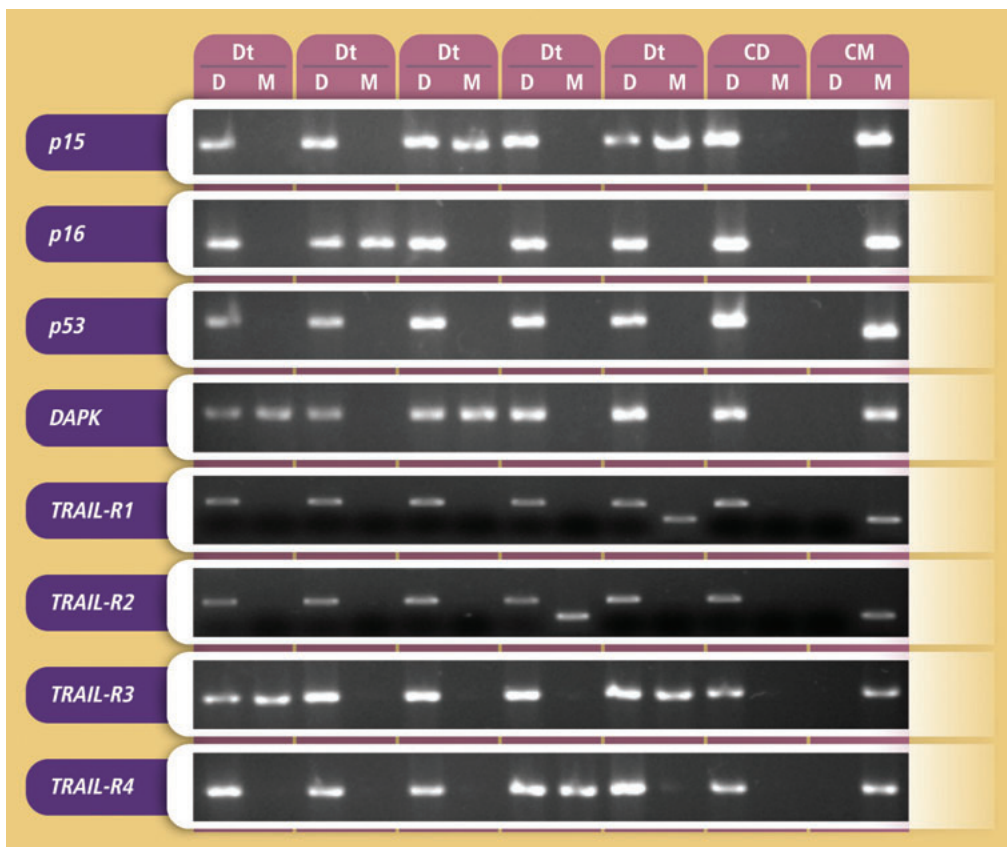


**FIGURA 31** Frequência de metilação dos genes *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK*, *TRAIL-R1*, *R2*, *R3* e *R4* em doentes com gamopatias monoclonais.

Em **A**, apresenta-se a análise nos doentes com gamopatias monoclonais em geral. Em **B**, individualizam-se os doentes com gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), mieloma múltiplo indolente (MMI), mieloma múltiplo sintomático ao diagnóstico (MM) e com mieloma múltiplo em recidiva/refratário (MMRR). As barras indicam a percentagem de doentes com o gene em causa metilado.

A metilação dos genes *p15*, *p16*, *p53* e *DAPK* foi mais frequente nos doentes com MM (22%, 24%, 8% e 33%, respetivamente) em relação aos doentes com MGUS (16%, 13%, 2% e 18%, respetivamente); no entanto, as diferenças encontradas entre doentes não atingiram significado estatístico para nenhum dos genes. Do mesmo modo, também não foram observadas diferenças relevantes entre os outros subgrupos de doentes com GM para estes quatro genes. (Figura 31-B). De realçar que, quando comparada a frequência de metilação do gene *TRAIL-R3*, foram encontradas diferenças significativas apenas entre controlos não neoplásicos e doentes com MGUS ( $p=0,001$ ) e com MM ( $p=0,001$ ).

Na figura 32, estão representados alguns exemplos dos resultados obtidos na eletroforese em gel de agarose a 5%, após MSP dos genes estudados, realizado em amostras de medula óssea colhidas no momento do diagnóstico dos doentes com MGUS, MM e MM. A metilação dos genes descritos foi observada em heterozigotia em todos os doentes, como podemos verificar na mesma figura.



Exemplos dos resultados da eletroforese dos produtos obtidos após *methylation-specific polymerase chain reaction* (MSP) dos genes *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK*, *TRAIL-R1*, *-R2*, *-R3* e *-R4*, em amostras de medula óssea colhidas ao diagnóstico em doentes com GM.

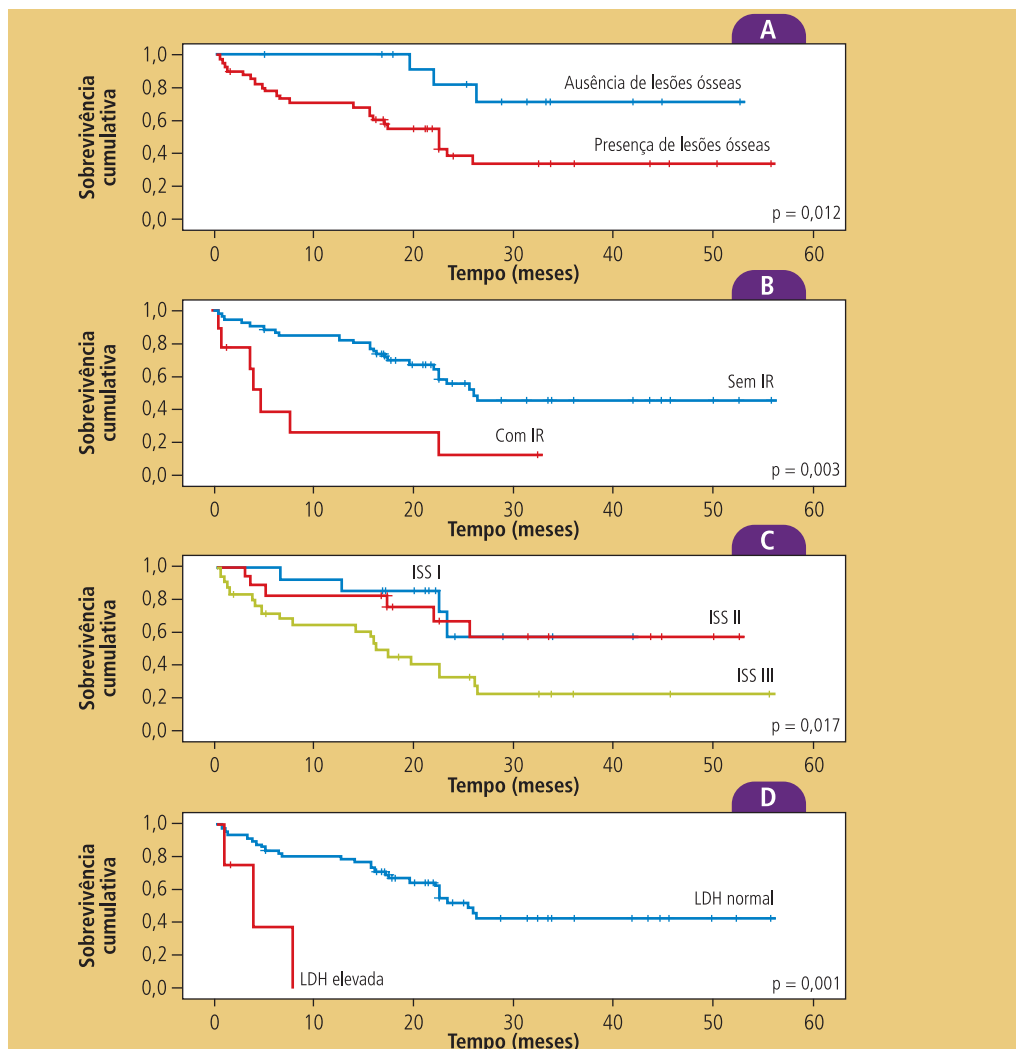
FIGURA 32

Dt - exemplos de doentes com o gene metilado (M) ou não metilado (D); CM - controlo universal metilado; CD - controlo universal não metilado.

#### 4.1.8. Impacto dos parâmetros clínicos e laboratoriais no prognóstico dos doentes com mieloma múltiplo sintomático

Analisámos a influência que os parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos, citogenéticos e imunofenotípicos, presentes ao diagnóstico, desempenharam na resposta à terapêutica e na sobrevivência dos doentes com MM.

Com efeito, no âmbito da avaliação clínico-laboratorial da nossa amostra de doentes com MM, constatámos que a presença de lesões ósseas ( $p=0,012$ ), a insuficiência renal ( $p=0,003$ ), a LDH sérica elevada ( $p=0,001$ ) e o ISS de III ( $p=0,017$ ) apresentaram um impacto negativo no prognóstico destes doentes, associando-se a uma menor sobrevivência global (Figura 33).



**FIGURA 33** Análise da influência da forma de apresentação clínica e dos parâmetros hematológicos e bioquímicos ao diagnóstico na sobrevivência global de doentes com MM.

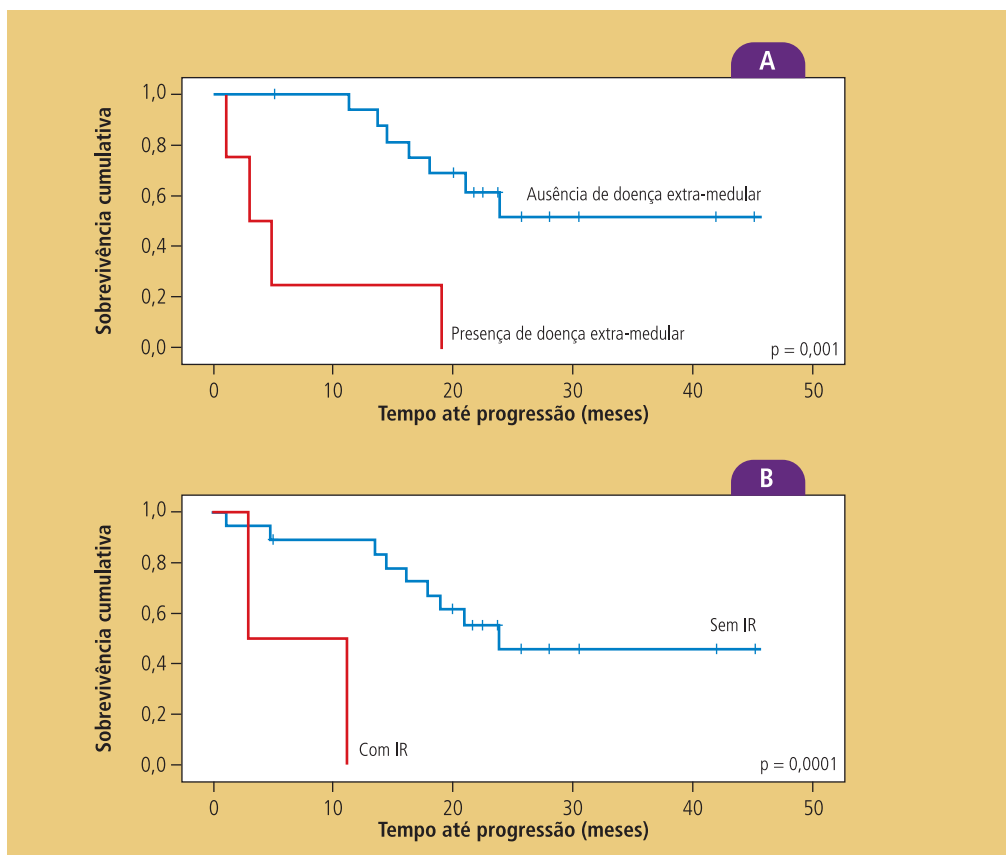
Em **A**, observa-se o impacto desfavorável da presença de lesões ósseas; em **B**, da insuficiência renal (IR); em **C**, do ISS=III e, em **D**, dos valores séricos elevados de LDH.



Pelo contrário, a presença de anemia e de doença extramedular (DEM) não apresentaram influência na sobrevivência global, embora a presença de DEM tivesse demonstrado impacto na sobrevivência livre de progressão ( $p=0,0001$ ), tal como a insuficiência renal e a LDH sérica elevada ( $p=0,0001$  e  $p=0,003$ , respetivamente) (Figura 34).

Nos doentes com MM avaliados, a análise dos marcadores imunofenotípicos CD27, CD28, CD56, CD117 e da ploidia do DNA não evidenciaram diferenças significativas nas sobrevivências global e livre de progressão.

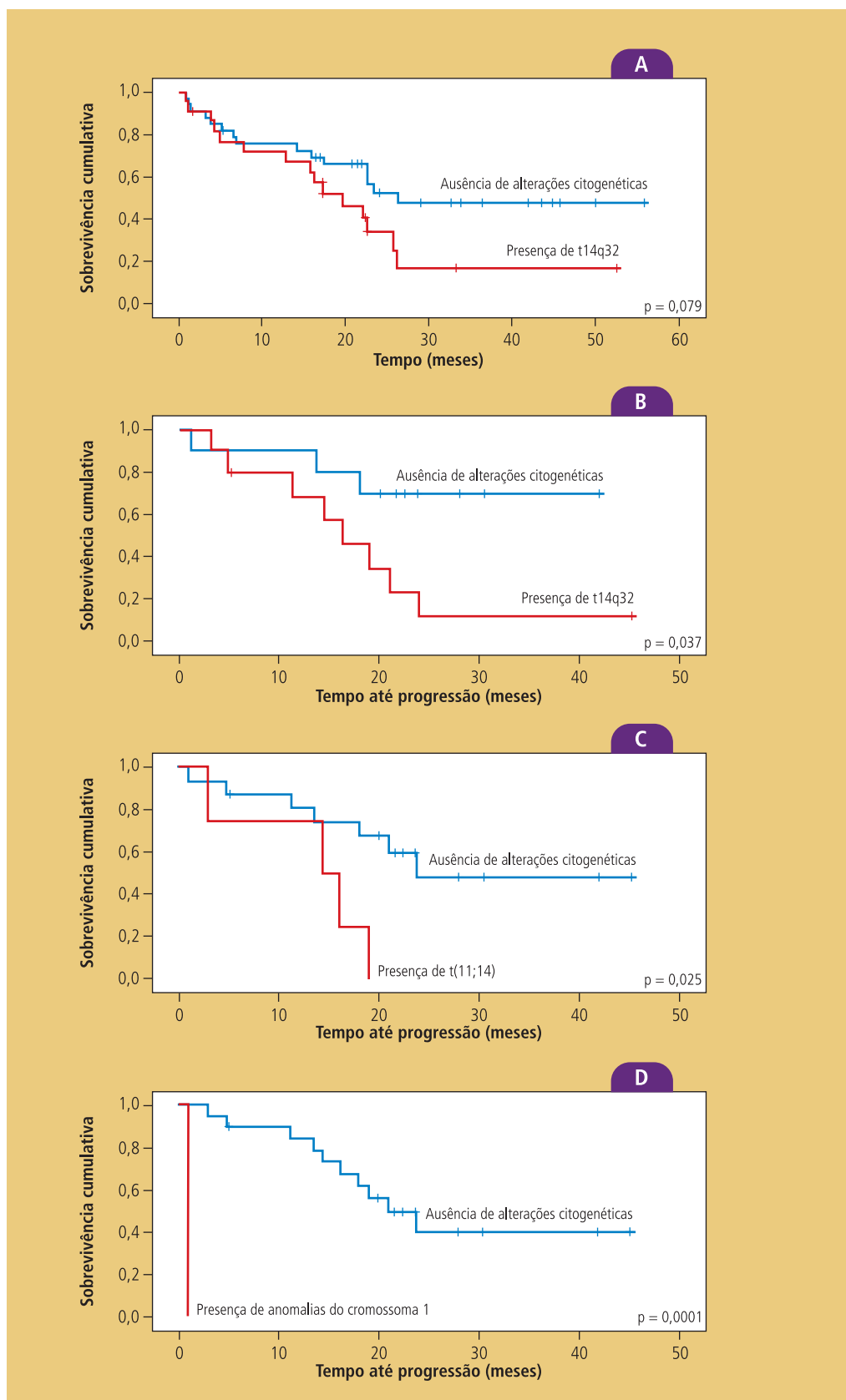
Relativamente à citogenética, e como podemos observar na figura 35, nos doentes com MM com a translocação t14q32 ao diagnóstico, apesar de não se observarem diferenças relevantes na sobrevivência global ( $p=0,079$ ), a sobrevivência livre de progressão foi negativamente influenciada por esta translocação ( $p=0,037$ ) (Figura 35-A e B), bem como pela t(11;14) ( $p=0,025$ ) (Figura 35-C) e pela presença de alterações citogenéticas a nível do cromossoma 1 que incluíram a deleção 1p32 e/ou a amplificação 1q21 ( $p=0,0001$ ) (Figura 35-D).



**Análise da influência dos parâmetros clínicos na sobrevivência livre de progressão de doentes com MM.**

**FIGURA 34**

Em **A**, observa-se o impacto negativo da presença de lesões ósseas e em **B** da insuficiência renal.



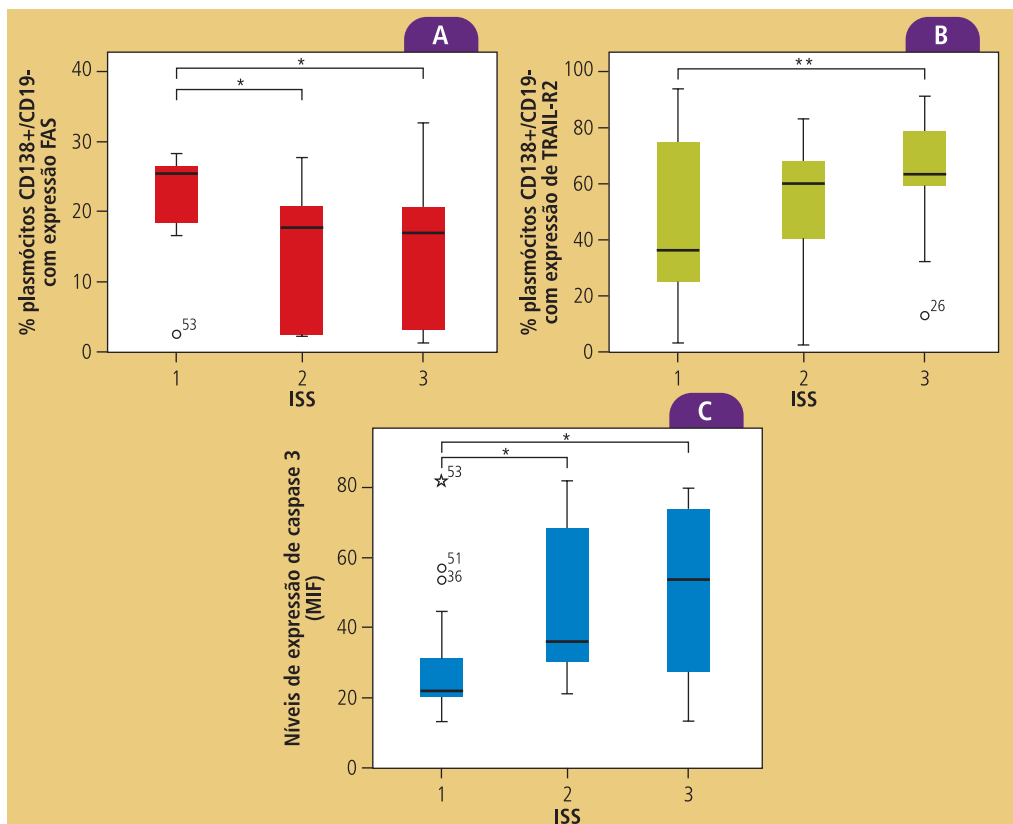
**FIGURA 35** Impacto das alterações citogenéticas presentes nos doentes com MM, ao diagnóstico, nas sobrevivências global (A) e livre de progressão (B, C e D).

Está representado o impacto da t14q32 (A e B), da t(11;14) (C) e das anomalias do cromossoma 1 (D).

#### 4.1.9. Associação entre os parâmetros moleculares, o ISS e a citogenética nos doentes com mieloma múltiplo sintomático

Depois de avaliada a expressão das moléculas em estudo neste trabalho, nos diversos subgrupos de doentes com GM, analisámos a sua associação com parâmetros que apresentam impacto prognóstico em doentes com MM, o estadiamento (ISS) e as alterações citogenéticas, determinados ao diagnóstico.

Na população de doentes com MM analisada nesta investigação, observaram-se diferenças na percentagem de plasmócitos CD138+/CD19- que expressa as proteínas FAS e TRAIL-R2, de acordo com os subtipos ISS. Com efeito, os doentes com MM com um estágio ISS de I apresentam uma percentagem significativamente mais elevada de plasmócitos com o fenótipo patológico a expressarem FAS ( $25,5\pm 3\%$ ) comparativamente aos estádios II ( $20,4\pm 1,2\%$ ;  $p=0,016$ ) e III ( $20,9\pm 1,3\%$ ;  $p=0,023$ ) (Figura 36-A). Por outro lado, a percentagem destes plasmócitos que expressa TRAIL-R2 é inferior no estágio I relativamente ao estágio III ( $p=0,006$ ) (Figura 36-B). Nos plasmócitos CD138+/CD19+, observámos níveis de expressão de caspase 3 significativamente inferiores nos doentes com ISS de I



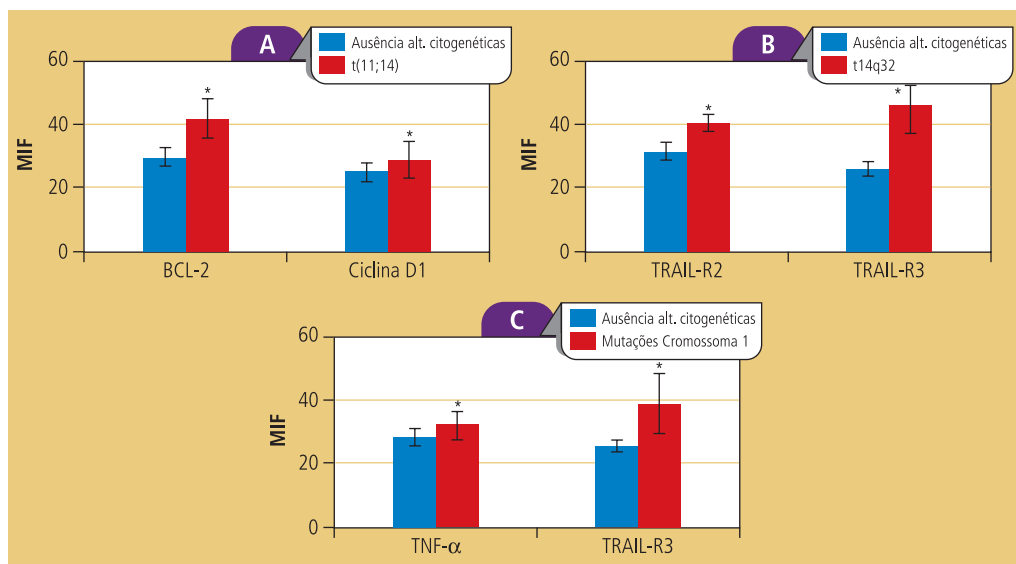
**Avaliação da expressão de moléculas reguladoras da apoptose em função do ISS.**

**FIGURA 36**

Está representada a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19- que expressa FAS (A) e TRAIL-R2 (B); em C, os níveis de expressão de caspase 3 nos plasmáticos CD138+/CD19+. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ .

( $31,9 \pm 3,3$ MIF) relativamente aos doentes com ISS II ( $37,2 \pm 3,9$ MIF;  $p=0,015$ ) ou de III ( $55,9 \pm 3,5$ MIF;  $p=0,023$ ) (Figura 36-C).

Da mesma forma que para o ISS, procurámos associações entre as alterações citogenéticas mais frequentes na nossa coorte de doentes com MM e a expressão das moléculas em análise nesta investigação (Figura 37). Assim, pesquisámos as diferenças na expressão destas moléculas, nos doentes com MM com e sem a  $t(11;14)$  e verificámos que apenas nas expressões de BCL-2 e de ciclina D1 nos plasmócitos CD138+/CD19- se observaram diferenças significativas. Com efeito, os doentes com a  $t(11;14)$  apresentam níveis de expressão superiores de BCL-2 ( $42 \pm 6$  MIF vs  $29,6 \pm 2,9$  MIF;  $p<0,05$ ) e de ciclina D1 ( $28,6 \pm 3,8$  MIF vs  $25,2 \pm 1$  MIF;  $p<0,05$ ) relativamente aos que não apresentam qualquer alteração citogenética (Figura 37-A). No que respeita à translocação 14q32, os recetores do TRAIL, R2 e R3, apresentam níveis de expressão significativamente mais elevados nos plasmócitos CD138+/CD19- que evidenciam a translocação 14q32, comparativamente aos que não apresentam qualquer alteração citogenética ( $40,6 \pm 2,9$  MIF vs  $31,2 \pm 2,8$  MIF;  $46,4 \pm 8,9$  vs  $25,7 \pm 1,95$  MIF, respetivamente;  $p<0,05$ ) (Figura 37-B). Os doentes com anomalias do cromossoma 1 (del 1p32 e 1q21+) apresentam aumento significativo na expressão de TNF- $\alpha$  e de TRAIL-R3 (Figura 37-C). No que respeita à expressão de outras proteínas analisadas neste trabalho, não foram encontradas associações com o ISS ou com as alterações citogenéticas.



**FIGURA 37**

**Relação entre as anomalias citogenéticas e a expressão de moléculas reguladoras da apoptose e do ciclo celular nos plasmócitos CD138+/CD19-, nos doentes com MM.**

Em **A**, apresentam-se os níveis de expressão de BCL-2 e de ciclina D1, em função da presença da  $t(11;14)$  e da  $del(13;13)q$ . Em **B**, observa-se a associação entre a presença da  $t(14q32)$  e os níveis de expressão dos recetores do TRAIL (-R2 e -R3). Em **C**, a associação entre as mutações no cromossoma 1 e os níveis de expressão de TNF- $\alpha$  e de TRAIL-R3. As comparações estão estabelecidas em relação à ausência de anomalias citogenéticas. \*  $p<0,05$ .

#### 4.1.10. Identificação de potenciais novos biomarcadores moleculares de diagnóstico e de prognóstico

Após avaliada a expressão de moléculas com funções relevantes na fisiopatologia do MM, em plasmócitos com os fenótipos CD138+/CD19- e CD138+/CD19+, pesquisamos associações entre as proteínas e os genes estudados (individualmente ou em combinação) e os parâmetros clínicos e laboratoriais presentes no momento do diagnóstico, de modo a identificar eventuais novos marcadores de diagnóstico em doentes com GM e de prognóstico, com relevância na resposta à terapêutica e na sobrevivência, em doentes com MM.

Foi previamente demonstrado, em análise univariada, que a expressão dos parâmetros moleculares analisados nos plasmócitos com fenótipo considerado normal e patológico dos doentes com GM apresenta diversas alterações relativamente aos controlos. Deste modo, prosseguimos o nosso estudo, recorrendo à análise multivariada (regressão logística) e das curvas ROC, com o objetivo de identificarmos novos potenciais marcadores de diagnóstico com um papel relevante na etiopatogenia das GM (Tabela 17). Foram ainda avaliadas as moléculas com capacidade discriminatória entre os subgrupos de doentes com GM, nos plasmócitos CD138+/CD19- e CD138+/CD19+, atingindo apenas resultados significativos nas comparações entre MM e MGUS (Tabela 18).

A expressão de moléculas com capacidade preditora do diagnóstico de GM foi efetuada nos plasmócitos CD138+/CD19+ dos doentes e comparada com a dos plasmócitos com o mesmo fenótipo dos controlos não neoplásicos (Tabela 19).

Nas tabelas 17, 18 e 19, estão representados o *odds ratio* (OR) e o respetivo intervalo de confiança a 95% (IC 95%), assim como o significado estatístico (p), calculados através de análise multivariada. A análise das curvas ROC permitiu a identificação dos pontos de corte, da área sob a curva (AUC), da significância estatística (p), assim como da sensibilidade e da especificidade. Estes dados conduziram ao cálculo do valor preditivo positivo (VPP) e do valor preditivo negativo (VPN).

Como podemos observar na [tabela 17](#), identificámos o aumento da expressão de TRAIL-R2 (superior a 29,5 MIF), de P53 (superior a 36,5 MIF), de VEGF-Rec (superior a 26,5 MIF), de MRP-1 membranar (superior a 29,5 MIF) e de gp-P citoplasmática (superior a 27,5 MIF), assim como a redução da expressão de ciclina D1 (inferior a 38,5 MIF), nos plasmócitos CD138+/CD19+, como marcadores com capacidade preditora independente de diagnóstico de GM. O TRAIL-R2 e a gp-P citoplasmática são as moléculas que apresentam a maior sensibilidade (85 e 91 %, respetivamente) e especificidade (100%).

TABELA 17

### Identificação de moléculas expressas nos plasmócitos CD138+/CD19+ com capacidade preditora independente de diagnóstico de gamopatias monoclonais

	OR (IC 95%)	p	Ponto de corte (MIF)	AUC (IC 95%)	p	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
TRAIL-R2	0,902 (0,831-0,979)	0,013	29,5	0,869 (0,814-0,925)	0,0001	85	100	100	34
P53	0,865 (0,792-0,945)	0,001	36,5	0,722 (0,586-0,858)	0,014	65	91	99	17
Ciclina D1	1,053 (1,02-1,087)	0,001	38,5	0,701 (0,602-0,801)	0,026	52	100	100	14
VEGF-Rec	0,895 (0,809-0,991)	0,032	26,5	0,73 (0,647-0,82)	0,01	54	100	100	14
MRP1 memb	0,628 (0,462-0,854)	0,003	29,5	0,821 (0,751-0,891)	< 0,0001	64	100	100	18
Gp-P cit	0,785 (0,673-0,917)	0,002	27,5	0,936 (0,898-0,975)	< 0,0001	91	100	100	46

OR - odds ratio; MIF - média de intensidade de fluorescência; AUC - área debaixo da curva; IC - intervalo de confiança; VPP - valor preditivo positivo; VPN - valor preditivo negativo; VEGF-Rec - Recetor do VEGF; memb - membranas; cit - citoplasmática.

TABELA 18

### Identificação de moléculas com potencial discriminatório entre mieloma múltiplo sintomático (MM) e gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) nos plasmócitos CD138+/CD19+ (A) e CD138+/CD19- (B)

A Plasmócitos CD138+/CD19+									
	OR (IC 95%)	p	Ponto de corte (MIF)	AUC (IC 95%)	p	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
TRAIL-R2	0,936 (0,883-0,992)	0,026	56,5	0,768 (0,679-0,858)	<0,0001	77	77	78	75
Survivina	1,091 (1,042-1,142)	<0,0001	45,5	0,685 (0,592-0,777)	<0,0001	93	42	68	95
R1+R2/R3+R4	37,234 (5,205-266,369)	<0,0001	1,22	0,797 (0,716-0,877)	<0,0001	92	63	69	89
Ciclina D1	1,033 (1,016-1,051)	<0,0001	43,5	0,78 (0,699-0,861)	<0,0001	83	64	68	81
Gp-P cit	1,029 (1,01-1,049)	0,003	67,5	0,681 (0,587-0,775)	<0,0001	83	47	59	76
Gp-P memb	0,881 (0,829-0,937)	<0,0001	34,5	0,747 (0,662-0,833)	<0,0001	65	71	67	69
B Plasmócitos CD138+/CD19-									
	OR (IC 95%)	p	Ponto de corte (MIF)	AUC (IC 95%)	p	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
TRAIL-R2	1,076 (1,044-1,109)	<0,0001	34,5	0,830 (0,757-0,902)	<0,0001	62	91	86	67
VEGF-Rec	0,967 (0,94-0,994)	0,016	23,5	0,688 (0,592-0,784)	<0,0001	90	56	65	84

OR - odds ratio; MIF - média de intensidade de fluorescência; AUC - área debaixo da curva; IC - intervalo de confiança; VPP - valor preditivo positivo; VPN - valor preditivo negativo; memb - membranas; cit - citoplasmática; VEGF-Rec - Recetor do VEGF.

TABELA 19

### Identificação do TRAIL-R2 expresso nos plasmócitos CD138+/CD19+ como uma molécula com potencial discriminatório entre doentes com gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) e controlos não neoplásicos

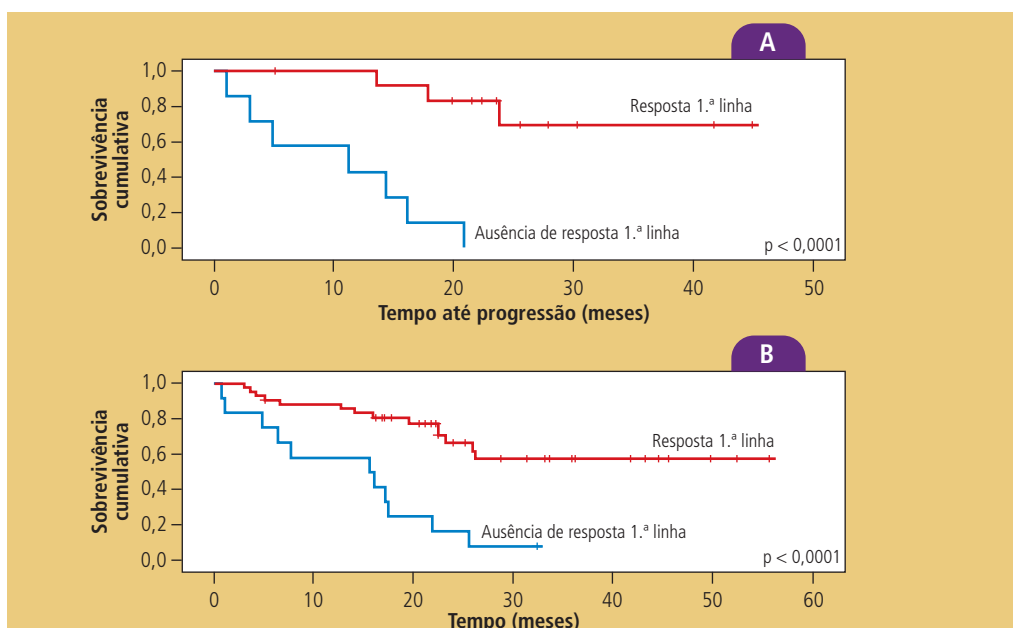
	OR (IC 95%)	p	Ponto de corte (MIF)	AUC (IC 95%)	p	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
TRAIL-R2	1,15 (1,046-1,267)	0,04	29,5	0,924 (0,862-0,985)	0,0001	91	100	100	65

OR - odds ratio; MIF - média de intensidade de fluorescência; AUC - área debaixo da curva; IC - intervalo de confiança; VPP - valor preditivo positivo; VPN - valor preditivo negativo.

Quando analisámos e comparámos a variação das moléculas estudadas nos plasmócitos CD138+/CD19+ dos doentes dos vários subgrupos de GM, em particular dos doentes com MM e MGUS, verificámos que a diminuição da expressão das proteínas TRAIL-R2 (inferior a 56,5 MIF), survivina (inferior a 45,5 MIF), das razões entre os níveis de expressão das moléculas indutoras e inibidoras da apoptose, TRAIL-R1+R2/TRAIL-R3+R4 (inferior a 1,22), dos níveis de ciclina D1 (inferior a 43,5 MIF) e da gp-P citoplasmática (inferior a 67,5 MIF), bem como a expressão de gp-P membranar superior a 34,5 MIF no MM foram reconhecidas, em análise multivariada, como apresentando potencial discriminatório em relação aos doentes com MGUS ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 18-A). Nos plasmócitos CD138+/CD19-, apenas o TRAIL-R2 inferior a 34,5 MIF e o VEGF-Rec superior a 23,5 MIF nos doentes com MM apresentam esse potencial ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 18-B).

A comparação entre MGUS e controlos evidenciou a expressão de TRAIL-R2 nos plasmócitos CD138+/CD19+ (superior a 29,5 MIF) como a molécula com maior potencial discriminatório entre estes dois grupos (sensibilidade de 91% e especificidade de 100%) (Tabela 19).

Muitos parâmetros clínicos e analíticos que caracterizam o MM e regularmente avaliados na prática clínica influenciam o prognóstico, como previamente demonstrado na amostra de doentes analisada nesta investigação. De igual modo, a ausência de resposta à terapêutica de primeira linha associa-se a um prognóstico desfavorável na nossa coorte de doentes com MM, como evidenciado pelo impacto nas sobrevivências global e livre de progressão (Figura 38).



**Análise do impacto da resposta na sobrevivência.**

**FIGURA 38**

Em **A** evidencia-se o efeito prognóstico desfavorável da ausência de resposta à primeira linha terapêutica nas sobrevivências livre de progressão (**A**) e global (**B**) dos doentes com mieloma múltiplo sintomático.



Esta terapêutica consistiu em bortezomib + dexametasona ± ciclofosfamida nos doentes elegíveis para transplante autólogo de progenitores hematopoiéticos; melfalano + prednisolona ± (bortezomib ou talidomida) ou ciclofosfamida + dexametasona/prednisolona nos não candidatos a transplante. Deste modo, pesquisámos a influência da expressão das proteínas em análise neste trabalho, nos plasmócitos CD138+/CD19- e CD138+/CD19+, dos doentes com MM, na resposta à terapêutica, na sobrevivência livre de progressão e na sobrevivência global.

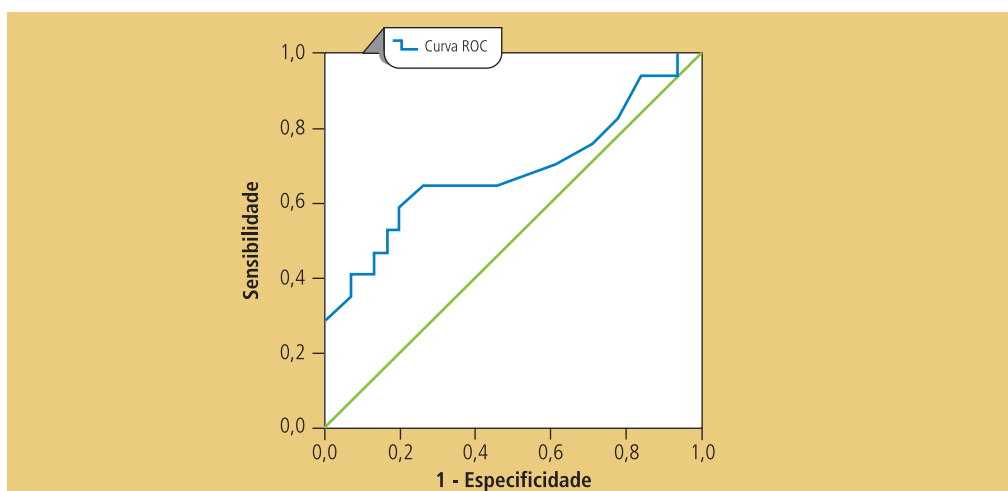
Quando avaliamos os doentes com MM em recidiva após terapêutica de primeira linha, em análise univariada, identificámos os níveis de expressão de caspase 3 superior a 38 MIF ( $p=0,01$ ) nos plasmócitos CD138+/CD19-, assim como os níveis de expressão de survivina inferior a 24 MIF ( $p=0,048$ ) e de P53 superior a 42 MIF ( $p=0,02$ ) nos plasmócitos CD138+/CD19+ ao diagnóstico, como potenciais biomarcadores de recidiva após terapêutica de primeira linha. Contudo, em análise multivariada por regressão logística, apenas os níveis de expressão de caspase 3 nos plasmócitos CD138+/CD19- indicam que esta molécula possa constituir um potencial biomarcador. De facto, como podemos observar na [tabela 20](#), encontramos uma associação entre os níveis de expressão de caspase 3 superiores a 38 MIF nos plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes com MM e uma maior probabilidade de recidiva ( $p=0,01$ ), resultados evidenciados também pela curva ROC ([Figura 39](#)).

**TABELA 20**

**Avaliação da expressão de caspase 3 nos plasmócitos CD138+/CD19- como biomarcador de falência de resposta à terapêutica em doentes com mieloma múltiplo sintomático**

	AUC (IC 95%)	p	Ponto de corte (MIF)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
Caspase 3 (MIF)	0,689 (0,515-0,863)	0,01	38	59	100	100	65

AUC- área debaixo da curva; MIF - média de intensidade de fluorescência; VPP-valor preditivo positivo; VPN-valor preditivo negativo.

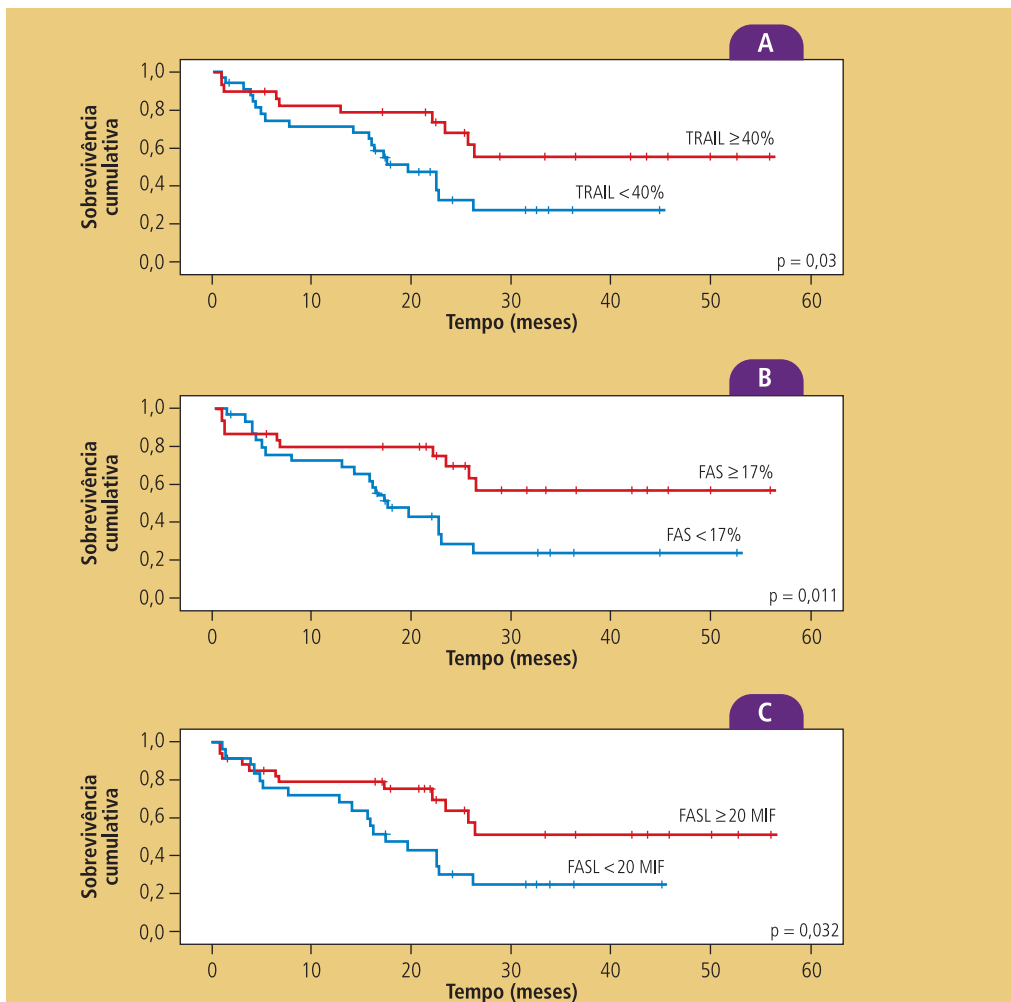


**FIGURA 39**

**Curva ROC dos níveis de expressão de caspase 3 nos plasmócitos CD138+/CD19- de doentes com MM.**

### - Influência da expressão de FAS, FAS ligando e TRAIL na sobrevivência

Avaliámos o impacto que a expressão das moléculas reguladoras da apoptose nos plasmócitos tumorais e não tumorais, ao diagnóstico, apresenta na sobrevivência global dos doentes com MM. Com efeito, verificámos que a presença de mais de 40% e de 17% de plasmócitos CD138+/CD19- com expressão das proteínas TRAIL e FAS, respetivamente, se associa a um prognóstico mais favorável comparativamente aos doentes com expressão numa percentagem inferior de plasmócitos com o referido fenótipo ( $p=0,03$ ;  $p=0,011$ ), como se demonstra na [figura 40 \(A e B\)](#). A apoiar estes dados, também os níveis de expressão de FAS ligando superiores a 20 MIF, nos plasmócitos CD138+/CD19-, se associou a uma vantagem na sobrevivência global ( $p=0,032$ ) ([Figura 40-C](#)).

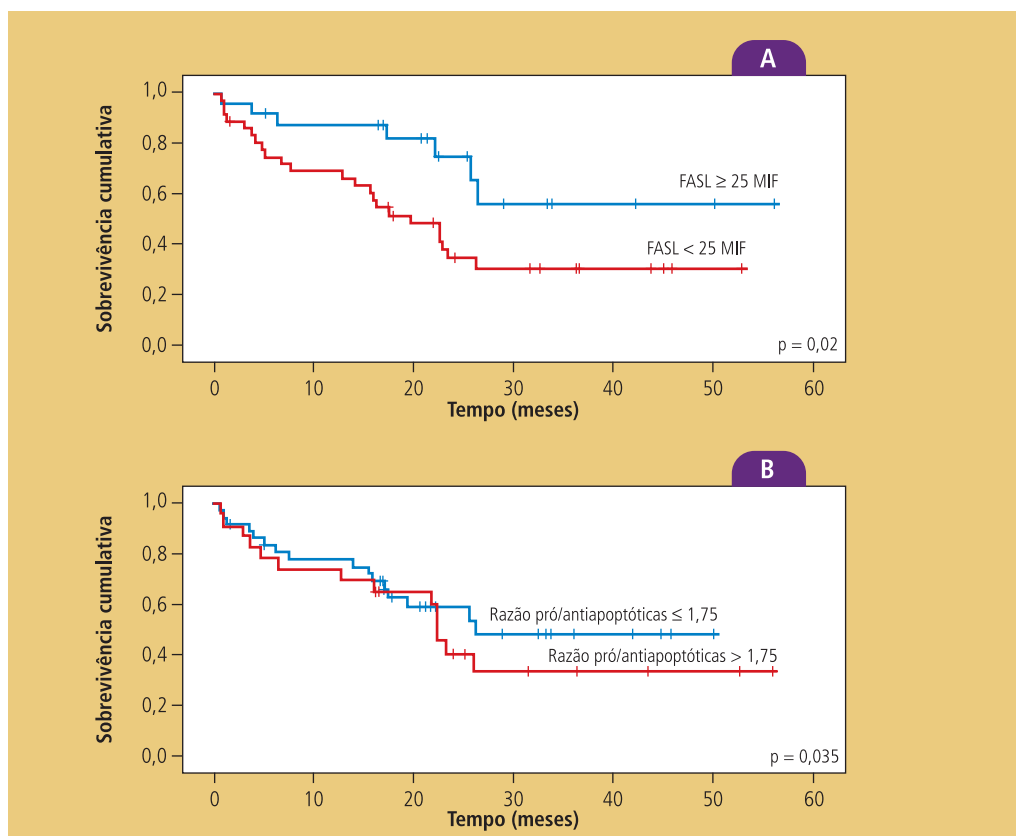


**Análise do impacto da expressão de TRAIL, FAS e FAS ligando nos plasmócitos CD138+/CD19-, na sobrevivência de doentes com MM.**

**FIGURA 40**

Em **A** e **B**, apresenta-se o impacto desfavorável que a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19- inferior a 40% e a 17% com expressão de TRAIL e de FAS, respetivamente, apresenta na sobrevivência global dos doentes. Em **C**, o mesmo impacto relativo ao nível de expressão de FAS ligando (FASL) inferior a 20 MIF. Os pontos de corte foram obtidos através da análise das curvas ROC.

Nos plasmócitos com fenótipo CD138+/CD19+, os níveis de expressão de FAS ligando inferiores a 25 MIF, assim como a razão entre proteínas pró e antiapoptóticas (BAX+R1+R2+FAS+caspase3/BCL-2+R3+R4+survivina) superior a 1,75 apresentaram um impacto negativo, associando-se a uma sobrevivência global inferior dos doentes com MM ( $p=0,02$  e  $p=0,035$ , respetivamente) (Figura 41).



**FIGURA 41** Avaliação da expressão de moléculas reguladoras da apoptose e do ciclo celular nos plasmócitos CD138+/CD19+ na sobrevivência global de doentes com mieloma múltiplo sintomático (MM).

A análise da figura evidencia o impacto desfavorável que os níveis de expressão de FAS ligando (FASL) inferiores a 25 MIF (A) e que a razão entre os níveis de expressão de proteínas indutoras/inibidoras da apoptose (BAX+R1+R2+FAS+caspase3/ BCL-2+R3+R4+survivina) superior a 1,75 (B) nos plasmócitos CD138+/CD19+ apresentam na sobrevivência global dos doentes com MM. Os pontos de corte foram obtidos através da análise das curvas ROC.

#### - Impacto da expressão de NF- $\kappa$ B e de VEGF na sobrevivência

Como referido previamente, o bortezomib é um inibidor do proteasoma com atividade clínica antitumoral claramente demonstrada e uma das terapêuticas de primeira linha de eleição para doentes com MM. Por conseguinte, pesquisámos o impacto que a expressão das moléculas em estudo neste trabalho apresenta na resposta e na sobrevivência global dos doentes tratados com bortezomib (+ dexametasona

± ciclofosfamida) como terapêutica de primeira linha. Os 24 doentes analisados (42% do sexo masculino) apresentavam uma mediana etária de 61 (41-75) anos. Destes 24 doentes, 21 (88%) apresentaram resposta ao bortezomib. A nossa análise demonstrou que a expressão de NF-κB e de VEGF influencia a resposta à terapêutica com bortezomib e a sobrevivência.

De acordo com os nossos resultados, os plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes com resposta ao bortezomib apresentam níveis de expressão de NF-κB significativamente superiores relativamente ao observado nos doentes que não responderam ao bortezomib (26,2±1,7 MIF vs 19,7±1,8 MIF; p=0,032). Nos plasmócitos CD138+/CD19+, não observámos diferenças significativas nos níveis de expressão de NF-κB entre os doentes com e sem resposta ao bortezomib.

Posteriormente, fomos analisar se esta molécula poderia ser um biomarcador de resposta, recorrendo à análise da curva ROC (Tabela 21). Nesta análise, verificamos que os doentes com níveis de expressão de NF-κB superiores a 23,5 MIF nos plasmócitos CD138+/CD19- se associam a uma maior probabilidade de resposta ao bortezomib (AUC=0,857; p=0,04; sensibilidade=67% e especificidade=100%).

### Avaliação da expressão de NF-κB nos plasmócitos CD138+/CD19- como biomarcador de resposta ao bortezomib

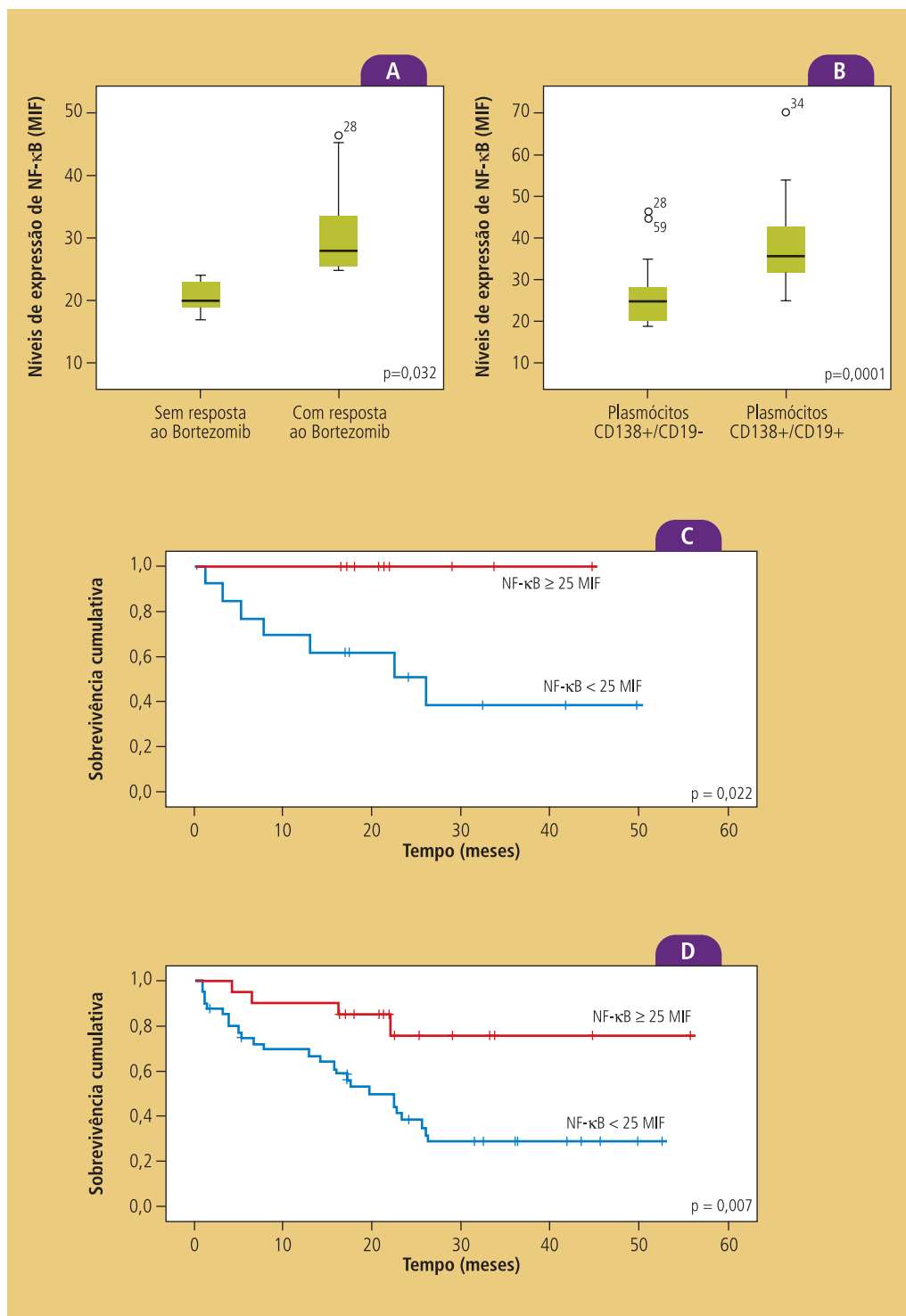
**TABELA 21**

	AUC (IC 95%)	p	Ponto de corte (MIF)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
NF-κB	0,857 (0,662-1)	0,04	23,5	67	100	100	30

AUC- área debaixo da curva; MIF - média de intensidade de fluorescência; VPP-valor preditivo positivo; VPN-valor preditivo negativo.

Além disso, nos doentes com resposta ao bortezomib, a média dos níveis de expressão de NF-κB nos plasmócitos CD138+/CD19- é inferior (26,2±1,7 MIF) à dos plasmócitos CD138+/CD19+ (38±2,3 MIF), sendo esta diferença estatisticamente significativa (p=0,0001) (Figura 42-B).

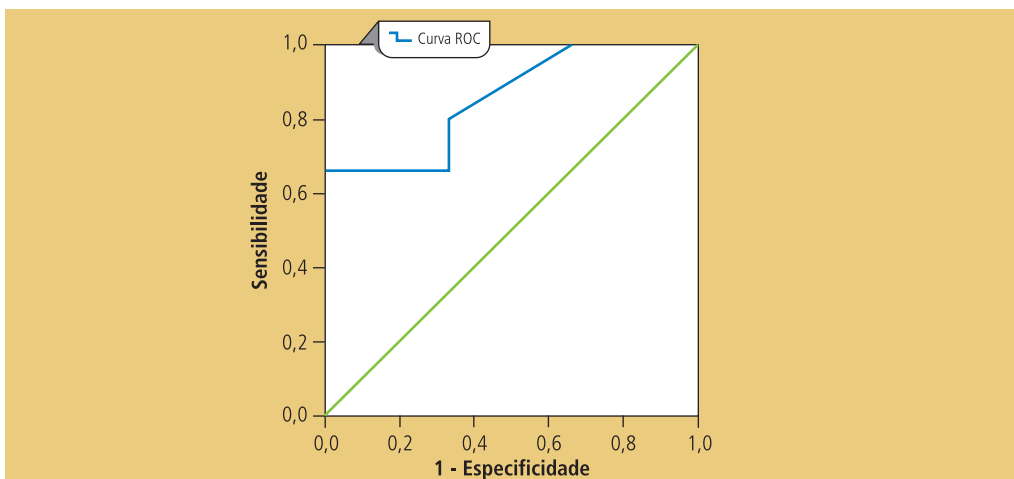
Quando avaliámos o impacto prognóstico que os níveis de expressão do NF-κB em cada subtipo de plasmócitos apresentava na sobrevivência global dos doentes com resposta ao bortezomib, constatámos que níveis de expressão superiores a 25 MIF nos plasmócitos CD138+/CD19- se associavam a uma sobrevivência mais longa (p=0,022) (Figura 42-C), o que também se observou nos doentes com resposta à terapêutica de primeira linha em geral (p=0,007) (Figura 42-D). Os níveis de expressão do NF-κB nos plasmócitos CD138+/CD19+ não apresentaram impacto na resposta e na sobrevivência global.



**FIGURA 42**

**Análise dos níveis de expressão de NF-κB na resposta ao bortezomib e na sobrevivência global de doentes com MM.**

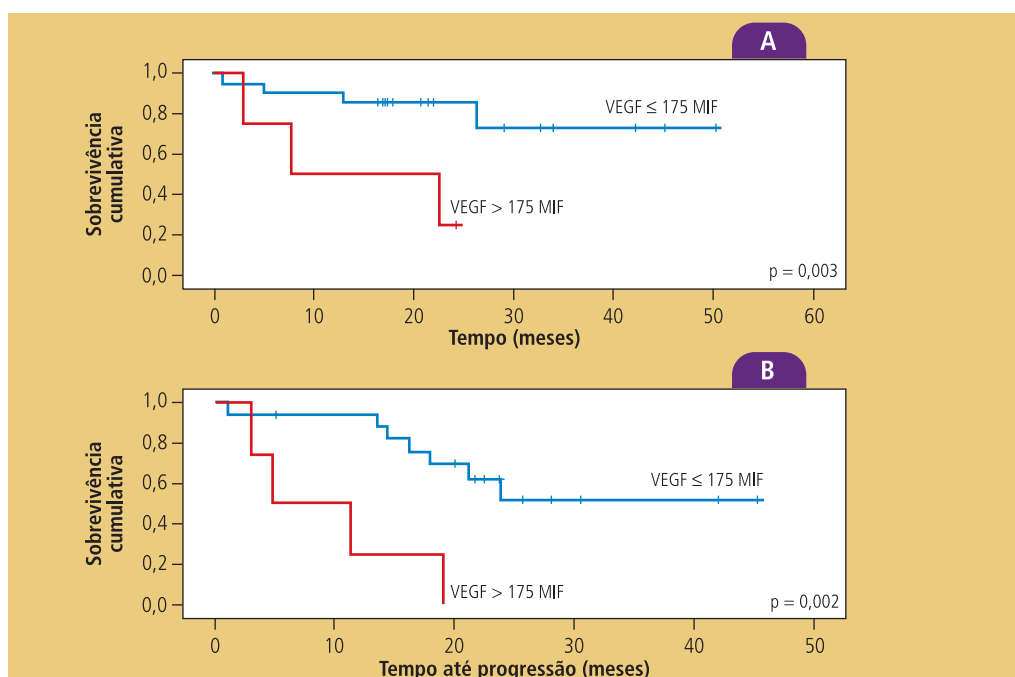
Em **(A)** estão representados os níveis de expressão de NF-κB nos plasmócitos CD138+/CD19- em doentes com e sem resposta ao bortezomib; em **(B)** os níveis de expressão de NF-κB nos plasmócitos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- de doentes com resposta ao bortezomib, em **(C)** o impacto do nível de expressão de NF-κB nos plasmócitos CD138+/CD19- na sobrevivência global dos doentes tratados com bortezomib e em **(D)** a influência da expressão de NF-κB nos plasmócitos CD138+/CD19- na sobrevivência global independentemente da terapêutica de primeira linha. Os pontos de corte foram obtidos através da análise das curvas ROC.



**Curva ROC dos níveis de expressão de NF-κB nos plasmócitos CD138+/CD19- como biomarcador de resposta à terapêutica de primeira linha com bortezomib.**

**FIGURA 43**

Relativamente à expressão de VEGF, a nossa investigação mostrou que níveis de expressão superiores a 175 MIF, nos plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes com MM, se associam a um prognóstico desfavorável, independentemente da terapêutica de primeira linha, traduzido em sobrevivências global e livre de progressão inferiores ( $p=0,003$  e  $p=0,002$ , respetivamente) (Figura 44).



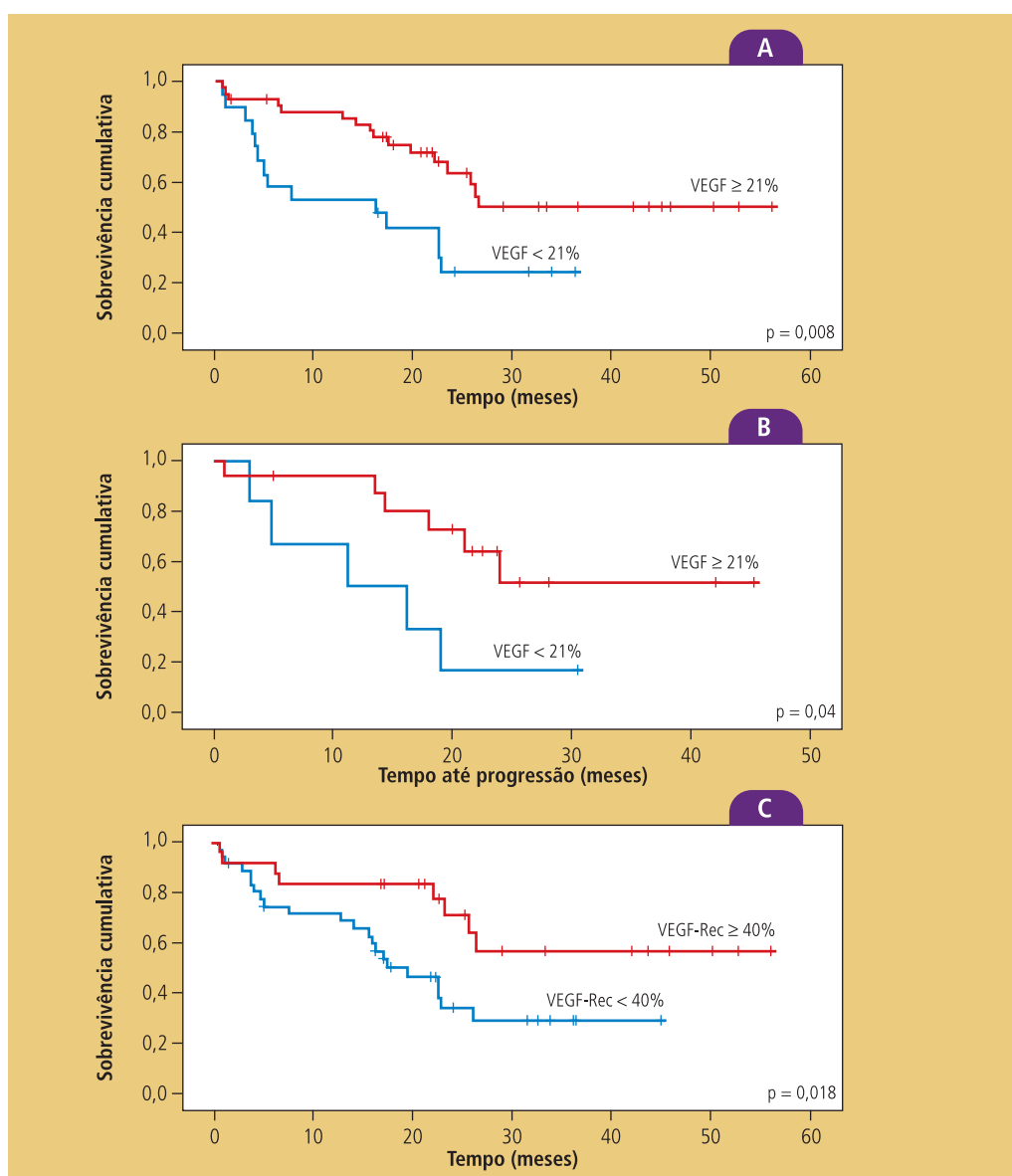
**Influência da expressão de VEGF na sobrevivência de doentes com MM.**

**FIGURA 44**

Em **A** e **B**, apresenta-se o impacto dos níveis de expressão do VEGF nos plasmócitos CD138+/CD19- nas sobrevivências global e livre de progressão, respetivamente. Os pontos de corte foram obtidos através da análise das curvas ROC.

De igual modo, constatamos que na subpopulação tratada com bortezomib em primeira linha, também os níveis de expressão de VEGF superiores a 175 MIF no mesmo subtipo fenotípico de plasmócitos se associam a uma sobrevivência global inferior ( $p=0,046$ ).

Por outro lado, uma percentagem de plasmócitos CD138+/CD19+ com expressão de VEGF superior ou igual a 21% está associada a sobrevivências global e livre de progressão superiores ( $p=0,008$  e  $p=0,04$ , respetivamente), tal como uma percentagem de plasmócitos com o mesmo fenótipo com expressão do recetor do VEGF superior ou igual a 40% ( $p=0,018$ ) (Figura 45).



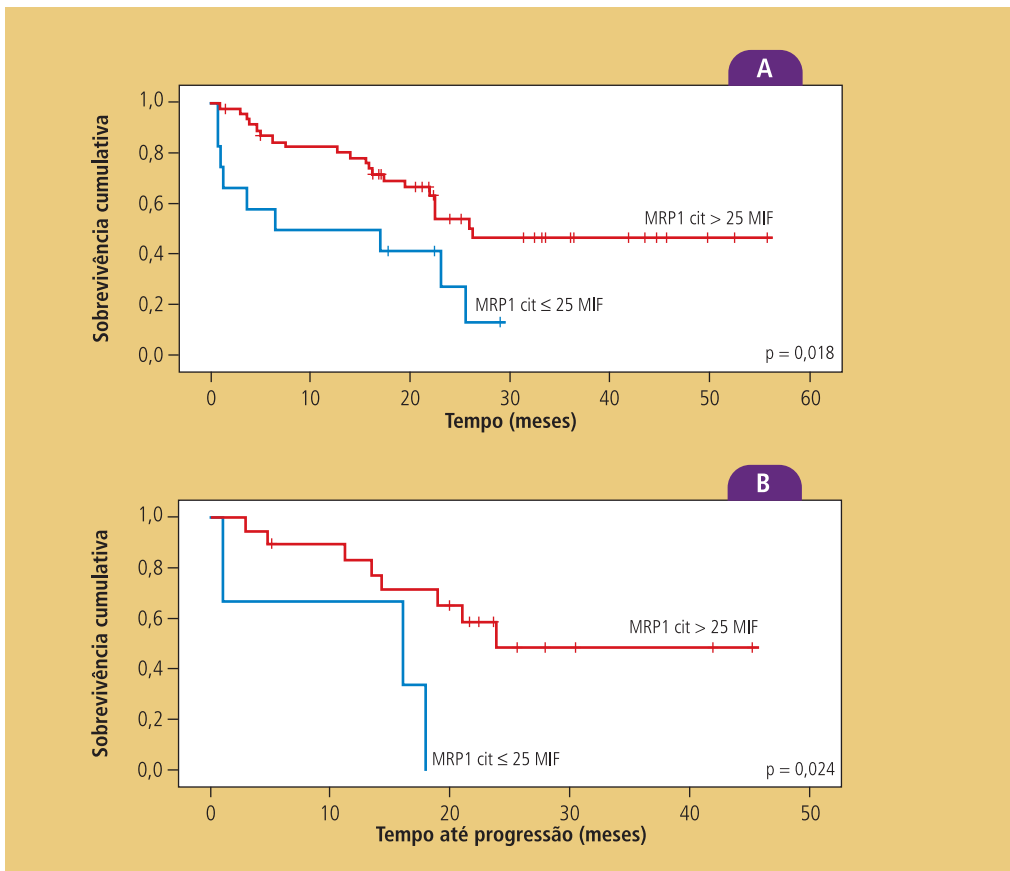
**FIGURA 45** Influência da expressão de VEGF e do seu recetor na sobrevivência de doentes com MM.

Em **A**, **B** e **C**, mostra-se o efeito da percentagem de plasmócitos CD138+/CD19+ com expressão de VEGF nas sobrevivências global (**A**) e livre de progressão (**B**) e com expressão do recetor do VEGF na sobrevivência global (**C**). Os pontos de corte foram obtidos através da análise das curvas ROC.



### - Impacto da expressão de MRP-1 citoplasmática nos plasmócitos CD138+/CD19+ na sobrevivência de doentes com mieloma múltiplo sintomático

No que respeita às proteínas da família ABC analisadas neste trabalho, gp-P e MRP-1 (citoplasmáticas e membranares), constatámos que os níveis de expressão de MRP-1 citoplasmática superiores a 25 MIF, nos plasmócitos CD138+/CD19+, ao diagnóstico, se relacionam com um benefício na sobrevivência global ( $p=0,018$ ) e na sobrevivência livre de progressão ( $p=0,024$ ) (Figura 46).



**Análise dos níveis de expressão de MRP-1 citoplasmática nos plasmócitos CD138+/CD19+ e do seu impacto nas sobrevivências global (A) e livre de progressão (B) nos doentes com MM.**

**FIGURA 46**

Em **A** e **B**, apresenta-se o impacto dos níveis de expressão de MRP-1 citoplasmática (cit) nos plasmócitos CD138+/CD19+ nas sobrevivências global e livre de progressão, respetivamente. Os pontos de corte foram obtidos através da análise das curvas ROC.

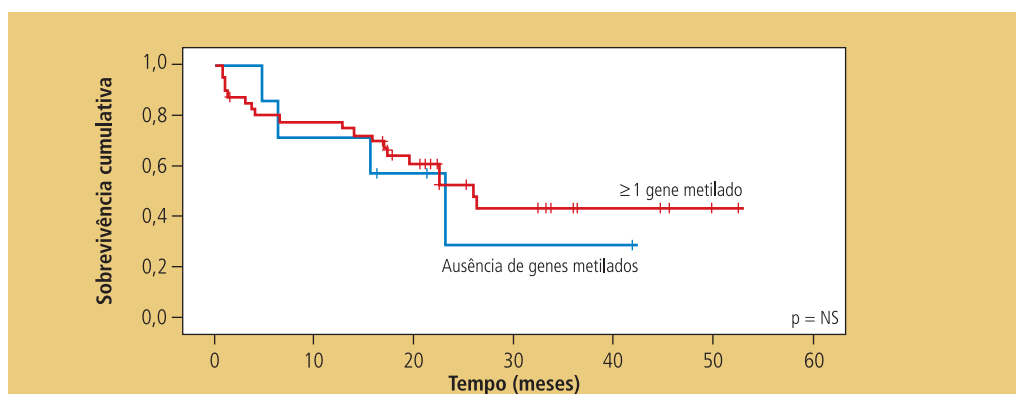
Em suma, os nossos estudos demonstram que, nos doentes com MM, a caspase 3 influencia a resposta à terapêutica de primeira linha; o FAS, o FAS ligando e o TRAIL têm impacto na sobrevivência global; o NF- $\kappa$ B e o VEGF influenciam simultaneamente a resposta à terapêutica e a sobrevivência; a MRP-1 citoplasmática apresenta impacto nas sobrevivências livre de progressão e global.

#### 4.1.11. Associação entre a metilação dos genes *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK*, genes dos recetores do *TRAIL*, *-R1*, *-R2*, *-R3*, *-R4*, as características clínico-laboratoriais e o prognóstico em doentes com gamopatias monoclonais

Pesquisámos associações entre o padrão de metilação dos oito genes estudados (*p15*, *p16*, *p53*, *DAPK*, *TRAIL-R1*, *-R2*, *-R3* e *-R4*) e as características clínicas e laboratoriais presentes ao diagnóstico em doentes com MM, incluindo a idade, o sexo, o tipo de paraproteína, o estágio ISS, os valores de hemoglobina, de LDH, de  $\beta$ 2-microglobulina, de creatinina e de cálcio séricos, a presença de lesões ósseas, de doença extramedular, anomalias citogenéticas e a expressão de determinados marcadores imunofenotípicos (CD27, CD28, CD56 e CD117). Os doentes com MM e metilação do gene *DAPK* apresentam mais frequentemente anemia ao diagnóstico (88% vs 55%;  $p=0,023$ ). Não foram evidenciadas outras associações entre os parâmetros clínicos e laboratoriais mencionados e a metilação anómala de nenhum dos genes estudados.

Da mesma forma, não foram encontradas relações entre o estado de metilação destes oito genes e a ploidia do DNA, as anomalias citogenéticas estudadas, como a del13/13q, a t(14q32), a t(4;11), a t(11;14), a del(17p), as anomalias do cromossoma 1 e a expressão dos marcadores imunofenotípicos CD27, CD28, CD56 e CD117, nos doentes com MGUS, MMI, MM e MMRR.

De acordo com os nossos resultados, a metilação dos genes *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK*, *TRAIL-R1*, *-R2* e *-R4* não influenciou a duração nem a qualidade de resposta à terapêutica, assim como as sobrevivências livre de progressão e global, nos doentes com MM (Figura 47). No entanto, observámos uma associação entre a metilação de *TRAIL-R3* e uma maior probabilidade de recidiva após terapêutica de primeira linha (88% dos doentes com metilação de *TRAIL-R3* recidivaram vs 46% sem metilação;  $p=0,04$ ), sem impacto na sobrevivência global.



**FIGURA 47**

**Curvas de sobrevivência global do subgrupo de doentes com mieloma múltiplo sintomático (MM), de acordo com a presença de, pelo menos, um dos genes estudados metilado.**

Não foi observado impacto da presença de metilação dos genes estudados na sobrevivência global dos doentes com MM. NS - sem significado estatístico.

## 4.2. Estudos realizados na linha celular de mieloma múltiplo NCI-H929

### 4.2.1. Caracterização da linha celular NCI-H929

Na presente investigação, foi utilizada a linha celular humana de MM NCI-H929, obtida a partir de células isoladas do líquido pleural de uma doente, caucasiana, com 62 anos de idade e o diagnóstico de mieloma múltiplo IgAk em recidiva (Gazdar *et al.*, 1986).

### 4.2.2. Estudo dos efeitos antiproliferativos e citotóxicos dos fármacos antineoplásicos

As células NCI-H929 foram incubadas com os seguintes fármacos antineoplásicos: bortezomib (inibidor do proteasoma), partenolide (inibidor do NF- $\kappa$ B), everolimus (inibidor da via mTOR), decitabina (hipometilante), tricostatina A (inibidor das histonas desacetilases), ácido gambóxico (indutor da apoptose), silibinina (inibidor da via STAT3 e da survivina), nas condições descritas na secção *Materiais e Métodos*. Os efeitos citotóxicos destes fármacos foram avaliados de acordo com três tipos de parâmetros: variações na viabilidade celular, análise da capacidade de indução de morte celular por apoptose/necrose através da marcação dupla com anexina V/iodeto de propídeo, por citometria de fluxo e observação das alterações morfológicas induzidas pelos referidos fármacos por microscopia ótica. Os efeitos antiproliferativos foram determinados pela análise do ciclo celular.

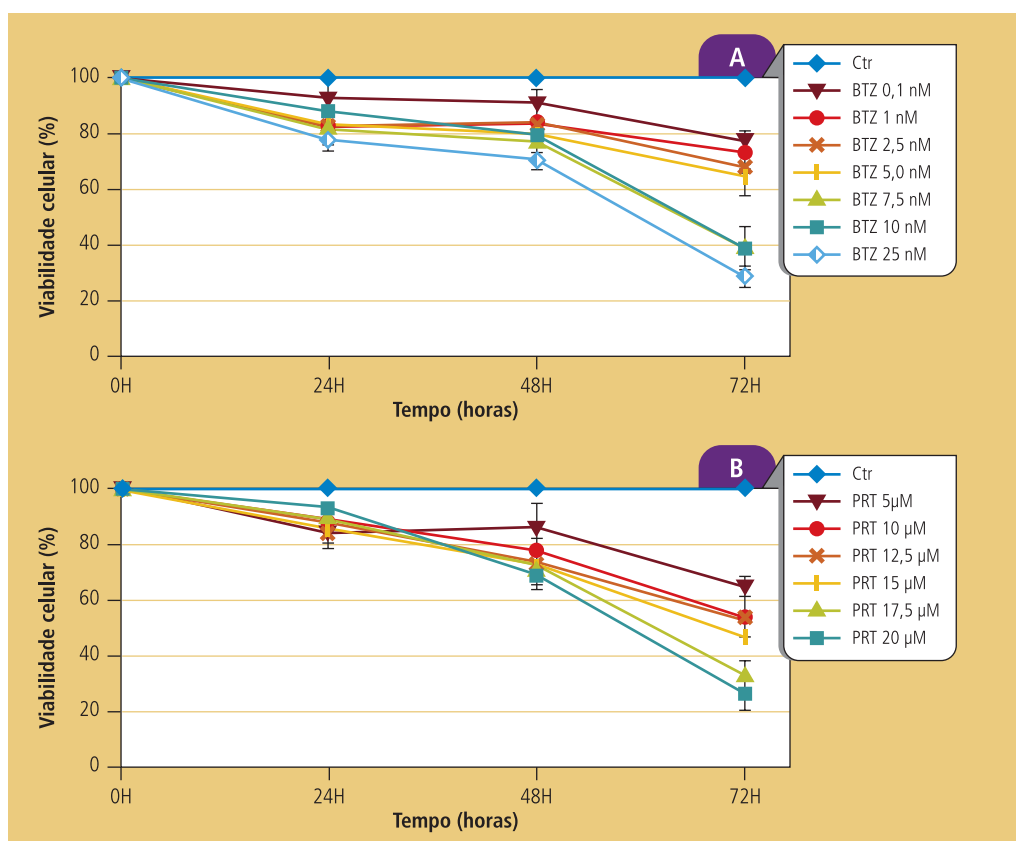
#### 4.2.2.1. Avaliação da viabilidade celular pelo método da resazurina – curvas dose-resposta

A proliferação celular foi avaliada através do ensaio metabólico com resazurina, como descrito na secção *Materiais e Métodos*.

Nas figuras seguintes, encontram-se representadas as curvas dose-resposta das células H929 incubadas com os diferentes fármacos analisados neste estudo. Na [figura 48](#), observa-se o efeito de dois inibidores da via do NF- $\kappa$ B, o bortezomib (A) e o partenolide (B), na viabilidade das células H929. A análise das curvas revela que ocorreu redução da viabilidade celular de uma forma dependente da dose e do tempo de exposição das células a estes agentes. O efeito citotóxico do bortezomib

é mais acentuado às 72 horas de exposição ao fármaco, sendo o  $IC_{50}$  (capacidade do fármaco de reduzir a viabilidade celular para 50%) atingido com a concentração de 7,5 nM. O efeito citotóxico é máximo quando as células são incubadas com este inibidor do proteasoma na dose de 25 nM, sendo a viabilidade celular de apenas 28,8% (Figura 48-A).

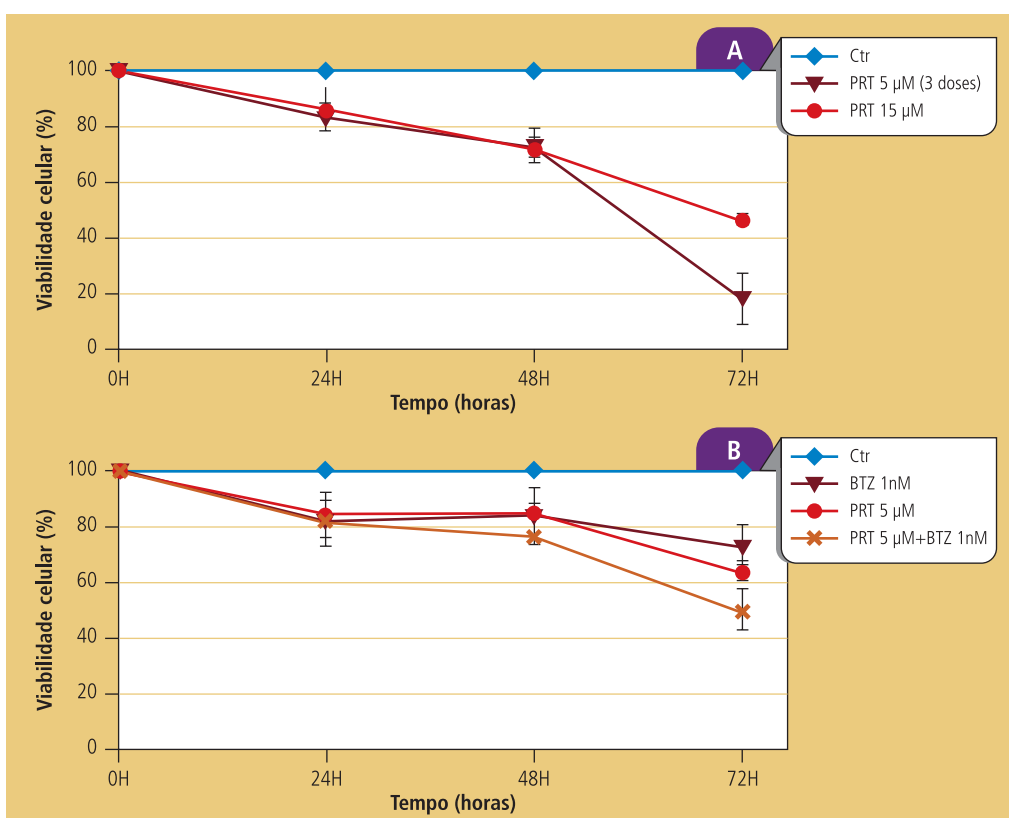
O efeito citotóxico do partenolide, nas células H929, foi estudado em concentrações compreendidas entre 5 e 20  $\mu$ M e constatamos que o seu efeito citotóxico é dependente da concentração e do tempo de exposição das células (Figura 48-B). Este efeito é mais pronunciado às 72 horas de incubação para todas as concentrações avaliadas. O  $IC_{50}$  para o partenolide foi atingido com a concentração de 15  $\mu$ M, às 72 horas. O efeito citotóxico máximo foi alcançado com a dose máxima analisada (20  $\mu$ M) e traduziu-se numa viabilidade celular de 26,5%, às 72 horas de incubação.



**FIGURA 48** Curvas dose-resposta de inibidores do NF- $\kappa$ B, bortezomib (A) e partenolide (B), nas células NCI-H929.

As células H929 foram incubadas na ausência de fármacos (controlo, Ctr) e com concentrações crescentes de bortezomib (BTZ) (A) e de partenolide (PRT) (B) e a sua viabilidade (% de células vivas) foi avaliada em intervalos de 24 horas durante 72 horas. Os resultados estão expressos em percentagem de células vivas e representam a média  $\pm$  erro-padrão de 3-6 experiências independentes. Os resultados têm significado estatístico ( $p < 0,05$ ) para todas as concentrações analisadas.

Quando avaliado o efeito do fracionamento da dose de partenolide (administração diária de 5µM), observou-se um efeito citotóxico 2,5 vezes superior com a dose fracionada (viabilidade celular de 18%) comparativamente à administração em dose única de 15 µM (viabilidade celular de 46%) ( $p=0,007$ ) (Figura 49-A). A associação de partenolide com bortezomib resultou num incremento do efeito citotóxico de 14% comparativamente à citotoxicidade induzida pelo partenolide em monoterapia ( $p=NS$ ) e de 23% em relação ao bortezomib como fármaco único ( $p=0,03$ ) (Figura 49-B).



**Avaliação do fracionamento da dose do partenolide (PRT) (A) e da associação do bortezomib (BTZ) com o PRT (B) na viabilidade das células NCI-H929.**

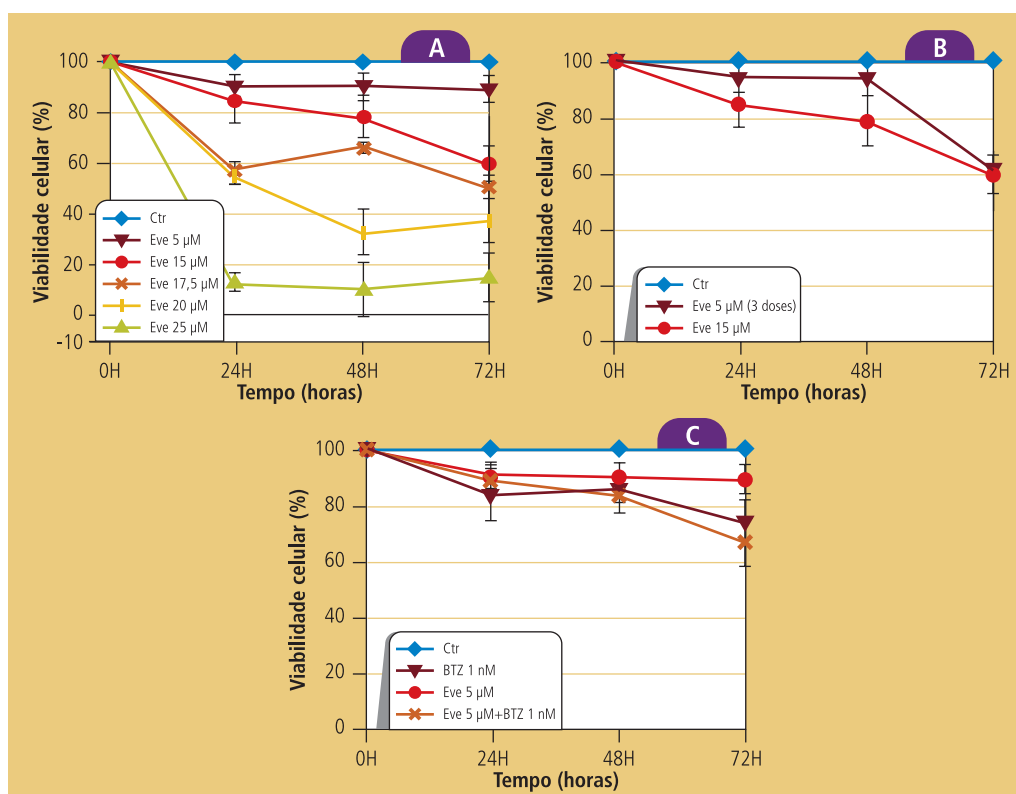
**FIGURA 49**

Em **A**, as curvas mostram a comparação entre a administração fracionada de 3 doses de 5µM de PRT, a cada 24h nas primeiras 72h e a administração em dose única de 15µM ( $p=0,007$ ). Em **B**, compara-se a associação de PRT+BTZ com cada um dos fármacos em monoterapia. PRT+BTZ vs PRT,  $p=NS$ ; PRT+BTZ vs BTZ,  $p=0,03$ . Ctr - controlo.

No que respeita ao everolimus, o  $IC_{50}$  às 24 horas é alcançado com doses compreendidas entre 20 e 25 µM e às 72 horas é de 17,5µM. O efeito citotóxico máximo é atingido às 24 horas na dose de 25µM, traduzido por uma redução da viabilidade celular para 12,3%, que se mantém sobreponível às 48 e às 72 horas (Figura 50-A). Os resultados têm significado estatístico ( $p<0,05$ ) para todas as concentrações analisadas. Seleccionámos, de seguida, a dose média de 15µM e comparámos a sua administração em dose única e em doses fracionadas de 5µM, num total de

três doses, às 0, 24 e 48 horas. A viabilidade das células NCI-H929 foi analisada em cada um destes intervalos durante 72 horas. Os resultados desta avaliação encontram-se apresentados na [figura 50-B](#) e mostram que não existem diferenças significativas entre estas duas formas de administração do everolimus.

Prosseguimos o nosso estudo analisando o efeito da combinação dos fármacos bortezomib e everolimus nas doses de 1 nM e 5  $\mu$ M, respetivamente ([Figura 50-C](#)). Na curva que representa a combinação dos dois fármacos, observamos um efeito aditivo, uma vez que a redução da viabilidade celular às 72 horas é mais acentuada com a combinação (66% de células viáveis) do que com cada fármaco administrado em monoterapia (74% de células viáveis com o bortezomib e 88% com o everolimus após 72 horas de incubação). A associação de bortezomib com everolimus resultou numa redução da viabilidade celular significativamente superior em relação ao everolimus em monoterapia ( $p=0,006$ ), sem diferença significativa em comparação com o bortezomib em monoterapia. Em nenhum dos casos, foi atingido o  $IC_{50}$ .

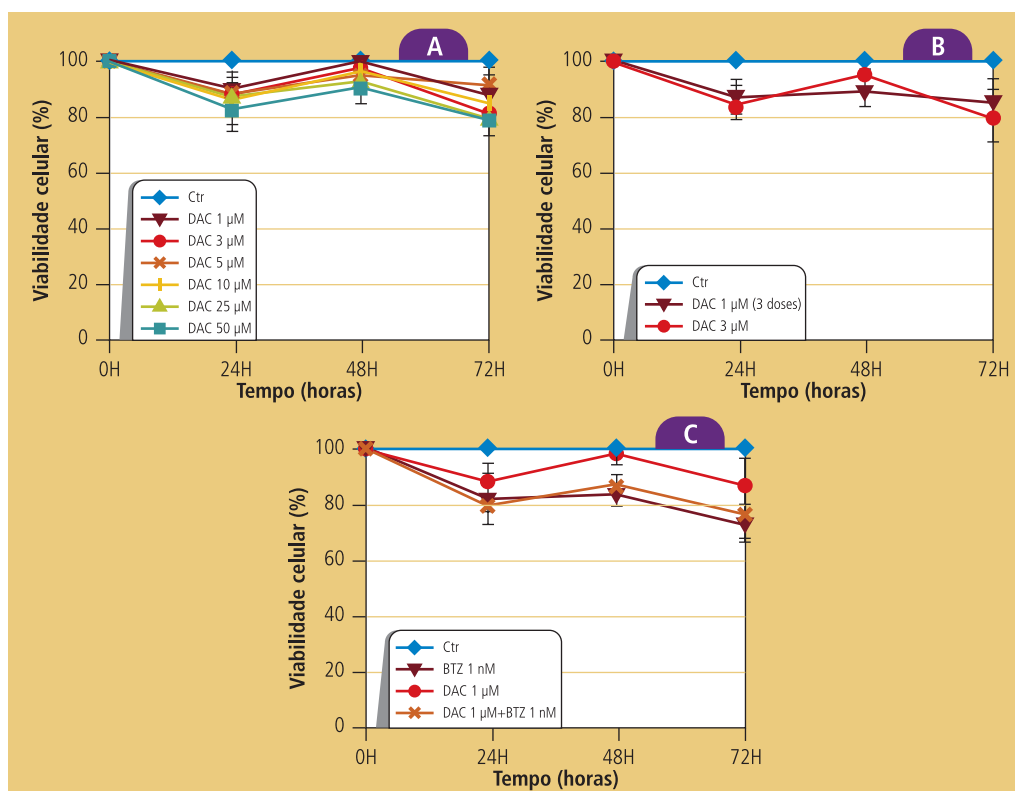


**FIGURA 50** Efeito do everolimus (Eve) em monoterapia (A e B) e em associação com o bortezomib (BTZ) (C) na viabilidade das células NCI-H929.

Os resultados estão expressos em percentagem de células viáveis e representam a média  $\pm$  erro-padrão de 3-6 experiências independentes. Em **A**, apresenta-se o efeito citotóxico do Eve em diferentes doses. Os resultados têm significado estatístico ( $p<0,05$ ) para todas as concentrações analisadas. Em **B**, as curvas mostram a comparação entre a administração fracionada de 3 doses de 5 $\mu$ M de Eve, a cada 24h nas primeiras 72h e a administração em dose única de 15 $\mu$ M ( $p=NS$ ). Em **C**, compara-se a associação Eve+BTZ com cada um dos fármacos em monoterapia. Eve + BTZ vs Eve ( $p<0,01$ ). Eve + BTZ vs BTZ ( $p=NS$ ). Ctr - controlo.

De seguida, analisámos o efeito citotóxico do hipometilante decitabina em monoterapia, em doses compreendidas entre 1 e 50  $\mu\text{M}$  nas células NCI-H929. O tratamento destas células com a dose de 1  $\mu\text{M}$  não demonstrou uma redução significativa da viabilidade celular comparativamente ao controlo (Figura 51-A) e, mesmo quando as células foram tratadas com a dose máxima de 50  $\mu\text{M}$ , o efeito citotóxico da decitabina foi inferior ao observado com fármacos previamente descritos, verificando-se uma redução da viabilidade celular de cerca de 20%, após 72 horas de incubação ( $p=0,007$ ).

Posteriormente avaliámos o efeito citotóxico do fracionamento da dose de decitabina (Figura 51-B). Assim, tratámos as células H929 com 1  $\mu\text{M}$  de decitabina em 3 administrações consecutivas, às 0, 24 e 48 horas e avaliámos a viabilidade celular. Os resultados desta análise não revelaram diferenças significativas no efeito citotóxico da decitabina entre a administração fracionada e a administração em dose única de 3  $\mu\text{M}$  às 0 horas. Por outro lado, a administração simultânea de decitabina e bortezomib não resultou, igualmente, num acréscimo da citotoxicidade.



**Efeito da decitabina (DAC) em monoterapia (A e B) e em associação com o bortezomib (BTZ) (C) na viabilidade das células NCI-H929.**

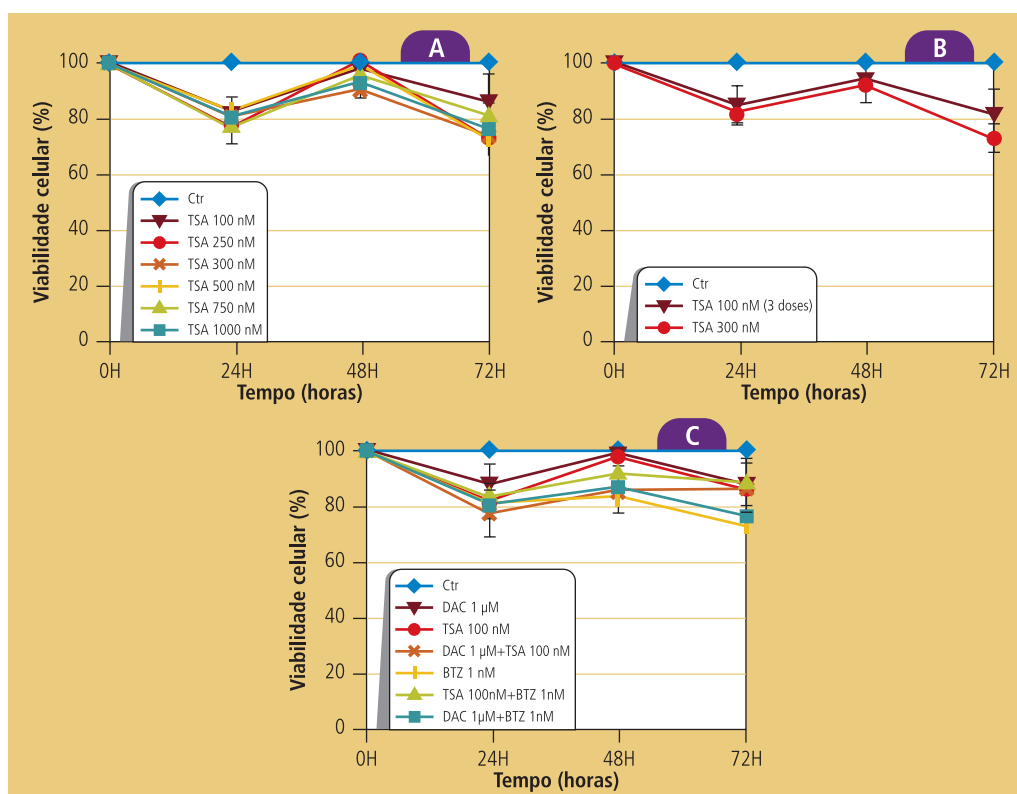
**FIGURA 51**

As células H929 foram tratadas com concentrações crescentes de DAC e a sua viabilidade (% de células vivas) foi analisada em intervalos de 24 horas, durante 72 horas. Os resultados representam a média  $\pm$  erro-padrão de 3-6 experiências independentes. Em **A**, apenas foram observadas diferenças significativas para doses iguais e superiores a 3  $\mu\text{M}$  ( $p<0,05$ ). Em **B** e **C**,  $p=NS$ . Ctr - controlo.



De facto, a exposição simultânea das células H929 à combinação de decitabina (1  $\mu$ M) e bortezomib (1 nM) traduziu-se numa redução da viabilidade para 77% após 72 horas, idêntica à do bortezomib em monoterapia e ligeiramente inferior à da decitabina em monoterapia ( $p=NS$ ) (Figura 51-C).

De seguida, as células H929 foram tratadas com tricostatina A, um inibidor da desacetilase das histonas, em concentrações que variaram entre 100 e 1000 nM, não tendo sido atingido o  $IC_{50}$  para nenhuma das doses testadas. O efeito citotóxico máximo foi de 28% para a dose de 500 nM após 72 horas. O fracionamento das doses da tricostatina A (três administrações de 100 nM) não mostrou resultados significativamente diferentes em relação à dose única de 300 nM após 72 horas de incubação (viabilidades de 80 e 72%, respetivamente), assim como a administração concomitante de tricostatina A com bortezomib ou decitabina (Figura 52).



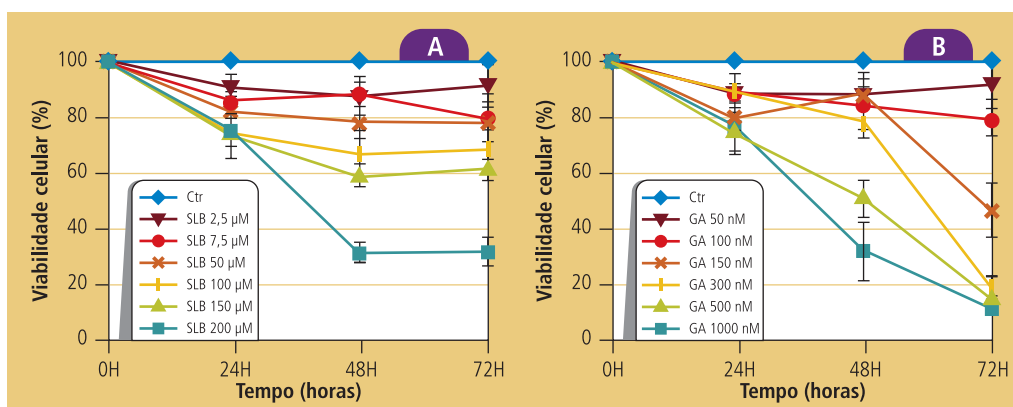
**FIGURA 52**

### Efeito da tricostatina A (TSA) na viabilidade das células NCI-H929.

Os resultados estão representados através de curvas dose-resposta. As células H929 foram tratadas com concentrações crescentes de tricostatina A e a sua viabilidade (% de células vivas) foi analisada em intervalos de 24 horas, durante 72 horas. Os resultados têm significado estatístico ( $p<0.05$ ) para todas as concentrações analisadas (A). Em B, avaliação do efeito do fracionamento da dose de TSA (três administrações de 100 nM às 0, 24 e 48 horas) e da administração única de 300 nM, às 0h, na viabilidade das células H929 ( $p=NS$ ). Em C, análise das combinações TSA+BTZ e TSA+Decitabina (DAC) na viabilidade celular (sem diferenças significativas entre as associações e cada fármaco em monoterapia). Os resultados representam a média  $\pm$  erro-padrão de 3-6 experiências independentes. Ctr - controlo.

Foi avaliado o potencial terapêutico do inibidor da via STAT3, silibinina, na linha celular NCI-H929, em monoterapia, em diferentes concentrações (2,5 a 200  $\mu\text{M}$ ), em dose única e em doses fracionadas, assim com em associação com o bortezomib (Figura 53). O  $\text{IC}_{50}$  apenas foi alcançado com a dose máxima analisada de 200  $\mu\text{M}$ , às 48 horas. Para a maioria das doses, a citotoxicidade não aumentou após as 48 horas de incubação das células com a silibinina (Figura 53-A). O fracionamento das doses deste fármaco (três administrações de 2,5  $\mu\text{M}$  às 0, 24 e 48 horas) não potenciou o seu efeito terapêutico (Figura 53-C). Tal como descrito em relação ao everolimus, apesar da associação de bortezomib com silibinina resultar numa redução significativa da viabilidade celular (para 69%) em comparação com a silibinina em monoterapia (90%;  $p=0,009$ ), às 72 horas, não se observou um incremento do efeito em relação ao bortezomib em monoterapia (viabilidade celular de 74%;  $p=\text{NS}$ ) (Figura 53-E).

Por fim, submetemos as células NCI-H929 ao efeito do indutor da apoptose, o ácido gambóxico, em concentrações variáveis (50 a 1000 nM), em doses fracionadas de 50nM (três administrações às 0, 24 e 48 horas de incubação) e em combinação com o bortezomib (Figura 53). O  $\text{IC}_{50}$  foi atingido com a dose de 500 nM às 48 horas. O efeito citotóxico do ácido gambóxico foi dependente da dose e do tempo (neste último caso, para as doses de 150nM ou superiores). O efeito máximo foi alcançado com a dose de 1000 nM às 72 horas (viabilidade celular de 10%) (Figura 53-B). O fracionamento da dose resultou numa citotoxicidade significativamente inferior (viabilidade celular de 47%) quando comparada com a administração única (90%;  $p=0,002$ ) (Figura 53-D). A associação com bortezomib potenciou de forma ligeira o efeito terapêutico deste fármaco em monoterapia, às 72 horas (viabilidade celular de 66% vs 74%;  $p=\text{NS}$ ) e de forma significativa o efeito citotóxico do ácido gambóxico em monoterapia ( $p=0,01$ ) (Figura 53-E).

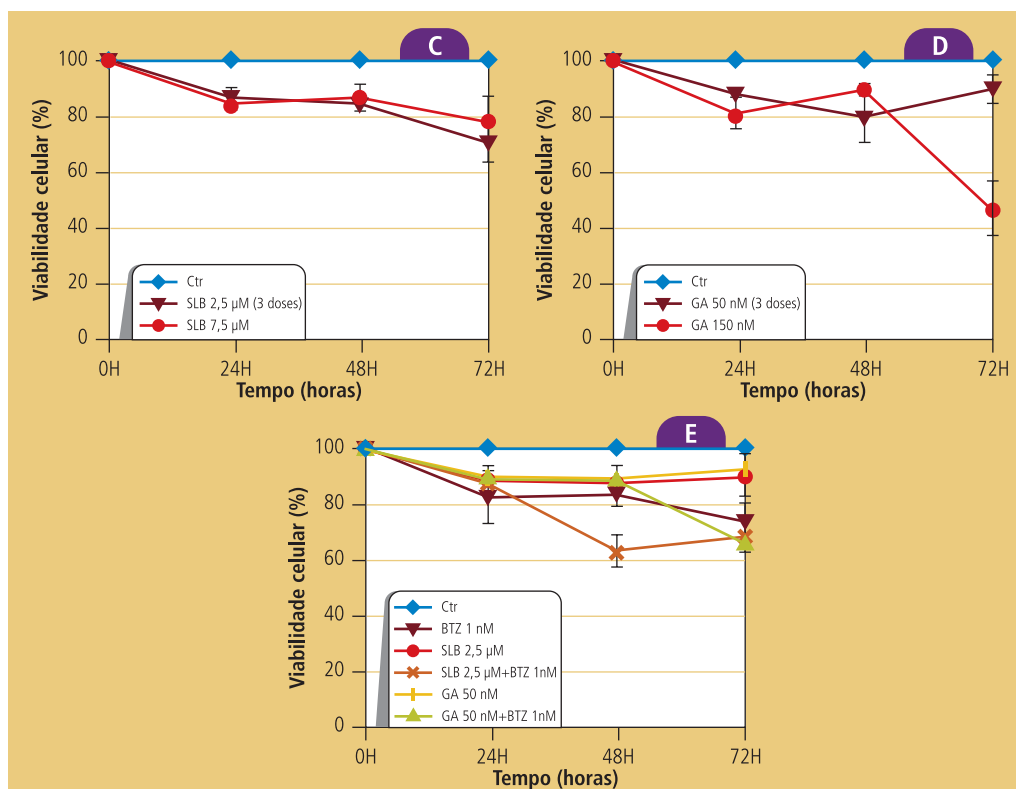


**Curvas dose-resposta das células H929 tratadas com silibinina (SLB) e com ácido gambóxico (GA).**

**FIGURA 53**

(cont.)

Em **A** e **B**, efeitos da SLB e do GA em monoterapia; apenas foram observadas diferenças significativas, ( $p<0,05$ ) para as doses iguais ou superiores a 7,5  $\mu\text{M}$  para a SLB e a 100nM para o GA. Ctr - controlo.



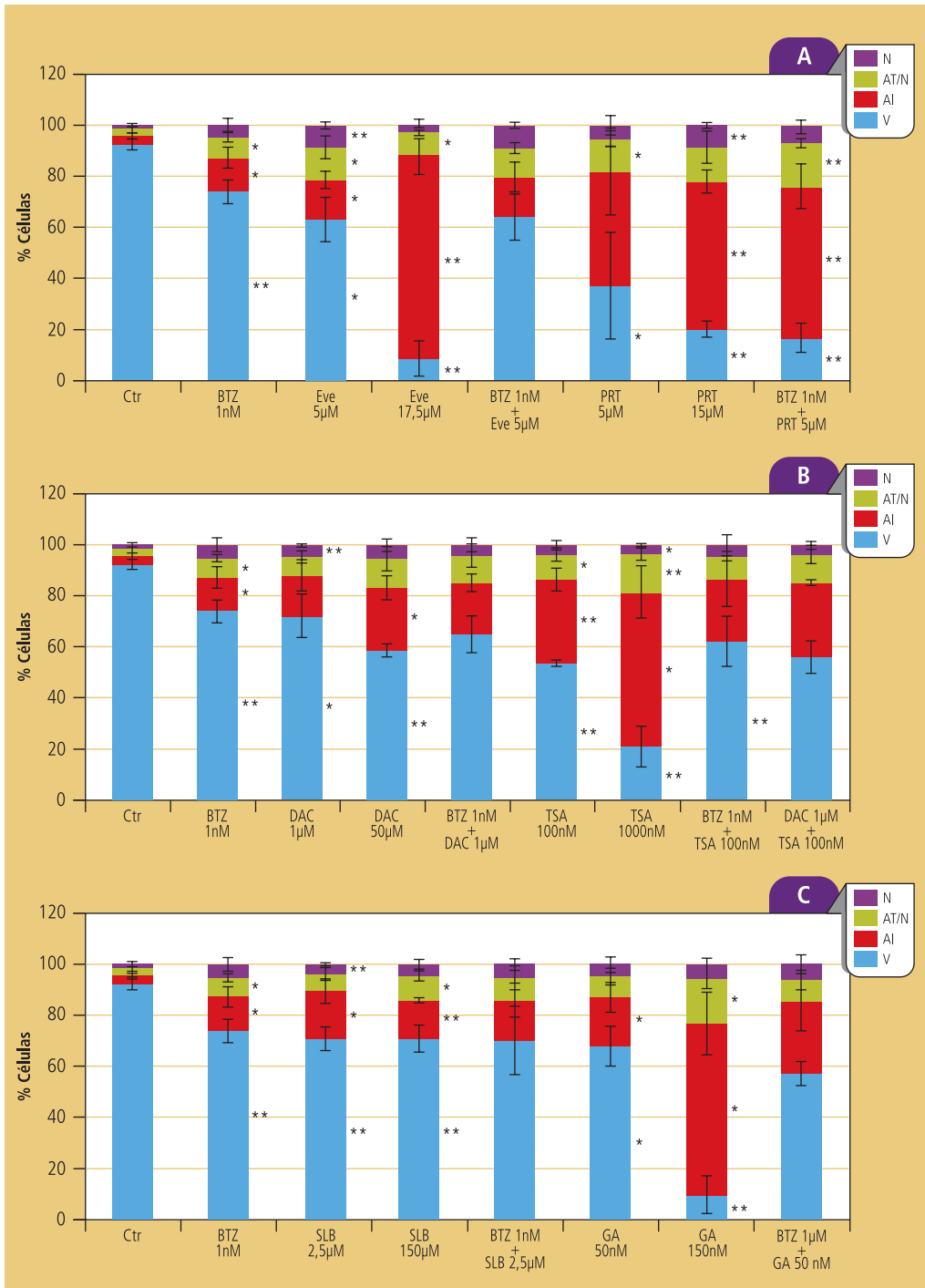
**FIGURA 53**  
(conclusão)

**Curvas dose-resposta das células H929 tratadas com silibinina (SLB) e com ácido gambogico (GA).**

Em **C** e **D**, representado o efeito do fracionamento da dose (às 0h, 24h e 48h) em relação à dose única (às 0h), sem diferenças para a SLB e efeito citotóxico mais acentuado da dose única para o GA ( $p=0,001$ ). Em **E**, analisada a associação de SLB e de GA com bortezomib (BTZ) e comparada com a monoterapia; SLB+BTZ vs SLB ( $p=0,009$ ) e GA+BTZ vs GA ( $p=0,01$ ). SLB+BTZ vs BTZ e GA+BTZ vs BTZ ( $p=NS$ ). Os resultados representam a média  $\pm$  erro-padrão de 3-6 experiências independentes. Ctrl - controlo.

#### 4.2.2.2. Análise da morte celular induzida pelos fármacos antineoplásicos na linha celular NCI-H929 por citometria de fluxo e por microscopia ótica

Os efeitos citotóxicos dos fármacos antineoplásicos partenolide, everolimus, decitabina, tricostatina A, silibinina e ácido gambogico, em monoterapia, e da associação de cada um destes agentes com o bortezomib, nas células NCI-H929, foram avaliados, por citometria de fluxo, recorrendo à marcação das células com anexina V e iodeto de propídeo, de acordo com o procedimento descrito na secção *Materiais e Métodos* (Figura 54). Como ilustrado nesta figura, os compostos estudados induzem, predominantemente, morte celular por apoptose e a percentagem de células em morte celular é dependente da concentração do fármaco a que foram submetidas. O aumento da apoptose associado a doses mais elevadas do fármaco foi particularmente evidente com o partenolide, com o everolimus, com a tricostatina

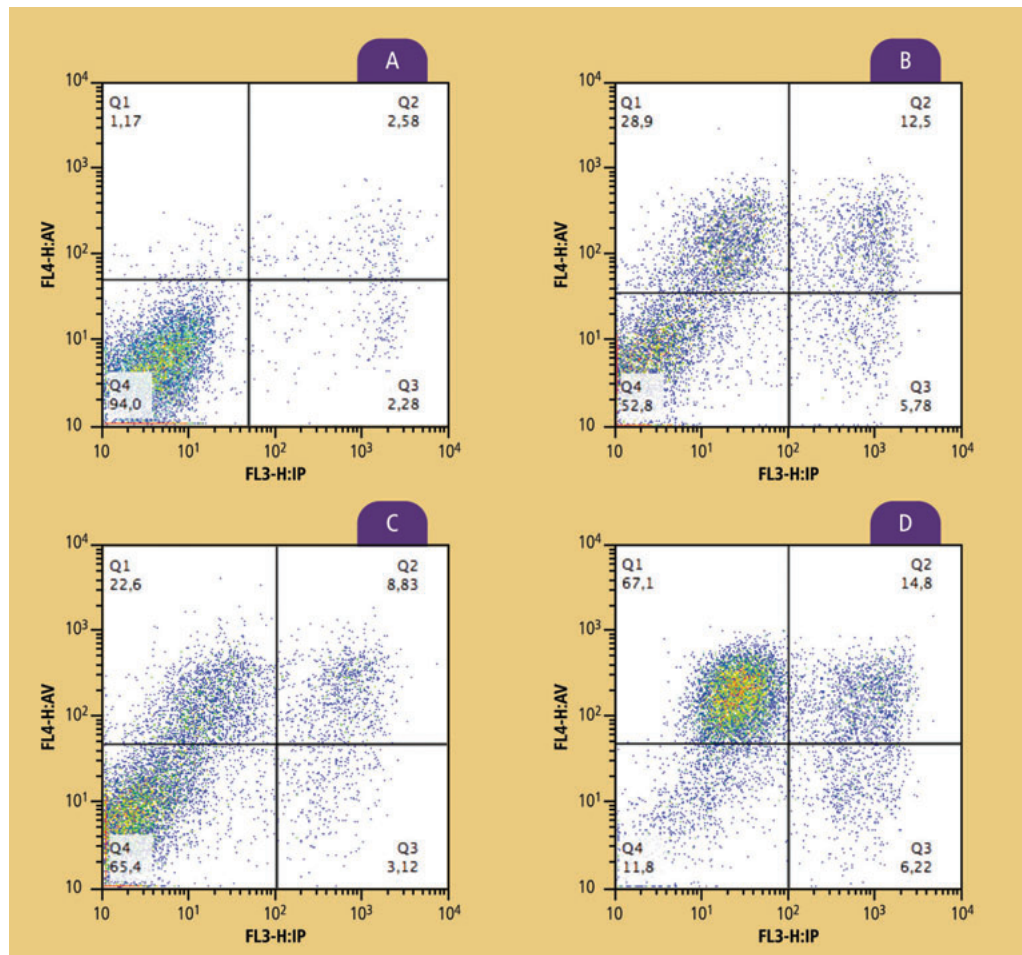


**Efeitos citotóxicos dos fármacos antineoplásicos nas células NCI-H929, em monoterapia e em associação com bortezomib (BTZ), com análise da capacidade destes desencadear morte celular por apoptose ou por necrose, através da marcação dupla das células com anexina V e iodeto de propídeo.**

**FIGURA 54**

Em **A** está representado o partenolide (PRT) e o everolimus (Eve), em **B** os moduladores epigenéticos decitabina (DAC) e tricostatina A (TSA) e em **C** a silibina (SLB) e o ácido gambóxico (GA). As células foram incubadas com os fármacos nas concentrações indicadas na figura, durante 24 horas. Os resultados encontram-se expressos em percentagem de células viáveis (V), percentagem de células em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N), em necrose (N) e representam a média  $\pm$  erro-padrão de 3 a 6 ensaios independentes. Os fármacos em monoterapia estão comparados com o controlo (Ctrl) e as associações, com o bortezomib em monoterapia (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

tatina A e com o ácido gambóxico (Figura 54-A, B e C). No caso da decitabina, o incremento da apoptose associado ao aumento da dose do fármaco foi de apenas 10% e, em relação à silibinina, não foram observadas diferenças na morte celular por apoptose, entre doses tão díspares como 2,5  $\mu\text{M}$  e 150  $\mu\text{M}$  (Figura 54-B e C). A associação dos fármacos estudados com o bortezomib resultou num incremento significativo da apoptose das células NCI-H929, apenas com o partenolide (Figura 54-A). Estudámos, igualmente, o efeito citotóxico da associação dos dois agentes epigenéticos, decitabina e tricostatina A, nas células H929 e verificámos que esta combinação induz acréscimo da apoptose apenas comparativamente à decitabina em monoterapia ( $p < 0,05$ ).

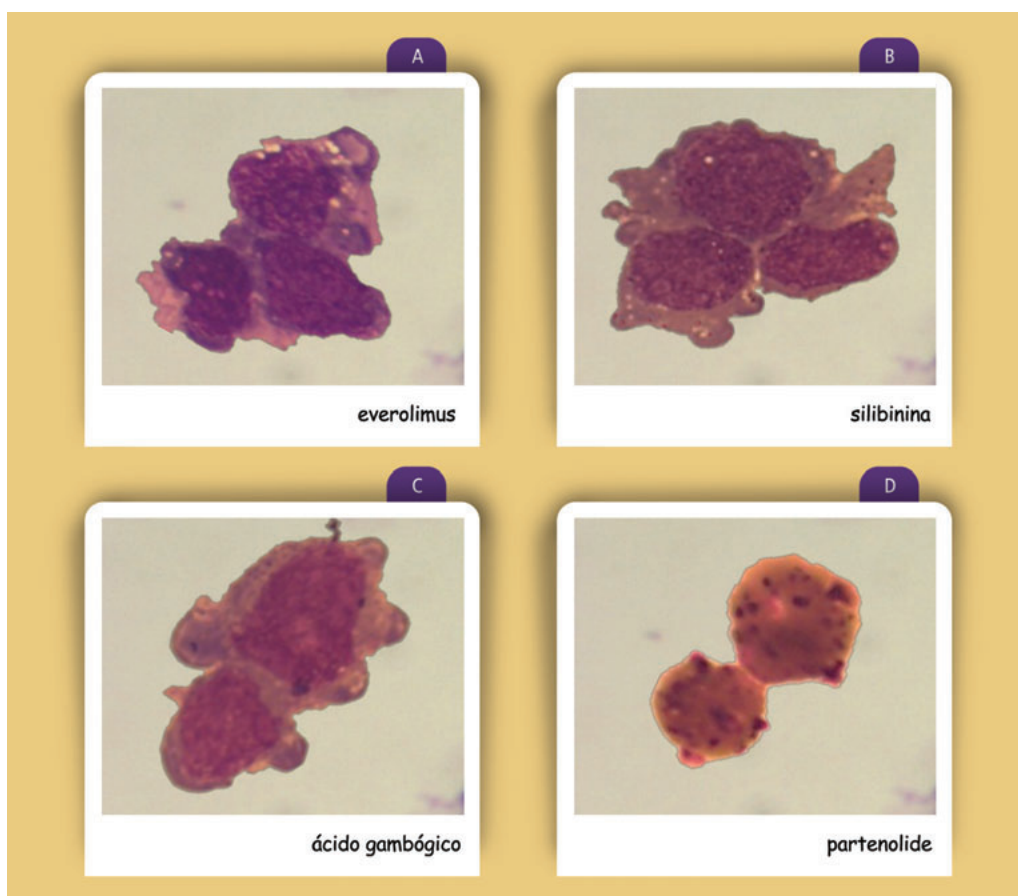


**FIGURA 55** Exemplos de *dot plots* representativos do tipo de morte celular induzida por fármacos anti-neoplásicos na linha celular humana NCI-H929, por citometria de fluxo.

Em **A**, na ausência do tratamento (controlo), observa-se uma viabilidade celular de 94%. Em **B**, o efeito do ácido gambóxico (150nM), onde se evidenciam 28,9% das células em apoptose inicial, 12,5% de células em apoptose tardia/necrose. Em **C**, o impacto do everolimus (5 $\mu\text{M}$ ), onde se observam 22,6% das células em apoptose inicial e 8,83% em apoptose tardia/necrose. Em **D**, após exposição ao partenolide (5 $\mu\text{M}$ ), onde se destacam 67,1% de células em apoptose inicial e 14,8% em apoptose tardia/necrose. Em todos os casos a percentagem de células em necrose foi inferior a 7%.

#### 4.2.2.3. Detecção do tipo de morte celular induzida pelos fármacos antineoplásicos por microscopia ótica

Com o objetivo de confirmar os resultados obtidos, os efeitos citotóxicos dos fármacos antineoplásicos estudados foram também caracterizados pela análise morfológica das células por microscopia ótica, na ausência e na presença dos referidos agentes. A [figura 56](#) mostra os aspetos morfológicos observados quando as células NCI-H929 são tratadas com os fármacos everolimus (17,5 $\mu$ M) (A), silibinina (150 $\mu$ M) (B), ácido gambógico (150nM) (C) e partenolide (15 $\mu$ M) (D) e também na ausência de tratamento (E), em esfregaços de células corados com solução de May-Grünwald-Giemsa. Após a exposição das células H929 ao efeito citotóxico dos fármacos mencionados, são aparentes alterações morfológicas características de apoptose, como o *blebbing* (projeções citoplasmáticas), os corpos apoptóticos, a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear ([Figura 56](#)).



Aspetos morfológicos das células NCI-H929 após incubação com everolimus 17,5 $\mu$ M (A), silibinina 150 $\mu$ M (B), ácido gambógico 150nM (C), partenolide 15 $\mu$ M (D) e na ausência de tratamento (E).

**FIGURA 56**  
(cont.)

Os esfregaços de células foram corados com solução de May-Grünwald-Giemsa e observados através de microscopia ótica (ampliação de 500x).



**FIGURA 56**  
(conclusão)

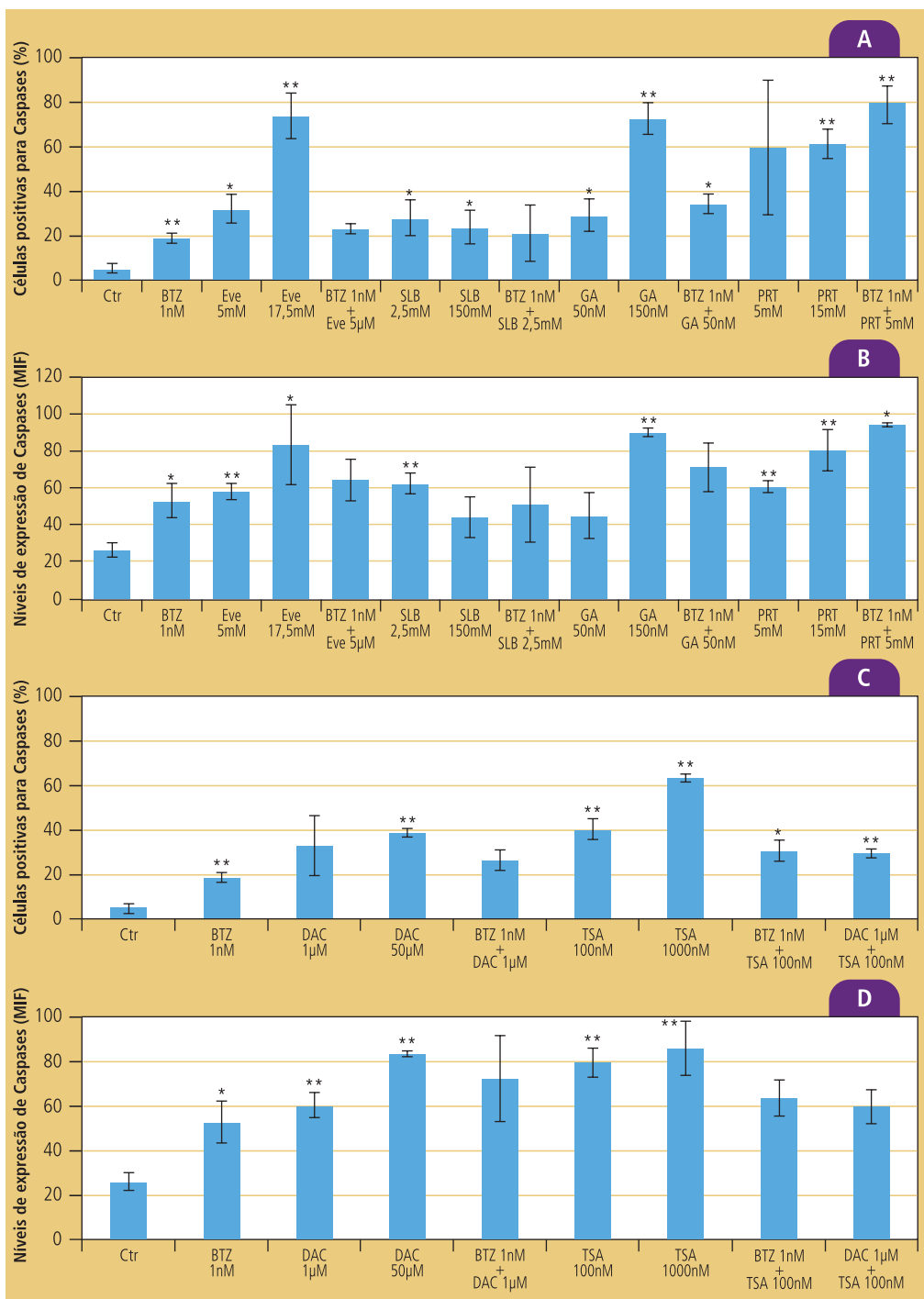
Aspectos morfológicos das células NCI-H929 após incubação com everolimus 17,5 $\mu$ M (A), silibinina 150 $\mu$ M (B), ácido gambógiico 150nM (C), partenolide 15 $\mu$ M (D) e na ausência de tratamento (E).

#### 4.2.2.4. Avaliação da expressão de caspases induzida pelos fármacos antineoplásicos

Para avaliar se os fármacos antineoplásicos estudados induziam apoptose através de mecanismos dependentes das caspases, analisou-se a influência destes agentes antineoplásicos na expressão intracelular de caspases ativadas pelas células NCI-H929, por citometria de fluxo, recorrendo a sondas fluorescentes, de acordo com o descrito na secção *Materiais e Métodos*. Os resultados da análise da percentagem de células com caspases ativadas e os respetivos níveis de expressão avaliados em médias de intensidade de fluorescência (MIF) estão representados na [figura 57](#).

A observação desta figura mostra que a incubação das células H929 com everolimus na dose de 5  $\mu$ M desencadeia ativação das caspases em 32% das células e na dose de 17,5  $\mu$ M em 74% destas ( $p=0,006$ ), o que é significativamente superior à percentagem de células com caspases ativadas no controlo (5%) ( $p<0,01$ ) e quando expostas ao bortezomib (19%) ( $p<0,01$  apenas para a dose de 17,5  $\mu$ M). Este valor eleva-se discretamente quando associamos o bortezomib ao everolimus, para 23% ( $p=NS$ ). No caso dos níveis de expressão, observa-se um aumento, embora não significativo, com a elevação da dose de everolimus (58 para 83 MIF;  $p=NS$ ) e sem alteração relevante com a associação de bortezomib (58 para 64 MIF). Estes dados indicam que o everolimus induz apoptose através de um mecanismo dependente das caspases ([Figura 57-A e B](#)).



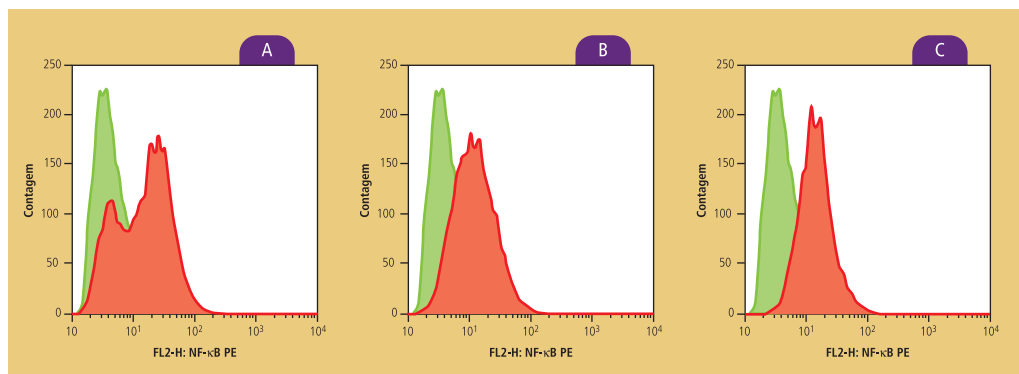


**Análise do efeito dos fármacos antineoplásicos na ativação de caspases intracelulares nas células NCI-H929.**

**FIGURA 57**

A expressão de caspases ativadas foi analisada na ausência (controlo, Ctr) e na presença dos fármacos everolimus (Eve), partenolide (PRT), silibinina (SLB), ácido gambógico (GA) (A e B); decitabina (DAC), tricostatina A (TSA) (C e D), em monoterapia e em associação com bortezomib (BTZ), nas concentrações indicadas nos gráficos, por citometria de fluxo, recorrendo a anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, como descrito na secção *Materiais e Métodos*. Em A e C, está representada a percentagem (%) de células que expressam caspases ativadas intracelulares; em B e D, os respetivos níveis de expressão em MIF (intensidade média de fluorescência). Os resultados representam a média de 3 a 6 ensaios independentes. Os estudos comparativos foram estabelecidos em relação ao controlo para os fármacos em monoterapia e as associações com o bortezomib (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

No caso dos fármacos tricostatina A, silibinina e partenolide, a percentagem de células NCI-H929 com caspases ativadas e os respetivos níveis de expressão não aumentaram significativamente com a exposição a concentrações superiores dos fármacos nem com a associação do bortezomib (Figura 57-A a D). No que respeita aos efeitos do ácido gambógico, verificou-se uma elevação significativa da percentagem de células que expressam caspases ativadas (29% das células na dose de 50nM; 73% na dose de 150nM,  $p=0,002$ ), assim como dos respetivos níveis de expressão com o aumento da dose do fármaco (45 MIF na dose de 50nM; 90 MIF na dose de 150nM,  $p=0,02$ ) (Figura 57-A e B). Relativamente à decitabina, apesar de se manter constante a percentagem de células com as caspases ativadas, observou-se um aumento significativo nos seus níveis de expressão na dose de 50 $\mu$ M ( $84\pm 1,2$  MIF) em relação à de 1  $\mu$ M ( $60\pm 5,5$  MIF;  $p=0,01$ ) (Figura 57-C e D). Na figura 58, apresentam-se exemplos de histogramas que traduzem a expressão de caspases ativadas nas células NCI-H929 não tratadas e após incubação com ácido gambógico, everolimus e partenolide.

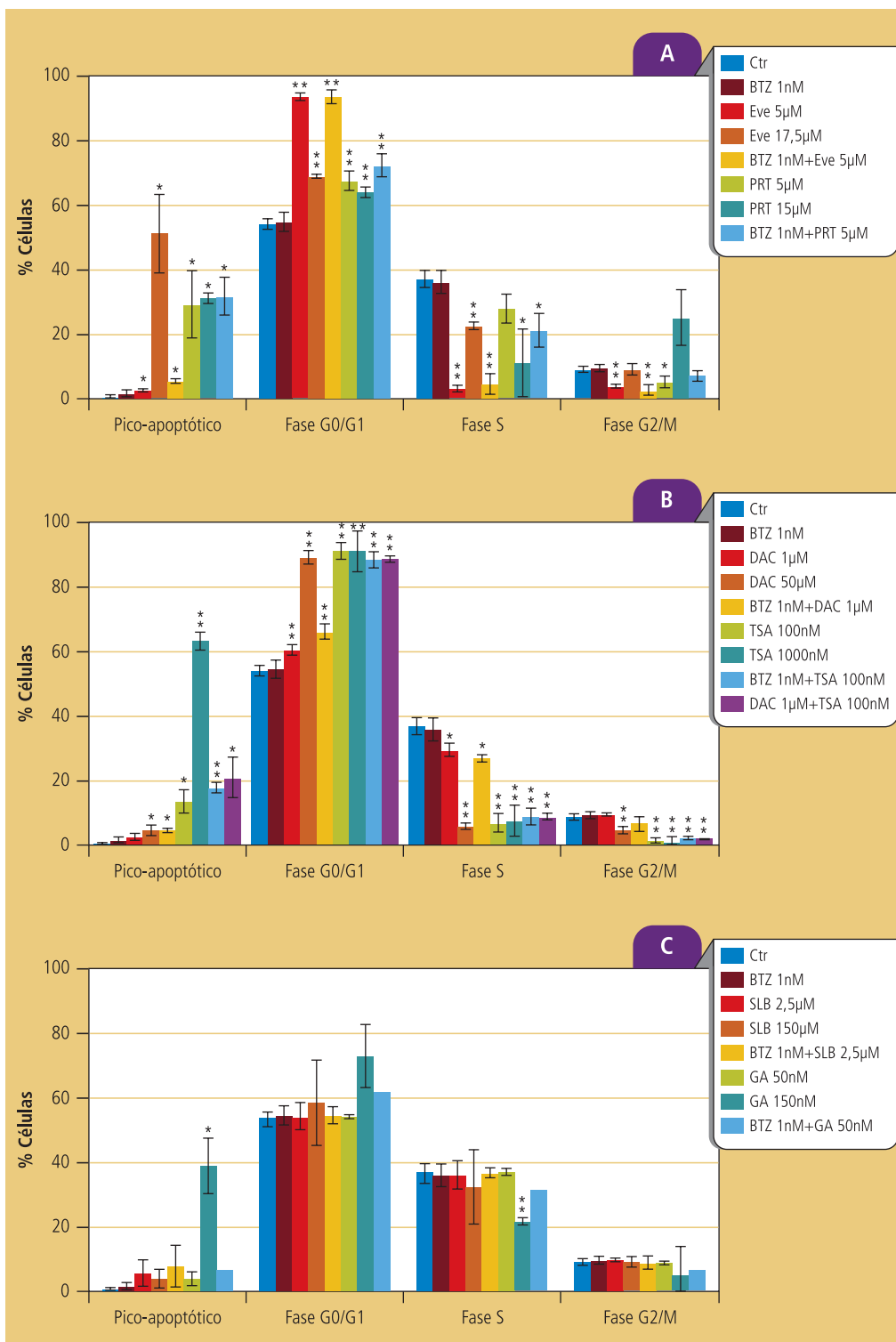


**FIGURA 58** Histograma representativo da expressão de caspases activadas por citometria de fluxo na linha celular NCI-H929.

Em verde, encontram-se as células não tratadas (controlo) e em vermelho, as células tratadas com ácido gambógico 150 nM (A), everolimus 5  $\mu$ M (B) e partenolide 5  $\mu$ M (C).

#### 4.2.2.5. Análise das alterações no ciclo celular induzidas pelos fármacos antineoplásicos nas células NCI-H929

A avaliação do efeito antiproliferativo dos agentes antineoplásicos anteriormente referidos na progressão das células H929, ao longo do ciclo celular, foi realizada por citometria de fluxo, através da análise do conteúdo em DNA, após a marcação prévia das células com iodeto de propídeo, de acordo com o procedimento descrito na secção de *Materiais e Métodos*. Os resultados deste estudo encontram-se representados graficamente na figura 59, na qual se observam alterações no padrão de



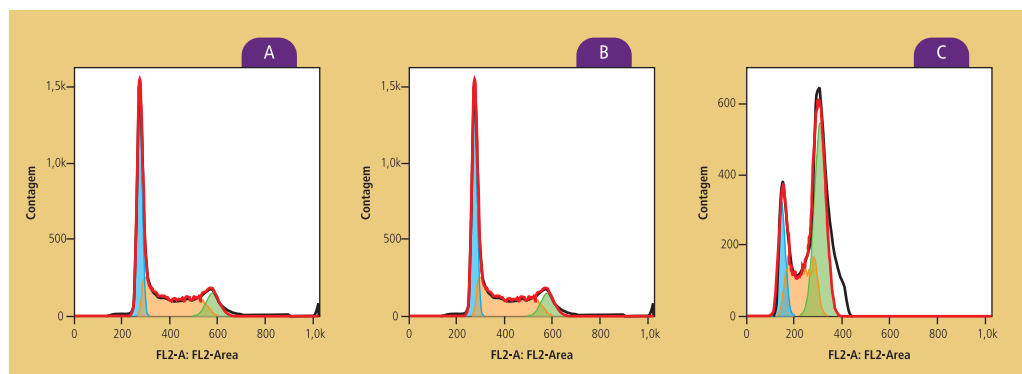
**Distribuição das células NCI-H929 pelas diferentes fases do ciclo celular, após exposição a fármacos antineoplásicos.**

**FIGURA 59**

Em **A**, estão representados o bortezomib (BTZ), o everolimus (Eve) e o partenolide (PRT). Em **B**, os moduladores epigenéticos decitabina (DAC) e tricostatina A (TSA). Em **C**, a silibinina (SLB) e o ácido gambó-gico (GA) nas concentrações referidas nos gráficos. Todos os fármacos estão apresentados em monoterapia e em associação com BTZ. Os resultados representam a média de 3 a 6 ensaios independentes. Nos fármacos avaliados em monoterapia, os estudos comparativos foram estabelecidos em relação ao controle (Ctr) e nas associações em relação ao BTZ (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

distribuição das células H929 pelas diferentes fases do ciclo celular. A análise dos gráficos representados na [figura 59](#) permite constatar um aumento da percentagem de células em apoptose (detetada pela altura do pico apoptótico) e um bloqueio na fase G0/G1, na presença dos fármacos everolimus, partenolide, decitabina (exceto na dose de 1µM), tricostatina A e das respetivas associações com o bortezomib. Relativamente aos mesmo fármacos, observou-se uma redução da percentagem de células em fase S e G2/M (exceto após tratamento com decitabina 1µM, quer em monoterapia, quer em associação com bortezomib 1 nM) em comparação com o controlo ( $p < 0,01$ ) ([Figura 59-A e B](#)). A silibinina apresenta um efeito mínimo a nível da distribuição das células ao longo do ciclo celular, nas doses avaliadas e também na associação com o bortezomib ([Figura 59-C](#)). Após o tratamento com ácido gambógico em monoterapia, na dose de 150nM, observou-se um incremento significativo da percentagem de células NCI-H929 em apoptose ( $p = 0,016$ ) e uma redução em fase S ( $p = 0,004$ ) ([Figura 59-C](#)). A [figura 60](#) mostra histogramas representativos dos efeitos do everolimus e do partenolide no ciclo celular das células NCI-H929, assim como o ciclo celular de células não tratadas.

Estes resultados estão em concordância com os estudos de viabilidade celular expressos nas curvas dose-resposta previamente apresentados, uma vez que são estes fármacos, nas doses referidas, que se associam a uma citotoxicidade mais acentuada, com redução da viabilidade celular e também a uma maior expressão de caspases ativadas.



**FIGURA 60** Histogramas representativos do ciclo celular de células NCI-H929.

Em **A**, está representado o ciclo celular das células NCI-H929 não tratadas; em **B**, após tratamento com everolimus 5 µM e, em **C**, após tratamento com partenolide 5 µM.

Os avanços recentes no conhecimento da fisiopatologia do MM contribuíram de forma decisiva para a melhoria do prognóstico dos doentes; contudo, não foram ainda suficientes para que o MM deixasse de ser uma doença incurável. A compreensão detalhada dos mecanismos biológicos envolvidos no crescimento e na manutenção das células de MM *in vivo* é fundamental para melhorar ou redirecionar estratégias terapêuticas, assim como o conhecimento das interações genéticas, epigenéticas e dos mecanismos que ultrapassam a resistência aos agentes antineoplásicos. Por este motivo, os reguladores da apoptose, do ciclo celular, da inflamação, da angiogénese e os modificadores epigenéticos e da sensibilidade das células tumorais à resposta imune atraíram particular atenção, constituindo alvos terapêuticos de interesse, atualmente em avaliação.

A maioria dos estudos direcionados para o conhecimento da fisiopatologia das GM, em geral, e do MM em particular centrou-se nos plasmócitos totais dos doentes, sem a respetiva identificação e caracterização dos subtipos tumoral e não tumoral. De facto, foi descrito em trabalhos prévios que os plasmócitos não clonais podem representar até 86% da população total de plasmócitos nos doentes com MGUS (Olteanu *et al.*, 2008), embora, em média, representem cerca de 30% (Ocqueteau *et al.*, 1998; Olteanu *et al.*, 2008) e, geralmente, menos de 5% nos doentes com MM, o que coloca reservas na comparação direta entre populações totais de plasmócitos entre os dois subgrupos de GM. Por outro lado, foi demonstrado que os doentes com MGUS, MMI ou MM com uma percentagem de plasmócitos considerados fenotipicamente normais superior a 5% apresentam um prognóstico favorável (Olteanu *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2010; Pérez-Persona *et al.*, 2007). Deste modo, desconhece-se em detalhe o papel desempenhado pelos plasmócitos com fenótipo não tumoral, presentes na medula óssea dos doentes com GM, no desenvolvimento e na manutenção da doença. Além disso, as características moleculares destas células no que respeita à expressão de proteínas reguladoras

da apoptose, do ciclo celular, da inflamação, da angiogênese e da resistência à terapêutica, assim como o impacto que a expressão destas moléculas desempenha na resposta à terapêutica e na sobrevivência dos doentes não é ainda conhecido.

Os estudos desenvolvidos neste âmbito, até à data, foram maioritariamente realizados em linhas celulares de MM. Os escassos trabalhos desenvolvidos em culturas primárias foram efetuados numa era prévia à introdução dos novos fármacos, nomeadamente o bortezomib, aprovado na Europa para o tratamento de doentes com MM em primeira linha, elegíveis e não elegíveis para transplante autólogo de progenitores hematopoiéticos.

A maioria dos fármacos antineoplásicos, presentemente disponíveis para utilização clínica na área da oncologia, desencadeia a destruição das células tumorais, ativando vias bioquímicas endógenas que conduzem à apoptose. Contudo, muitas células tumorais desenvolvem alterações na regulação de genes que controlam esta forma de morte celular, tornando-as resistentes à indução da apoptose por uma variedade de estímulos, que incluem fármacos antineoplásicos e radioterapia. Neste sentido, torna-se fundamental para a terapêutica do MM o desenvolvimento de novas estratégias dirigidas, capazes de ultrapassar a resistência às terapêuticas convencionais e com menor toxicidade.

Deste modo, foi nosso objetivo contribuir para um conhecimento mais aprofundado acerca da relevância da epigenética e das características moleculares dos plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ (considerado normal) e CD138+/CD19- (característico de malignidade) (Rawstron *et al.*, 2008; Paiva *et al.*, 2010), presentes nos doentes com GM, de modo a identificar potenciais novos biomarcadores de diagnóstico e / ou de prognóstico, relevantes não só na etiopatogenia das GM e na progressão de MGUS para MM, mas que possam também constituir novos alvos terapêuticos. Para cumprirmos o nosso objetivo, avaliámos, em doentes com GM, a expressão de moléculas com funções decisivas na regulação da apoptose, no ciclo celular e na resistência à terapêutica, assim como o perfil de metilação de alguns genes relevantes nos mecanismos mencionados e procurámos, nos doentes com MM, associações entre a expressão destas moléculas e os parâmetros clínico-laboratoriais presentes ao diagnóstico, a resposta à terapêutica e a sobrevivência.

Para além do trabalho desenvolvido em amostras de doentes com GM e recorrendo a uma linha celular de MM (as células NCI-H929), analisámos o potencial terapêutico de novos fármacos em monoterapia e em associação com o bortezomib, nomeadamente o partenolide (inibidor do proteasoma e do NF- $\kappa$ B), o everolimus (inibidor m-TOR), a decitabina e a tricostatina A (moduladores epigenéticos), a silibinina (antiproliferativo) e o ácido gambógico (indutor da apoptose).

## 5.1. ESTUDOS REALIZADOS EM DOENTES COM GAMAPATIAS MONOCLONAIS

### 5.1.1. Caracterização clínica e laboratorial dos doentes com gamapatias monoclonais

O presente estudo incluiu 142 doentes com GM, estudados ao diagnóstico, cinco com MMRR e 11 controlos não neoplásicos. O estudo decorreu ao longo de um período de 56 meses. Na nossa série, 42% dos doentes com MM são do sexo masculino, o que está em desacordo com as séries publicadas pela maioria dos autores que apresentam um predomínio do sexo masculino. A distribuição e a mediana etárias estão em concordância com os dados publicados, com a maioria da nossa coorte de doentes com MM a apresentar uma idade superior a 65 anos ao diagnóstico (mediana de 70 anos) (UK, 2013; Carcer Research UK, 2012). Em todos os subgrupos de doentes com GM, a imunoglobulina G foi o subtipo predominante, o que está de acordo com o publicado, tal como as incidências relativas dos outros subtipos de imunoglobulinas. De igual modo, as características clínicas e laboratoriais presentes nos doentes com MM ao diagnóstico seguem o que está descrito na literatura, nomeadamente a incidência de anemia, doença óssea, insuficiência renal, hipercalcémia, albuminémia e doença extramedular (Kyle & Rajkumar, 2009a; Short *et al.*, 2011; Weinstock & Ghobrial, 2013). A distribuição pelos subtipos ISS mostra um aumento de doentes com ISS I (48%), comparativamente à maioria das séries descritas (Greipp *et al.*, 2005a). Relativamente às características citogenéticas, a sua incidência na nossa série não apresenta diferenças relevantes comparativamente ao que se encontra publicado, nos diversos subgrupos de GM (Nahi *et al.*, 2011; Kalff & Spencer, 2012; Stewart *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2010).

### 5.1.2. Análise da expressão de moléculas envolvidas na apoptose e na regulação do ciclo celular, do NF- $\kappa$ B e dos conjugados da ubiquitina em doentes com gamapatias monoclonais

No presente estudo, começámos por avaliar a expressão das moléculas pró-apoptóticas citoplasmáticas, BAX, TNF- $\alpha$ , caspase 3, e membranares, FAS, FAS ligando, TRAIL, recetor do TNF- $\alpha$ , TRAIL-R1 e TRAIL-R2, assim como das moléculas antiapoptóticas citoplasmáticas, BCL-2, survivina e membranares, TRAIL-R3, TRAIL-R4, em plasmócitos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19-, por citometria de fluxo.



A maioria das investigações que analisaram a expressão de moléculas envolvidas na apoptose foi efetuada recorrendo a técnicas de *Western-Blot* e, por isso, sem a caracterização individual de subtipos fenotípicos de plasmócitos.

No geral, verificámos que os plasmócitos CD138+/CD19+ dos doentes com GM apresentam um aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas relativamente aos controlos não neoplásicos, o que fundamenta o conceito de que os plasmócitos fenotipicamente normais (CD138+/CD19+) de doentes com GM apresentam características moleculares distintas relativamente aos plasmócitos com o mesmo fenótipo dos controlos. Por outro lado, os plasmócitos com fenótipo CD138+/CD19- apresentam, no geral, diminuição da percentagem de células que expressa as moléculas pró-apoptóticas estudadas, o que pode favorecer a sua resistência à apoptose e contribuir para a mielomagénese, bem como influenciar a resposta à terapêutica e a recidiva no MM.

Uma família de proteínas com um papel crítico na regulação das principais formas de morte celular (a apoptose, a necrose e a autofagia) e cuja expressão se encontra frequentemente alterada em múltiplas neoplasias humanas, é a família das proteínas BCL-2 (Spets *et al.*, 2002; Adams & Cory, 2007; Kirkin *et al.*, 2004). Estas proteínas ligam-se e inativam o domínio BH3 das proteínas pró-apoptóticas. O gene *BCL-2* foi o primeiro membro desta família de genes a ser identificado, devido ao seu envolvimento na translocação t(14;18), frequentemente encontrada em linfomas não Hodgkin de células B (Ngan *et al.*, 1988). Subsequentemente, a hiperexpressão de BCL-2 foi descrita numa grande variedade de tumores, sem translocações cromosómicas associadas (Reed, 1997; Pezzella *et al.*, 1990).

Múltiplas investigações conduziram a evidências de que a elevação na expressão da proteína BCL-2 causa resistência a agentes antineoplásicos, enquanto uma redução na sua expressão sensibiliza as células à apoptose induzida por estes fármacos. Os conhecimentos acerca dos mecanismos de ação bioquímicos dos membros da família BCL-2 conduziram ao desenvolvimento de estratégias que ultrapassem os efeitos citoprotetores da hiperexpressão de BCL-2 nos diferentes subtipos de tumores. Diversos estudos pré-clínicos evidenciaram a atividade de agentes que têm como alvo membros da família de proteínas antiapoptóticas BCL-2, quer em monoterapia, quer em combinação com outros fármacos antitumorais em MM (Chauhan *et al.*, 2007; Trudel *et al.*, 2007), em leucemia linfoblástica aguda (Kang *et al.*, 2007) e em carcinoma de pequenas células do pulmão (Hann *et al.*, 2008). Foram realizados múltiplos ensaios clínicos, alguns ainda em curso, com fármacos investigacionais anti-BCL-2, como o oblimersen em linfoma não Hodgkin (Pro *et al.*, 2008), em leucemia linfocítica crónica (O'Brien *et al.*, 2009) e em carcinoma da próstata (Sternberg *et al.*, 2009); o AT-101 (glossypol) em carcinoma de pequenas células do pulmão (Baggstrom *et al.*, 2011) e em leucemia linfocítica crónica

(U.S. National Institutes of Health, 2013); o ABT-263 (navotoclax) em leucemia linfocítica crónica (J.F. *et al.*, 2011), em leucemia linfoblástica aguda (High *et al.*, 2010), em carcinoma de pequenas células do pulmão (Rudin *et al.*, 2012) e em carcinoma da próstata (U.S. National Institutes of Health, 2013) ou o GX15-070 em neoplasias linfoides e em carcinoma de pequenas células do pulmão (U.S. National Institutes of Health, 2013; Kang & Reynolds, 2009; Adams & Cory, 2007).

No nosso trabalho, observámos níveis de expressão de BCL-2 superiores nos plasmócitos CD138+/CD19+ de doentes com MM comparativamente aos doentes com MGUS ( $47,4 \pm 4$  MIF vs  $37,3 \pm 2,9$  MIF;  $p < 0,05$ ), o que revela diferenças na expressão desta proteína, entre plasmócitos fenotipicamente idênticos de doentes com MM e com MGUS. Puthier e colaboradores (Puthier *et al.*, 1999) publicaram um estudo, no qual avaliaram a expressão de genes que codificam proteínas da família BCL-2, em doentes com MGUS e com MM não tratado e os resultados deste trabalho apoiam o conceito de que existe heterogeneidade na expressão diferencial de proteínas da família BCL-2, nos doentes com GM. Com efeito, demonstraram que a expressão de BCL-2 é idêntica entre estes dois subgrupos de GM, ou ligeiramente diminuída no MM (Puthier *et al.*, 1999). No que respeita à expressão de BCL-2, os nossos resultados estão de acordo com os destes autores para os plasmócitos CD138+/CD19-, mas são discordantes para os plasmócitos CD138+/CD19+. No mesmo trabalho, Puthier e colaboradores recomendam prudência na avaliação dos seus resultados e realçam que todos os estudos foram efetuados na população total de plasmócitos, sem individualizar subtipos fenotípicos. No nosso trabalho, como previamente mencionado, todas as análises foram realizadas após identificação dos respetivos subgrupos fenotípicos, o que alicerça de forma mais robusta os nossos resultados.

Da mesma forma que no nosso estudo, também no trabalho de Miguel-García e colaboradores (1998) não foram encontradas associações entre a expressão de BCL-2 e os parâmetros clínico-biológicos, a resposta à terapêutica ou a sobrevivência global, nos doentes com MM. Ainda neste estudo, a percentagem de plasmócitos BCL-2 positivos e a intensidade de expressão desta proteína foi significativamente superior nos doentes com MGUS e com MM relativamente aos indivíduos com plasmocitose reativa. Os mesmos autores observaram níveis de expressão de BCL-2 superiores nos doentes com MM em estágio avançado relativamente aos doentes com MGUS (Miguel-García *et al.*, 1998). Tal como mencionado em relação a trabalhos prévios, também neste a avaliação da expressão de BCL-2 foi realizada na população total de plasmócitos, assumida como homogénea nos doentes com GM, o que poderá induzir alterações nos resultados, uma vez que existem nestes doentes plasmócitos com fenótipos distintos. Com efeito, de acordo com a nossa investigação, os doentes com GM em geral evidenciam diferenças na expressão

de BCL-2 entre os plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19-, com níveis de expressão desta proteína significativamente superiores nos primeiros ( $p=0,0001$ ) e igualmente superiores nestes plasmócitos dos doentes com GM comparativamente aos controlos ( $p=0,0001$ ). Estes resultados sugerem que a proteína BCL-2 poderá ser relevante na patogénese das GM, prolongando a sobrevivência dos plasmócitos, prevenindo a apoptose e aumentando a probabilidade de aquisição de defeitos genéticos adicionais (Chen & Ray, 2003).

O papel da proteína BCL-2 na evolução clínica dos doentes com neoplasias não está ainda totalmente esclarecido e parece ser específico do subtipo tumoral (Renner *et al.*, 2000). Tem sido sugerido que a expressão de BCL-2 poderia contribuir para a resistência à terapêutica observada no MM (van de Donk *et al.*, 2005; Bloem & Lockhorst, 1999; Kim *et al.*, 2004). No entanto, os escassos estudos disponíveis acerca da expressão de BCL-2 no MM não demonstraram um papel relevante para esta proteína como fator determinante da resposta à terapêutica ou da sobrevivência. A ausência de impacto da expressão de BCL-2 na sobrevivência observada no nosso trabalho está de acordo com os resultados de trabalhos prévios (Ong F., 1995; Miguel-García *et al.*, 1998).

Apesar destes resultados, outros membros da família de proteínas BCL-2 poderão modular de forma significativa a morte celular e contribuir de modo determinante para o prognóstico.

De facto, nos doentes com MM, observámos uma percentagem significativamente superior de plasmócitos CD138+/CD19+ com expressão de BAX ( $66,2 \pm 4\%$ ) comparativamente aos doentes com MGUS ( $37,4 \pm 4,1\%$ ) e aos controlos não neoplásicos ( $39,8 \pm 2,5\%$ ) ( $p=0,0001$ ), mas com níveis de expressão inferiores aos dos doentes com MGUS ( $p<0,05$ ). No caso dos plasmócitos CD138+/CD19-, a percentagem de células que expressava BAX e os respetivos níveis de expressão foram superiores nos doentes com MM *versus* MGUS ( $p<0,01$ ), em concordância com os resultados de outros autores que descreveram um aumento da expressão génica da proteína BAX, durante a progressão de MGUS para MM (Puthier *et al.*, 1999). Renner e colaboradores (2000) avaliaram, por imunohistoquímica, a expressão de BAX em indivíduos com plasmocitose reativa e em doentes com MGUS/MMI e MM. Um aumento da expressão de BCL-2 e de BAX foi detetado nos doentes com MM relativamente aos indivíduos com plasmocitose reativa. Foi, ainda, pesquisada neste estudo uma associação entre a expressão de BAX ao diagnóstico de MM e o prognóstico, numa era em que os doentes eram tratados com os protocolos VAD (vincristina, adriamicina, dexametasona) ou MP (melfalano, prednisolona), não tendo sido documentada qualquer associação entre a expressão de BAX e de BCL-2 e a resposta à terapêutica, a duração da resposta ou, no caso da proteína BCL-2, a sobrevivência. Contudo, os doentes com MM com uma expressão muito reduzida

de BAX nos plasmócitos apresentaram vantagem na sobrevivência; de realçar que os plasmócitos foram avaliados neste estudo como uma população única (Renner *et al.*, 2000). Os resultados das investigações de Renner e colaboradores encontram-se, tal como os de outros autores já mencionados, em concordância com os nossos, no que respeita à ausência de associação destas proteínas com a resposta à terapêutica; no nosso estudo, a ausência de impacto na sobrevivência foi também observada para a proteína BAX. Este facto pode estar relacionado com a dimensão limitada da nossa amostra ou com o facto de cada uma destas proteínas, isoladamente, poder não apresentar um papel determinante na resposta à terapêutica, na progressão das GM e na sobrevivência no MM.

A survivina é outra proteína relevante na apoptose, constitui um membro das proteínas inibidoras da apoptose (IAP) e desempenha ainda um papel central também na divisão celular. Esta proteína encontra-se altamente expressa na maioria das neoplasias humanas e está envolvida na resistência das células tumorais à terapêutica antineoplásica e à radiação ionizante (Pennati *et al.*, 2007; Li, 2005). Romagnoli e colaboradores descreveram elevados níveis de expressão de survivina nos plasmócitos de linhas celulares de MM, comparativamente a células não tumorais (Romagnoli *et al.*, 2007). De acordo com estes autores, as células de MM apresentam geralmente uma reduzida taxa de proliferação *in vivo* e elevados níveis de survivina, o que sugere uma possível regulação da expressão do gene da survivina nestas células. (Romagnoli *et al.*, 2007).

No nosso estudo, os níveis de expressão de survivina observados nos plasmócitos CD138+/CD19+ foram significativamente superiores nos doentes com MGUS, MMI e MM relativamente aos controlos não neoplásicos, assim como nos doentes com MGUS em relação aos doentes com MM ( $40,8 \pm 2,9$  MIF vs  $29,1 \pm 1,9$  MIF;  $p < 0,01$ ). De facto, em análise multivariada por regressão logística, a expressão de survivina nestes plasmócitos apresentou potencial discriminatório entre MGUS e MM (OR: 1,09; IC95%: 1,04-1,14;  $p < 0,0001$ ). Nos plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes com MGUS e com MM, encontramos também níveis de expressão de survivina superiores em relação aos controlos ( $p = 0,001$ ), em concordância com os resultados do trabalho de Romagnoli e colaboradores (2007), no que respeita à expressão mais elevada de survivina em linhas celulares de MM comparativamente a células não tumorais. Não foram observadas diferenças na expressão de survivina entre plasmócitos com diferentes fenótipos nos doentes com GM. A alteração na expressão de survivina também observada nos doentes com MGUS relativamente aos controlos sugere que a possível regulação da expressão do gene da survivina possa ocorrer precocemente na mielomagénese. (Wang *et al.*, 2010)

A caspase 3 constitui um membro da família das proteases da cisteína e desempenha um papel crucial nos mecanismos da apoptose, uma vez que conduz à

clivagem de múltiplas proteínas celulares e à apoptose. Diversos sinais indutores de morte, incluindo fármacos citotóxicos podem ativar a caspase 3. A sua expressão nos plasmócitos de doentes com MM encontra-se muito escassamente estudada. Na nossa amostra de doentes, observámos níveis de expressão de caspase 3 superiores nos plasmócitos CD138+/CD19+ de doentes com MM, MMI, MGUS relativamente aos controlos e de doentes com MM em relação a doentes com MGUS ( $45,3 \pm 3,1$  MIF vs  $31,7 \pm 2$  MIF;  $p < 0,01$ ). Este resultado reforça o conceito de que existem alterações moleculares significativas nos plasmócitos com fenótipo não clonal dos doentes com GM relativamente aos plasmócitos dos controlos. Por outro lado, as diferenças neste subtipo de plasmócitos entre doentes com MGUS e com MM sugere que, durante o processo de mielomagénese, ocorrem alterações moleculares também a nível das células não tumorais. Pelo contrário, não foram encontradas diferenças na expressão desta proteína nos plasmócitos CD138+/CD19- entre os doentes com os diferentes subgrupos de GM. Estes dados indicam que a expressão de caspase 3 neste subtipo de plasmócitos não parece ser determinante na progressão de MGUS para MM. No entanto, nos doentes com MM, estes plasmócitos apresentam níveis de expressão inferiores comparativamente aos dos plasmócitos CD138+/CD19+ ( $p < 0,05$ ), o que poderá contribuir para a resistência à apoptose dos plasmócitos tumorais e influenciar a resposta à terapêutica e o prognóstico. Constatámos também que os níveis de expressão de caspase 3 no subtipo fenotípico CD138+/CD19+ são significativamente inferiores nos doentes com MM com ISS de I relativamente a doentes com estádios mais avançados (ISS II ou III) ( $p < 0,05$ ). Este dado sugere a existência de alterações moleculares importantes também nos plasmócitos não tumorais (neste caso, a expressão de caspase 3), entre formas de apresentação de MM com graus de agressividade diferentes.

Os estudos realizados em linhas celulares de carcinoma hepatocelular relativamente à expressão de caspase 3 conduziram a resultados contraditórios. Assim, Persad e colaboradores (2004) descreveram níveis de expressão de caspase 3 mais elevados em quatro linhas celulares de carcinoma hepatocelular (Persad *et al.*, 2004), enquanto Fujikawa e colaboradores (2000) observaram uma expressão reduzida de caspase 3 nesta neoplasia, comparativamente à expressão em células de tecido hepático não tumoral (Fujikawa *et al.*, 2000), tal como observado no nosso estudo nos plasmócitos tumorais relativamente aos não tumorais. Estas discrepâncias na expressão de caspase 3 foram descritas em diversas neoplasias, nomeadamente a sua hiperexpressão no neuroblastoma (Nakagawara *et al.*, 1997) e no linfoma de Hodgkin clássico (Chhanabhai *et al.*, 1997; Izbán *et al.*, 1999) e níveis reduzidos de expressão desta proteína no carcinoma da próstata (Winter *et al.*, 2001), no carcinoma de células renais (Kolenko *et al.*, 1999) e em doentes com neoplasia da mama (Devarajan *et al.*, 2002). Neste último caso, a perda de expressão de caspase 3 foi demonstrada, não apenas no tecido tumoral, mas também em amostras de tecido normal peri-tumoral de doentes com neoplasia da mama, tendo sido sugerido pelos autores que a perda

de expressão de caspase 3 poderia representar um importante mecanismo de sobrevivência celular e de quimiorresistência.

Contudo, de acordo com os nossos resultados, em estudos de análise multivariada (regressão logística), identificámos a expressão de caspase 3 em plasmócitos CD138+/CD19- de doentes com MM como um potencial biomarcador de recidiva. De facto, observámos uma associação entre os níveis de expressão de caspase 3 superiores a 38 MIF nestes doentes e uma maior probabilidade de recidiva do MM ( $p=0,01$ ). Outros autores encontraram associações entre a expressão de caspase 3 e o prognóstico, como foi o caso de Koomagi e colaboradores (2000) relativamente ao carcinoma não de pequenas células do pulmão. Neste estudo, os autores descrevem um prognóstico mais favorável para os doentes com amostras tumorais positivas para a expressão de caspase 3 (Koomagi & Volm, 2000). Resultados contraditórios foram observados por Takata e colaboradores (2001) no mesmo subtipo tumoral, uma vez que estes autores confirmaram, por análise multivariada, que a hiperexpressão de caspase 3 constituía um fator preditor de prognóstico desfavorável em doentes com carcinoma não de pequenas células do pulmão (Takata *et al.*, 2001), em concordância com os nossos resultados. De igual modo, Nakopoulou e colaboradores (2001) demonstraram também que a hiperexpressão de caspase 3 em células de carcinoma da mama exercia um efeito adverso independente na sobrevivência global das doentes com esta neoplasia (Nakopoulou *et al.*, 2001). Estes dados sugerem que, pelo menos em alguns subtipos celulares tumorais, a caspase 3 e, eventualmente, outros mecanismos relacionados com a apoptose possam desempenhar um papel importante na resistência à terapêutica, e no prognóstico dos doentes.

Além das proteínas citoplasmáticas mencionadas, também as proteínas da família do TNF- $\alpha$  regulam a apoptose mediada por recetores de morte membranares (FAS, recetor 1 do TNF e recetores do TRAIL). Foi descrito por Filella *et al.*, (1996) que as células do estroma da medula óssea e os plasmócitos de doentes com MM expressam o RNAm e a proteína TNF- $\alpha$  e que a secreção de TNF- $\alpha$  está significativamente aumentada nos doentes com doença óssea (Davies *et al.*, 2000). Este ligando pode induzir morte celular por apoptose através do domínio de morte associado ao FAS/caspase 8 (Bang *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2001), assim como a sobrevivência através da ativação da via do NF- $\kappa$ B e aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas, como a BCL-XL, a XIAP ou as IAP (Badrichani *et al.*, 1999). De facto, combinando a inibição do TNF- $\alpha$  com o bloqueio do NF- $\kappa$ B, usando inibidores da IKK, aumenta-se a citotoxicidade (Baud & Karin, 2009a; Hideshima *et al.*, 2002b).

Os plasmócitos CD138+/CD19+ dos doentes com MGUS e com MM apresentam níveis de expressão de TNF- $\alpha$  significativamente inferiores em comparação com os controlos não neoplásicos ( $p=0,0001$ ). Também em relação ao recetor do



TNF- $\alpha$ , os níveis de expressão nestes plasmócitos são superiores nos controlos em relação aos doentes com MGUS, com MM ( $p < 0,001$ ) e com MMI ( $p < 0,05$ ). No que respeita aos níveis de expressão de TNF- $\alpha$  nos plasmócitos CD138+/CD19-, estes são significativamente superiores nos doentes com MGUS em relação aos doentes com MM ( $p < 0,01$ ), sem diferenças observadas nos recetores do TNF- $\alpha$ . Estes resultados sugerem, tal como mencionado em relação a outras proteínas com funções importantes na apoptose, o envolvimento da regulação do gene do TNF- $\alpha$  na progressão de MGUS para MM e na mielomagénese em geral.

Outra proteína estudada neste trabalho que está envolvida na apoptose das células tumorais é o TRAIL (ligando indutor de apoptose relacionado com o TNF), um membro da superfamília de ligandos indutores de morte celular, que também inclui o TNF- $\alpha$  e o FAS ligando (Walczak *et al.*, 1999). O TRAIL induz apoptose nas células tumorais, interagindo com um sistema complexo de recetores da superfície celular, que incluem os recetores transdutores de sinais de morte, R1 (também designado DR4) e R2 (também denominado DR5). Estes dois recetores transmitem um sinal pró-apoptótico através do seu domínio de morte intracelular, iniciando uma cascata de ativação proteolítica de caspases e apoptose celular (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Em oposição aos recetores de morte, R1 e R2, dois outros recetores do TRAIL localizados na superfície celular, R3 (ou DcR1) e R4 (ou DcR2) não possuem o domínio de morte funcional, pelo que não podem ser transdutores de sinais pró-apoptóticos e são considerados “decoy receptors”, que competem com DR4 e DR5 para a ligação do TRAIL na superfície celular, bloqueando fisiologicamente a apoptose (Griffith *et al.*, 1999). Este complexo sistema de recetores do TRAIL e, em particular, a expressão dos recetores *decoy* nas células normais foi inicialmente postulado como sendo a base para a especificidade da ação pró-apoptótica do TRAIL contra as células tumorais (Griffith *et al.*, 1998). Foi inicialmente demonstrado que o TRAIL induz apoptose *in vitro* e *in vivo*, em modelos animais (Walczak *et al.*, 1999; Griffith *et al.*, 1998). Em contraste com este facto, não induz morte na maioria das células humanas normais *in vitro* (Tartaglia & Goeddel, 1992), como referido. O RNA mensageiro para recetores do TRAIL é expresso numa grande variedade de tecidos normais (Griffith & Lynch, 1998; Holoch & Griffith, 2009), o que conduziu a investigações usando o TRAIL como terapêutica antineoplásica no MM ( Mitsiades *et al.*, 2001, Ashkenazi *et al.*, 2008; Dimberg *et al.*, 2012; Holoch & Griffith, 2009).

Mitsiades e colaboradores (2001) demonstraram que o TRAIL induz apoptose seletivamente nas células humanas de MM, incluindo linhas celulares resistentes e sensíveis a diversos fármacos, como a dexametasona e a doxorubicina, bem como em células de doentes com MM. Os mesmos autores demonstraram, ainda, que o TRAIL apresentava atividade anti-MM *in vivo* em ratinhos xenotransplantados com plasmocitomas humanos (Mitsiades *et al.*, 2001).



Mais recentemente, o sistema TRAIL/recetores do TRAIL foi considerado como um marcador de ativação de doença em diversas neoplasias. Com efeito, elevados níveis de expressão de R4/DcR2 em doentes com neoplasia da próstata foram fortemente associados a PSA elevado, recidiva da doença e sobrevivência desfavorável (Koksal *et al.*, 2008). Da mesma forma, no adenocarcinoma ductal do pâncreas, foram demonstrados níveis de expressão superiores de R4/DcR2 e de R1/DR4 nas células tumorais comparativamente às células ductais pancreáticas de controlos não neoplásicos (Sanlioglu *et al.*, 2009). Em doentes com carcinoma ductal invasivo, foram igualmente encontrados níveis elevados de expressão de R1/DR4, que foram associados a tumor avançado e a prognóstico desfavorável (Sanlioglu *et al.*, 2007).

Não existem dados publicados relativamente ao perfil de expressão do TRAIL e dos seus recetores no desenvolvimento e na evolução das GM.

Na nossa amostra de doentes com GM em geral, verificámos que os níveis de expressão de R1/DR4 e de R2/DR5 foram significativamente mais elevados nos plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- dos doentes relativamente aos plasmócitos dos controlos, em concordância com os estudos relativos ao TRAIL-R1 de Sanglioli e colaboradores (2009), em células tumorais de adenocarcinoma do pâncreas e células de controlos não neoplásicos. Entre os doentes com GM, os níveis de expressão de TRAIL e do seu recetor R2 nos plasmócitos CD138+/CD19- foram significativamente inferiores nos doentes com MM em relação aos doentes com MGUS. Pelo contrário, nos plasmócitos CD138+/CD19+, os níveis de expressão de R2 foram superiores nos doentes com MGUS ( $61,6 \pm 1,9$  MIF) relativamente aos doentes com MMI ( $41,8 \pm 4,8$  MIF) e MM ( $43,7 \pm 2,2$  MIF) ( $p < 0,01$ ). De facto, em análise multivariada, a expressão de TRAIL-R2 foi considerada com potencial discriminatório entre MGUS e MM, quer em plasmócitos tumorais (ponto de corte 34,5 MIF) quer não tumorais (ponto de corte 56,5 MIF) (tabelas 18 A e B).

Para além das diferenças observadas e descritas nos plasmócitos com fenótipos idênticos entre os doentes com GM e os controlos não neoplásicos, também foram encontradas diferenças relevantes entre os plasmócitos com os diferentes fenótipos. De facto, a percentagem de plasmócitos CD138+/CD19+ que expressa TRAIL é significativamente superior em relação à percentagem de plasmócitos CD138+/CD19-, para os doentes com MM, MGUS ( $p < 0,01$ ) e MMI ( $p < 0,05$ ), o mesmo ocorrendo em relação aos níveis de expressão de TRAIL e de TRAIL-R2, apenas nos doentes com MM ( $p < 0,01$ ).

Na nossa coorte de doentes com MM, constatámos também que a presença de uma percentagem de plasmócitos CD138+/CD19- com expressão de TRAIL inferior a 40% constitui um fator de prognóstico desfavorável, associado a uma

sobrevivência global inferior ( $p=0,03$ ), o que apoia estudos prévios que encontraram níveis reduzidos de RNAm do TRAIL em doentes com carcinoma mamário e metástases cerebrais, com prognóstico desfavorável (Bos *et al.*, 2009). Foi também observado um silenciamento da expressão do gene do TRAIL em doentes com neoplasias da próstata (Modur *et al.*, 2002) e do cólon (Koornstra *et al.*, 2003). De facto, como o TRAIL está associado à apoptose induzida por TNF, foi proposto que a diminuição da apoptose mediada pelo TRAIL possa conferir uma vantagem para o escape imune de clones malignos da vigilância pelas células NK e pelos linfócitos T citotóxicos (Takeda *et al.*, 2002; Prideaux *et al.*, 2014).

As diferenças observadas no nosso estudo apoiam e confirmam a hipótese de que os plasmócitos presentes nos doentes com MM, MMI ou MGUS não constituem uma população homogénea no que respeita à expressão de múltiplas moléculas, nomeadamente de proteínas envolvidas no processo de apoptose, sendo possível identificar diferenças significativas também na expressão do TRAIL e dos seus recetores de morte, R1 e R2, como descrito. Com efeito, constatámos no nosso estudo, em análise multivariada por regressão logística, que os níveis de expressão de TRAIL-R2 nos plasmócitos CD138+/CD19+ constituem um marcador de doença, uma vez que estes são significativamente superiores nos doentes com MGUS em relação aos controlos ( $p=0,04$ ). De facto, níveis de expressão superiores a 29,5 MIF associam-se ao diagnóstico de MGUS (sensibilidade de 91%; especificidade de 100%; VPP=100%; VPN=65%). Em concordância com os nossos resultados, Bavi e colaboradores (2010) encontraram também níveis de expressão de TRAIL-R2 superiores nas células de carcinoma colorectal comparativamente a células normais da mucosa cólica (Bavi *et al.*, 2010).

Por outro lado, em relação aos recetores R3 e R4 do TRAIL, estes são expressos numa percentagem superior de plasmócitos CD138+/CD19+ e também com níveis de expressão superiores relativamente aos plasmócitos CD138+/CD19-, nos doentes com MM ( $p<0,01$ ). Estes dados apoiam o que está publicado relativamente à elevada expressão destes recetores nas células não tumorais, o que fundamentou o conceito de que estes recetores protegem as células dos efeitos apoptóticos do TRAIL (Sheridan *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997a; MacFarlane, 2003). No que respeita aos mesmos recetores, não foram observadas diferenças de expressão entre os dois subtipos fenotípicos para os doentes com MMI e MMRR, provavelmente devido ao reduzido número de doentes em cada um destes subgrupos. Por outro lado, a reforçar a importância dos recetores do TRAIL verificámos que a razão entre os recetores pró e antiapoptóticos (R1+R2/R3+R4) nos plasmócitos CD138+/CD19+ apresenta potencial discriminatório entre doentes com MGUS e MM. De facto, os doentes com MGUS apresentam aumento desta razão (superior a 1,22) relativamente aos doentes com MM (OR: 37,2; IC95%: 5,2–266,4;  $p<0,0001$ ).

Tal como mencionado em relação a outras proteínas, também para o TRAIL e seus recetores, os autores que analisaram estas proteínas, fizeram-no sem individualizar subtipos de plasmócitos, com as limitações inerentes, uma vez que se assumiu que a população seria homogénea, o que não corresponde à realidade. Todos estes trabalhos apoiam o conceito de que o TRAIL e os seus recetores desempenham um papel relevante na carcinogénese, em neoplasias distintas, o que fundamenta a sua utilização como alvo terapêutico, já avaliado em alguns estudos. Com efeito, até ao presente, numerosas investigações se centraram no conhecimento dos mecanismos de apoptose induzidos pelo TRAIL e nos processos envolvidos no desenvolvimento de resistência a esta molécula, tendo-se concluído que os tumores resistentes podem ser ressensibilizados através de uma combinação de TRAIL com quimioterapia ou radioterapia (Mahalingam *et al.*, 2009), ou ainda com androgénios, como no caso das neoplasias da próstata (Wang *et al.*, 2013) ou com inibidores das histonas desacetilases, no carcinoma da mama (Srivastava *et al.*, 2010). Os estudos realizados neste âmbito revelaram que, em muitas células tumorais, apenas um dos dois recetores de morte do TRAIL se encontra funcional. Estas descobertas, assim como o objetivo de evitar a neutralização dos recetores *decoy*, conduziram ao desenvolvimento de variantes solúveis humanas do TRAIL e de anticorpos monoclonais agonistas, com especificidade para os recetores R1 e R2. Estas moléculas são, previsivelmente, mais potentes que o TRAIL nativo *in vivo* e poderão vir a constituir terapêuticas dirigidas em determinados tumores (Mahalingam *et al.*, 2009; Hellwig & Rehm, 2012; Mérino *et al.*, 2007). Contudo, foi descrito que, apesar de diversas neoplasias apresentarem elevados níveis de expressão de TRAIL-R1 e de TRAIL-R2, outras apresentam níveis reduzidos destes recetores, o que poderá limitar o efeito terapêutico do TRAIL (Daniels *et al.*, 2005). A apoiar estes dados, encontra-se o facto de células tumorais de melanomas, MM, carcinomas da mama, próstata, bexiga, cólon, entre outros, serem previsivelmente sensíveis ao TRAIL, com base nos resultados de eficácia de estudos pré-clínicos. Contudo, os casos de resistência ao TRAIL são frequentemente observados e poderão estar relacionados com a hiperexpressão de proteínas antiapoptóticas ou com a reduzida expressão de recetores do TRAIL (Hellwig & Rehm, 2012). Está a decorrer um ensaio clínico de fase 2 que utiliza um anticorpo monoclonal agonista do TRAIL-R1 (mapatumomab) em associação com bortezomib em doentes com MM em recidiva ou refratário (referência NCT00315757 em *ClinicalTrials.gov*).

As terapêuticas antineoplásicas baseadas nos agonistas dos recetores pró-apoptóticos têm-se revelado decepcionantes, incluindo o TRAIL e anticorpos dirigidos aos recetores TRAIL-R1 e -R2, apesar da evidência de atividade clínica e reduzida toxicidade associada a estes compostos, em monoterapia ou em associação com terapêuticas convencionais (Micheau *et al.*, 2013).

Em suma, os resultados dos nossos estudos sugerem que o TRAIL e os seus recetores poderão ter um papel no desenvolvimento e na progressão das GM. Por outro lado, a associação entre a diminuição da percentagem de plasmócitos CD138+/CD19- que expressa TRAIL (inferior a 40%) e a redução da sobrevivência demonstrada na nossa população de doentes com MM, sugere que esta proteína poderá ser um potencial marcador de prognóstico.

A expressão do antígeno FAS nas células tumorais poderá constituir parte de um mecanismo efetor que tem como finalidade a destruição celular pelas células T imunocompetentes, que representam a principal fonte do FAS ligando e, adicionalmente, desempenha um papel na execução da morte celular induzida por agentes citotóxicos (Waring & Müllbacher, 1999a; Friesen *et al.*, 1996). A expressão de FAS e de FAS ligando nas células de MM é importante uma vez que os seus níveis de expressão, a atividade funcional do recetor FAS e a sinalização intracelular após a ligação do ligando, parecem ser fundamentais para definir a sensibilidade das células de MM ao sistema imune e/ou aos agentes citotóxicos (Egle *et al.*, 1997).

A interação entre o recetor de morte da superfície celular FAS e o seu ligando (FAS ligando) resulta na morte celular por apoptose, mediada pela ativação das caspases. A morte celular mediada pela interação FAS/FAS ligando é importante para a homeostasia das células no sistema imune e para a manutenção de locais imuno-privilegiados no organismo. A destruição através da via FAS/FAS ligando também constitui uma importante via de destruição para os linfócitos T citotóxicos, como referido. Foi descrito que o aumento da expressão do recetor FAS após lesão do DNA parece ser dependente da proteína P53 (Waring & Müllbacher, 1999b).

Na presente investigação, foi demonstrado que os níveis de expressão de FAS ligando nos plasmócitos CD138+/CD19+ em valor superior ou igual a 25 MIF nos doentes com MM se associam a um benefício na sobrevivência global ( $p=0,02$ ), em paralelo com a constatação de que níveis de expressão da mesma molécula inferiores a 20 MIF nos plasmócitos CD138+/CD19- e uma percentagem diminuída destes a expressar FAS (inferior a 17%) nos doentes com MM, se associam a uma sobrevivência global desfavorável ( $p=0,032$  e  $p=0,011$ , respetivamente). Ito e colaboradores (2000) avaliaram a expressão de FAS e de FAS ligando em células de carcinoma hepatocelular e observaram uma expressão de FAS significativamente diminuída nos subtipos histológicos mais agressivos, associada a uma menor sobrevivência livre de progressão e sugerindo um valor prognóstico para a expressão de FAS e de FAS ligando nos doentes com carcinoma hepatocelular (Ito *et al.*, 2000). De igual modo, verificámos que os doentes com MM com ISS I ao diagnóstico apresentam uma percentagem significativamente mais elevada de plasmócitos com o fenótipo patológico a expressarem FAS, relativamente aos doentes com ISS III, o que indica que a expressão de FAS poderá estar relacionada com a agressividade

da forma de apresentação do MM e está concordante com os nossos resultados acerca da expressão de FAS na sobrevivência.

Foi demonstrado por Terry Landowski e colaboradores que muitas células neoplásicas, incluindo as derivadas de doentes com MM, expressam o recetor FAS na sua superfície, o que as torna suscetíveis de destruição pelas células efetoras do sistema imune que expressam o FAS ligando (Landowski *et al.*, 1997; Catlett-Falcone *et al.*, 1999b). Este conceito é apoiado pelos resultados da nossa investigação, já mencionados. Sjöström e colaboradores (2002) apresentaram resultados contraditórios que descrevem uma expressão aumentada de FAS ligando em células tumorais de doentes com neoplasias da mama associada a uma sobrevivência inferior ( $p=0,005$ ) (Sjöström *et al.*, 2002).

Uma vez que diversos tumores expressam FAS na membrana celular, a apoptose mediada por FAS através de anticorpos anti-FAS poderia constituir uma terapêutica antineoplásica promissora. Contudo, nem todas as células que expressam FAS são sensíveis à apoptose mediada por FAS. Este facto resultou na descoberta de muitos mecanismos de inibição da apoptose mediada por FAS. Por outro lado, as mutações nos genes *FAS* ou *p53* podem também influenciar a sensibilidade para a apoptose mediada por FAS. Como muitos fármacos citotóxicos são capazes de induzir a expressão do recetor FAS a nível da membrana, a terapêutica combinada destes fármacos com anticorpos anti-FAS ou FAS ligando recombinante parece interessante. De facto, a eficácia desta estratégia foi já demonstrada *in vivo* em tumores sólidos implantados em ratinhos, embora com toxicidade hepática significativa (Timmer *et al.*, 2002).

Por outro lado, e ainda não previamente descrito por outros autores, verificámos, na nossa amostra, que os doentes com MGUS apresentam uma percentagem superior de plasmócitos CD138+/CD19- que expressam FAS ligando e respetivos níveis de expressão assim como níveis de expressão aumentados de P53 em relação aos doentes com MM ( $p<0,01$ ).

De facto, a proteína P53 apresenta, para além de funções reguladoras do ciclo celular, uma função de reparação do DNA, fundamental no MM, em que a instabilidade intraclonal é uma característica proeminente (Morgan *et al.*, 2012b; Prideaux *et al.*, 2014). Com efeito, foi descrito que o aumento da expressão do recetor FAS após lesão do DNA parece ser dependente da P53. A interação entre o recetor de morte da superfície celular FAS e o seu ligando (FAS ligando) resulta na morte celular por apoptose, mediada pela ativação das caspases. (Waring & Müllbacher, 1999b).

Por outro lado, os níveis de expressão do recetor FAS, do FAS ligando e da P53, observados nos plasmócitos CD138+/CD19-, são significativamente superiores nos doentes com MGUS comparativamente aos doentes com MM ( $p<0,01$  em todos os casos), o que é consistente com os dados publicados acerca das interações entre

estas moléculas. No caso da P53, como referido, observámos níveis de expressão superiores nos doentes com MGUS relativamente aos doentes com MM, o que, sendo a P53 uma molécula importante na reparação do DNA, é concordante com as evidências já descritas de que se acumulam anomalias genéticas durante a progressão de MGUS para MM.

Foi recentemente demonstrado por Crescenzi *et al.* (2011), que a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células senescentes, particularmente de TNF- $\alpha$ , medeia o aumento da expressão de FAS. De facto, o tratamento das linhas celulares tumorais em proliferação com TNF- $\alpha$  aumenta a expressão de FAS e diminui a expressão desta molécula nas células senescentes. Os mesmos autores demonstraram, ainda, que o NF- $\kappa$ B desempenha um papel central no controlo do fenótipo secretório associado à senescência, por parte das células senescentes prematuras e que o TNF- $\alpha$ , transcripcionalmente controlado pelo NF- $\kappa$ B, é um dos principais mediadores do aumento da expressão de FAS. Com efeito, a existência de uma ansa autócrina dependente do NF- $\kappa$ B e mediada pelo TNF- $\alpha$  parece ser responsável pela expressão de FAS na superfície das células senescentes e pela sua destruição (Crescenzi *et al.*, 2011).

A variabilidade observada na expressão das moléculas reguladoras da apoptose mostra que a relação entre a sensibilidade e/ou a resistência de uma célula à morte poderá ser dependente do balanço entre as moléculas pró e antiapoptóticas. Neste sentido, os nossos resultados evidenciam que a razão entre os níveis de expressão dos recetores do TRAIL indutores (R1 e R2) e inibidores da apoptose (R3 e R4), nos plasmócitos CD138+/CD19+, apresentam valores significativamente inferiores nos doentes com MM em relação aos doentes com MGUS, observando-se o inverso nos plasmócitos tumorais. Foi demonstrado que esta razão apresenta um potencial discriminatório entre MGUS e MM, em análise multivariada por regressão logística, podendo constituir um marcador importante na progressão de MGUS para MM (tabela 18A). De igual modo, e considerando um número superior de moléculas pró e antiapoptóticas, o valor da razão BAX+caspase3+R1+R2+FAS/BCL-2+survivina+R3+R4 foi também inferior nos plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes com MGUS relativamente aos doentes com MM ( $p < 0,01$ ) enquanto o inverso foi observado no caso dos plasmócitos CD138+/CD19+ ( $p = NS$ ). Estes resultados reforçam a existência de alterações na expressão de moléculas envolvidas na apoptose ao longo da mielomagenese e destacam estas alterações nos plasmócitos com fenótipo normal como discriminatórias entre MGUS e MM, o que apoia o conceito de que estas células desempenham também um papel fundamental na progressão das GM.

Como mencionado, vários mecanismos oncogénicos são importantes para a patogénese no MM. Contudo, um elemento unificador nestes eventos precoces e frequentemente referido na literatura é a desregulação da ciclina D (essencialmente da ciclina D1, mas também da D2 e da D3, ou das três em conjunto).



Nesta situação, as células tornam-se mais suscetíveis a estímulos proliferativos, o que resulta na expansão seletiva dos clones tumorais, constituindo um fator importante na interação com as células do estroma da medula óssea. Desta interação resulta a libertação de uma cascata de moléculas de sinalização e de citocinas que promovem a progressão adicional (Bergsagel *et al.*, 2005; Bartek & Lukas, 2011; Pestell, 2013). Na nossa coorte de doentes com GM, os níveis de expressão de ciclina D1 foram superiores nos plasmócitos CD138+/CD19+ relativamente aos CD138+/CD19- ( $p < 0,01$ ), o que confirma a importância da ciclina D1 não apenas no clone tumoral. Com efeito, em análise multivariada (regressão logística), identificámos a expressão de ciclina D1 nos plasmócitos não tumorais como uma das moléculas com capacidade preditora independente de diagnóstico de GM (tabela 17).

Por outro lado, os níveis de expressão de ciclina D1 nos plasmócitos CD138+/CD19- e CD138+/CD19+ foram superiores nos doentes com MGUS relativamente aos doentes com MM ( $p < 0,01$ ), o que indicia que já existe hiperexpressão desta proteína em fases precoces do desenvolvimento das GM, não apenas nos plasmócitos tumorais mas também nos não tumorais. Com efeito, a desregulação da ciclina D1 foi descrita por Bergsagel e colaboradores (2005) como um evento patogénico precoce e unificador no MM (Bergsagel *et al.*, 2005), como referido anteriormente e em concordância com os resultados do nosso trabalho, não estando ainda clarificado o seu papel na progressão das GM. O facto de não terem sido observadas diferenças na expressão de ciclina D1 entre os plasmócitos CD138+/CD19- e CD138+/CD19+, nos diferentes subgrupos de GM confirma a importância dos plasmócitos não tumorais na patogénese do MM. A reforçar este conceito, está o facto da expressão de ciclina D1 nestes plasmócitos em análise multivariada (regressão logística) apresentar potencial discriminatório entre MGUS e MM (Tabela 18A).

A ciclina D1 desempenha funções reguladoras do ciclo celular em condições fisiológicas e neoplásicas. Foi demonstrado por diversos autores que a inibição da sua função se associou a uma redução da proliferação de células tumorais. No caso do MM, o valor prognóstico da hiperexpressão do gene da ciclina D1 permanece controverso (Sewify *et al.*, 2014); a amplificação deste gene foi associada à expressão de *MDR1* (Sewify *et al.*, 2014) e à  $t(11;14)$ , conduzindo à hiperexpressão da ciclina D1 (Pruneri *et al.*, 2000). No nosso estudo, não evidenciamos nenhuma associação entre a expressão de ciclina D1 e a de proteínas da família ABC. Foi igualmente demonstrado que a hiperexpressão da ciclina D1 se associa a um prognóstico desfavorável no MM, traduzido em sobrevivências global e livre de progressão inferiores (Sewify *et al.*, 2014). Na presente investigação não observámos associação entre a expressão de ciclina D1 e o prognóstico dos doentes com MM.

A maioria dos estudos relativos à expressão de ciclina D1 no MM foram realizados por técnicas moleculares, tendo sido encontrada hiperexpressão do gene da ciclina



D1 em 14 a 70% dos doentes estudados, na maioria dos casos em associação com a t(11;14). Estes dados estão de acordo com os nossos resultados, uma vez que os doentes com MM com a t(11;14) apresentam níveis de expressão de ciclina D1 superiores comparativamente aos que não apresentam anomalias citogenéticas ( $p < 0,05$ ), o que era esperado, uma vez que esta translocação se associa à hiper-expressão do gene *CCND1*, que codifica a ciclina D1 (Pruneri *et al.*, 2000).

No que respeita à associação entre as alterações citogenéticas presentes nos doentes com MM ao diagnóstico e a expressão das moléculas reguladoras da apoptose e do ciclo celular, encontramos outras associações ainda não descritas, como o aumento da expressão de BCL-2 em doentes com a t(11;14), o aumento da expressão de TRAIL-R2 e R3 em doentes com a t14q32; de TNF- $\alpha$  e TRAIL-R3 em doentes com anomalias do cromossoma 1 (todas as moléculas referidas expressas em plasmócitos CD138+/CD19-). Estes resultados indicam que poderão existir associações entre alterações citogenéticas e moleculares ainda não conhecidas, permitindo considerar a hipótese de associação entre as alterações citogenéticas mencionadas e a regulação da expressão dos genes que codificam as proteínas referidas.

O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição multifuncional com funções fundamentais na regulação da sobrevivência das células onde convergem múltiplas vias de transdução de sinal, que incluem estímulos anti e pró-apoptóticos. O NF- $\kappa$ B regula a expressão de múltiplos genes que desempenham um papel fundamental na apoptose, na proliferação e na migração celulares e tem sido amplamente demonstrado que a regulação anómala do NF- $\kappa$ B e das vias de sinalização que controlam a sua atividade está envolvida no desenvolvimento e na progressão dos tumores, assim como na resistência à quimioterapia e à radioterapia (Mercurio & Manning, 1999; Baud & Karin, 2009b).

A ativação constitutiva ou aberrante do NF- $\kappa$ B foi detetada em múltiplas neoplasias humanas (Dolcet *et al.*, 2005b), levando a que o NF- $\kappa$ B se tornasse um alvo terapêutico interessante para o tratamento do cancro. Quando ativado, este factor transcripcional parece proteger algumas células neoplásicas hematopoiéticas da apoptose. Hongyu Ni e colaboradores (2001) demonstraram que a ativação constitutiva do NF- $\kappa$ B estava presente em todas as amostras de doentes com MM, assim como em linhas celulares estudadas por estes autores (Ni *et al.*, 2001) e como também previamente demonstrado por Feinman e colaboradores (Feinman *et al.*, 1999). Além disso, a expressão deste fator pode ser induzida por interação da célula de MM com o microambiente, o que a protege da apoptose induzida por fármacos, e pode determinar a falência da terapêutica. Foi ainda evidenciado que a inibição do NF- $\kappa$ B se associa a indução da apoptose nas células tumorais de doentes com MM. Estes resultados sugerem que a expressão constitutiva de NF- $\kappa$ B desempenha um papel importante na sobrevivência dos plasmócitos tumorais no

MM (Demchenko & Kuehl, 2010; Fabre *et al.*, 2012), constituindo um alvo terapêutico, como mencionado. Estes factos contribuíram para o desenvolvimento do bortezomib, um inibidor do NF- $\kappa$ B, que demonstrou eficácia em ensaios clínicos de fase II e III, o que conduziu à sua aprovação para o tratamento de doentes com MM, inicialmente em recidiva ou refratário (Richardson *et al.*, 2005) e, posteriormente, como primeira linha terapêutica (San Miguel *et al.*, 2008b; Rosiñol *et al.*, 2012).

No entanto, é desconhecida a importância que os níveis de expressão de NF- $\kappa$ B, nos diferentes subtipos fenotípicos de plasmócitos desempenham, na etiopatogenia das GM, em particular na evolução de MGUS para MM e no prognóstico de doentes com MM, tratados com bortezomib em primeira linha. Os resultados da nossa investigação mostraram que os níveis de expressão de NF- $\kappa$ B nos plasmócitos CD138+/CD19+ dos doentes com MGUS ( $36 \pm 1,5$  MIF), MMI ( $33,3 \pm 1,9$  MIF) e MM ( $38,9 \pm 1,5$  MIF) apresentam valores significativamente inferiores em relação aos controlos não neoplásicos ( $69,6 \pm 10,2$  MIF) ( $p < 0,05$ ), sem diferenças significativas entre os diferentes subgrupos de GM. Por outro lado, observámos nos plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes com MGUS, MMI e MM níveis de expressão de NF- $\kappa$ B significativamente inferiores em relação aos plasmócitos CD138+/CD19+ dos doentes ( $p < 0,01$ ) e dos controlos não neoplásicos ( $p < 0,01$ ). Estes dados comprovam as características diferenciais dos plasmócitos não neoplásicos (CD138+/CD19+) relativamente aos plasmócitos neoplásicos (CD138+/CD19-) dos doentes com GM e aos dos controlos, também para a expressão de NF- $\kappa$ B.

O facto de não terem sido observadas diferenças significativas neste fator de transcrição, entre os doentes com GM, sugere que a regulação da expressão de NF- $\kappa$ B poderá ser um evento precoce na mielomagénese, não sendo tão relevante na progressão de MGUS para MM. No entanto, os níveis de expressão deste fator de transcrição poderão influenciar a agressividade da doença e, deste modo, a sobrevivência dos doentes. No presente estudo, verificámos que os níveis de expressão de NF- $\kappa$ B superiores ou iguais a 25 MIF nos plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes com MM se associam a um benefício na sobrevivência global destes doentes ( $p = 0,022$ ). Estes resultados podem estar relacionados com o efeito do NF- $\kappa$ B na regulação positiva da expressão de TRAIL e de FAS ligando, o que pode sensibilizar os plasmócitos tumorais à apoptose (Allen & El-Deiry, 2012). De facto, como anteriormente mencionado, verificámos que os níveis de expressão de FAS ligando iguais ou superiores a 20 MIF nos mesmos plasmócitos ( $p = 0,032$ ) e a percentagem destes que expressa TRAIL superior a 40% ( $p = 0,03$ ) se acompanham igualmente de aumento na sobrevivência global dos doentes com MM. Além disso, os nossos resultados mostram ainda que os doentes com MM com resposta ao bortezomib apresentam níveis de expressão significativamente superiores deste

fator transcripcional ( $26,2 \pm 1,7$  MIF) em relação aos doentes sem resposta a este fármaco ( $19,7 \pm 1,8$  MIF) ( $p=0,032$ ). Keats e colaboradores (2007) sugeriram que anomalias que condicionam diminuição da expressão do regulador negativo da via não-canónica do NF- $\kappa$ B (*TRAF3*) apresentam maior probabilidade de resposta ao bortezomib. De facto, os doentes com redução da expressão de *TRAF3* revelam maior sensibilidade ao bortezomib (Keats *et al.*, 2007b).

Estes dados sugerem a potencial relevância dos níveis de expressão de NF- $\kappa$ B em plasmócitos CD138+/CD19- como um biomarcador de resposta ao bortezomib e/ou de prognóstico em doentes com MM. No entanto, estudos multicêntricos envolvendo maior número de doentes são necessários para confirmar estes resultados.

Uma vez que a ativação do NF- $\kappa$ B é dependente da degradação do I $\kappa$ B no proteossoma, previamente ubiquitinado, avaliámos os níveis de expressão de conjugados de ubiquitina nos plasmócitos dos doentes e dos controlos.

A ubiquitinação de proteínas endógenas consiste numa modificação pós-tradução através da ligação covalente de ubiquitina e está envolvida, não apenas na degradação de proteínas desnecessárias à célula e na regulação da estabilidade proteica, mas também em múltiplos processos celulares eucariotas, que incluem a progressão ao longo do ciclo celular, a reparação do DNA ou a transdução de sinal (Tomlinson *et al.*, 2007). De facto, é amplamente desconhecida a importância da ubiquitinação de proteínas endógenas, quer em condições fisiológicas, quer em situações patológicas, apesar de reconhecido o seu papel na tumorigénese (Mani & Gelmann, 2005). Estudos proteómicos prévios identificaram 52 proteínas ubiquitinadas numa linha celular de MM, as células U266 (Jia *et al.*, 2011). De acordo com os nossos resultados, não foram encontradas diferenças nos níveis de expressão de conjugados de ubiquitina entre os diversos subgrupos de GM, quer para os plasmócitos CD138+/CD19-, quer para os CD138+/CD19+. De igual modo, também não se observaram diferenças entre plasmócitos neoplásicos e não neoplásicos dos doentes com MGUS, MMI, MM e MMRR. Por outro lado, relativamente aos controlos não neoplásicos, os níveis de expressão dos conjugados de ubiquitina dos doentes com MGUS, MMI e MM foram significativamente inferiores nos dois subtipos de plasmócitos ( $p<0,05$ ), o que sugere que o processo de ubiquitinação poderá ser relevante no desenvolvimento de GM, mas sem importância demonstrada na progressão de MGUS para MM. Do mesmo modo, também não encontramos associação entre a expressão de conjugados de ubiquitina e a resposta à terapêutica ou a sobrevivência.

### 5.1.3. Análise da expressão de fatores de crescimento envolvidos na angiogénese e na inflamação

O VEGF é uma glicoproteína estreitamente associada à indução da angiogénese, por ativação da proliferação das células endoteliais. Para além dos seus efeitos vasculotróficos, induz vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração celular, podendo estar envolvido na metastização (Podar *et al.*, 2001a; Podar & Anderson, 2005). Como demonstrado por diversos autores, a angiogénese da medula óssea desempenha um papel importante na patogénese e na progressão do MM (Rajkumar & Greipp, 2001). Com efeito, no contexto do MM, foi demonstrado que a angiogénese medular, estimada através da densidade de microvasos, revelou ter impacto prognóstico em diversos estudos. Por outro lado, verificou-se que o grau de angiogénese da medula óssea aumenta progressivamente ao longo da evolução das GM (Rajkumar *et al.*, 2002). Vacca e colaboradores (2006) demonstraram uma atividade angiogénica aumentada na medula óssea de doentes com MM comparativamente a doentes com MMI ou com MGUS (Vacca & Ribatti, 2006). A secreção de VEGF pelos plasmócitos do MM parece desempenhar um papel central na iniciação e manutenção da angiogénese anómala (Kumar *et al.*, 2003a). O endotélio vascular anómalo responde aos estímulos do VEGF e secreta IL-6, um fator de crescimento essencial para os plasmócitos tumorais no MM. Por outro lado, esta citocina tem a capacidade de estimular a secreção de IL-6 pelas próprias células de MM (Dankbar *et al.*, 2000).

O VEGF, secretado por plasmócitos clonais e por células do estroma da medula óssea, em doentes com MM, pode ainda ser libertado em resposta a diversos estímulos desencadeados por outras citocinas, como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$ , assim como pela sinalização mediada pelo CD40, entre outras. O VEGF, além de estimular a angiogénese, através de um mecanismo autócrino, conduz ao crescimento e à quimiotaxia mediadas pelo recetor 1 do VEGF (VEGF-Rec1). Por outro lado, induz as células do estroma a secretarem IL-6 que por sua vez, aumenta a sobrevivência das células do MM, por estimulação do crescimento celular e inibição da apoptose. Com efeito, a inibição da atividade do VEGF também suprime a produção de TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$  pelas células mononucleares da medula óssea. Estes dados sugerem que o VEGF desempenhe um papel importante em neoplasias hematológicas, como o MM, através de múltiplos mecanismos autócrinos e parácrinos (Kumar *et al.*, 2003b; Podar *et al.*, 2001b).

Os nossos resultados são concordantes com os dados obtidos por estes autores, uma vez que os doentes com GM apresentam uma expressão aumentada de VEGF nos plasmócitos neoplásicos relativamente aos não neoplásicos dos doentes com GM e

aos dos controlos ( $p < 0,01$ ). Relativamente à IL-6, observamos níveis de expressão nos plasmócitos CD138+/CD19+ superiores aos dos CD138+/CD19- dos doentes com GM e aos dos controlos ( $p < 0,05$ ). Em oposição, os plasmócitos CD138+/CD19- são os que apresentam os níveis de expressão mais elevados do recetor da IL-6. Estes resultados apoiam a relevância desta citocina na patogénese das GM, ao mesmo tempo que realçam as diferenças moleculares nos plasmócitos com fenótipo normal dos doentes relativamente aos plasmócitos com o mesmo fenótipo dos controlos. No entanto, quando analisamos estas moléculas nos diferentes subgrupos na nossa série de doentes com GM, não observamos diferenças nos níveis de expressão de VEGF, de IL-6 ou dos respetivos recetores, nos plasmócitos CD138+/CD19+, permitindo inferir que as alterações na expressão destas moléculas nos plasmócitos com fenótipo normal surgem muito precocemente no desenvolvimento das GM e se mantêm ao longo da sua progressão. De salientar que, nos doentes com MGUS, os níveis de expressão do recetor do VEGF nestes plasmócitos foram superiores aos dos controlos ( $p = 0,001$ ), o que apoia a importância deste fator de crescimento numa fase pré-neoplásica, assim como a sua expressão nos plasmócitos com fenótipo normal. De facto, em análise multivariada, a expressão do recetor do VEGF nos plasmócitos CD138+/CD19+ destacou-se como uma das moléculas com capacidade preditora independente de diagnóstico de GM (tabela 17).

Quando comparámos os plasmócitos com os fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- dos doentes com MM, MMI e MGUS, constatámos que os níveis de expressão de VEGF são significativamente superiores nos plasmócitos neoplásicos ( $p < 0,05$ ). Além disso, nos doentes com MM, estes plasmócitos apresentam níveis de expressão superiores de VEGF e do seu recetor relativamente aos controlos ( $p < 0,05$ ), o que realça o papel fundamental que este fator angiogénico representa para a sobrevivência das células tumorais no MM. A expressão do recetor do VEGF nos plasmócitos tumorais foi superior nos doentes com MM relativamente aos doentes com MGUS ( $p < 0,01$ ) e, em análise multivariada por regressão logística, apresentou potencial discriminatório entre MGUS e MM (tabela 18B).

A reforçar este dado, está a demonstração, na nossa coorte de doentes com MM, da associação entre níveis de expressão mais elevados de VEGF nos plasmócitos CD138+/CD19- e sobrevivências global e livre de progressão inferiores ( $p = 0,003$  e  $p = 0,002$ , respetivamente). Na análise da subpopulação de doentes tratada com bortezomib em primeira linha, mantém-se o impacto negativo da elevada expressão de VEGF na sobrevivência global dos doentes com MM ( $p = 0,046$ ). Este dado sugere que o bortezomib não ultrapassa o efeito prognóstico desfavorável associado a elevados níveis de expressão de VEGF nos plasmócitos tumorais dos doentes com MM.

Não existem descrições na literatura que façam referência à discriminação entre plasmócitos com fenótipos tumoral e não tumoral, no que respeita à expressão de proteínas com funções celulares fundamentais, nos doentes com GM. Kumar e colaboradores (2003) demonstraram previamente que existe heterogeneidade na expressão de citocinas angiogénicas, como o VEGF, entre células de MM do mesmo doente, sem que fizessem qualquer referência ou associação entre níveis de expressão, subtipos fenotípicos de plasmócitos e prognóstico (Kumar *et al.*, 2003a). Ao contrário do descrito com o VEGF, não observámos diferenças significativas nos níveis de expressão de IL-6 e do seu recetor entre os subgrupos de doentes com GM, quer para os plasmócitos tumorais, quer para os não tumorais.

Apesar de um elevado número de citocinas e de fatores de crescimento ter sido implicado nesta complexa cascata de interações, o VEGF é considerado um participante fundamental, com um interesse particular no MM. Neste sentido, diversas estratégias terapêuticas foram ensaiadas, tendo por base este fator de crescimento, recorrendo a anticorpos monoclonais anti-VEGF, com resultados que vieram a revelar-se desencorajadores, em uso clínico (Anargyrou *et al.*, 2008; Shojaei, 2012). Da mesma forma, e apesar de reconhecida a importância da IL-6 como fator de crescimento central no MM, a tentativa de inibição da sua atividade através da utilização clínica de anticorpos anti-IL-6 foi igualmente decepcionante (Fulciniti *et al.*, 2009; Todoerti *et al.*, 2010; Voorhees *et al.*, 2013). Os resultados destes ensaios clínicos sugerem que a inibição dos mecanismos regulados por estas citocinas individualmente possam não ser determinantes no controlo do clone maligno no MM. Estes dados, em associação com a ausência de diferenças na expressão de IL-6 e do seu recetor nos diferentes subgrupos de GM, destacam a relevância da IL-6 nas fases iniciais do desenvolvimento da doença.

#### **5.1.4. Avaliação da expressão de proteínas da família ABC em doentes com gamopatias monoclonais**

O estado atual do conhecimento acerca da fisiopatologia do MM sugere a presença de diversos clones malignos no momento do diagnóstico, para o desenvolvimento dos quais terão contribuído complexos mecanismos genéticos e epigenéticos (Morgan *et al.*, 2012a; Maes *et al.*, 2013c). Na sua evolução natural, o MM está associado a elevadas taxas de resistência primária ou adquirida e cursa com recidivas sucessivas, o que o tornam uma doença incurável na maioria dos doentes. Um dos mecanismos relacionados com a falência da terapêutica envolve a aquisição

de resistência a múltiplos fármacos antineoplásicos (*multidrug resistance*, MDR) constituindo um grave bloqueio ao sucesso terapêutico, com implicações diretas no prognóstico. Estes mecanismos de resistência encontram-se frequentemente associados à expressão de proteínas que pertencem à família de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), nomeadamente a gp-P e a MRP-1, que desempenham funções como bombas de efluxo de vários compostos (xenobióticos e fármacos, por exemplo) para o exterior da célula. Neste sentido, além do conhecido papel na resistência a fármacos anticancerígenos em diversas neoplasias, poderão também estar envolvidas nos mecanismos de carcinogénese. O paradigma do transportador de múltiplos fármacos, a gp-P, codificada pelo gene *MDR-1*, foi identificada há mais de três décadas e a sua hiperexpressão continua a ser considerada uma causa fundamental de MDR nas neoplasias malignas (Higgins, 2007b; Baguley, 2010; Wu *et al.*, 2013). A gp-P está localizada maioritariamente na membrana plasmática e pode ser responsável pelo efluxo de substratos estrutural e quimicamente distintos; localiza-se também nos compartimentos intracelulares e circula entre estes e a membrana plasmática. A interrupção da sua deslocação para a membrana celular conduz a um aumento nos níveis intracelulares de gp-P e de fármacos antineoplásicos, sugerindo um potencial alvo capaz ultrapassar os mecanismos de MDR nos tumores malignos (Fu & Arias, 2012). A MRP-1 é outra proteína da família de transportadores ABC, originalmente descrita como uma causa de MDR nas células tumorais. Estudos mais recentes demonstraram que esta proteína transporta também moléculas pró-inflamatórias e antioxidantes, podendo estar implicada na etiologia e na progressão de diversas patologias (Cole, 2014).

Até ao presente, apesar de todas as investigações desenvolvidas na área, não foram ainda encontradas estratégias eficazes para ultrapassar os mecanismos de resistência (Higgins, 2007b; Ullah, 2008; Fu, 2013). Para além destes factos, acresce a constatação de que os novos agentes antineoplásicos, direcionados a alvos específicos, estão associados a mecanismos de resistência semelhantes ou idênticos aos classicamente descritos com os agentes citotóxicos (Lage, 2008; Hawley *et al.*, 2013).

Neste contexto, foi nosso objetivo avaliar se as proteínas da família ABC (gp-P e MRP-1) contribuíam apenas para os mecanismos de resistência ou se tinham alguma participação na etiopatogenia das GM. No subgrupo de doentes com MM, analisámos ainda o impacto da expressão destas proteínas na resposta à terapêutica, na recidiva e na sobrevivência global.

De acordo com os nossos resultados, os níveis de expressão de gp-P membranar inferiores nos plasmócitos CD138+/CD19+ dos doentes com MM, MMI e MGUS, comparativamente aos controlos ( $p < 0,05$ ) indicam, como descrito previamente para outras moléculas, que os plasmócitos com fenótipo normal dos doentes com GM



apresentam alterações moleculares relevantes também na expressão de proteínas envolvidas na resistência à terapêutica em comparação com os plasmócitos dos controlos. A confirmar a importância que estas proteínas parecem desempenhar no desenvolvimento das GM, está o facto de, em análise multivariada, a expressão da gp-P citoplasmática (superior a 27,5 MIF) e da MRP-1 membranar (superior a 29,5 MIF) nos plasmócitos com fenótipo normal serem identificadas como apresentando capacidade preditora independente de diagnóstico de GM (tabela 17).

Os níveis de expressão superiores de gp-P membranar nos plasmócitos com este fenótipo dos doentes com MM relativamente aos doentes com MGUS ( $p < 0,01$ ) reforça a importância dos mesmos plasmócitos na progressão de MGUS para MM, para além de sugerir um papel ainda pouco esclarecido da gp-P nesta progressão. Pelo contrário, os níveis de expressão de MRP-1 membranar nos plasmócitos CD138+/CD19+ foram superiores nos doentes com MM e com MGUS comparativamente aos controlos ( $p < 0,01$ ) e na MGUS em relação ao MM ( $p < 0,01$ ), o que sugere, mais uma vez, um papel para os transportadores ABC na progressão das GM, que parece ultrapassar o da resistência. Os doentes com MMRR apresentam níveis de expressão superiores de MRP-1 membranar relativamente aos doentes com MM, quer nos plasmócitos neoplásicos quer nos normais, ainda que esta diferença não tenha alcançado significado estatístico, provavelmente devido ao reduzido número de doentes com MMRR, mas poderá sugerir a participação desta proteína na refractariedade da doença e no desenvolvimento de resistência adquirida.

Além disso, constatámos que os níveis de expressão da gp-P membranar e de MRP-1 citoplasmática são superiores nos plasmócitos CD138+/CD19+ relativamente aos CD138+/CD19-, nos doentes com MM e com MGUS ( $p < 0,01$ ); no caso da gp-P membranar, também superiores nos controlos relativamente aos plasmócitos CD138+/CD19- nestes dois subgrupos de GM ( $p < 0,01$ ). De facto, resultados sobreponíveis foram previamente descritos por Calatuzzolo e colaboradores, que avaliaram a expressão de gp-P e de MRP-1 em células tumorais de doentes com gliomas malignos e constataram que a expressão destas proteínas era mais elevada nos astrócitos normais e nas células endoteliais cerebrais do que nas células tumorais (Calatuzzolo *et al.*, 2005), o que poderá representar um dos mecanismos de defesa das células normais aos efeitos de fármacos ou substâncias que são substratos destas glicoproteínas.

O oposto foi observado em relação à gp-P citoplasmática, em que os níveis de expressão mais elevados foram encontrados nos plasmócitos CD138+/CD19-, relativamente aos CD138+/CD19+ dos doentes com MGUS, MMI e MM e dos controlos. A gp-P citoplasmática parece representar um *pool* de armazenamento para a manutenção dos níveis de gp-P membranar, tal como descrito por Labroille e colaboradores

(Labroille *et al.*, 1998). Este poderá constituir mais um mecanismo importante na resistência à morte celular por apoptose, por rapidamente conduzir à diminuição da concentração intracelular do fármaco, podendo contribuir para um pior prognóstico por falência da terapêutica. De facto, o aumento da expressão de gp-P citoplasmática pode ocasionar resistência intrínseca ou adquirida aos citostáticos e originar desta forma a falência da quimioterapia (Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2012). Além disso, tem um papel indutor da proliferação celular pela sua participação no transporte de interleucinas importantes na proliferação e na diferenciação celulares (Lehne, G. *et al.*, 1998) e uma função antiapoptótica (Michielli, M. *et al.*, 2000; Pallis, M. *et al.*, 2000). Recentemente, foi mencionado em tumores do colon que a ativação destes transportadores ABC, além de aumentar o efluxo de fármacos, pode desencadear a sinalização mediada pelo fator transcripcional HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$* ) e induzir a expressão de genes que codificam proteínas que promovem a sobrevivência e/ou inibem a apoptose como a survivina, a BCL-2 ou o TRAIL-R4 (Garza-Treviño *et al.*, 2015). Esta redução da sinalização pró-apoptótica permite à célula a tolerância de níveis mais elevados de fármacos antineoplásicos antes de serem induzidas as vias de morte celular, o que poderá influenciar não só a resposta à terapêutica como o prognóstico dos doentes.

Neste sentido, fomos também avaliar o efeito destas glicoproteínas na sobrevivência dos doentes com MM e verificámos que os doentes com níveis de expressão de MRP-1 citoplasmática superiores a 25 MIF, nos plasmócitos CD138+/CD19+, apresentam um prognóstico mais favorável, com aumento da sobrevivência global ( $p=0,018$ ) e da sobrevivência livre de progressão ( $p=0,024$ ). No que respeita à expressão das proteínas da família ABC nos plasmócitos CD138+/CD19-, não observámos impacto na sobrevivência. Os estudos que avaliaram o impacto prognóstico das proteínas MRP-1 e gp-P apresentam resultados contraditórios. Li e colaboradores constataram que a expressão aumentada do gene *MRP-1* em células tumorais de doentes com neoplasia do pulmão não de pequenas células se associava a um prognóstico desfavorável, traduzido numa redução da sobrevivência livre de progressão (Li *et al.*, 2009a). Haber e colaboradores demonstraram que a elevada expressão do gene *MRP-1* nas células tumorais de doentes com neuroblastoma apresentava impacto no prognóstico, uma vez que se associava a sobrevivências global e livre de progressão inferiores, o inverso do observado com a expressão do gene *MDR1*, que não apresentou impacto prognóstico nestes doentes (Haber *et al.*, 2006). Tal como neste estudo, também Roundhill e colaboradores estabeleceram uma associação entre níveis elevados de expressão da proteína MRP-1 membranar nas células tumorais de doentes com sarcoma de Ewing primário e um prognóstico adverso, ao mesmo tempo que descreveram uma ausência de impacto da expressão de gp-P. Por outro lado, e em concordância com os nossos resultados, Leith e cola-

boradores não encontraram associação entre a expressão de MRP-1 nos blastos dos doentes com leucemia mieloblástica aguda e o prognóstico (Leith *et al.*, 1999).

Um estudo recente revelou que o bortezomib funciona como um substrato para a gp-P e que a hiperexpressão desta glicoproteína pode estar subjacente à resistência ao bortezomib (O'Connor *et al.*, 2013). Contudo, estes resultados não foram reproduzidos noutros estudos, nomeadamente em linhas celulares de linfoma T e de carcinoma do pulmão não de pequenas células (Lü & Wang, 2013; Abdi *et al.*, 2013b; De Wilt *et al.*, 2012). Outra investigação mostrou que a hiperexpressão de gp-P define uma subpopulação de plasmócitos tumorais no MM que são resistentes ao carfilzomib, um inibidor do proteasoma de segunda geração (Hawley *et al.*, 2013). Na nossa coorte de doentes com MM, não encontramos diferenças nos níveis de expressão de MRP-1 nem de gp-P (citoplasmáticas e membranares) nos plasmócitos CD138+/CD19- de doentes com e sem resposta à terapêutica de primeira linha e também na subpopulação de doentes tratada com bortezomib como terapêutica inicial. De igual modo, Taheri e colaboradores não observaram diferenças na expressão do gene *MDR1* em doentes com neoplasia da mama, com e sem resposta à quimioterapia neoadjuvante (Taheri & Mahjoubi, 2013).

Diversos ensaios clínicos avaliaram a combinação de quimioterapia com inibidores da gp-P, como a ciclosporina ou o verapamil, mas sem benefício clínico e com toxicidade acrescida (Sonneveld *et al.*, 2001; O'Connor *et al.*, 2013).

Apesar das múltiplas investigações sobre o papel dos transportadores ABC nos mecanismos de resistência aos agentes antineoplásicos e na evolução das neoplasias malignas, a sua aplicação na prática clínica ainda não é uma realidade e mais estudos serão necessários, com inclusão de amostras com maior número de doentes, para um conhecimento mais aprofundado nesta área.

### **5.1.5. Estudo do perfil de metilação de genes nas gamopatias monoclonais**

O MM constitui uma patologia altamente heterogénea, com eventos genéticos e epigenéticos cumulativos, alguns dos quais já presentes nos plasmócitos clonais da fase pré-neoplásica de MGUS. As modificações epigenéticas constituem formas de regulação da expressão génica e representam uma variedade de mecanismos complexos e interdependentes que foram reconhecidos como desempenhando um papel fundamental em pontos críticos da iniciação e da progressão de diversas neoplasias (Cheung *et al.*, 2009; Taberlay & Jones, 2011). Uma das alterações

epigenéticas mais conhecida e documentada envolve a metilação de dinucleótidos CpG em regiões promotoras de genes supressores tumorais, com consequente silenciamento destes genes, o que foi descrito em múltiplas neoplasias malignas (Esteller *et al.*, 2001; Esteller, 2008; Heyn & Esteller, 2012). O conhecimento das alterações epigenéticas presentes em doentes com GM, nomeadamente o perfil de metilação dos genes supressores tumorais, é limitado e controverso.

Na presente investigação, analisámos a frequência de metilação anómala das regiões promotoras de oito genes reguladores do ciclo celular e/ou da apoptose, em doentes com GM, e avaliámos o seu papel na evolução clonal de MGUS para MM, assim como associações entre as alterações epigenéticas, as características clínico-laboratoriais ao diagnóstico, a resposta à terapêutica e a sobrevivência, nos doentes com MM. Deste modo, analisámos a metilação dos genes *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK* e dos genes que codificam os recetores do TRAIL, *R1*, *R2*, *R3* e *R4*, em doentes com MGUS, MMI, MM e MMRR. Em estudos prévios, a metilação aberrante destes genes foi associada a silenciamento transcripcional (Katzenellenbogen *et al.*, 1999; Virmani *et al.*, 2001; Braggio *et al.*, 2010b; Maes *et al.*, 2013a; Hervouet *et al.*, 2013).

Os estudos de metilação foram realizados recorrendo à análise por *Methylation-specific Polymerase Chain Reaction* (MS-PCR), um método sensível e rápido, adequado à análise de elevado número de amostras (Herman *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2002; Mateos *et al.*, 2002). Um ponto crítico nos estudos genómicos em doentes com GM consiste na separação da fração celular CD138+, que inclui o clone tumoral (Braggio *et al.*, 2010b). A análise por MS-PCR foi utilizada para a deteção de metilação tanto em amostras de células mononucleares não selecionadas da medula óssea, como especificamente em células CD138+ (Ng *et al.*, 2001; Guillermin G, Depil S, Wolowicz D, 2003). Diversos autores estudaram a metilação de genes, como *p16*, *DAPK*, *p57* e *SOCS1* em células mononucleares não selecionadas da medula óssea de doentes com MM e outras neoplasias de células B (Ng *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Voso *et al.*, 2004) enquanto outros (Guillermin *et al.*, 2001) utilizaram células CD138+ para investigar a metilação de *p15* e de *p16*. As frequências de metilação descritas foram comparáveis nos dois tipos de estudos, o que indica que a separação do clone tumoral por técnicas de *sorting* não é mandatória para a técnica de MS-PCR e que esta pode ser realizada em células mononucleares não selecionadas da medula óssea (Braggio *et al.*, 2010b).

No presente estudo, a metilação anómala dos ilhéus CpG foi detetada em heterozigotia em todos os casos. Identificámos a presença de, pelo menos, um gene metilado dos oito estudados em 81% dos doentes com GM (77% com MGUS, 82% com MMI, 86% com MM e 75% com MMRR). Estes resultados apoiam o conceito de que a metilação anómala de genes supressores tumorais é um evento

frequentemente observado em doentes com GM e que envolve genes que controlam diferentes processos celulares, importantes no desenvolvimento das GM, em concordância com estudos anteriores (Galm *et al.*, 2004; Braggio *et al.*, 2010b; Seidl *et al.*, 2004; Stanganelli *et al.*, 2010; Shivapurkar *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2010a; Gonzalez-Paz *et al.*, 2007b; Guillerm *et al.*, 2001; Chim *et al.*, 2007b). Por outro lado, na medula óssea dos controlos não neoplásicos, não observámos metilação aberrante em nenhum dos genes estudados, o que é consistente com os resultados de estudos previamente publicados, nos quais os tecidos normais se encontravam completamente desmetilados ou muito raramente metilados (Galm *et al.*, 2004; Braggio *et al.*, 2010b; Chim *et al.*, 2007b; Van Noesel *et al.*, 2002; Shivapurkar *et al.*, 2004). Não observámos diferenças significativas entre os subgrupos de GM, no que respeita ao estado de metilação dos oito genes analisados.

Uma das alterações epigenéticas mais frequentes no MM é a metilação das regiões promotoras dos genes *p15* e *p16*. As proteínas codificadas por estes genes, P15 e P16, desempenham uma função reguladora do ciclo celular e estão envolvidas na inibição da transição da fase G1 para a fase S. Estas proteínas associam-se com as cinases dependentes das ciclinas 4 e 6 (CDK4 e CDK6), inibindo as suas funções (Guillerm *et al.*, 2001). Encontram-se descritas frequências variáveis de metilação dos genes *p15* e *p16* no MM, até 30% e 53%, respetivamente (Galm *et al.*, 2004; Braggio *et al.*, 2010b; Seidl *et al.*, 2004; Stanganelli *et al.*, 2010; Chim *et al.*, 2007b; Guillerm *et al.*, 2001). Diversos autores demonstraram que a metilação de *p16* é mais frequente nos doentes com MM relativamente aos doentes com MGUS (Chim *et al.*, 2007b; Mateos *et al.*, 2001; Uchida *et al.*, 2001), enquanto outros descreveram frequências idênticas (Seidl *et al.*, 2004; Stanganelli *et al.*, 2010). Guillerm e colaboradores (2001) descreveram frequências de metilação idênticas, não só do gene *p16*, mas também do gene *p15* entre MM e MGUS (Guillerm *et al.*, 2001).

Os resultados do presente estudo encontram-se em concordância com os dados dos últimos trabalhos mencionados, uma vez que observámos, na nossa série de doentes, frequências idênticas de metilação dos genes *p15* e *p16* entre doentes com MGUS e com MM (16% vs 22% para o gene *p15* e 13% vs 24% para o gene *p16*, respetivamente,  $p=NS$ ). Deste modo, os nossos dados apoiam o conceito de que uma alteração da regulação do ciclo celular, nomeadamente na transição da fase G1 para a fase S, constitui um evento muito precoce na história natural do MM, sugerindo que a metilação de *p15* e de *p16*, apesar de não se encontrar diretamente envolvida na progressão clonal de MGUS para MM, poderá contribuir para a imortalização dos plasmócitos clonais (Guillerm *et al.*, 2001). Outro ponto crítico frequentemente não considerado na maioria dos estudos é a distinção entre MMI e MM. De facto, a maioria das investigações em que se avaliou o perfil de metilação de genes supressores tumorais, em doentes com MM, não fizeram referência ou

incluíram um número muito reduzido de doentes com MMI. Ainda que presentes em número limitado, poderão influenciar os resultados da comparação entre MM e MGUS. Raros estudos individualizaram os doentes com MMI, como Seidl e colaboradores, mas o número de doentes neste subgrupo foi de apenas cinco, o que coloca reservas na valorização dos resultados (Seidl *et al.*, 2004).

A metilação anómala do gene *DAPK* em doentes com MM ao diagnóstico tem sido descrita em frequências muito díspares, variando entre 5% e 77% (Braggio *et al.*, 2010b; Seidl *et al.*, 2004; Stanganelli *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2001). Estas discrepâncias na frequência de metilação do gene *DAPK* (16 a 81%) foram igualmente observadas, por outros autores, em neoplasias do pulmão (Zochbauer-Muller, 2002), colorectais (Mittag *et al.*, 2006) e gástricas (Kato *et al.*, 2008). Esteller e colaboradores demonstraram que a expressão do gene *DAPK* suprimia o potencial metastático de células tumorais em modelos animais (Esteller *et al.*, 2001). Outros autores descreveram que a ausência de expressão deste gene conferia uma vantagem seletiva durante o complexo processo de metastização, com resistência a múltiplos estímulos apoptóticos, constituindo a perda de expressão de *DAPK* um mecanismo único que relaciona a supressão da apoptose com a metastização (Inbal *et al.*, 1997), podendo estar envolvido na progressão clonal de MGUS para MM. O nosso trabalho evidenciou uma frequência de metilação do gene *DAPK* idêntica entre doentes com MGUS (18%), com MMI (18%) e com MM (33%) ( $p=NS$ ), não se demonstrando relação entre a metilação anómala deste gene e a evolução clonal de MGUS para MM, em concordância com os resultados das investigações de outros autores (Chim *et al.*, 2007b).

O perfil de metilação do gene *p53* foi também analisado neste trabalho nos doentes com GM. Este gene desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular, na apoptose e na senescência celular, participando em muitos processos fisiológicos e patológicos, como previamente mencionado. A perda de atividade deste gene resulta na diminuição da apoptose em resposta à lesão do DNA, o que constitui um mecanismo de sobrevivência comum em muitas células tumorais. Com efeito, o gene *p53* é o que apresenta mais frequentemente mutações nas neoplasias em geral, podendo estar mutado em até 50% dos tumores humanos (Maes *et al.*, 2013a; Almeida *et al.*, 2009); contudo, a sua metilação anómala é excecional (Esteller, 2008). Nos doentes com MM, raramente são encontradas mutações ou deleções de *p53* ao diagnóstico (0-3% dos doentes), ocorrendo mais frequentemente em estádios avançados (até 20%) (Hurt *et al.*, 2006; Schmidt-Hieber *et al.*, 2012; López-Corral *et al.*, 2011; Munshi & Avet-loiseau, 2011; Velangi *et al.*, 2004). A metilação deste gene foi descrita em 32 a 55% das amostras de linhas celulares de MM (Hurt *et al.*, 2006). Esta observação contrasta com os nossos resultados, de acordo com os quais a metilação de *p53* foi observada numa percentagem muito



reduzida de doentes com MM (2%) e com MGUS (5%). Estas discrepâncias poderão estar relacionadas com o tipo de amostra (linha celular vs células de doentes).

A apoptose induzida pelo TRAIL foi sugerida como um componente chave na discriminação entre células transformadas e não transformadas. Em oposição às células normais, as células tumorais expressam preferencialmente níveis mais elevados dos recetores do TRAIL indutores de morte, tornando-as mais suscetíveis à apoptose mediada pelo TRAIL (Daniels *et al.*, 2005). O facto do TRAIL induzir preferencialmente a apoptose das células transformadas e dos ratinhos deficientes em TRAIL apresentarem níveis aumentados de tumorigénese sugere que a sinalização mediada pelo TRAIL poderá constituir uma estratégia terapêutica antineoplásica dirigida (Ashkenazi *et al.*, 1999; Cretney *et al.*, 2002).

Os recetores do TRAIL foram inicialmente identificados e caracterizados na década de 1990 (Pan *et al.*, 1997b). A família de recetores do TRAIL é composta por dois recetores de morte pró-apoptóticos (TRAIL-R1 e -R2) e dois recetores de membrana antiapoptóticos (TRAIL-R3 e -R4). Estes, ao contrário dos anteriores, não possuem o domínio de morte intracelular (DD) necessário para a indução da apoptose, atuando como recetores *decoy* que bloqueiam a sinalização de morte induzida pelo TRAIL (Schneider *et al.*, 2003). Estes recetores competem com os recetores de morte pró-apoptóticos para a ligação do TRAIL e/ou ativam vias de sobrevivência celular através da via do NF- $\kappa$ B, da via ERK e da P38 (Varfolomeev *et al.*, 2005; Shirley *et al.*, 2011).

Estudos prévios demonstraram que os níveis de expressão dos recetores de morte do TRAIL, R1 e R2, desempenham um papel determinante na sensibilidade das células tumorais à apoptose induzida pelo TRAIL (Griffith & Lynch, 1998; Walczak *et al.*, 1999; Schulze-Osthoff *et al.*, 1998; Wajant, 2003; Zhang & Fang, 2005). De facto, a desregulação da expressão dos recetores do TRAIL é frequentemente observada em tumores nos quais a expressão aumentada de TRAIL-R1 e -R2 se associa a estádios precoces (McCarthy *et al.*, 2006). Pelo contrário, a expressão reduzida destes recetores do TRAIL foi observada no cancro colorectal em estádios avançados (Perraud *et al.*, 2011). Da mesma forma, a perda de TRAIL-R1 e -R2 foi associada a prognóstico desfavorável nos doentes com neoplasias pancreáticas (Gallmeier *et al.*, 2013). Em oposição a estes dados, a expressão aumentada de TRAIL-R1 foi também associada a doentes com carcinoma ductal invasivo com um fenótipo mais agressivo (Sanlioglu *et al.*, 2007), tal como no presente estudo em que foi observada uma percentagem superior de plasmócitos CD138+/CD19- com expressão de TRAIL-R2 em doentes com MM com ISS de III relativamente a doentes com ISS de I. Estes dados sugerem que a expressão dos recetores do TRAIL possa servir como um biomarcador com utilidade prognóstica em diversas neoplasias.



No caso dos recetores *decoy* do TRAIL, permanece controverso se a hiperexpressão de *R3* ou *R4* se correlaciona com a resistência à apoptose após a exposição ao TRAIL, uma vez que raramente são encontrados elevados níveis de *R3* e de *R4* em linhas celulares tumorais (Hellwig & Rehm, 2012). De facto, o mecanismo exato de como os recetores *decoy* inibem a apoptose induzida pelo TRAIL não é conhecido e poderá diferir entre o TRAIL-*R3* e -*R4*. Foi descrito que o TRAIL-*R3* forma exclusivamente homotrimeros após ligação do TRAIL, enquanto o *R4* pode também agregar-se em heterotrimeros, com ativação do *R1* e do *R2*. Estes heterotrimeros são incapazes de formar um DISC (*death-inducing signalling complex*) funcional necessário para o início da apoptose (Mérino *et al.*, 2006). De facto, múltiplos eventos parecem regular a expressão génica dos recetores do TRAIL (Chen *et al.*, 2003; Zhang & Fang, 2005).

Na nossa amostra, o gene que codifica o recetor do TRAIL, *R3*, é o que se encontra mais frequentemente metilado (64% dos doentes com MGUS, 55% com MMI, 61% com MM e 75% com MMRR); a metilação dos outros três recetores do TRAIL não foi superior a 20% em nenhum dos subgrupos de GM estudados. Estes resultados encontram-se concordantes com os descritos na investigação de Shivapurkar e colaboradores (2004), na qual o gene mais frequentemente metilado foi também o *TRAIL-R3*, em 56% dos doentes com MM, seguido da metilação de *TRAIL-R4* em 20% destes doentes. Não foi observada metilação dos genes *TRAIL-R1* e *TRAIL-R2* em nenhum dos doentes com MM estudados por estes autores. No nosso trabalho, verificou-se a metilação anómala dos genes dos recetores *R1* e *R2* em 8% e 18% dos doentes com MM, respetivamente. Shivapurkar e colaboradores (2004) analisaram o perfil de metilação dos genes dos recetores do TRAIL em linhas celulares e em culturas primárias de diversas outras neoplasias, com resultados discrepantes. Com efeito, a metilação dos genes dos recetores *R3* ou *R4* do TRAIL, foi encontrada numa frequência que variou entre 16% nos mesoteliomas malignos do tipo sarcomatoso e 100% nas neoplasias cervicais; a metilação de *R1* e de *R2* foi muito raramente observada em todas as neoplasias examinadas. Estes dados sugerem que a metilação destes dois genes (*R1* e *R2*) possa não estar envolvida na patogénese da maioria dos tumores (Shivapurkar *et al.*, 2004; Van Noesel *et al.*, 2002).

Os quatro recetores do TRAIL encontram-se localizados no mesmo *locus*, no cromossoma 8p21-22 e a metilação inicia-se nos ilhéus CpG na região promotora, progredindo posteriormente para locais adjacentes ao longo da cadeia de DNA. Assim, alguns autores sugeriram que a metilação e o conseqüente silenciamento dos genes dos recetores *R1* e *R2* poderia resultar no silenciamento dos genes adjacentes, *R3* e *R4*, representando a metilação destes um efeito secundário, sem relevância clínica (Turker, 2002). Contudo, no nosso trabalho e no de Shivapurkar (2004), a metilação dos dois recetores *decoy* ocorreu independentemente uma da outra e

da metilação dos genes dos recetores R1 e R2. Com base nas frequências de metilação de R3 observadas nos doentes com MM, no presente trabalho, e em diversas neoplasias, no estudo de Shivapurkar (2004), podemos inferir que a metilação do gene que codifica o recetor *decoy*, R3, não constitui um evento secundário e que, muito provavelmente, o silenciamento deste gene por metilação poderá desempenhar um papel relevante na patogénese tumoral. Os dados apresentados sugerem que a regulação da expressão dos genes dos recetores R3 e R4 seja efetuada por mecanismos diferentes e independentes. De facto, a inativação de genes pode ocorrer através de mutações pontuais, perdas alélicas, deleções homozigóticas, para além de metilação anómala (Merlo *et al.*, 1995).

Foi reconhecido que os genes dos recetores R3 e R4 funcionem como oncogenes, uma vez que os seus efeitos antiapoptóticos são vantajosos para a sobrevivência das células tumorais. A sensibilidade aumentada ao TRAIL observada nas linhas celulares, assim como a sobrevivência mais longa nos doentes com neoplasia da próstata e com mesotelioma maligno com perda da expressão destes genes ou com hipermetilação suportam este conceito. Assim, falta compreender como o silenciamento dos recetores *decoy* pode favorecer a tumorigénese. Neste contexto, contudo, é importante lembrar que, para além do seu papel na indução da apoptose, os recetores do TRAIL são também conhecidos por activarem a via do NF- $\kappa$ B (Chaudhary *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1997). Esta via parece desempenhar um papel antiapoptótico e foi implicada na patogénese de numerosas neoplasias humanas (Gilmore, 2007). Diversos cenários podem ser configurados nos quais o TRAIL ativa predominantemente o NF- $\kappa$ B. Primeiro, a evasão da apoptose é uma característica das neoplasias malignas em geral e muitas células desenvolvem resistência à apoptose induzida pelos recetores de morte através de mecanismos genéticos e epigenéticos. No caso da morte celular induzida pelo TRAIL, esta pode envolver a redução da expressão de várias proteínas envolvidas nas vias intrínseca e extrínseca de ativação das caspases ou aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas, como BCL-2 e BCL-XL (Shivapurkar *et al.*, 2003). Alguns estudos sugeriram que a indução da apoptose por recetores de morte poderia ser dependente do grau de multimerização do recetor, que poderia, por sua vez, depender da concentração do ligando de morte, da sua forma (solúvel vs ligado à membrana), da expressão relativa dos recetores de morte na superfície celular e do estímulo induzido pelos fatores de crescimento e pelas citocinas aos quais as células estão expostas (Villunger *et al.*, 2000; Zhivotovsky & Orrenius, 2010). Assim, é possível que sob as condições prevalentes no microambiente tumoral, o TRAIL falhe na indução da apoptose e ative predominantemente a via do NF- $\kappa$ B. Curiosamente, enquanto a sinalização através dos recetores R1 e R2 pode ativar a via do NF- $\kappa$ B, a dos recetores R3 e R4 parece não possuir esta propriedade (Marsters *et al.*, 1997;

LeBlanc & Ashkenazi, 2003). Considera-se que os recetores R3 e R4 bloqueiam a ativação do NF- $\kappa$ B através de R1 e R2, em resposta ao TRAIL, privando a célula tumoral de estímulos para a sobrevivência e para o crescimento. Baseado neste modelo explicativo, será de esperar que as células tumorais ultrapassem este bloqueio ao seu potencial proliferativo, reduzindo a expressão dos recetores *decoy*, o que está de acordo com os resultados do nosso estudo, no que respeita à metilação e consequente silenciamento particularmente do gene que codifica o recetor R3 (ou DcR1), observado nos doentes com MM.

Outro objetivo do presente trabalho foi pesquisar possíveis associações entre as características clínicas e laboratoriais presentes ao diagnóstico dos doentes com MM e o padrão de metilação dos oito genes analisados. Os nossos resultados mostram que os doentes com metilação de *DAPK* se apresentam mais frequentemente com anemia ao diagnóstico (88% vs 55%;  $p=0,023$ ). Observámos também uma associação entre a metilação de *TRAIL-R3* e uma maior probabilidade de recidiva após a terapêutica de primeira linha (88% dos doentes com metilação de *TRAIL-R3* recidivaram vs 46% sem metilação;  $p=0,04$ ). Estes achados parecem sugerir que a metilação deste gene se associa a uma forma mais agressiva do MM; no entanto, não foi observado impacto nas sobrevivências global e livre de progressão. No que respeita às alterações citogenéticas, não foram encontradas associações entre o perfil de metilação de nenhum dos oito genes estudados e a presença de del 13/13q, t(11;14), t(4;14) ou del 17p detetadas por FISH. Estes resultados estão em concordância com os achados de outros autores (Braggio *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2011b) para todos os subgrupos citogenéticos mencionados, exceto para a t(4;14), que foi associada a um aumento da metilação de diversos genes no trabalho de Walker (2011). Este autor demonstrou também a presença de alterações relevantes na metilação na transição de MM para leucemia de plasmócitos, particularmente na metilação de genes envolvidos na sinalização e na adesão celulares. Pesquisámos ainda possíveis relações entre a presença dos marcadores imunofenotípicos CD27, CD28, CD56 e CD117 e o perfil de metilação dos oito genes analisados e, numa análise multivariada, não foram encontradas correlações envolvendo o perfil de metilação dos genes analisados e os marcadores imunofenotípicos mencionados. De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que investiga possíveis associações entre os referidos marcadores imunofenotípicos e o estado de metilação de genes supressores tumorais em discrasias de plasmócitos.

Finalmente, pesquisámos o impacto que o perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK*, *TRAIL-R1*, *-R2*, *-R3* e *-R4*, individualmente ou em combinação, apresenta no prognóstico dos doentes com MM. Com efeito, não encontramos diferenças estatisticamente significativas na resposta à terapêutica de primeira linha, na sobrevivência livre de progressão e na sobrevivência global, nos doentes com e

sem a presença de metilação anómala das regiões promotoras dos genes estudados. Em concordância com os nossos, encontram-se os resultados das investigações de Seidl (2004) para os genes *p15* e *p16*, de Galm (2004) para *p15* e *DAPK* e de Gonzalez-Paz (2007) para o *p16*, que não encontraram relação entre a metilação dos genes mencionados e o prognóstico. Em desacordo com estes dados, estão os trabalhos de Chim (2001) e de Braggio (2010), que evidenciaram que a metilação do gene *DAPK* se relacionou com uma sobrevivência global inferior, assim como os de Mateos (2001) e de Galm (2001) que também encontraram uma associação entre a metilação de *p16* e um prognóstico desfavorável. Relativamente à metilação dos genes dos recetores do TRAIL, não encontramos estudos publicados que tivessem feito esta análise, especificamente em doentes com MM. Contudo, de acordo com os nossos resultados, embora em doentes com glioblastoma, Vaitkienė (2013) descreve uma ausência de impacto da metilação de *TRAIL-R3* e Skiriute (2012) de *TRAIL-R1* no prognóstico destes doentes (Vaitkienė *et al.*, 2013; Skiriute *et al.*, 2012). Num outro estudo, Crieckinge (2013) descreveu uma sobrevivência livre de progressão inferior em doentes com carcinoma colorectal e metilação de *TRAIL-R3* (W. *et al.*, 2013).

Em resumo, a metilação anómala dos ilhéus CpG das regiões promotoras de alguns genes cruciais na regulação do ciclo celular, na apoptose e na supressão tumoral são eventos frequentes e precoces na imortalização dos plasmócitos, contribuindo para o desenvolvimento de GM. O que permanece controverso é a relevância da metilação anómala destes genes na evolução clonal de MGUS para MM, assim como a associação entre os eventos citogenéticos e epigenéticos no processo de mielomagénesese e o impacto prognóstico da metilação do DNA nos doentes com MM.

## **5.2. ESTUDOS EFETUADOS NA LINHA CELULAR DE MIELOMA MÚLTIPLO NCI-H929**

Os avanços terapêuticos ocorridos nas duas últimas décadas na abordagem do MM são inequívocos mas, como já previamente referido, insuficientes para a maioria dos doentes, que vêm a falecer na sequência de progressão do MM. Deste modo, a procura de fármacos com mecanismos de ação inovadores, assim como a combinação mais eficaz com agentes reconhecidamente ativos nesta patologia constituem desafios constantes para a comunidade científica.

O bortezomib, um inibidor do proteasoma de primeira geração, representa o tratamento de eleição para um elevado número de doentes com MM, quer como abordagem de primeira linha, quer no contexto de recidiva ou refractariedade. Contudo, o desenvolvimento de resistência a este fármaco constitui um importante obstáculo ao sucesso da terapêutica e tem conduzido à pesquisa de novas estratégias de tratamento.

No presente trabalho, investigámos numa linha celular de MM, as células NCI-H929, os efeitos citotóxicos de fármacos antineoplásicos, com diferentes mecanismos de ação e atuando em vias de sinalização relevantes para o MM, em monoterapia e em terapêutica de combinação com o bortezomib. Este fármaco está aprovado na terapêutica de doentes com MM, com eficácia amplamente demonstrada em inúmeros estudos e incluído em protocolos com diferentes combinações (Rosiñol *et al.*, 2012; San Miguel *et al.*, 2008b).

O mecanismo de ação do bortezomib subjacente à atividade antimieloma múltiplo é atualmente objeto de intenso estudo, com a inibição do proteasoma, a autofagia e a ativação da via de resposta às proteínas de stresse a desempenharem um papel crucial. Uma consequência da inibição do proteasoma relevante na fisiopatologia do MM é o bloqueio da atividade do NF- $\kappa$ B. Este bloqueio poderá parcialmente mediar a atividade do bortezomib no MM, uma vez que foram identificadas mutações ativadoras na via do NF- $\kappa$ B em cerca de 17% dos doentes com MM e em 41% das linhas celulares de mieloma humanas e parecem mediar o crescimento acelerado e a sobrevivência dos plasmócitos neoplásicos (Keats *et al.*, 2007a; Annunziata *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Contudo, cerca de 35 a 50% das taxas de resposta ao bortezomib não podem ser totalmente explicadas por anomalias na via do NF- $\kappa$ B, sugerindo que outros alvos moleculares específicos, ou aspetos farmacocinéticos particulares, inerentes a cada doente possam desempenhar também um papel crucial. Foi igualmente observado que a resistência à terapêutica com bortezomib se desenvolve com frequência em doentes inicialmente sensíveis e que as mutações nas subunidades do proteasoma (Oerlemans *et al.*, 2008) assim como a expressão de transportadores ABC possam ser apontados como mecanismos subjacentes. No entanto, os mecanismos envolvidos e que definem esta perda de resposta são largamente desconhecidos, bem como a forma de os ultrapassar.

Assim, a compreensão dos mecanismos que contribuem para a sensibilidade à inibição do proteasoma poderão, não apenas prever a resposta à terapêutica, mas permitir um uso mais dirigido dos inibidores do proteasoma, tornando possível a utilização de combinações de fármacos, racionalmente desenhados, com ações sinérgicas (Zhu *et al.*, 2011) que possam ressensibilizar as células tumorais à terapêutica antineoplásica.

Neste estudo, investigámos os efeitos do bortezomib em combinação com outros agentes, incluindo partenolide, everolimus, silibinina, ácido gambóxico, decitabina e tricostatina A.

O partenolide, uma lactona sesquiterpena, constitui um inibidor natural do NF- $\kappa$ B, que se encontra aberrantemente ativado em diversas neoplasias. A silibinina induz a apoptose dependente e independente das caspases, diminui a expressão de survivina e conduz à translocação nuclear de AIF (*apoptosis inhibitor factor*). O everolimus, um inibidor do mTOR (*mammalian target of rapamycin*) bloqueia a tradução de proteínas relacionadas com a proliferação e a sobrevivência celulares. O ácido gambóxico é uma xantona que inibe a proliferação e induz a apoptose das células neoplásicas, por inibição de proteínas antiapoptóticas, como a BCL-2 e a survivina e indução de P53, de BAX e de pró-caspase 3 (Wang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2004).

Estes fármacos apresentaram atividade antineoplásica em diversas neoplasias; contudo, a sua utilização no contexto do MM é escassamente conhecida. Assim, foi nosso objetivo investigar os efeitos citotóxicos e antiproliferativos destes fármacos, quer em monoterapia, quer em associação com o bortezomib, na linha celular NCI-H929, explorando a potencial atividade sinérgica anti-mieloma entre compostos com mecanismos de acção complementares ou distintos.

Os nossos resultados mostraram que o everolimus, o partenolide, a silibinina e o ácido gambóxico induzem uma redução significativa na viabilidade das células H929, dependente da dose e do tempo. Com efeito, após 72 horas de tratamento das células, o IC<sub>50</sub> foi de 17,5  $\mu$ M para o everolimus, 150  $\mu$ M para a silibinina, 12,5  $\mu$ M para o partenolide e 150 nM para o ácido gambóxico. Observámos, ainda, que cada um destes compostos aumentava de forma variável o efeito citotóxico do bortezomib, quando combinado com baixas doses deste fármaco. No entanto, apenas o partenolide conduziu a um aumento significativo do efeito citotóxico do bortezomib ( $p < 0,01$ ). Por outro lado, os nossos resultados demonstram que estes fármacos induzem morte celular preferencialmente por apoptose, como evidenciado pelos estudos morfológicos e por citometria de fluxo.

Todos estes agentes induziram morte celular por apoptose, que poderá ter sido mediada pelo aumento observado na expressão de caspases ativadas. Para além do efeito citotóxico, o everolimus evidenciou também um efeito antiproliferativo, induzindo o bloqueio G0/G1 na linha celular de MM estudada.

Os efeitos citotóxicos do partenolide já foram previamente demonstrados noutras linhas celulares e em xenotransplantes, nomeadamente de neoplasia da mama (D'Anneo *et al.*, 2013). Da mesma forma que outros produtos naturais com propriedades antineoplásicas, o partenolide pode também afetar a progressão ao longo do ciclo celular e conduzir à apoptose, bloqueando as células na fase G2/M

(Kim *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Negrin *et al.*, 2010; Rozenblat *et al.*, 2008) ou, por outro lado, bloqueando as células na fase G1/S (Cho *et al.*, 2004). A ativação da P53 e a subsequente inativação da proteína 2 do controlo da divisão celular (CDK1) estão implicados no bloqueio G2/M, enquanto o bloqueio G1/S envolve a modulação de cinases dependentes da ciclina e dos seus ativadores, as ciclinas. Como referido, as neoplasias humanas caracterizam-se frequentemente pela inativação do gene supressor tumoral *p53*. O partenolide ativa a P53, promovendo a ubiquitinação e a degradação do seu regulador negativo (Gopal *et al.*, 2009).

No caso dos inibidores mTOR, foram publicados diversos estudos que mostraram atividade antitumoral destes agentes em neoplasias da próstata (Templeton *et al.*, 2013), mama (Zagouri *et al.*, 2012), pâncreas (Yim, 2012) e gástricas (Doi *et al.*, 2010). O everolimus foi formalmente aprovado em 2009 nos Estados Unidos da América para o tratamento do carcinoma de células renais avançado (Lu *et al.*, 2013). Lu e colaboradores avaliaram o efeito do everolimus em duas linhas celulares de MM, as células MM1.S e RPMI8226, e descreveram um efeito antiproliferativo mínimo deste fármaco (Lu *et al.*, 2013). Contudo, as doses utilizadas por estes autores foram de 1000 nM, inferiores às utilizadas na presente investigação, na qual o IC<sub>50</sub> foi atingido às 48 horas para a dose de 20 µM e às 24 horas na dose de 25 µM.

A silibinina é uma flavanona derivada da planta *Silybum marianum* e apresenta propriedades antineoplásicas, através dos seus efeitos antiproliferativos e antiangiogénicos potentes (diminui a secreção de VEGF e a formação de capilares *in vitro*) em diversas linhas celulares humanas de neoplasias do cólon (Yang *et al.*, 2003b), pulmão (Cufí *et al.*, 2013), bexiga (Zeng *et al.*, 2011) e próstata (Mora *et al.*, 2002).

Os nossos resultados revelaram que a silibinina induz um efeito citotóxico significativo, desencadeando a morte em cerca de 70% das células H929, após 72 horas de tratamento, de uma forma dependente da dose e do tempo. Verificámos que este efeito citotóxico se acompanha de um aumento da percentagem de células em apoptose ( $p < 0,01$ ), o que poderá estar relacionado com o aumento da expressão de caspases ativadas ( $p < 0,05$ ), como demonstram os nossos estudos de citometria de fluxo. Por outro lado, este fármaco não parece ter um efeito citostático, uma vez que não observámos um bloqueio significativo do ciclo celular.

Outros autores observaram citotoxicidade importante com a silibinina em células humanas de carcinoma da próstata (Agarwal *et al.*, 2007), mama, pele, cólon, pulmão, rim e bexiga (Zeng *et al.*, 2011). Ge e colaboradores (2011) demonstraram que a silibinina induz morte celular por apoptose e por bloqueio do ciclo celular em linhas celulares humanas de carcinoma do pâncreas. As doses de silibinina usadas foram idênticas às do nosso trabalho e com resultados sobreponíveis no



que respeita à citotoxicidade e à ativação das caspases (Ge *et al.*, 2011). Estes autores observaram ainda uma redução das células em fase S e um bloqueio do ciclo celular em G1 em apenas uma das três linhas celulares avaliadas (as células AsPC-1), sem efeitos evidenciados no ciclo celular nas outras duas linhas de células humanas de carcinoma do pâncreas (as células BxPC-3 e Panc-1), em concordância com os nossos resultados, uma vez que não verificámos efeitos significativos deste fármaco a nível do ciclo celular, nas células NCI-H929 (Ge *et al.*, 2011). Estes dados evidenciam alguma seletividade e especificidade da silibinina nas suas respostas biológicas em diferentes subtipos de células tumorais. De facto, foi previamente demonstrado que a silibinina induz os seus efeitos antineoplásicos através de mecanismos distintos em diferentes neoplasias (Zhang *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2009; Agarwal *et al.*, 2007). No nosso trabalho, a combinação da silibinina com o bortezomib não conduz a uma ativação significativa das caspases. Agarwal e colaboradores (2003) já tinham observado na linha celular de carcinoma do cólon humano HT-29 que a silibinina induz a expressão de inibidores das cinases dependentes das ciclinas e causa apoptose independente da ativação das caspases (Agarwal *et al.*, 2003).

O ácido gambógico é uma xantona derivada da resina de *Garcinia hanburryi*, uma planta que cresce, maioritariamente no sul da China, Cambodja, Vietname e Tailândia (Zhu *et al.*, 2009). Diversos estudos demonstraram que o ácido gambógico apresenta atividade antitumoral, inibindo o crescimento de múltiplos subtipos celulares tumorais *in vitro* e *in vivo*. Estudos prévios demonstraram que o ácido gambógico suprime o crescimento de células tumorais de diversas neoplasias, como o carcinoma do pulmão de pequenas células (Zhu *et al.*, 2009), o carcinoma hepatocelular (Mu *et al.*, 2010), o carcinoma da mama (Gu *et al.*, 2009), o melanoma (Wang *et al.*, 2009), o carcinoma gástrico (Wang *et al.*, 2009) e a leucemia mieloide crónica (Li *et al.*, 2009b; Shi *et al.*, 2014). Foi recentemente descrito que o proteasoma poderia constituir um alvo molecular específico do ácido gambógico e que, em doses terapêuticas, este composto poderia exercer os seus efeitos antitumorais através, entre outros, da inibição do proteasoma (Li *et al.*, 2013).

O ácido gambógico foi utilizado em doses compreendidas entre 50 e 1000 nM, atingindo-se o IC<sub>50</sub> às 48 horas, com a dose de 500 nM, tendo-se observado uma redução da viabilidade celular para valores inferiores a 20% às 72 horas, nas doses superiores ou iguais a 300nM. Os estudos de Zhang e colaboradores evidenciam que o IC<sub>50</sub> relativo à inibição da atividade do proteasoma (250 nM a 750 nM), está dentro da gama de concentrações necessárias para induzir citotoxicidade nas células tumorais (IC<sub>50</sub> de 500 a 1500 nM) (Zhang *et al.*, 2004). Os mesmos autores consideram que estes dados são indicadores que a inibição do proteasoma possa ser um pré-requisito para o bloqueio da proliferação e da morte celular indu-

zidas pelo ácido gambógico. Estudos mais recentes avaliaram os efeitos do ácido gambógico na linha celular de MM, NCI-H929, e observaram resultados idênticos aos nossos. Com efeito, doses inferiores a 1000 nM resultaram na inibição quase completa da viabilidade celular e na indução da morte das células H929 (Li *et al.*, 2013). Estes autores avaliaram ainda se o ácido gambógico seria um inibidor direto do proteasoma e verificaram que apenas doses de 10-50 µM apresentavam uma inibição parcial do proteasoma 20S (IC<sub>50</sub> 25 µM), demonstrando que o ácido gambógico não é um inibidor potente do proteasoma (Li *et al.*, 2013). Outros autores demonstraram que a angiogénese constitui também um alvo importante deste composto, o que se traduz num bloqueio da sinalização mediada pelo VEGF, um fator de crescimento importante para as células tumorais no MM, podendo contribuir para os efeitos antiproliferativos e citotóxicos observados com o ácido gambógico (Yi *et al.*, 2008).

Por outro lado, a associação do ácido gambógico (na dose de 50 nM) com o bortezomib (1 nM) não resultou num aumento do efeito citotóxico deste, comparativamente à sua utilização em monoterapia, provavelmente devido às reduzidas doses utilizadas, inferiores às que resultam num efeito citotóxico significativo (Zhang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2013).

Em resumo, quando associámos o everolimus, a silibinina e o ácido gambógico ao bortezomib, não observámos um aumento significativo na percentagem de células H929 em apoptose, comparativamente ao tratamento com bortezomib em monoterapia. Este facto deve-se, muito provavelmente, à utilização de doses reduzidas dos compostos associados, uma vez que os mesmos em monoterapia e em doses superiores apresentam um efeito citotóxico significativo. Contudo, a associação do partenolide (na dose de 5 µM) ao bortezomib (1 nM) conduziu a um efeito citotóxico sinérgico traduzido num aumento significativo da percentagem de células em apoptose (p=0,004).

A avaliação morfológica das células H929 tratadas com everolimus, partenolide, silibinina e ácido gambógico permitiu identificar, nos esfregaços, algumas características de células em apoptose inicial, como a presença de projeções citoplasmáticas (*blebbing*) e também alterações típicas de estádios mais avançados de morte celular por apoptose, nomeadamente a condensação da cromatina, a retração do volume celular e o aparecimento de corpos apoptóticos.

Por último, com o objetivo de analisarmos o efeito de compostos com mecanismos de ação inovadores na linha celular de MM, investigámos a atividade de dois moduladores epigenéticos, o inibidor da metiltransferase do DNA decitabina e o inibidor da desacetilase das histonas tricostatina A, em monoterapia, em associação com o bortezomib e em associação um com o outro. A decitabina induz a hipometi-

lação do DNA em genes específicos das células neoplásicas. Em particular, causa hipometilação da região promotora do gene da caspase 8, restaurando a apoptose nestas células (Gopisetty *et al.*, 2006).

No caso da decitabina, foram utilizadas doses compreendidas entre 1 e 50  $\mu\text{M}$ , não se tendo atingido o  $\text{IC}_{50}$  até às 72 horas, mesmo com doses fracionadas, administradas às 0, 24 e 48 horas. Apesar de se ter verificado uma redução significativa na viabilidade celular com doses reduzidas (1  $\mu\text{M}$ ) de decitabina ( $p=0,03$ ), não observámos um aumento relevante da apoptose, o que sugere que, em baixas doses, este fármaco desencadeia morte celular preferencialmente não apoptótica. Quando as células H929 foram tratadas com doses superiores (50  $\mu\text{M}$ ), verificou-se que a decitabina induzia morte celular por apoptose ( $p<0,05$ ). Vários autores referiram que os hipometilantes têm sobretudo um efeito desmetilante em baixas doses, sendo o efeito citotóxico evidenciado apenas para doses mais elevadas (Christman *et al.*, 1983; Christman, 2002; Raj & Mufti, 2006; Leone *et al.*, 2008).

A tricostatina A foi utilizada em doses que variaram entre 100 e 1000 nM e, tal como com a decitabina, não se atingiu o  $\text{IC}_{50}$  até às 72 horas, nem efeitos citotóxicos diferentes entre a administração em dose única às 0 horas ou em doses fracionadas às 0, 24 e 48 horas. Da mesma forma que no caso anterior, também a tricostatina A não potenciou o efeito do bortezomib mas, ao invés do observado com a decitabina, induziu morte celular por apoptose, mesmo em doses reduzidas (100 nM) ( $p<0,01$ ). A associação dos dois moduladores epigenéticos desencadeia apoptose numa percentagem significativamente superior de células comparativamente à decitabina em monoterapia mas não em comparação com a tricostatina A, sugerindo que o efeito antiapoptótico seja predominantemente mediado pela tricostatina A. O mesmo se verificou em relação à ativação das caspases, apenas desencadeada por doses mais elevadas de decitabina e, no caso da tricostatina A, este efeito foi observado mesmo com doses reduzidas. A nível do ciclo celular, os efeitos da decitabina em baixa dose foram limitados, como esperado. Relativamente à tricostatina A e à decitabina em doses mais elevadas, os seus efeitos antiproliferativos na linha celular em estudo traduziram-se num aumento do pico apoptótico, numa diminuição das células em fase S e num bloqueio em fase G0/G1 e G2/M. Em concordância com os nossos resultados, os estudos de Liu e colaboradores (2011) em células humanas de melanoma demonstraram que a decitabina exerce os seus efeitos antiproliferativos de uma forma dependente do tempo e da dose, predominantemente associados ao bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e à indução de diferenciação e não à apoptose (Liu *et al.*, 2011).

A associação dos dois moduladores epigenéticos já tinha sido avaliada em três linhas celulares de tumores endócrinos pancreáticos, tendo-se demonstrado um efeito sinérgico na inibição da proliferação destas células, maioritariamente devido

à morte celular por apoptose (Cecconi *et al.*, 2009). Tal como no nosso estudo, o tratamento combinado não aumentou significativamente o efeito citostático obtido com a tricostatina A, sugerindo que o mesmo seja devido maioritariamente a este modulador epigenético. Os mesmos autores verificaram ainda que o bloqueio no ciclo celular ocorreu em fases distintas nas diferentes linhas celulares estudadas (G0/G1 numa e G2/M nas outras duas linhas) (Cecconi *et al.*, 2009). Um outro estudo avaliou também os efeitos combinados da decitabina e da tricostatina A em linhas celulares de leucemia mieloblástica aguda e os autores verificaram um aumento da apoptose após a administração conjunta destes fármacos relativamente à decitabina em monoterapia mas não em relação à tricostatina A isolada. Por outro lado, demonstraram que a associação induzia a reexpressão de maior número de genes, alguns dos quais que programam a diferenciação celular, o que resulta na redução da sobrevivência das células leucémicas, comparativamente à monoterapia (Momparler *et al.*, 2014).

No nosso estudo, uma vez que a associação incluiu a decitabina com uma dose muito reduzida, com a qual não evidenciámos efeitos pró-apoptóticos, a sua associação com a tricostatina A foi sinérgica na indução da apoptose se a compararmos com a decitabina em monoterapia. Contudo, demonstrámos que as propriedades pró-apoptóticas da associação são devidas maioritariamente aos efeitos da tricostatina A. A ação demonstrada pela tricostatina A nas células H929 sugere outro mecanismo epigenético de silenciamento de genes já descrito em diversas linhas celulares, nomeadamente de leucemia mieloblástica aguda, que é a conversão da cromatina aberta numa configuração compacta por ação das HDAC. A sua importância é realçada pela interação da decitabina com HDACs para reativar genes supressores tumorais silenciados e inibir o crescimento de células leucémicas (Momparler *et al.*, 2014).

Os nossos resultados sugerem que compostos com diferentes mecanismos de ação, como o everolimus, a silibinina e o ácido gambóxico possam potenciar a atividade do bortezomib, ainda que apenas o partenolide tivesse resultado num aumento significativo do efeito citotóxico do bortezomib ( $p < 0,01$ ). Esta associação poderá contribuir para ultrapassar ou reduzir a probabilidade de resistências a este fármaco, podendo constituir uma nova estratégia terapêutica em doentes com MM.

## CONCLUSÃO

6

O mieloma múltiplo (MM) é uma patologia hemato-oncológica muito heterogênea e complexa, com inúmeros mecanismos envolvidos na sua etiopatogenia. Os eventos determinantes na transição do estado pré-maligno de MGUS para MM são amplamente desconhecidos, bem como a caracterização do clone maligno e da sua contraparte normal, no que respeita à expressão de moléculas relevantes em processos celulares fundamentais, como a apoptose, o ciclo e o crescimento celulares e de outras moléculas relevantes na resposta à terapêutica ou resultantes de interações com células do microambiente tumoral.

Neste trabalho, demonstramos que os plasmócitos fenotipicamente não neoplásicos dos doentes com GM apresentam características moleculares distintas, não apenas em relação aos plasmócitos neoplásicos destes doentes, mas também comparativamente aos plasmócitos dos controlos não neoplásicos, o que realça a sua eventual importância no processo de desenvolvimento das GM.

As diferenças observadas na expressão das moléculas avaliadas entre os plasmócitos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- foram significativas, quer nos doentes com MM, quer nos doentes com MGUS.

Assim, nos doentes com MM, verificámos que os plasmócitos CD138+/CD19+ apresentam um aumento da expressão de TRAIL-R3, TNF- $\alpha$ , P53 e NF- $\kappa$ B, assim como uma diminuição da expressão de VEGF quando comparados com os plasmócitos CD138+/CD19- ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, nos doentes com MGUS, observámos uma expressão aumentada de BCL-2, de TRAIL-R2, de FAS e diminuída de TRAIL-R3 e de VEGF nos plasmócitos com fenótipo não neoplásico relativamente aos plasmócitos neoplásicos ( $p < 0,05$ ).

Nos subgrupos de doentes com MGUS e com MM, observámos um aumento da expressão de glicoproteína P citoplasmática nos plasmócitos CD138+/CD19- relativamente aos CD138+/CD19+ ( $p < 0,05$ ). Estes dados confirmam a expressão

diferencial de proteínas relevantes na patogênese do MM e na resistência à terapêutica, entre plasmócitos tumorais e não tumorais, não apenas nos doentes com MM, mas também nos doentes com MGUS. O aumento da expressão de glicoproteína P citoplasmática, nos plasmócitos CD138+/CD19- relativamente aos que apresentam fenótipo não neoplásico evidencia a relevância desta proteína na resistência do clone maligno à terapêutica, que é frequentemente observada nos doentes com MM.

Os plasmócitos CD138+/CD19+ dos doentes com MGUS, MMI e MM apresentam níveis de expressão de NF- $\kappa$ B inferiores relativamente aos controlos ( $p < 0,05$ ), sem diferenças significativas entre os diversos subgrupos de GM. Por outro lado, observámos nos doentes com GM (MGUS, MMI e MM) níveis de expressão de NF- $\kappa$ B inferiores nos plasmócitos CD138+/CD19- relativamente aos plasmócitos CD138+/CD19+ ( $p < 0,05$ ) e aos controlos não neoplásicos ( $p < 0,01$ ). O facto de não terem sido observadas diferenças significativas neste fator de transcrição entre os doentes com GM, sugere que a expressão de NF- $\kappa$ B poderá ser um evento precoce na mielomagênese, não sendo particularmente relevante na progressão de MGUS para MM. No entanto, os níveis de expressão deste fator de transcrição parecem influenciar o prognóstico do MM e, deste modo, a sobrevivência dos doentes. Verificámos que os níveis de expressão de NF- $\kappa$ B superiores a 25 MIF e de FAS ligando iguais ou superiores a 20 MIF nos plasmócitos CD138+/CD19- se associam a um benefício na sobrevivência global dos doentes com MM ( $p = 0,022$ ). Estes resultados parecem estar relacionados com o efeito do NF- $\kappa$ B na expressão de FAS ligando, o que poderá contribuir para sensibilizar os plasmócitos tumorais à apoptose.

Nos plasmócitos CD138+/CD19+, a análise multivariada dos resultados do presente trabalho (regressão logística) identificou o aumento da expressão de TRAIL-R2 (superior a 29,5 MIF), de P53 (superior a 36,5 MIF), do recetor do VEGF (superior a 26,5 MIF), da MRP-1 membranar (superior a 29,5 MIF) e da gp-P citoplasmática (superior a 27,5 MIF), assim como a redução da expressão de ciclina D1 (inferior a 38,5 MIF), como marcadores com capacidade preditora independente de diagnóstico de GM.

Por outro lado, os plasmócitos com o fenótipo CD138+/CD19- dos doentes com GM apresentam, no geral, diminuição da expressão das moléculas pró-apoptóticas estudadas relativamente aos plasmócitos CD138+/CD19+, o que pode contribuir para a resistência à apoptose e consequente falência da terapêutica.

Quando comparada a expressão das moléculas analisadas neste trabalho, nos plasmócitos CD138+/CD19+ dos doentes com MM e com MGUS, verificámos que, nos doentes com MM, a diminuição da expressão da proteína TRAIL-R2 (inferior a 56,5 MIF), da survivina (inferior a 45,5 MIF), da razão entre as moléculas pró e antiapoptóticas



TRAIL-R1+R2/TRAIL-R3+R4 (inferior a 1,22), dos níveis de ciclina D1 (inferiores a 43,5 MIF) e da gp-P citoplasmática (inferior a 67,5 MIF), bem como o aumento da expressão da gp-P membranar (superior a 34,5 MIF) foram reconhecidas, em análise multivariada, como apresentando potencial discriminatório entre os doentes com estes dois subtipos de GM ( $p < 0,05$ ); nos plasmócitos CD138+/CD19-, apenas o TRAIL-R2 superior a 34,5 MIF e o VEGF superior a 23,5 MIF apresentaram esse potencial ( $p < 0,05$ ). Estes dados destacam a relevância da expressão destas moléculas nos plasmócitos com diferentes fenótipos na progressão de MGUS para MM, podendo constituir eventuais biomarcadores de progressão.

Quando avaliada a influência da expressão das moléculas em estudo na resposta à terapêutica com bortezomib em primeira linha, verificámos que os plasmócitos CD138+/CD19- dos doentes com resposta ao bortezomib apresentam níveis de expressão de NF- $\kappa$ B significativamente superiores relativamente ao observado nos doentes que não responderam a este fármaco ( $p = 0,032$ ). Nos plasmócitos CD138+/CD19+, não foi observada diferença na expressão de NF- $\kappa$ B entre os doentes com e sem resposta ao bortezomib. Além disso, os níveis de expressão de NF- $\kappa$ B superiores a 25 MIF nos plasmócitos CD138+/CD19- associam-se a uma sobrevivência global mais longa, enquanto os níveis de expressão do NF- $\kappa$ B nos plasmócitos CD138+/CD19+ não apresentaram impacto na sobrevivência. Estes resultados sugerem a relevância do nível de expressão de NF- $\kappa$ B em plasmócitos CD138+/CD19- como um potencial biomarcador de resposta ao bortezomib e/ou de prognóstico em doentes com MM. No entanto, estudos multicêntricos envolvendo mais doentes deverão ser realizados para confirmar estes dados.

A relação entre a expressão das moléculas em estudo e as características clinico-laboratoriais evidenciou que os doentes com MM com ISS I ao diagnóstico apresentam uma percentagem significativamente superior de plasmócitos com o fenótipo patológico a expressar FAS e inferior a expressar TRAIL-R2 comparativamente aos doentes num estágio mais avançado (ISS III) ( $p < 0,05$ ). Pelo contrário, nos plasmócitos CD138+/CD19+, observámos níveis de expressão de caspase 3 significativamente inferiores nos doentes com ISS I relativamente aos doentes com ISS II ou III ( $p < 0,05$ ).

Os doentes com a t(11;14) apresentaram níveis de expressão superiores de BCL-2 e de ciclina D1 nos plasmócitos CD138+/CD19-, enquanto os doentes com a t(14q32) apresentam níveis de expressão significativamente mais elevados de TRAIL-R2 e R3 e com anomalias do cromossoma 1 de TNF- $\alpha$  e de TRAIL-R3, comparativamente aos que não apresentam qualquer alteração citogenética. Estes dados demonstram que poderão existir interações entre a expressão das referidas moléculas e as características citogenéticas presentes ao diagnóstico, nos doentes com MM.



A avaliação do perfil de metilação mostrou que mais de 80% dos doentes com GM apresentam, pelo menos, um gene metilado e mais de 50%, pelo menos, dois genes metilados dos oito analisados (*p15*, *p16*, *p53*, *DAPK*, *TRAIL-R1*, *R2*, *R3* e *R4*). Os nossos estudos mostram que a metilação anómala dos ilhéus CpG das regiões promotoras de genes cruciais na regulação do ciclo celular, na apoptose e na supressão tumoral são eventos frequentes e precoces, importantes na imortalização dos plasmócitos, que conduzem ao desenvolvimento de GM, mas sem um papel demonstrado na sua progressão para MM. O gene do recetor antiapoptótico R3 do TRAIL (*TRAIL-R3* ou *TRAIL-DcR1*) é o que se encontra mais frequentemente metilado nos doentes com GM (61%). Não foram observadas diferenças relevantes entre os subgrupos de GM, o que sugere que a metilação anómala, apesar de ser um evento epigenético frequente nas GM, parece não ser determinante na progressão de MGUS para MM. Contudo, foi encontrada uma associação entre a presença de metilação anómala do gene do recetor R3 do TRAIL nos doentes com MM e uma maior probabilidade de recidiva ( $p < 0,05$ ), o que sugere uma eventual maior agressividade do clone tumoral. Contudo, este facto não se traduziu num impacto significativo nas sobrevivências global e livre de progressão. Relativamente aos outros genes estudados, não foi encontrada nenhuma associação entre a estado de metilação e a resposta à terapêutica, a sobrevivência livre de progressão ou a sobrevivência global, o que reforça a importância da metilação na fase inicial da doença e não na sua progressão.

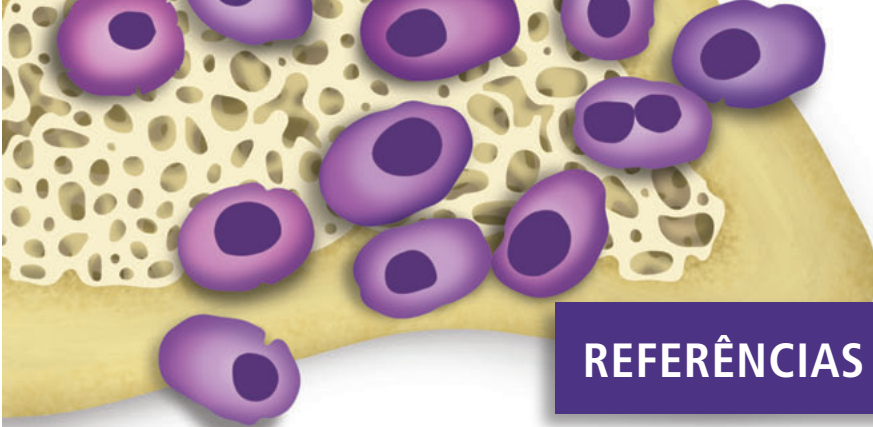
Os estudos *in vitro* para avaliação do potencial terapêutico de novos fármacos dirigidos a alguns dos alvos moleculares estudados, assim como dos seus mecanismos de ação mostram que o everolimus, o partenolide, a silibinina, o ácido gambógico, a tricostatina A e a decitabina em doses elevadas desencadeiam uma citotoxicidade significativa na linha celular humana de MM analisada (as células NCI-H929), de forma dependente da dose e do tempo, induzindo morte celular por apoptose, através de mecanismos dependentes das caspases. Os nossos resultados evidenciam ainda, para além do efeito citotóxico, um efeito antiproliferativo traduzido por um bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 e por uma diminuição significativa da percentagem de células NCI-H929 em fase S, após tratamento com everolimus, partenolide, tricostatina A e decitabina. Observámos, ainda, que dos compostos analisados, apenas o partenolide demonstrou um incremento significativo do efeito citotóxico do bortezomib, quando combinado com baixas doses deste fármaco, potenciando a sua atividade, o que poderá contribuir para ultrapassar ou reduzir a probabilidade de resistências a este fármaco e constituir novas estratégias terapêuticas em doentes com MM.

## DIREÇÕES FUTURAS

Os estudos desenvolvidos nesta Tese abrem perspectivas na etiopatogenia das GM, destacando a relevância dos plasmócitos com fenótipo não neoplásico e de alguns biomarcadores moleculares com potencial no diagnóstico, na progressão e no prognóstico de doentes com GM, bem como eventuais novos alvos terapêuticos. Contudo, para a validação dos nossos resultados, é necessário:

- Incluir mais doentes da amostra, alargando o estudo a outros centros, através de uma colaboração mais ativa com o Grupo Português de Mieloma Múltiplo (GPMM).
- Estudar doentes com MMRR e com MGUS em progressão para MMI e/ou para MM.
- Prosseguir o estudo da população de plasmócitos com fenótipo não neoplásico de forma a compreender-se melhor as interações que estabelece com as outras células do microambiente tumoral, a sua importância na evolução e no comportamento do próprio clone maligno, bem como a forma como este pode ser modulado pela sua contraparte normal, tal como o é por outras células do microambiente.
- Quantificar a metilação génica dos genes estudados e de outros com um papel relevante nos mecanismos etiopatogénicos das GM, como genes que codificam as ciclinas, a interleucina-6, o NF- $\kappa$ B, o I $\kappa$ B, entre outros.
- Avaliar o contributo de polimorfismos em genes que codificam as proteínas analisadas neste trabalho no risco de desenvolvimento e/ou de progressão de GM.
- Avaliar o efeito de novos fármacos com mecanismos de ação inovadores nas células dos doentes com MM, ao diagnóstico e na recidiva, em monoterapia e em associação com fármacos já utilizados na prática clínica, como inibidores do proteasoma (como o bortezomib e o carfilzomib) e fármacos imunomoduladores (como a lenalidomida e a pomalidomida).
- Estudar a eficácia terapêutica de novas combinações de fármacos avaliados neste trabalho, nomeadamente com imunomoduladores, analisar os seus mecanismos de ação e identificar o esquema de associação mais eficaz (doses e intervalo de administração).
- Realizar culturas celulares tridimensionais para avaliação da eficácia dos fármacos em estudo e para uma melhor aproximação ao modelo *in vivo*.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdi, J., Chen, G. & Chang, H. (2013a) Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms ABSTRACT: **4**.
- Abdi, J., Chen, G. & Chang, H. (2013b) Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms. *Oncotarget*, **4**, 2186–207 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3926819&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Abe, M., Hiura, K., Wilde, J., Shioyasono, A., Moriyama, K., Hashimoto, T., Kido, S., Oshima, T., Shibata, H., Ozaki, S., Inoue, D. & Matsumoto, T. (2004) Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: A vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion. *Blood*, **104**, 2484–2491.
- ADAMS, J. (2003) The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treatment Reviews*, **29**, 3–9.
- Adams, J. (2003) Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Drug Discovery Today*, **8**, 307–315.
- Adams, J. (2004) The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*, **5**, 417–421.
- Adams, J.M. & Cory, S. (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, **26**, 1324–1337.
- Agarwal, A. & Ghobrial, I.M. (2013) Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: a review of the current understanding of epidemiology, biology, risk stratification, and management of myeloma precursor disease. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **19**, 985–94 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3593941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 27, 2014].
- Agarwal, C., Singh, R.P., Dhanalakshmi, S., Tyagi, A.K., Tecklenburg, M., Sclafani, R.A. & Agarwal, R. (2003) Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. *Oncogene*, **22**, 8271–8282.
- Agarwal, C., Tyagi, A., Kaur, M. & Agarwal, R. (2007) Silibinin inhibits constitutive activation of Stat3, and causes caspase activation and apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells. *Carcinogenesis*, **28**, 1463–1470.
- Akiyama, M., Hideshima, T., Hayashi, T., Tai, Y.T., Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Chauhan, D., Richardson, P., Munshi, N.C. & Anderson, K.C. (2002) Cytokines modulate telomerase activity in a human

- multiple myeloma cell line. *Cancer Res*, **62**, 3876–3882 Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12097303](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12097303).
- Al-Nasiry, S., Hanssens, M., Luyten, C. & Pijnenborg, R. (2007) The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*, **22**, 1304–1309.
- Alao, J.P. (2007) The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Molecular cancer*, **6**, 24.
- Alas, S. & Bonavida, B. (2003) Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clinical Cancer Research*, **9**, 316–326.
- Alexander, D.D., Mink, P.J., Adami, H.O., Cole, P., Mandel, J.S., Oken, M.M. & Trichopoulos, D. (2007) Multiple myeloma: A review of the epidemiologic literature. *International Journal of Cancer*, **120**, 40–61.
- Allen, J.E. & El-Deiry, W.S. (2012) Regulation of the human TRAIL gene. *Cancer Biology and Therapy*, **13**, 1143–1151.
- Almeida, L.O., Custódio, A.C., Pinto, G.R., Santos, M.J., Almeida, J.R.W., Clara, C.A., Rey, J.A. & Casartelli, C. (2009) Polymorphisms and DNA methylation of gene TP53 associated with extra-axial brain tumors. *Genetics and molecular research: GMR*, **8**, 8–18.
- Amit-Vazina, M., Shishodia, S., Harris, D., Van, Q., Wang, M., Weber, D., Alexanian, R., Talpaz, M., Aggarwal, B.B. & Estrov, Z. (2005) Atiprimod blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in multiple myeloma cells. *British journal of cancer*, **93**, 70–80.
- An, G., Xu, Y., Shi, L., Zhong, S., Deng, S., Xie, Z., Sui, W., Zhan, F. & Qiu, L. (2014) Chromosome 1q21 gains confer inferior outcomes in multiple myeloma treated with bortezomib but copy number variation and percentage of plasma cells involved have no additional prognostic value. *Haematologica*, **99**, 353–359.
- Anargyrou, K., Dimopoulos, M.-A., Sezer, O. & Terpos, E. (2008) Novel anti-myeloma agents and angiogenesis. *Leukemia & lymphoma*, **49**, 677–689.
- Anderson, K., Lutz, C., van Delft, F.W., Bateman, C.M., Guo, Y., Colman, S.M., Kempinski, H., Moorman, A. V, Titley, I., Swansbury, J., Kearney, L., Enver, T. & Greaves, M. (2011) Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*, **469**, 356–361.
- Anderson, K.C. (2007) Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor-microenvironmental interactions. *Experimental Hematology*, **35**, 155–162.
- Anderson, K.C. & Carrasco, R.D. (2011) Pathogenesis of myeloma. *Annual review of pathology*, **6**, 249–274.
- Annunziata, C.M., Davis, R.E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., Dave, S., Hurt, E.M., Tan, B., Zhao, H., Stephens, O., Santra, M., Williams, D.R., Dang, L., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., *et al.* (2007) Frequent Engagement of the Classical and Alternative NF- $\kappa$ B Pathways by Diverse Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma. *Cancer Cell*, **12**, 115–130.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)*, **281**, 1305–1308.
- Ashkenazi, A., Holland, P. & Eckhardt, S.G. (2008) Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: The potential of recombinant human apoptosis ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *Journal of Clinical Oncology*, **26**, 3621–3630.
- Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I.L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokhi, Z. & Schwall, R.H. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *Journal of Clinical Investigation*, **104**, 155–162.
- Aubry, J.P., Blaecke, A., Lecoanet-Henchoz, S., Jeannin, P., Herbault, N., Caron, G., Moine, V. & Bonnefoy, J.Y. (1999) Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry*, **37**, 197–204.

- Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Leyvraz, S., Michallet, M., Yakoub-Agha, I., Garderet, L., Marit, G., Michaux, L., Voillat, L., Renaud, M., Grosbois, B., Guillermin, G., Benboubker, L., Monconduit, M., Thieblemont, C., Casassus, P., *et al.* (2007) Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: The experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*, **109**, 3489–3495.
- Avet-Loiseau, H., Facon, T., Grosbois, B., Magrangeas, F., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Minvielle, S. & Bataille, R. (2002) Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood*, **99**, 2185–2191.
- Avet-Loiseau, H., Gerson, F., Magrangeas, F., Minvielle, S., Harousseau, J.L. & Bataille, R. (2001) Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*, **98**, 3082–3086.
- Avet-Loiseau, H., Leleu, X., Roussel, M., Moreau, P., Guerin-Charbonnel, C., Caillot, D., Marit, G., Benboubker, L., Voillat, L., Mathiot, C., Kolb, B., Macro, M., Campion, L., Wetterwald, M., Stoppa, A.M., Hulin, C., Facon, T., Attal, M., Minvielle, S. & Harousseau, J.L. (2010) Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p). *Journal of Clinical Oncology*, **28**, 4630–4634.
- Avet-Loiseau, H., Li, J.Y., Godon, C., Morineau, N., Daviet, A., Harousseau, J.L., Facon, T. & Bataille, R. (1999) P53 deletion is not a frequent event in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, **106**, 717–719.
- Avet-Loiseau, H., Magrangeas, F., Moreau, P., Attal, M., Facon, T., Anderson, K., Harousseau, J.L., Munshi, N. & Minvielle, S. (2011a) Molecular heterogeneity of multiple myeloma: Pathogenesis, prognosis, and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 1893–1897.
- Avet-Loiseau, H., Malard, F., Campion, L., Magrangeas, F., Sebban, C., Lioure, B., Decaux, O., Lamy, T., Legros, L., Fuzibet, J.G., Michallet, M., Corront, B., Lenain, P., Hulin, C., Mathiot, C., Attal, M., Facon, T., Harousseau, J.L., Minvielle, S. & Moreau, P. (2011b) Translocation t(14;16) and multiple myeloma: Is it really an independent prognostic factor? *Blood*, **117**, 2009–2011.
- Bacolla, A., Pradhan, S., Larson, J.E., Roberts, R.J. & Wells, R.D. (2001) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. III. Allosteric control, reaction order, and influence of plasmid topology and triplet repeat length on methylation of the fragile X CGG.CCG sequence. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 18605–18613.
- Badrichani, A.Z., Stroka, D.M., Bilbao, G., Curiel, D.T., Bach, F.H. & Ferran, C. (1999) Bcl-2 and Bcl-X(L) serve an anti-inflammatory function in endothelial cells through inhibition of NF- $\kappa$ B. *Journal of Clinical Investigation*, **103**, 543–553.
- Badros, A., Burger, A.M., Philip, S., Niesvizky, R., Kolla, S.S., Goloubeva, O., Harris, C., Zwiebel, J., Wright, J.J., Espinoza-Delgado, I., Baer, M.R., Holleran, J.L., Egorin, M.J. & Grant, S. (2009) Phase I study of vorinostat in combination with bortezomib for relapsed and refractory multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, **15**, 5250–5257.
- Baggstrom, M.Q., Qi, Y., Koczywas, M., Argiris, A., Johnson, E.A., Millward, M.J., Murphy, S.C., Erlichman, C., Rudin, C.M. & Govindan, R. (2011) A Phase II Study of AT-101 (Gossypol) in Chemotherapy-Sensitive Recurrent Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, **6**, 1757–1760.
- Baguley, B.C. (2010) Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Molecular Biotechnology*, **46**, 308–316.
- Balasubramanian, K., Mirnikjoo, B. & Schroit, A.J. (2007) Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 18357–18364.
- Bang, S., Jeong, E.J., Kim, I.K., Jung, Y.K. & Kim, K.S. (2000) Fas- and tumor necrosis factor-mediated apoptosis uses the same binding surface of FADD to trigger signal transduction: A typical model for convergent signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 36217–36222.
- Bartek, J. & Lukas, J. (2011) DNA repair: Cyclin D1 multitasks. *Nature*, **474**, 171–172.
- Bartlett, J.M.S. & W. (2003) Extraction of DNA from Whole Blood.

- Bassères, D.S. & Baldwin, A.S. (2006) Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*, **25**, 6817–6830.
- Baud, V. & Karin, M. (2009a) Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature reviews. Drug discovery*, **8**, 33–40.
- Baud, V. & Karin, M. (2009b) Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature reviews. Drug discovery*, **8**, 33–40.
- Bavi, P., Prabhakaran, S.E., Abubaker, J., Qadri, Z., George, T., Al-Sanea, N., Abduljabbar, A., Ashari, L.H., Alhomoud, S., Al-Dayel, F., Hussain, A.R., Uddin, S. & Al-Kuraya, K.S. (2010) Prognostic significance of TRAIL death receptors in Middle Eastern colorectal carcinomas and their correlation to oncogenic KRAS alterations. *Molecular cancer*, **9**, 203.
- Baylin, S.B. (2008) Epigenetics and Cancer. In *The Molecular Basis of Cancer* pp 57–65.
- Baylin, S.B. & Jones, P.A. (2011) A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer*, **11**, 726–734.
- Beane Freeman, L.E., Rusiecki, J.A., Hoppin, J.A., Lubin, J.H., Koutros, S., Andreotti, G., Zahm, S.H., Hines, C.J., Coble, J.B., Barone-Adesi, F., Sloan, J., Sandler, D.P., Blair, A. & Alavanja, M.C.R. (2011) Atrazine and cancer incidence among pesticide applicators in the Agricultural Health Study (1994–2007). *Environmental Health Perspectives*, **119**, 1253–1259.
- Bech-Otschir, D., Helfrich, A., Enenkel, C., Consiglieri, G., Seeger, M., Holzhütter, H.-G., Dahlmann, B. & Kloetzel, P.-M. (2009) Polyubiquitin substrates allosterically activate their own degradation by the 26S proteasome. *Nature structural & molecular biology*, **16**, 219–225.
- Becker, N. (2011) Epidemiology of multiple myeloma. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*, **183**, 25–35.
- Ben-Neriah, Y. & Karin, M. (2011) Inflammation meets cancer, with NF-κB as the matchmaker. *Nature immunology*, **12**, 715–723.
- Bender, C.M., Pao, M.M. & Jones, P.A. (1998) Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer research*, **58**, 95–101.
- Berdeja, J., Savona, M., Mace, J.R., Hart, L., Essell, J., Owera, R., Arrowsmith, E. & Flinn, I. (2013) A Single-Arm, Open-Label, Multi-Center Phase III Study Of The Combination Of Panobinostat and Carfilzomib In Patients (pts) With Relapsed Or Relapse/Refractory Multiple Myeloma (MM). *Blood*, **122**, 1937– Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/122/21/1937.abstract?sid=62705b87-cb40-47a8-b825-d762c6f0845c>.
- Vanden Berghe, T., van Loo, G., Saelens, X., Van Gurp, M., Brouckaert, G., Kalai, M., Declercq, W. & Vandenabeele, P. (2004) Differential signaling to apoptotic and necrotic cell death by Fas-associated death domain protein FADD. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 7925–7933.
- Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., Zhan, F., Sawyer, J., Barlogie, B. & Shaughnessy, J. (2005) Cyclin D dysregulation: An early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*, **106**, 296–303.
- Bernas, T., Grégori, G., Asem, E.K. & Robinson, J.P. (2006) Integrating cytomics and proteomics. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, **5**, 2–13.
- Bharti, A.C., Donato, N. & Aggarwal, B.B. (2003) Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **171**, 3863–3871.
- Bharti, A.C., Shishodia, S., Reuben, J.M., Weber, D., Alexanian, R., Raj-Vadhan, S., Estrov, Z., Talpaz, M. & Aggarwal, B.B. (2004) Nuclear factor-κB and STAT3 are constitutively active in CD138 + cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. *Blood*, **103**, 3175–3184.
- Bianchi, G., Kyle, R.A., Larson, D.R., Witzig, T.E., Kumar, S., Dispenzieri, A., Morice, W.G. & Rajkumar, S. V (2012) High levels of peripheral blood circulating plasma cells as a specific risk factor for progression of smoldering multiple myeloma. *Leukemia*.
- Bjorklund, C.C., Baladandayuthapani, V., Lin, H.Y., Jones, R.J., Kuitatse, I., Wang, H., Yang, J., Shah, J.J., Thomas, S.K., Wang, M., Weber, D.M. & Orłowski, R.Z. (2014) Evidence of a role for CD44 and cell adhesion in mediating resistance to lenalidomide in multiple myeloma: therapeutic



- implications. *Leukemia*, **28**, 373–83 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3874423&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bloem, A. & Lockhorst, H. (1999) Bcl-2 antisense therapy in multiple myeloma. *Pathologie-biologie*, **47**, 216–220.
- Blombery, P.A., Wong, S.Q., Hewitt, C.A., Dobrovic, A., Maxwell, E.L., Juneja, S., Grigoriadis, G. & Westerman, D.A. (2012) Detection of BRAF mutations in patients with hairy cell leukemia and related lymphoproliferative disorders. *Haematologica*, **97**, 780–783.
- Boffetta, P., Stellman, S.D. & Garfinkel, L. (1989) A case-control study of multiple myeloma nested in the American Cancer Society prospective study. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **43**, 554–559.
- Bohnhorst, J., Rasmussen, T., Moen, S.H., Fløttum, M., Knudsen, L., Børset, M., Espevik, T. & Sundan, A. (2006) Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia*, **20**, 1138–1144.
- Bos, P.D., Zhang, X.H.-F., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R.R., Nguyen, D.X., Minn, A.J., van de Vijver, M.J., Gerald, W.L., Foekens, J.A. & Massagué, J. (2009) Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*, **459**, 1005–1009.
- Boumber, Y. & Issa, J.-P.J. (2011) Epigenetics in cancer: what's the future? *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, **25**, 220–226, 228.
- Boyd, K.D., Pawlyn, C., Morgan, G.J. & Davies, F.E. (2012) Understanding the molecular biology of myeloma and its therapeutic implications. *Expert review of hematology*, **5**, 603–17 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23216592>.
- Boyd, K.D., Ross, F.M., Walker, B.A., Wardell, C.P., Tapper, W.J., Chiecchio, L., Dagrada, G., Konn, Z.J., Gregory, W.M., Jackson, G.H., Child, J.A., Davies, F.E. & Morgan, G.J. (2011) Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies FAM46C at 1p12 and CDKN2C at 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clinical Cancer Research*, **17**, 7776–7784.
- Braggio, E., Maiolino, A., Gouveia, M.E., Magalhães, R., Souto Filho, J.T., Garnica, M., Nucci, M. & Renault, I.Z. (2010a) Methylation status of nine tumor suppressor genes in multiple myeloma. *International Journal of Hematology*, **91**, 87–96.
- Braggio, E., Maiolino, A., Gouveia, M.E., Magalhães, R., Souto Filho, J.T., Garnica, M., Nucci, M. & Renault, I.Z. (2010b) Methylation status of nine tumor suppressor genes in multiple myeloma. *International journal of hematology*, **91**, 87–96.
- Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A. & Henson, P.M. (1997) Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 26159–26165.
- Braun, T., Carvalho, G., Fabre, C., Grosjean, J., Fenaux, P. & Kroemer, G. (2006) Targeting NF-kappaB in hematologic malignancies. *Cell death and differentiation*, **13**, 748–758.
- Brito, J.L.R., Walker, B., Jenner, M., Dickens, N.J., Brown, N.J.M., Ross, F.M., Avramidou, A., Irving, J.A.E., Gonzalez, D., Davies, F.E. & Morgan, G.J. (2009) MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells. *Haematologica*, **94**, 78–86.
- Brown, L.M., Pottern, L.M., Silverman, D.T., Schoenberg, J.B., Schwartz, a G., Greenberg, R.S., Hayes, R.B., Liff, J.M., Swanson, G.M. & Hoover, R. (1997) Multiple myeloma among Blacks and Whites in the United States: role of cigarettes and alcoholic beverages. *Cancer causes & control*, **8**, 610–4 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9242477>.
- Brueckner, B., Kuck, D. & Lyko, F. (2007) DNA methyltransferase inhibitors for cancer therapy. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*, **13**, 17–22 Available at: [papers2://publication/doi/10.1097/PPO.0b013e31803c7245](http://papers2://publication/doi/10.1097/PPO.0b013e31803c7245).
- Buda, G., Maggini, V., Galimberti, S., Martino, A., Giuliani, N., Morabito, F., Genestreti, G., Iacopino, P., Rizzoli, V., Barale, R., Rossi, A.M. & Petrini, M. (2007) MDR1 polymorphism influences the outcome of multiple myeloma patients. *British Journal of Haematology*, **137**, 454–456.
- Calatozzolo, C., Gelati, M., Ciusani, E., Sciacca, F.L., Pollo, B., Cajola, L., Marras, C., Silvani, A., Vitellaro-Zuccarello, L., Croci, D., Boiardi, A. & Salmaggi, A. (2005) Expression of drug resistance

- proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 AND GST-?? in human glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, **74**, 113–121.
- Cancer Research UK (2012) CancerStats: Cancer Statistics for the UK. *Online Source*. [www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/](http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/).
- Candé, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N. & Kroemer, G. (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): A novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, **84**, 215–222.
- Carroll, R.G. & Martin, S.J. (2013) Autophagy in multiple myeloma: What makes you stronger can also kill you. *Cancer Cell*, **23**, 425–426.
- De Carvalho, F., Colleoni, G.W.B., Almeida, M.S.S., Carvalho, A.L. & Vettore, A.L. (2009) TGFbetaR2 aberrant methylation is a potential prognostic marker and therapeutic target in multiple myeloma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **125**, 1985–1991.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernández-Luna, J.L., Nuñez, G., Dalton, W.S. & Jove, R. (1999a) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, **10**, 105–115.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernández-Luna, J.L., Nuñez, G., Dalton, W.S. & Jove, R. (1999b) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, **10**, 105–115.
- Cecconi, D., Donadelli, M., Pozza, E.D., Rinalducci, S., Zolla, L., Scupoli, M.T., Righetti, P.G., Scarpa, A. & Palmieri, M. (2009) Synergistic effect of trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine on growth inhibition of pancreatic endocrine tumour cell lines: A proteomic study. *Proteomics*, **9**, 1952–1966.
- Cepedaa, V., Fuertesa, M.A., Castillac, J., Alonsoa, C., Quevedob, C., Sotoa, M. & Pérezb, J.M. (2006) Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors in Cancer Chemotherapy. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, **1**, 39–53.
- Cesana, C., Klersy, C., Barbarano, L., Nosari, A.M., Crugnola, M., Pungolino, E., Gargantini, L., Granata, S., Valentini, M. & Morra, E. (2002) Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **20**, 1625–1634.
- Chang, H., Jiang, A., Qi, C., Trieu, Y., Chen, C. & Reece, D. (2010a) Impact of genomic aberrations including chromosome 1 abnormalities on the outcome of patients with relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone. *Leukemia & lymphoma*, **51**, 2084–2091.
- Chang, H., Qi, C., Yi, Q.L., Reece, D. & Stewart, A.K. (2005) p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Blood*, **105**, 358–360 Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/105/1/358.full.pdf>.
- Chang, H., Qi, X., Jiang, A., Xu, W., Young, T. & Reece, D. (2010b) 1p21 deletions are strongly associated with 1q21 gains and are an independent adverse prognostic factor for the outcome of high-dose chemotherapy in patients with multiple myeloma. *Bone marrow transplantation*, **45**, 117–121.
- Chang, H., Sloan, S., Li, D., Zhuang, L., Yi, Q.L., Chen, C.I., Reece, D., Chun, K. & Keith Stewart, A. (2004) The t(4;14) is associated with poor prognosis in myeloma patients undergoing autologous stem cell transplant. *Br J Haematol*, **125**, 64–68 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15015970>.
- Chang, H., Yeung, J., Xu, W., Ning, Y. & Patterson, B. (2006) Significant increase of CKS1B amplification from monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma and plasma cell leukaemia as demonstrated by interphase fluorescence in situ hybridisation. *British Journal of Haematology*, **134**, 613–615.

- Chao, D.T. & Korsmeyer, S.J. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual review of immunology*, **16**, 395–419.
- Chapman, M.A., Lawrence, M.S., Keats, J.J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A.C., Harview, C.L., Brunet, J.-P., Ahmann, G.J., Adli, M., Anderson, K.C., Ardlie, K.G., Auclair, D., Baker, A., Bergsagel, P.L., Bernstein, B.E., Drier, Y., Fonseca, R., Gabriel, S.B., Hofmeister, C.C., *et al.* (2011) Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, **471**, 467–472.
- Chari, A., Mazumder, A. & Jagannath, S. (2010) Proteasome inhibition and its therapeutic potential in multiple myeloma. *Biologics: targets & therapy*, **4**, 273–287.
- Chaturvedi, M.M., Sung, B., Yadav, V.R., Kannappan, R. & Aggarwal, B.B. (2011) NF- $\kappa$ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene*, **30**, 1615–1630.
- Chau, B.N., Cheng, E.H., Kerr, D.A. & Hardwick, J.M. (2000) Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1. *Molecular cell*, **6**, 31–40.
- Chaudhary, P.M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J. & Hood, L. (1997) Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity*, **7**, 821–830.
- Chauhan, D., Hideshima, T. & Anderson, K.C. (2005) Proteasome inhibition in multiple myeloma: therapeutic implication. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **45**, 465–476.
- Chauhan, D., Tian, Z., Nicholson, B., Kumar, K.G.S., Zhou, B., Carrasco, R., McDermott, J.L., Leach, C.A., Fulciniti, M., Kodrasov, M.P., Weinstock, J., Kingsbury, W.D., Hideshima, T., Shah, P.K., Minvielle, S., Altun, M., Kessler, B.M., Orlowski, R., Richardson, P., Munshi, N., *et al.* (2012) A Small Molecule Inhibitor of Ubiquitin-Specific Protease-7 Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells and Overcomes Bortezomib Resistance. *Cancer Cell*, **22**, 345–358.
- Chauhan, D., Uchiyama, H., Akbarali, Y., Urashima, M., Yamamoto, K., Libermann, T.A. & Anderson, K.C. (1996) Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood*, **87**, 1104–1112.
- Chauhan, D., Velankar, M., Brahmandam, M., Hideshima, T., Podar, K., Richardson, P., Schlossman, R., Ghobrial, I., Raje, N., Munshi, N. & Anderson, K.C. (2007) A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma. *Oncogene*, **26**, 2374–2380.
- Chen, C.-C., Wang, K.-Y. & Shen, C.-K.J. (2012a) The Mammalian de Novo DNA Methyltransferases DNMT3A and DNMT3B Are Also DNA 5-Hydroxymethylcytosine Dehydroxymethylases. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 33116–33121.
- Chen, D.J. & Huerta, S. (2009) Smac mimetics as new cancer therapeutics. *Anti-cancer drugs*, **20**, 646–658.
- Chen, G.Q. & Lu, Y. (2011) Effector caspases and leukemia. *International Journal of Cell Biology*.
- Chen, M.H., Qi, C.X.Y., Saha, M.N. & Chang, H. (2012b) p53 nuclear expression correlates with hemizygous TP53 deletion and predicts an adverse outcome for patients with relapsed/refractory multiple myeloma treated with lenalidomide. *American Journal of Clinical Pathology*, **137**, 208–212.
- Chen, Q. & Ray, S. (2003) Role of Apo2L/TRAIL and Bcl-2-family proteins in apoptosis of multiple myeloma. *Leukemia & ...*, **44**, 1209–1214 Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/1042819031000068052> [Accessed May 18, 2014].
- Chen, X.P., He, S.Q., Wang, H.P., Zhao, Y.Z. & Zhang, W.G. (2003) Expression of TNF-related apoptosis-inducing Ligand receptors and antitumor tumor effects of TNF-related apoptosis-inducing Ligand in human hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, **9**, 2433–2440.
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J.P., Brauer, M.J., Kiefer, M.C., Barr, P.J. & Mountz, J.D. (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science (New York, N.Y.)*, **263**, 1759–1762.
- Chesi, M. & Bergsagel, P.L. (2013) Molecular pathogenesis of multiple myeloma: Basic and clinical updates. *International Journal of Hematology*, **97**, 313–323.
- Chesi, M., Brents, L.A., Ely, S.A., Bais, C., Robbiani, D.F., Mesri, E.A., Kuehl, W.M. & Bergsagel, P.L. (2001) Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood*, **97**, 729–736.

- Chesi, M., Nardini, E., Lim, R.S., Smith, K.D., Kuehl, W.M. & Bergsagel, P.L. (1998) The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood*, **92**, 3025–3034.
- Cheung, C.W.Y., Gibbons, N., Johnson, D.W. & Nicol, D.L. (2010) Silibinin—a promising new treatment for cancer. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, **10**, 186–195.
- Cheung, H.-H., Lee, T.-L., Rennert, O.M. & Chan, W.-Y. (2009) DNA methylation of cancer genome. *Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews*, **87**, 335–350.
- Chhanabhai, M., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Reed, J.C. & Gascoyne, R.D. (1997) Immunohistochemical analysis of interleukin-1beta-converting enzyme/Ced-3 family protease, CPP32/Yama/Caspase-3, in Hodgkin's disease. *Blood*, **90**, 2451–2455.
- Chiecchio, L., Dagrada, G.P., Ibrahim, A.H., Cabanas, E.D., Protheroe, R.K.M., Stockley, D.M., Orchard, K.H., Cross, N.C.P., Harrison, C.J. & Ross, F.M. (2009) Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica*, **94**, 1708–1713.
- Chim, C.-S., Liang, R., Fung, T.-K., Choi, C.-L. & Kwong, Y.-L. (2007a) Epigenetic dysregulation of the death-associated protein kinase/p14/HDM2/p53/Apaf-1 apoptosis pathway in multiple myeloma. *Journal of clinical pathology*, **60**, 664–669.
- Chim, C.-S., Liang, R., Leung, M.-H. & Kwong, Y.-L. (2007b) Aberrant gene methylation implicated in the progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Journal of clinical pathology*, **60**, 104–106.
- Chim, C.S., Pang, R., Fung, T.K., Choi, C.L. & Liang, R. (2007c) Epigenetic dysregulation of Wnt signaling pathway in multiple myeloma. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **21**, 2527–2536.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J. & Green, D.R. (2010) The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell*, **37**, 299–310.
- Chng, W.-J., Huang, G.F., Chung, T.H., Ng, S.B., Gonzalez-Paz, N., Troska-Price, T., Mulligan, G., Chesi, M., Bergsagel, P.L. & Fonseca, R. (2011) Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **25**, 1026–1035.
- Chng, W.J., Gonzalez-Paz, N., Price-Troska, T., Jacobus, S., Rajkumar, S. V, Oken, M.M., Kyle, R. a, Henderson, K.J., Van Wier, S., Greipp, P., Van Ness, B. & Fonseca, R. (2008) Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia*, **22**, 2280–4 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3864109&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 12, 2014].
- Chng, W.J., Kumar, S., VanWier, S., Ahmann, G., Price-Troska, T., Henderson, K., Chung, T.H., Kim, S., Mulligan, G., Bryant, B., Carpten, J., Gertz, M., Rajkumar, S.V., Lacy, M., Dispenzieri, A., Kyle, R., Greipp, P., Bergsagel, P.L. & Fonseca, R. (2007a) Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Research*, **67**, 2982–2989.
- Chng, W.J., Price-Troska, T., Gonzalez-Paz, N., Van Wier, S., Jacobus, S., Blood, E., Henderson, K., Oken, M., Van Ness, B., Greipp, P., Rajkumar, S. V & Fonseca, R. (2007b) Clinical significance of TP53 mutation in myeloma. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **21**, 582–584.
- Cho, J.Y., Kim, A.R., Jung, J.H., Chun, T., Rhee, M.H. & Yoo, E.S. (2004) Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. *European Journal of Pharmacology*, **492**, 85–94.
- Choi, C.-H. (2005) ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer cell international*, **5**, 30.
- Christman, J.K., Mendelsohn N., Herzog, D. & Schneiderman N. (1983) Effect of 5-azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Cancer Res*, Feb, **43**(2), 763–9.
- Christman, J.K. (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation; mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, vol.21, 5483-5495.
- Chuang, J.C. & Jones, P.A. (2007) Epigenetics and microRNAs. *Pediatric Research*, **61**.

- Cole, S.P.C. (2014) Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), a 'Multitasking' ATP-binding Cassette (ABC) Transporter. *The Journal of biological chemistry*, **289**, 30880–30888 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25281745>.
- Covelli, A. (1999) Modulation of multidrug resistance (MDR) in hematological malignancies. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, **10 Suppl 6**, 53–59.
- Crescenzi, E., Pacifico, F., Lavorgna, A., De Palma, R., D'Aiuto, E., Palumbo, G., Formisano, S. & Leonardi, A. (2011) NF- $\kappa$ B-dependent cytokine secretion controls Fas expression on chemotherapy-induced premature senescent tumor cells. *Oncogene*, **30**, 2707–2717.
- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J.J. & Smyth, M.J. (2002) Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **168**, 1356–1361.
- Cufi, S., Bonavia, R., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., Corominas-Faja, B., Cuyàs, E., Martin-Castillo, B., Barrajón-Catalán, E., Visa, J., Segura-Carretero, A., Joven, J., Bosch-Barrera, J., Micol, V. & Menendez, J. a (2013) Silibinin suppresses EMT-driven erlotinib resistance by reversing the high miR-21/low miR-200c signature in vivo. *Scientific reports*, **3**, 2459 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3748425&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cvek, B. & Dvorak, Z. (2008) The value of proteasome inhibition in cancer. Can the old drug, disulfiram, have a bright new future as a novel proteasome inhibitor? *Drug Discovery Today*, **13**, 716–722.
- Czekanska, E.M. (2011) Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **740**, 27–32.
- D'Anneo, A., Carlisi, D., Lauricella, M., Puleio, R., Martinez, R., Di Bella, S., Di Marco, P., Emanuele, S., Di Fiore, R., Guercio, A., Vento, R. & Tesoriere, G. (2013) Parthenolide generates reactive oxygen species and autophagy in MDA-MB231 cells. A soluble parthenolide analogue inhibits tumour growth and metastasis in a xenograft model of breast cancer. *Cell death & disease*, **4**, e891 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3920954&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dalton, W.S., Crowley, J.J., Salmon, S.S., Grogan, T.M., Laufman, L.R., Weiss, G.R. & Bonnet, J.D. (1995) A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma: A Southwest Oncology Group study. *Cancer*, **75**, 815–820.
- Dang, C. V. (2012) MYC on the path to cancer. *Cell*, **149**, 22–35.
- Daniels, R.A., Turley, H., Kimberley, F.C., Liu, X.S., Mongkolsapaya, J., Ch'En, P., Xu, X.N., Jin, B.Q., Pezzella, F. & Screaton, G.R. (2005) Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. *Cell research*, **15**, 430–438.
- Dankbar, B., Padró, T., Leo, R., Feldmann, B., Kropff, M., Mesters, R.M., Serve, H., Berdel, W.E. & Kienast, J. (2000) Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood*, **95**, 2630–2636.
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S.A., Zamzami, N. & Kroemer, G. (2000) Apoptosis-inducing factor (AIF): A ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Letters*, **476**, 118–123.
- Davenport, E.L., Moore, H.E., Dunlop, A.S., Sharp, S.Y., Workman, P., Morgan, G.J. & Davies, F.E. (2007) Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells. *Blood*, **110**, 2641–2649.
- Davies, F.E., Rollinson, S.J., Rawstron, A.C., Roman, E., Richards, S., Drayson, M., Child, J.A. & Morgan, G.J. (2000) High-producer haplotypes of tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha are associated with an increased risk of myeloma and have an improved progression-free survival after treatment. *Journal of Clinical Oncology*, **18**, 2843–2851.
- DeAngelo, D.J., Spencer, a, Bhalla, K.N., Prince, H.M., Fischer, T., Kindler, T., Giles, F.J., Scott, J.W., Parker, K., Liu, a, Woo, M., Atadja, P., Mishra, K.K. & Ottmann, O.G. (2013) Phase Ia/II, two-arm,



open-label, dose-escalation study of oral panobinostat administered via two dosing schedules in patients with advanced hematologic malignancies. *Leukemia*, **27**, 1628–36 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23385375>.

- Deaton, A.M. & Bird, A. (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, **25**, 1010–1022.
- Decaux, O., Lodé, L., Magrangeas, F., Charbonnel, C., Gouraud, W., Jézéquel, P., Attal, M., Harousseau, J.-L., Moreau, P., Bataille, R., Campion, L., Avet-Loiseau, H. & Minvielle, S. (2008) Prediction of survival in multiple myeloma based on gene expression profiles reveals cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients: a study of the Intergroupe Francophone du Myélom. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **26**, 4798–805 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18591550> [Accessed September 16, 2014].
- Demchenko, Y.N., Glebov, O.K., Zingone, A., Keats, J.J., Bergsagel, P.L. & Kuehl, W.M. (2010) Classical and/or alternative NF-kappaB pathway activation in multiple myeloma. *Blood*, **115**, 3541–3552.
- Demchenko, Y.N. & Kuehl, W.M. (2010) A critical role for the NFkB pathway in multiple myeloma. *Oncotarget*, **1**, 59–68.
- Derenne, S., Monia, B., Dean, N.M., Taylor, J.K., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Bataille, R. & Amiot, M. (2002) Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-xL is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood*, **100**, 194–199.
- Deveraux, Q.L. & Reed, J.C. (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes & development*, **13**, 239–252.
- Dib, A., Gabrea, A., Glebov, O.K., Bergsagel, P.L. & Kuehl, W.M. (2008) Characterization of MYC translocations in multiple myeloma cell lines. In *Journal of the National Cancer Institute - Monographs*, 25–31.
- Dimberg, L.Y., Anderson, C.K., Camidge, R., Behbakht, K., Thorburn, A. & Ford, H.L. (2012) On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene*.
- Dimopoulos, M., Siegel, D.S., Lonial, S., Qi, J., Hajek, R., Facon, T., Rosinol, L., Williams, C., Blacklock, H., Goldschmidt, H., Hungria, V., Spencer, A., Palumbo, A., Graef, T., Eid, J.E., Houp, J., Sun, L., Vuocolo, S. & Anderson, K.C. (2013) Vorinostat or placebo in combination with bortezomib in patients with multiple myeloma (VANTAGE 088): A multicentre, randomised, double-blind study. *The Lancet Oncology*, **14**, 1129–1140.
- Dimopoulos, M.A., San-Miguel, J.F. & Anderson, K.C. (2011) Emerging therapies for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. *European Journal of Haematology*, **86**, 1–15.
- Dingli, D., Kyle, R.A., Rajkumar, S.V., Nowakowski, G.S., Larson, D.R., Bida, J.P., Gertz, M.A., Therneau, T.M., Melton, L.J., Dispenzieri, A. & Katzmann, J.A. (2006) Immunoglobulin free light chains and solitary plasmacytoma of bone. *Blood*, **108**, 1979–1983.
- Dispenzieri, A., Kyle, R., Merlini, G., Miguel, J.S., Ludwig, H., Hajek, R., Palumbo, A., Jagannath, S., Blade, J., Lonial, S., Dimopoulos, M., Comenzo, R., Einsele, H., Barlogie, B., Anderson, K., Gertz, M., Harousseau, J.L., Attal, M., Tosi, P., Sonneveld, P., *et al.* (2009) International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **23**, 215–224.
- Doi, T., Muro, K., Boku, N., Yamada, Y., Nishina, T., Takiuchi, H., Komatsu, Y., Hamamoto, Y., Ohno, N., Fujita, Y., Robson, M. & Ohtsu, A. (2010) Multicenter phase II study of everolimus in patients with previously treated metastatic gastric cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28**, 1904–10 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20231677>.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J. & Matias-Guiu, X. (2005a) NF-κB in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv*, **446**, 475–482.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J. & Matias-Guiu, X. (2005b) NF-κB in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, **446**, 475–482.

- Van de Donk, N.W.C.J., Kamphuis, M.M.J., van Dijk, M., Borst, H.P.E., Bloem, A.C. & Lokhorst, H.M. (2003) Chemosensitization of myeloma plasma cells by an antisense-mediated downregulation of Bcl-2 protein. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **17**, 211–219.
- Van de Donk, N.W.C.J., Lokhorst, H.M. & Bloem, A.C. (2005) Growth factors and antiapoptotic signaling pathways in multiple myeloma. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **19**, 2177–2185.
- Van de Donk, N.W.C.J., de Weerd, O., Veth, G., Eurelings, M., van Stralen, E., Frankel, S.R., Hagenbeek, A., Bloem, A.C. & Lokhorst, H.M. (2004) G3139, a Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotide, induces clinical responses in VAD refractory myeloma.
- Drach, J., Ackermann, J., Fritz, E., Krömer, E., Schuster, R., Gisslinger, H., DeSantis, M., Zojer, N., Fiegl, M., Roka, S., Schuster, J., Heinz, R., Ludwig, H. & Huber, H. (1998) Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood*, **92**, 802–809.
- Drayson, M., Tang, L.X., Drew, R., Mead, G.P., Carr-Smith, H. & Bradwell, A.R. (2001) Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood*, **97**, 2900–2902.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**, 33–42.
- Du, H.-L., Ren, L.-M., Chen, H., Zhu, Y. & Qi, Y. (2002) Re-expression of p16 gene in the myeloma cell line U266 induced by synergy of sodium butyrate and 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Di 1 jun yi da xue xue bao = Academic journal of the first medical college of PLA*, **22**, 981–984.
- Edwards, C.M., Zhuang, J. & Mundy, G.R. (2008) The pathogenesis of the bone disease of multiple myeloma. *Bone*, **42**, 1007–1013.
- Egan, J.B., Shi, C.X., Tembe, W., Christoforides, A., Kurdoglu, A., Sinari, S., Middha, S., Asmann, Y., Schmidt, J., Braggio, E., Keats, J.J., Fonseca, R., Bergsagel, P.L., Craig, D.W., Carpten, J.D. & Stewart, A.K. (2012) Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*, **120**, 1060–1066.
- Egle, A., Villunger, A., Marschitz, I., Kos, M., Hittmair, A., Lukas, P., Grünewald, K. & Greil, R. (1997) Expression of Apo-1/Fas (CD95), Bcl-2, Bax and Bcl-x in myeloma cell lines: relationship between responsiveness to anti-Fas mab and p53 functional status. *British journal of haematology*, **97**, 418–428.
- Eiðmann, M., Melzer, I.M., Fernández, S.B.M., Michel, G., Hrabě de Angelis, M., Hoefler, G., Finkenwirth, P., Jauch, A., Schoell, B., Grez, M., Schmidt, M., Bartholomae, C.C., Newrzela, S., Haetscher, N., Rieger, M.A., Zachskorn, C., Mittelbronn, M. & Zörnig, M. (2012) Overexpression of the anti-apoptotic protein AVEN contributes to increased malignancy in hematopoietic neoplasms. *Oncogene*.
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, **35**, 495–516.
- Elnemr, A., Ohta, T., Yachie, A., Kayahara, M., Kitagawa, H., Ninomiya, I., Fushida, S., Fujimura, T., Nishimura, G., Shimizu, K. & Miwa, K. (2001) Human pancreatic cancer cells express non-functional Fas receptors and counterattack lymphocytes by expressing Fas ligand; a potential mechanism for immune escape. *International journal of oncology*, **18**, 33–39.
- Elnenaï, M.O., Gruszka-Westwood, A.M., A'Hern, R., Matutes, E., Sirohi, B., Powles, R. & Catovsky, D. (2003) Gene abnormalities in multiple myeloma; the relevance of TP53, MDM2, and CDKN2A. *Haematologica*, **88**, 529–537.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**, 43–50.
- Engelhardt, M., Terpos, E., Kleber, M., Gay, F., Wäsch, R., Morgan, G., ... Palumbo, A. (2014). European myeloma network recommendations on the evaluation and treatment of newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Haematologica*, *99*(2), 232–242. <http://doi.org/10.3324/haematol.2013.099358>.



- Epstein, J., Xiao, H.Q. & Oba, B.K. (1989) P-glycoprotein expression in plasma-cell myeloma is associated with resistance to VAD. *Blood*, **74**, 913–917.
- Esteller, M. (2008) Epigenetics in evolution and disease. *The Lancet*, **372**, S90–S96.
- Esteller, M. (2008) Epigenetics in cancer. *The New England journal of medicine*, **358**, 1148–59 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337604>.
- Esteller, M. (2011) Epigenetic changes in cancer. *F1000 biology reports*, **3**, 9.
- Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer research*, **61**, 3225–3229.
- Esteller, M., Hamilton, S.R., Burger, P.C., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (1999) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer research*, **59**, 793–797.
- Evans, S.C. & Lozano, G. (1997) The Li-Fraumeni syndrome: An inherited susceptibility to cancer. *Molecular Medicine Today*, **3**, 390–395.
- Fabbri, M. & Calin, G.A. (2010) Epigenetics and miRNAs in Human Cancer.
- Fabre, C., Mimura, N., Bobb, K., Kong, S.Y., Gorgun, G., Cirstea, D., Hu, Y., Minami, J., Ohguchi, H., Zhang, J., Meshulam, J., Carrasco, R.D., Tai, Y.T., Richardson, P.G., Hideshima, T. & Anderson, K.C. (2012) Dual inhibition of canonical and noncanonical NF- $\kappa$ B pathways demonstrates significant antitumor activities in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, **18**, 4669–4681.
- Fadok, V.A., de Cathelineau A, Daleke, D.L., Henson, P.M. & Bratton, D.L. (2001) Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 1071–1077.
- Fandy, T.E. (2009) Development of DNA methyltransferase inhibitors for the treatment of neoplastic diseases. *Current medicinal chemistry*, **16**, 2075–2085.
- Farnebo, M., Bykov, V.J.N. & Wiman, K.G. (2010) The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, **396**, 85–89.
- Feinman, R., Koury, J., Thames, M., Barlogie, B., Epstein, J. & Siegel, D.S. (1999) Role of NF-kappaB in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by bcl-2. *Blood*, **93**, 3044–3052.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D. & Bray, F. (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, **49**, 1374–1403.
- Fesus, L., Madi, A., Balajthy, Z., Nemes, Z. & Szondy, Z. (1996) Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways. *Experientia*, **52**, 942–949.
- Filella, X., Blade, J., Guillermo, A.L., Molina, R., Rozman, C. & Ballesta, A.M. (1996) Cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1alpha) and soluble interleukin-2 receptor as serum tumor markers in multiple myeloma. *Cancer detection and prevention*, **20**, 52–56.
- Fischle, W., Wang, Y. & Allis, C.D. (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Current Opinion in Cell Biology*, **15**, 172–183.
- Flanagan, L., Sebastià, J., Tuffy, L.P., Spring, A., Lichawska, A., Devocelle, M., Prehn, J.H.M. & Rehm, M. (2010) XIAP impairs Smac release from the mitochondria during apoptosis. *Cell death & disease*, **1**, e49.
- Fonseca, R., Bailey, R.J., Ahmann, G.J., Rajkumar, S. V, Hoyer, J.D., Lust, J.A., Kyle, R.A., Gertz, M.A., Greipp, P.R. & Dewald, G.W. (2002) Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, **100**, 1417–1424 Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/reprint/100/4/1417.pdf>.
- Fonseca, R., Barlogie, B., Bataille, R., Bastard, C., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Davies, F.E., Drach, J., Greipp, P.R., Kirsch, I.R., Kuehl, W.M., Hernandez, J.M., Minvielle, S., Pilarski, L.M., Shaughnessy, J.D., Stewart, A.K. & Avet-Loiseau, H. (2004) Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report. In *Cancer Research* pp 1546–1558.

- Fonseca, R., Bergsagel, P.L., Drach, J., Shaughnessy, J., Gutierrez, N., Stewart, A.K., Morgan, G., Van Ness, B., Chesi, M., Minvielle, S., Neri, A., Barlogie, B., Kuehl, W.M., Liebisch, P., Davies, F., Chen-Kiang, S., Durie, B.G.M., Carrasco, R., Sezer, O., Reiman, T., et al. (2009) International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **23**, 2210–2221.
- Fonseca, R., Blood, E., Rue, M., Harrington, D., Oken, M.M., Kyle, R.A., Dewald, G.W., Van Ness, B., Van Wier, S.A., Henderson, K.J., Bailey, R.J. & Greipp, P.R. (2003) Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*, **101**, 4569–4575.
- Fonseca, R., Van Wier, S.A., Chng, W.J., Ketterling, R., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Bergsagel, P.L., Rajkumar, S. V, Greipp, P.R., Litzow, M.R., Price-Troska, T., Henderson, K.J., Ahmann, G.J. & Gertz, M.A. (2006) Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **20**, 2034–2040.
- Franklin, D.J., Brussaard, C.P.D. & Berges, J. a. (2006) What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology? *European Journal of Phycology*, **41**, 1–14 Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670260500505433> [Accessed May 7, 2014].
- Frassanito, M.A., Cusmai, A., Iodice, G. & Dammacco, F. (2001) Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: Relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood*, **97**, 483–489.
- Friedman, G.D. & Herrinton, L.J. (1994) Obesity and multiple myeloma. *Cancer Causes and Control*, **5**, 479–483.
- Frost, P., Moatamed, F., Hoang, B., Shi, Y., Gera, J., Yan, H., Frost, P., Gibbons, J. & Lichtenstein, A. (2004) In vivo antitumor effects of the mTOR inhibitor CCI-779 against human multiple myeloma cells in a xenograft model. *Blood*, **104**, 4181–4187.
- Fu, D. (2013) Where is it and How Does it Get There - Intracellular Localization and Traffic of P-glycoprotein. *Frontiers in oncology*, **3**, 321 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3874554&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Fu, D. & Arias, I.M. (2012) Intracellular trafficking of P-glycoprotein. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **44**, 461–464 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.009>.
- Fujikawa, K., Shiraki, K., Sugimoto, K., Ito, T., Yamanaka, T., Takase, K. & Nakano, T. (2000) Reduced expression of ICE/caspase1 and CPP32/caspase3 in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Research*, **20**, 1927–1932.
- Fuks, F. (2005) DNA methylation and histone modifications: Teaming up to silence genes. *Current Opinion in Genetics and Development*, **15**, 490–495.
- Fulciniti, M., Hideshima, T., Vermot-Desroches, C., Pozzi, S., Nanjappa, P., Shen, Z., Patel, N., Smith, E.S., Wang, W., Prabhala, R., Tai, Y.T., Tassone, P., Anderson, K.C. & Munshi, N.C. (2009) A high-affinity fully human anti-IL-6 mAb, 1339, for the treatment of multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, **15**, 7144–7152.
- Gabrea, A., Martelli, M.L., Qi, Y., Roschke, A., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., Sawyer, J.R. & Kuehl, W.M. (2008) Secondary genomic rearrangements involving immunoglobulin or MYC loci show similar prevalences in hyperdiploid and nonhyperdiploid myeloma tumors. *Genes Chromosomes and Cancer*, **47**, 573–590.
- Galli, M., Salmoiraghi, S., Golay, J., Gozzini, A., Crippa, C., Pescosta, N. & Rambaldi, A. (2010) A phase II multiple dose clinical trial of histone deacetylase inhibitor ITF2357 in patients with relapsed or progressive multiple myeloma. *Annals of Hematology*, **89**, 185–190.
- Gallmeier, E., Bader, D.C., Kriegl, L., Berezowska, S., Seeliger, H., Göke, B., Kirchner, T., Bruns, C. & de Toni, E.N. (2013) Loss of TRAIL-Receptors Is a Recurrent Feature in Pancreatic Cancer and Determines the Prognosis of Patients with No Nodal Metastasis after Surgery. *PLoS ONE*, **8**.
- Galm, O., Wilop, S., Reichelt, J., Jost, E., Gehbauer, G., Herman, J.G. & Osieka, R. (2004) DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **18**, 1687–1692.

- Gao, Z., Tian, Y., Wang, J., Yin, Q., Wu, H., Li, Y.-M. & Jiang, X. (2007) A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 30718–30727.
- García-Piñeres, A.J., Castro, V., Mora, G., Schmidt, T.J., Strunck, E., Pahl, H.L. & Merfort, I. (2001) Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 39713–39720.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didot, C. & Kroemer, G. (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell death and differentiation*, **13**, 1423–1433.
- Garza-Treviño, E.N., Said-Fernández, S.L. & Martínez-Rodríguez, H.G. (2015) Understanding the colon cancer stem cells and perspectives on treatment. *Cancer Cell International*, **15**, 1–9 Available at: <http://www.cancerci.com/content/15/1/2>.
- Gazdar, A.F., Oie, H.K., Kirsch, I.R. & Hollis, G.F. (1986) Establishment and characterization of a human plasma cell myeloma culture having a rearranged cellular myc proto-oncogene.
- Ge, Y., Zhang, Y., Chen, Y., Li, Q., Chen, J., Dong, Y. & Shi, W. (2011) Silibinin causes apoptosis and cell cycle arrest in some human pancreatic cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**, 4861–4871.
- Gentile, M., Recchia, A.G., Mazzone, C., Lucia, E., Vigna, E. & Morabito, F. (2013) Perspectives in the treatment of multiple myeloma. *Expert opinion on biological therapy*, **13 Suppl 1**, S1–22 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23692500>.
- Geoerger, B., Kerr, K., Tang, C.B., Fung, K.M., Powell, B., Sutton, L.N., Phillips, P.C. & Janss, A.J. (2001) Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy. *Cancer research*, **61**, 1527–1532.
- Ghobrial, I.M. & Landgren, O. (2014) How I Treat How I treat smoldering multiple myeloma. **124**, 3380–3389.
- Ghosh, N. & Matsui, W. (2009) Cancer stem cells in multiple myeloma. *Cancer Letters*, **277**, 1–7.
- Ghoshal, K., Datta, J., Majumder, S., Bai, S., Kutay, H., Motiwala, T. & Jacob, S.T. (2005) 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Molecular and cellular biology*, **25**, 4727–4741.
- Giacomelli, S., Gallo, D., Apollonio, P., Ferlini, C., Distefano, M., Morazzoni, P., Riva, A., Bombardelli, E., Mancuso, S. & Scambia, G. (2002) Silybin and its bioavailable phospholipid complex (IdB 1016) potentiate in vitro and in vivo the activity of cisplatin. *Life Sciences*, **70**, 1447–1459.
- Gillet, J.-P. & Gottesman, M.M. (2010) Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **596**, 47–76.
- Gilmore, T.D. (2007) Multiple myeloma: lusting for NF-kappaB. *Cancer cell*, **12**, 95–97.
- Gimsing, P., Hansen, M., Knudsen, L.M., Knoblauch, P., Christensen, I.J., Ooi, C.E. & Buhl-Jensen, P. (2008) A phase I clinical trial of the histone deacetylase inhibitor belinostat in patients with advanced hematological neoplasia. In *European Journal of Haematology*, 170–176.
- Giuliani, N., Colla, S., Morandi, F., Lazzaretti, M., Sala, R., Bonomini, S., Grano, M., Colucci, S., Svaldi, M. & Rizzoli, V. (2005) Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood*, **106**, 2472–2483.
- Glass, D.A., Bialek, P., Ahn, J.D., Starbuck, M., Patel, M.S., Clevers, H., Taketo, M.M., Long, F., McMahon, A.P., Lang, R.A. & Karsenty, G. (2005) Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Developmental Cell*, **8**, 751–764.
- Gmidène, A., Saad, A. & Avet-Loiseau, H. (2013) 8p21.3 deletion suggesting a probable role of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate tumor suppressor genes in the pathogenesis of multiple myeloma. *Medical Oncology*, **30**.
- Gogvadze, V., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. (2006) Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1757**, 639–647.

- Gonzalez-Paz, N., Chng, W.J., McClure, R.F., Blood, E., Oken, M.M., Van Ness, B., James, C.D., Kurtin, P.J., Henderson, K., Ahmann, G.J., Gertz, M., Lacy, M., Dispenzieri, A., Greipp, P.R. & Fonseca, R. (2007a) Tumor suppressor p16 methylation in multiple myeloma: Biological and clinical implications. *Blood*, **109**, 1228–1232.
- Gonzalez-Paz, N., Chng, W.J., McClure, R.F., Blood, E., Oken, M.M., Van Ness, B., James, C.D., Kurtin, P.J., Henderson, K., Ahmann, G.J., Gertz, M., Lacy, M., Dispenzieri, A., Greipp, P.R. & Fonseca, R. (2007b) Tumor suppressor p16 methylation in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Blood*, **109**, 1228–32 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16840723> [Accessed October 6, 2014].
- Gopal, Y.N.V., Chanchorn, E. & Van Dyke, M.W. (2009) Parthenolide promotes the ubiquitination of MDM2 and activates p53 cellular functions. *Molecular cancer therapeutics*, **8**, 552–562.
- Gopisetty, G., Ramachandran, K. & Singal, R. (2006) DNA methylation and apoptosis. *Molecular Immunology*, **43**, 1729–1740.
- Gorman, A.M., Samali, A., McGowan, A.J. & Cotter, T.G. (1997) Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells. *Cytometry*, **29**, 97–105.
- Green, D.R. & Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, **281**, 1309–1312.
- Greenberg, R.S., Mandel, J.S., Pastides, H., Britton, N.L., Rudenko, L. & Starr, T.B. (2001) A meta-analysis of cohort studies describing mortality and cancer incidence among chemical workers in the United States and western Europe. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, **12**, 727–740.
- Greipp, P.R., Miguel, J.S., Dune, B.G.M., Crowley, J.J., Barlogie, B., Bladé, J., Boccadoro, M., Child, J.A., Harousseau, J.L., Kyle, R.A., Lahuerta, J.J., Ludwig, H., Morgan, G., Powles, R., Shimizu, K., Shustik, C., Sonneveld, P., Tosi, P., Turesson, I. & Westin, J. (2005a) International staging system for multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 3412–3420.
- Greipp, P.R., Miguel, J.S., Dune, B.G.M., Crowley, J.J., Barlogie, B., Bladé, J., Boccadoro, M., Child, J.A., Harousseau, J.L., Kyle, R.A., Lahuerta, J.J., Ludwig, H., Morgan, G., Powles, R., Shimizu, K., Shustik, C., Sonneveld, P., Tosi, P., Turesson, I. & Westin, J. (2005b) International staging system for multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 3412–3420.
- Griffith, T.S., Chin, W.A., Jackson, G.C., Lynch, D.H. & Kubin, M.Z. (1998) Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **161**, 2833–2840.
- Griffith, T.S. & Lynch, D.H. (1998) TRAIL: A molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Current Opinion in Immunology*, **10**, 559–563.
- Griffith, T.S., Rauch, C.T., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Lynch, D.H., Smith, C.A., Goodwin, R.G. & Kubin, M.Z. (1999) Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **162**, 2597–2605.
- Grogan, T.M., Spier, C.M., Salmon, S.E., Matzner, M., Rybski, J., Weinstein, R.S., Scheper, R.J. & Dalton, W.S. (1993) P-glycoprotein expression in human plasma cell myeloma: correlation with prior chemotherapy. *Blood*, **81**, 490–495.
- Gu, H., Rao, S., Zhao, J., Wang, J., Mu, R., Rong, J., Tao, L., Qi, Q., You, Q. & Guo, Q. (2009) Gambogic acid reduced bcl-2 expression via p53 in human breast MCF-7 cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*, **135**, 1777–1782.
- Guillerm G, Depil S, Wolowiec D, Q.B. (2003) Different prognostic values of p15INK4b and p16INK4a in multiple myeloma. *Hematologica*, 15–17.
- Guillerm, G., Gyan, E., Wolowiec, D., Facon, T., Avet-Loiseau, H., Kuliczowski, K., Bauters, F., Fenaux, P. & Quesnel, B. (2001) p16(INK4a) and p15(INK4b) gene methylations in plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, **98**, 244–246.
- Gupta, D., Treon, S.P., Shima, Y., Hideshima, T., Podar, K., Tai, Y.T., Lin, B., Lentzsch, S., Davies, F.E., Chauhan, D., Schlossman, R.L., Richardson, P., Ralph, P., Wu, L., Payvandi, F., Muller, G., Stirling, D.I. & Anderson, K.C. (2001) Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia*, **15**, 1950–1961 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753617>.

- Guzman, M.L., Rossi, R.M., Karnischky, L., Li, X., Peterson, D.R., Howard, D.S. & Jordan, C.T. (2005) The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*, **105**, 4163–4169.
- Haber, M., Smith, J., Bordow, S.B., Flemming, C., Cohn, S.L., London, W.B., Marshall, G.M. & Norris, M.D. (2006) Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, **24**, 1546–1553.
- Hainaut, P. & Hollstein, M. (2000) p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Advances in cancer research*, **77**, 81–137.
- Hanamura, I., Stewart, J.P., Huang, Y., Zhan, F., Santra, M., Sawyer, J.R., Hollmig, K., Zangari, M., Pineda-Roman, M., van Rhee, F., Cavallo, F., Burington, B., Crowley, J., Tricot, G., Barlogie, B. & Shaughnessy, J.D. (2006) Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*, **108**, 1724–32 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1895503&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 5, 2014].
- Hann, C.L., Daniel, V.C., Sugar, E.A., Dobromilskaya, I., Murphy, S.C., Cope, L., Lin, X., Hierman, J.S., Wilburn, D.L., Watkins, D.N. & Rudin, C.M. (2008) Therapeutic efficacy of ABT-737, a selective inhibitor of BCL-2, in small cell lung cancer. *Cancer Research*, **68**, 2321–2328.
- Hannon, G.J. & Beach, D. (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, **371**, 257–261.
- Harrison, S.J., Quach, H., Link, E., Seymour, J.F., Ritchie, D.S., Ruell, S., Dean, J., Januszewicz, H., Johnstone, R., Neeson, P., Dickinson, M., Nichols, J. & Prince, H.M. (2011) A high rate of durable responses with romidepsin, bortezomib, and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*, **118**, 6274–6283.
- Hatzimichael, E., Dasoula, A., Shah, R., Syed, N., Papoudou-Bai, A., Coley, H.M., Dranitsaris, G., Bourantas, K.L., Stebbing, J. & Crook, T. (2010) The prolyl-hydroxylase EGLN3 and not EGLN1 is inactivated by methylation in plasma cell neoplasia. *European Journal of Haematology*, **84**, 47–51.
- Hawley, T.S., Riz, I., Yang, W., Wakabayashi, Y., Depalma, L., Chang, Y.T., Peng, W., Zhu, J. & Hawley, R.G. (2013) Identification of an ABCB1 (P-glycoprotein)-positive carfilzomib-resistant myeloma subpopulation by the pluripotent stem cell fluorescent dye CDy1. *American Journal of Hematology*, **88**, 265–272.
- Hegner, S.P., Hofmann, T.G., Dröge, W. & Schmitz, M.L. (1999) The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **163**, 5617–5623.
- Heller, G., Schmidt, W.M., Ziegler, B., Holzer, S., Müllauer, L., Bilban, M., Zielinski, C.C., Drach, J. & Zöchbauer-Müller, S. (2008) Genome-wide transcriptional response to 5-Aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A in multiple myeloma cells. *Cancer Research*, **68**, 44–54.
- Hellwig, C.T. & Rehm, M. (2012) TRAIL Signaling and Synergy Mechanisms Used in TRAIL-Based Combination Therapies. *Molecular Cancer Therapeutics*, **11**, 3–13.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D. & Baylin, S.B. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 9821–9826.
- Hervouet, E., Cheray, M., Vallette, F.M. & Cartron, P.-F. (2013) DNA methylation and apoptosis resistance in cancer cells. *Cells*, **2**, 545–73 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3972670&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Heyn, H. & Esteller, M. (2012) DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nature Reviews Genetics*, **13**, 679–692.
- Hideshima, T. & Anderson, K.C. (2002) Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nature reviews. Cancer*, **2**, 927–937.
- Hideshima, T., Bradner, J.E., Wong, J., Chauhan, D., Richardson, P., Schreiber, S.L. & Anderson, K.C. (2005) Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic



- antitumor activity in multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 8567–72 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1150844&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Hayashi, T., Podar, K., Akiyama, M., Gupta, D., Richardson, P., Munshi, N. & Anderson, K.C. (2002a) The biological sequelae of stromal cell-derived factor-1alpha in multiple myeloma. *Molecular cancer therapeutics*, **1**, 539–544.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J. & Anderson, K.C. (2002b) NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 16639–16647.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Schlossman, R., Richardson, P. & Anderson, K.C. (2001a) The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene*, **20**, 4519–4527.
- Hideshima, T., Mitsiades, C., Akiyama, M., Hayashi, T., Chauhan, D., Richardson, P., Schlossman, R., Podar, K., Munshi, N.C., Mitsiades, N. & Anderson, K.C. (2003) Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood*, **101**, 1530–1534.
- Hideshima, T., Mitsiades, C., Tonon, G., Richardson, P.G. & Anderson, K.C. (2007) Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature reviews. Cancer*, **7**, 585–598.
- Hideshima, T., Nakamura, N., Chauhan, D. & Anderson, K.C. (2001b) Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene*, **20**, 5991–6000.
- Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Adams, J. & Anderson, K.C. (2001c) The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer research*, **61**, 3071–3076.
- Higgins, C.F. (2007a) Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, **446**, 749–757.
- Higgins, C.F. (2007b) Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, **446**, 749–757.
- High, L.M., Szymanska, B., Wilczynska-Kalak, U., Barber, N., O'Brien, R., Khaw, S.L., Vikstrom, I.B., Roberts, A.W. & Lock, R.B. (2010) The Bcl-2 homology domain 3 mimetic ABT-737 targets the apoptotic machinery in acute lymphoblastic leukemia resulting in synergistic in vitro and in vivo interactions with established drugs. *Molecular pharmacology*, **77**, 483–494.
- Hjorth-Hansen, H., Seifert, M.F., Börset, M., Aarset, H., Ostlie, A., Sundan, A. & Waage, A. (1999) Marked osteoblastopenia and reduced bone formation in a model of multiple myeloma bone disease in severe combined immunodeficiency mice. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, **14**, 256–263.
- Hoang, B., Zhu, L., Shi, Y., Frost, P., Yan, H., Sharma, S., Sharma, S., Goodglick, L., Dubinett, S. & Lichtenstein, A. (2006) Oncogenic RAS mutations in myeloma cells selectively induce cox-2 expression, which participates in enhanced adhesion to fibronectin and chemoresistance. *Blood*, **107**, 4484–4490.
- Hodge, D.R., Peng, B., Cherry, J.C., Hurt, E.M., Fox, S.D., Kelley, J.A., Munroe, D.J. & Farrar, W.L. (2005) Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. *Cancer research*, **65**, 4673–4682.
- Hofmeister, C.C.; Bowers, M.A.; Efebera, Y.A.; Humphries, K.; Benson, D.M., Jr.; Greenfield, C.N.; Sell, M.; Devine, S.M. (2012) Phase I trial of lenalidomide + vorinostat after autologous transplant in multiple myeloma. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, **120**, 3114.
- Hogan, F.S., Krishnegowda, N.K., Mikhailova, M. & Kahlenberg, M.S. (2007) Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. *The Journal of surgical research*, **143**, 58–65.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science (New York, N.Y.)*, **253**, 49–53.
- Holoch, P.A. & Griffith, T.S. (2009) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): A new path to anti-cancer therapies. *European Journal of Pharmacology*, **625**, 63–72.

- Hsu, H., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H.L., Elliott, G., Kelley, M.J., Sarosi, I., Wang, L., Xia, X.Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M.B., *et al.* (1999) Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 3540–3545.
- Hsu, Y.-L., Wu, L.-Y. & Kuo, P.-L. (2009) Dehydrocostuslactone, a medicinal plant-derived sesquiterpene lactone, induces apoptosis coupled to endoplasmic reticulum stress in liver cancer cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **329**, 808–819.
- Hurt, E.M., Thomas, S.B., Peng, B. & Farrar, W.L. (2006) Reversal of p53 epigenetic silencing in multiple myeloma permits apoptosis by a p53 activator. *Cancer biology & therapy*, **5**, 1154–1160.
- Hurt, E.M., Wiestner, A., Rosenwald, A., Shaffer, A.L., Campo, E., Grogan, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M. & Staudt, L.M. (2004) Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell*, **5**, 191–199.
- IARC., I.A. for R. on C.W.H.O. (2012) GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. *GLOBOCAN*.
- Igney, F.H. & Krammer, P.H. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews. Cancer*, **2**, 277–288.
- Inbal, B., Cohen, O., Polak-Charcon, S., Kopolovic, J., Vadai, E., Eisenbach, L. & Kimchi, A. (1997) DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature*, **390**, 180–184.
- International Myeloma Working Group (2003) Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders. *British journal of haematology*, **121**, 749–757 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12780789>.
- International Myeloma Working Group (2014) International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, **15**, 538–548.
- Ishikawa, H., Tsuyama, N., Abroun, S., Liu, S., Li, F.-J., Otsuyama, K.-I., Zheng, X. & Kawano, M.M. (2003) Interleukin-6, CD45 and the src-kinases in myeloma cell proliferation. *Leukemia & lymphoma*, **44**, 1477–1481.
- Issa, J.-P.J. & Kantarjian, H.M. (2009) Targeting DNA methylation. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **15**, 3938–3946.
- Ito, D., Fujimoto, K., Mori, T., Kami, K., Koizumi, M., Toyoda, E., Kawaguchi, Y. & Doi, R. (2006) In vivo antitumor effect of the mTOR inhibitor CCI-779 and gemcitabine in xenograft models of human pancreatic cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **118**, 2337–2343.
- Ito, Y., Monden, M., Takeda, T., Eguchi, H., Umeshita, K., Nagano, H., Nakamori, S., Dono, K., Sakon, M., Nakamura, M., Tsujimoto, M., Nakahara, M., Nakao, K., Yokosaki, Y. & Matsuura, N. (2000) The status of Fas and Fas ligand expression can predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer*, **82**, 1211–1217.
- Izban, K.F., Wrono-Smith, T., Hsi, E.D., Schnitzer, B., Quevedo, M.E. & Alkan, S. (1999) Characterization of the interleukin-1beta-converting enzyme/ced-3-family protease, caspase-3/CPP32, in Hodgkin's disease: lack of caspase-3 expression in nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. *The American journal of pathology*, **154**, 1439–1447.
- Jüllig, M., Zhang, W. V., Ferreira, A. & Stott, N.S. (2006) MG132 induced apoptosis is associated with p53-independent induction of pro-apoptotic Noxa and transcriptional activity of  $\beta$ -catenin. *Apoptosis*, **11**, 627–641.
- J.F., S., A.W., R., D.A., C., M.J.S., D., T.J., K., M., H., R., G.B., J.R., B., W.G., W., K., R., M.R., D.O., E., M., B., C., T., B., A., K., S., E. & R., H. (2011) Phase 2 study of navitoclax (ABT-263) safety and efficacy in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: Interim results. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, **11**, S258 Available at: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed10&NEWS=N&AN=70622319>.
- Jablonka, E. & Lamb, M.J. (2002) The changing concept of epigenetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **981**, 82–96.



- Jagani, Z., Wiederschain, D., Loo, A., He, D., Mosher, R., Fordjour, P., Monahan, J., Morrissey, M., Yao, Y.M., Lengauer, C., Warmuth, M., Sellers, W.R. & Dorsch, M. (2010) The polycomb group protein Bmi-1 is essential for the growth of multiple myeloma cells. *Cancer Research*, **70**, 5528–5538.
- Jego, G., Bataille, R., Geffroy-Luseau, A., Descamps, G. & Pellat-Deceunynck, C. (2006) Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia*, **20**, 1130–1137.
- Jeltsch, A. (2011) Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics. Edited by Trygve Tollefsbol. *ChemBioChem*, **12**, 970–970 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbic.201100065> [Accessed May 3, 2014].
- Jenuwein, T. & Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)*, **293**, 1074–1080.
- Jia, H., Liu, C., Ge, F., Xiao, C., Lu, C., Wang, T. & He, Q. (2011) Identification of ubiquitinated proteins from human multiple myeloma U266 cells by proteomics. *Biomedical and environmental sciences: BES*, **24**, 422–30 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22108332>.
- Jiang, X. & Wang, X. (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annual review of biochemistry*, **73**, 87–106.
- Jost, E., Gezer, D., Wilop, S., Suzuki, H., Herman, J.G., Osieka, R. & Galm, O. (2009) Epigenetic dysregulation of secreted Frizzled-related proteins in multiple myeloma. *Cancer Letters*, **281**, 24–31.
- Kalff, A. & Spencer, A. (2012) The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies. *Blood Cancer Journal*, **2**, e89.
- Kalushkova, A., Fryknäs, M., Lemaire, M., Fristedt, C., Agarwal, P., Eriksson, M., Deleu, S., Atadja, P., Österborg, A., Nilsson, K., Vanderkerken, K., Öberg, F. & Jernberg-Wiklund, H. (2010) Polycomb target genes are silenced in multiple myeloma. *PLoS ONE*, **5**.
- Kang, M.H., Kang, H.K., Szymanska, B., Wilczynska-Kalak, U., Sheard, M.A., Harned, T.M., Lock, R.B. & Reynolds, C.P. (2007) Activity of vincristine, L-ASP, and dexamethasone against acute lymphoblastic leukemia is enhanced by the BH3-mimetic ABT-737 in vitro and in vivo. *Blood*, **110**, 2057–2066.
- Kang, M.H. & Reynolds, C.P. (2009) Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **15**, 1126–1132.
- Kantarjian, H., Issa, J.-P.J., Rosenfeld, C.S., Bennett, J.M., Albitar, M., DiPersio, J., Klimek, V., Slack, J., de Castro, C., Ravandi, F., Helmer, R., Shen, L., Nimer, S.D., Leavitt, R., Raza, A. & Saba, H. (2006) Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study.
- Kapoor, P., Kumar, S. K., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Buadi, F., Dingli, D., ... Gertz, M. a. (2013). Importance of Achieving Stringent Complete Response After Autologous Stem-Cell Transplantation in Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **31**, 4529–4536. <http://doi.org/10.1200/JCO.2013.49.0086>.
- Karadag, A., Oyajobi, B.O., Apperley, J.F., Russell, R.G. & Croucher, P.I. (2000) Human myeloma cells promote the production of interleukin 6 by primary human osteoblasts. *British journal of haematology*, **108**, 383–390.
- Karin, M. (2006) Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, **441**, 431–436.
- Karpf, A.R. & Jones, D.A. (2002) Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene*, **21**, 5496–5503.
- Kasibhatla, S., Jessen, K.A., Maliartchouk, S., Wang, J.Y., English, N.M., Drewe, J., Qiu, L., Archer, S.P., Ponce, A.E., Sirisoma, N., Jiang, S., Zhang, H.-Z., Gehlsen, K.R., Cai, S.X., Green, D.R. & Tseng, B. (2005) A role for transferrin receptor in triggering apoptosis when targeted with gambogic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 12095–12100.
- Kataoka, T., Schröter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C.J. & Tschopp, J. (1998) FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme

- B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **161**, 3936–3942.
- Kato, K., Iida, S., Uetake, H., Takagi, Y., Yamashita, T., Inokuchi, M., Yamada, H., Kojima, K. & Sugihara, K. (2008) Methylated TMS1 and DAPK genes predict prognosis and response to chemotherapy in gastric cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **122**, 603–608.
- Katzenellenbogen, R.A., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (1999) Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood*, **93**, 4347–4353.
- Kaufman, J.L., Shah, J.J., Laubach, J.P., Heffner, L., Francis, D., Harvey, R.D., Lewis, C., Tighiouart, M., Richardson, P., Orłowski, R.Z. & Lonial, S.C.-E. firstline (2010) Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone (RVD) In Combination with Vorinostat as Front-Line Therapy for Patients with Multiple Myeloma (MM): Initial Results of a Phase 1 Study. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, **116**, 3034– ST – Lenalidomide, Bortezomib, and Dexameth Available at: <http://abstracts.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/ashmtg%2F116/21/3034>.
- Kaur, M., Velmurugan, B., Tyagi, A., Deep, G., Katiyar, S., Agarwal, C. & Agarwal, R. (2009) Silibinin suppresses growth and induces apoptotic death of human colorectal carcinoma LoVo cells in culture and tumor xenograft. *Molecular cancer therapeutics*, **8**, 2366–2374.
- Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O. & Tanaka, H. (1988) Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*, **332**, 83–85.
- Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C.X., Sebag, M., Braggio, E., Henry, T., Zhu, Y.X., Fogle, H., Price-Troska, T., Ahmann, G., Mancini, C., Brents, L.A., Kumar, S., Greipp, P., et al. (2007a) Promiscuous Mutations Activate the Noncanonical NF- $\kappa$ B Pathway in Multiple Myeloma. *Cancer Cell*, **12**, 131–144.
- Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C.X., Sebag, M., Braggio, E., Henry, T., Zhu, Y.X., Fogle, H., Price-Troska, T., Ahmann, G., Mancini, C., Brents, L.A., Kumar, S., Greipp, P., et al. (2007b) Promiscuous Mutations Activate the Noncanonical NF- $\kappa$ B Pathway in Multiple Myeloma. *Cancer Cell*, **12**, 131–144.
- Keats, J.J., Reiman, T., Maxwell, C.A., Taylor, B.J., Larratt, L.M., Mant, M.J., Belch, A.R. & Pilarski, L.M. (2003) In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood*, **101**, 1520–1529.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, **26**, 239–257.
- Khong, T., Sharkey, J. & Spencer, A. (2008) The effect of azacitidine on interleukin-6 signaling and nuclear factor-kappaB activation and its in vitro and in vivo activity against multiple myeloma. *Haematologica*, **93**, 860–869.
- Kihlslinger, J.E. & Godley, L.A. (2007) The use of hypomethylating agents in the treatment of hematologic malignancies. *Leukemia & lymphoma*, **48**, 1676–1695.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. & Toge, T. (2004) Therapeutic potential of antisense Bcl-2 as a chemosensitizer for cancer therapy. *Cancer*, **101**, 2491–502 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15503311>.
- Kim, S.H., Chun, S.-Y. & Kim, T.S. (2008) Interferon-alpha enhances artemisinin-induced differentiation of HL-60 leukemia cells via a PKC alpha/ERK pathway. *European journal of pharmacology*, **587**, 65–72.
- King, K.L. & Cidlowski, J.A. (1998) Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual review of physiology*, **60**, 601–617.
- Kirkin, V., Joos, S. & Zörnig, M. (2004) The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1644**, 229–249.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal*, **14**, 5579–5588.

- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Castillo, V. & Goldberg, A.L. (1999) Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Molecular Cell*, **4**, 395–402.
- Kiziltepe, T., Hideshima, T., Catley, L., Raje, N., Yasui, H., Shiraishi, N., Okawa, Y., Ikeda, H., Vallet, S., Pozzi, S., Ishitsuka, K., Ocio, E.M., Chauhan, D. & Anderson, K.C. (2007) 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. *Molecular cancer therapeutics*, **6**, 1718–1727.
- Klein, B., Seckinger, A., Moehler, T. & Hose, D. (2011) Molecular pathogenesis of multiple myeloma: Chromosomal aberrations, changes in gene expression, cytokine networks, and the bone marrow microenvironment. *Recent Results in Cancer Research*, **183**, 39–86.
- Klein, B., Zhang, X.G., Jourdan, M., Content, J., Houssiau, F., Aarden, L., Piechaczyk, M. & Bataille, R. (1989) Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, **73**, 517–526.
- Kocemba, K.A., Groen, R.W.J., van Andel, H., Kersten, M.J., Mahtouk, K., Spaargaren, M. & Pals, S.T. (2012) Transcriptional silencing of the Wnt-Antagonist DKK1 by promoter methylation is associated with enhanced Wnt signaling in advanced multiple myeloma. *PLoS ONE*, **7**.
- Koksal, I.T., Sanlioglu, A.D., Karacay, B., Griffith, T.S. & Sanlioglu, S. (2008) Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-R4 decoy receptor expression is correlated with high Gleason scores, prostate-specific antigen recurrence, and decreased survival in patients with prostate carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, **26**, 158–165.
- Kolenko, V., Uzzo, R.G., Bukowski, R., Bander, N.H., Novick, A.C., Hsi, E.D. & Finke, J.H. (1999) Dead or dying: Necrosis versus apoptosis in caspase-deficient human renal cell carcinoma. *Cancer Research*, **59**, 2838–2842.
- Kondo, Y. (2009) Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Medical Journal*, **50**, 455–463.
- Königsberg, R., Ackermann, J., Kaufmann, H., Zojer, N., Urbauer, E., Krömer, E., Jäger, U., Gisslinger, H., Schreiber, S., Heinz, R., Ludwig, H., Huber, H. & Drach, J. (2000) Deletions of chromosome 13q in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **14**, 1975–1979.
- Koomagi, R. & Volm, M. (2000) Relationship between the expression of caspase-3 and the clinical outcome of patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*, **20**, 493–496.
- Koornstra, J.J., Kleibeuker, J.H., van Geelen, C.M.M., Rijcken, F.E.M., Hollema, H., de Vries, E.G.E. & de Jong, S. (2003) Expression of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and its receptors in normal colonic mucosa, adenomas, and carcinomas. *Journal of Pathology*, **200**, 327–335.
- Korde, N., Kristinsson, S.Y. & Landgren, O. (2011) Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): Novel biological insights and development of early treatment strategies. *Blood*, **117**, 5573–5581.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J. & Williams, L.T. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, **278**, 294–298.
- Kouzarides, T. (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Current opinion in genetics & development*, **12**, 198–209.
- Krishan, A. (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *Journal of Cell Biology*, **66**, 188–193.
- Kristinsson SY, Holmberg E, B.C. (2013) Treatment for high-risk smoldering myeloma. *The new england journal of medicine*, **369**, 1762–63.
- Kuehl, W.M. & Bergsagel, P.L. (2002) Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature reviews. Cancer*, **2**, 175–187.
- Kuehl, W.M. & Bergsagel, P.L. (2005) Early genetic events provide the basis for a clinical classification of multiple myeloma. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 346–352.

- Kuehl, W.M. & Bergsagel, P.L. (2012) Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *Journal of Clinical Investigation*, **122**, 3456–3463.
- Kumar, S., Kimlinger, T. & Morice, W. (2010) Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best practice & research. Clinical haematology*, **23**, 433–51 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521692610000630>.
- Kumar, S., Witzig, T.E., Timm, M., Haug, J., Wellik, L., Fonseca, R., Greipp, P.R. & Rajkumar, S. V (2003a) Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. *Leukemia*, **17**, 2025–2031.
- Kumar, S., Witzig, T.E., Timm, M., Haug, J., Wellik, L., Fonseca, R., Greipp, P.R. & Rajkumar, S. V (2003b) Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. , 2025–2031.
- Kuo, H.K., Griffith, J.D. & Kreuzer, K.N. (2007) 5-Azacytidine induced methyltransferase-DNA adducts block DNA replication in vivo. *Cancer research*, **67**, 8248–8254.
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N. & Kobayashi, Y. (2003) Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **171**, 4672–4679.
- Kurz, E.U. & Lees-Miller, S.P. (2004) DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair*, **3**, 889–900.
- Kutuk, O., Temel, S.G., Tolunay, S. & Basaga, H. (2010) Aven blocks DNA damage-induced apoptosis by stabilising Bcl-xL. *European Journal of Cancer*, **46**, 2494–2505.
- Kyle, R.A. (1978) Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Natural history in 241 cases. *The American journal of medicine*, **64**, 814–826.
- Kyle, R.A., Benson, J., Larson, D., Therneau, T., Dispenzieri, A., Melton Iii, L.J. & Rajkumar, S.V. (2009) IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering Waldenström's macroglobulinemia. *Clinical lymphoma & myeloma*, **9**, 17–18.
- Kyle, R.A., Child, J.A., Anderson, K., Barlogie, B., Bataille, R., Bensinger, W., Blad??, J., Boccadoro, M., Dalton, W., Dimopoulos, M., Djulbegovic, B., Drayson, M., Durie, B., Facon, T., Fonseca, R., Gahrton, G., Greipp, P., Harsouseau, J.L., Harrington, D., Hussein, M., et al. (2003) Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: A report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology*, **121**, 749–757.
- Kyle, R.A., Durie, B.G.M., Rajkumar, S. V, Landgren, O., Blade, J., Merlini, G., Kröger, N., Einsele, H., Vesole, D.H., Dimopoulos, M., San Miguel, J., Avet-Loiseau, H., Hajek, R., Chen, W.M., Anderson, K.C., Ludwig, H., Sonneveld, P., Pavlovsky, S., Palumbo, A., Richardson, P.G., et al. (2010) Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **24**, 1121–1127.
- Kyle, R.A. & Rajkumar, S. V (2009a) Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **23**, 3–9.
- Kyle, R.A. & Rajkumar, S. V (2009b) Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, **23**, 3–9.
- Kyle, R.A. & Rajkumar, S.V. (2008a) Multiple myeloma ASH 50th anniversary review Multiple myeloma. *Bone*, **111**, 2962–2972 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2265446&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kyle, R.A. & Rajkumar, S.V. (2008b) Multiple myeloma. *Blood*, **111**, 2962–2972.
- Kyle, R.A., Therneau, T.M., Rajkumar, S.V., Offord, J.R., Larson, D.R., Plevak, M.F. & Melton, L.J. (2002) A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *The New England journal of medicine*, **346**, 564–569.
- Kyle RA, G.P. (1980) Smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*, **302**, 1347–9 Available at: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM198006123022405>.
- Labroille, G., Belloc, F., Bilhou-Nabera, C., Bonnefille, S., Bascans, E., Boisseau, M.R., Bernard, P. & Lacombe, F. (1998) Cytometric study of intracellular P-gp expression and reversal of drug resistance. *Cytometry*, **32**, 86–94 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9627221>.

- Lage, H. (2008) An overview of cancer multidrug resistance: A still unsolved problem. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**, 3145–3167.
- Laird, P.W. (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature reviews. Cancer*, **3**, 253–266.
- Landgren, O. (2013) Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: biological insights and early treatment strategies. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, **2013**, 478–87 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24319222>.
- Landgren, O., Kyle, R.A., Pfeiffer, R.M., Katzmann, J.A., Caporaso, N.E., Richard, B., Dispenzieri, A., Kumar, S., Clark, R.J., Baris, D., Hoover, R., Vincent, S., Hayes, R.B. & Rajkumar, S.V. (2014) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study Monoclonal gammopathy of undetermined significance ( MGUS ) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study, 5412–5417.
- Landowski, T.H., Olashaw, N.E., Agrawal, D. & Dalton, W.S. (2003) Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kappa B (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene*, **22**, 2417–2421.
- Landowski, T.H., Qu, N., Buyuksal, I., Painter, J.S. & Dalton, W.S. (1997) Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood*, **90**, 4266–4270.
- Larsen, J.T., Kumar, S.K., Dispenzieri, A., Kyle, R.A., Katzmann, J.A. & Rajkumar, S. V (2012) Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia*.
- Latham, J.A. & Dent, S.Y.R. (2007) Cross-regulation of histone modifications. *Nature structural & molecular biology*, **14**, 1017–1024.
- LeBlanc, H.N. & Ashkenazi, A. (2003) Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell death and differentiation*, **10**, 66–75.
- LeBlanc, R., Catley, L.P., Hideshima, T., Lentzsch, S., Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Neubergh, D., Goloubeva, O., Pien, C.S., Adams, J., Gupta, D., Richardson, P.G., Munshi, N.C. & Anderson, K.C. (2002) Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer research*, **62**, 4996–5000.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Anderson, K.C. & Glimcher, L.H. (2003) Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 9946–9951.
- Leith, C.P., Kopecky, K.J., Chen, I.M., Eijdens, L., Slovak, M.L., McConnell, T.S., Head, D.R., Weick, J., Grever, M.R., Appelbaum, F.R. & Willman, C.L. (1999) Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study.
- Leone, G., D'Alò, F., Zardo, G. Voso, M.T. & Nervi, C. (2008) Epigenetic Treatment of Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemias. *Current Medicinal Chemistry*, **15**, 1274–1287.
- Leone, P.E., Walker, B.A., Jenner, M.W., Chiecchio, L., Dagrada, G., Protheroe, R.K.M., Johnson, D.C., Dickens, N.J., Brito, J.L., Else, M., Gonzalez, D., Ross, F.M., Chen-Kiang, S., Davies, F.E. & Morgan, G.J. (2008) Deletions of CDKN2C in multiple myeloma: Biological and clinical implications. *Clinical Cancer Research*, **14**, 6033–6041.
- Lewis, D.R., Pottner, L.M., Brown, L.M., Silverman, D.T., Hayes, R.B., Schoenberg, J.B., Greenberg, R.S., Swanson, G.M., Schwartz, A.G., Liff, J.M. & *et al.* (1994) Multiple myeloma among blacks and whites in the United States: the role of chronic antigenic stimulation. *Cancer Causes Control*, **5**, 529–539.
- Li, F. (2005) Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *British journal of cancer*, **92**, 212–216.
- Li, G.H., Arora, P.D., Chen, Y., McCulloch, C.A. & Liu, P. (2012) Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases. *Medicinal research reviews*, **32**, 999–1025 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22886630>.
- Li, J., Lee, B. & Lee, A.S. (2006) Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 7260–7270.



- Li, J., Li, Z.-N., Du, Y.-J., Li, X.-Q., Bao, Q.-L. & Chen, P. (2009a) Expression of MRP1, BCRP, LRP, and ERCC1 in advanced non-small-cell lung cancer: correlation with response to chemotherapy and survival. *Clinical lung cancer*, **10**, 414–421.
- Li, L., Zeng, J., Gao, Y. & He, D. (2010) Targeting silibinin in the antiproliferative pathway. *Expert opinion on investigational drugs*, **19**, 243–255.
- Li, R., Chen, Y., Zeng, L., Lan, Shu, W., Xiu, Zhao, F., Wen, L. & Liu, Y. (2009b) Gambogic acid induces G0/G1 arrest and apoptosis involving inhibition of SRC-3 and inactivation of Akt pathway in K562 leukemia cells. *Toxicology*, **262**, 98–105.
- Li, X., Liu, S., Huang, H., Liu, N., Zhao, C., Liao, S., Yang, C., Liu, Y., Zhao, C., Li, S., Lu, X., Liu, C., Guan, L., Zhao, K., Shi, X., Song, W., Zhou, P., Dong, X., Guo, H., Wen, G., *et al.* (2013) Gambogic Acid Is a Tissue-Specific Proteasome Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Cell Reports*, **3**, 211–222.
- Li, Y., Nagai, H., Ohno, T., Yuge, M., Hatano, S., Ito, E., Mori, N., Saito, H. & Kinoshita, T. (2002) Aberrant DNA methylation of p57(KIP2) gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype. *Blood*, **100**, 2572–2577.
- Li, Z.-W., Chen, H., Campbell, R.A., Bonavida, B. & Berenson, J.R. (2008) NF-kappaB in the pathogenesis and treatment of multiple myeloma. *Current opinion in hematology*, **15**, 391–399.
- Liggett, W.H. & Sidransky, D. (1998) Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **16**, 1197–1206.
- Lightcap, E.S., McCormack, T.A., Pien, C.S., Chau, V., Adams, J. & Elliott, P.J. (2000) Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clinical chemistry*, **46**, 673–683.
- Linden, M., Kirchhof, N., Carlson, C. & Van Ness, B. (2004) Targeted overexpression of Bcl-XL in B-lymphoid cells results in lymphoproliferative disease and plasma cell malignancies. *Blood*, **103**, 2779–2786.
- Liu, Q. & Gazitt, Y. (2003) Potentiation of dexamethasone-, paclitaxel-, and Ad-p53-induced apoptosis by Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides in drug-resistant multiple myeloma cells. *Blood*, **101**, 4105–4114.
- Liu, Q.Y., Chen, D.W., Xie, L.P., Zhang, R.Q. & Wang, H.Z. (2011) Decitabine, independent of apoptosis, exerts its cytotoxic effects on cell growth in melanoma cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **32**, 423–429.
- Liu, Y.Y., Han, T.Y., Giuliano, A.E. & Cabot, M.C. (2001) Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **15**, 719–730.
- Liu, Z., Liu, S., Xie, Z., Pavlovicz, R.E., Wu, J., Chen, P., Aimiwu, J., Pang, J., Bhasin, D., Neviani, P., Fuchs, J.R., Plass, C., Li, P.-K., Li, C., Huang, T.H.-M., Wu, L.-C., Rush, L., Wang, H., Perrotti, D., Marcucci, G., *et al.* (2009) Modulation of DNA methylation by a sesquiterpene lactone parthenolide. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **329**, 505–514.
- Livingston, D.J. (1997) In vitro and in vivo studies of ICE inhibitors. *Journal of cellular biochemistry*, **64**, 19–26.
- Locksley, R.M., Killeen, N. & Lenardo, M.J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*, **104**, 487–501.
- Lodé, L., Eveillard, M., Trichet, V., Soussi, T., Wuillème, S., Richebourg, S., Magrangeas, F., Ifrah, N., Campion, L., Traullé, C., Guilhot, F., Caillot, D., Marit, G., Mathiot, C., Facon, T., Attal, M., Harousseau, J.L., Moreau, P., Minvielle, S. & Avet-Loiseau, H. (2010) Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica*, **95**, 1973–1976.
- Van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S.M., Rodriguez, I., Alnemri, E.S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W. & Vandenabeele, P. (2002) The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell death and differentiation*, **9**, 20–26.
- Lopez, J., Percharde, M., Coley, H.M., Webb, A. & Crook, T. (2009) The context and potential of epigenetics in oncology. *British journal of cancer*, **100**, 571–577.
- López-Corral, L., Gutiérrez, N.C., Vidriales, M.B., Mateos, M.V., Rasillo, A., García-Sanz, R., Paiva, B. & San Miguel, J.F. (2011) The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to

- multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **17**, 1692–700 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21325290> [Accessed March 23, 2014].
- Lowe, S.W. & Lin, A.W. (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, **21**, 485–495.
- Lu, B., Li, J., Pan, J., Huang, B., Liu, J. & Zheng, D. (2013) Everolimus enhances the cytotoxicity of bendamustine in multiple myeloma cells through a network of pro-apoptotic and cell-cycle-progression regulatory proteins. **45**, 683–691.
- Lu, N., Yang, Y., You, Q.-D., Ling, Y., Gao, Y., Gu, H.-Y., Zhao, L., Wang, X.-T. & Guo, Q.-L. (2007) Gambogic acid inhibits angiogenesis through suppressing vascular endothelial growth factor-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1. *Cancer letters*, **258**, 80–89.
- Lü, S. & Wang, J. (2013) The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. *Biomarker research*, **1**, 13 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24252210>.
- Ludwig, H., Durie, B. G., McCarthy, P., Palumbo, A., San Miguel, J., Barlogie, B., ... Attal, M. (2012). IMWG consensus on maintenance therapy in multiple myeloma. *Blood*, 3003–3015. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-11-374249>.
- MacFarlane, M. (2003) TRAIL-induced signalling and apoptosis. In *Toxicology Letters* pp 89–97.
- Maes, K., Menu, E., Van Valckenborgh, E., Van Riet, I., Vanderkerken, K. & De Bruyne, E. (2013a) Epigenetic modulating agents as a new therapeutic approach in multiple myeloma. *Cancers*, **5**, 430–61 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3730337&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Maes, K., Menu, E., Van Valckenborgh, E., Van Riet, I., Vanderkerken, K. & de Bruyne, E. (2013b) Epigenetic modulating agents as a new therapeutic approach in multiple myeloma. *Cancers*, **5**, 430–461.
- Maes, K., Menu, E., Van Valckenborgh, E., Van Riet, I., Vanderkerken, K. & de Bruyne, E. (2013c) Epigenetic modulating agents as a new therapeutic approach in multiple myeloma. *Cancers*, **5**, 430–461.
- Mahalingam, D., Szegezdi, E., Keane, M., Jong, S. de & Samali, A. (2009) TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treatment Reviews*, **35**, 280–288.
- Malik, H.S. & Henikoff, S. (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nature structural biology*, **10**, 882–891.
- Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M. & Basu, J. (2005) Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 39460–39467.
- Mani, A. & Gelmann, E.P. (2005) The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **23**, 4776–4789.
- Marango, J., Shimoyama, M., Nishio, H., Meyer, J.A., Min, D.J., Sirulnik, A., Martinez-Martinez, Y., Chesi, M., Bergsagel, P.L., Zhou, M.M., Waxman, S., Leibovitch, B.A., Walsh, M.J. & Licht, J.D. (2008) The MMSET protein is a histone methyltransferase with characteristics of a transcriptional corepressor. *Blood*, **111**, 3145–3154.
- Markovina, S., Callander, N.S., O'Connor, S.L., Kim, J., Werndli, J.E., Raschko, M., Leith, C.P., Kahl, B.S., Kim, K. & Miyamoto, S. (2008) Bortezomib-resistant nuclear factor-kappaB activity in multiple myeloma cells. *Molecular cancer research: MCR*, **6**, 1356–1364.
- Markovina, S., Callander, N.S., O'Connor, S.L., Xu, G., Shi, Y., Leith, C.P., Kim, K., Trivedi, P., Kim, J., Hematti, P. & Miyamoto, S. (2010) Bone marrow stromal cells from multiple myeloma patients uniquely induce bortezomib resistant NF-kappaB activity in myeloma cells. *Molecular cancer*, **9**, 176.
- Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Pitti, R.M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A.D., Godowski, P. & Ashkenazi, A. (1997) A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Current biology: CB*, **7**, 1003–1006.
- Martinez-Garcia, E., Popovic, R., Min, D.J., Sweet, S.M.M., Thomas, P.M., Zamdborg, L., Heffner, A., Will, C., Lamy, L., Staudt, L.M., Levens, D.L., Kelleher, N.L. & Licht, J.D. (2011) The MMSET



- histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood*, **117**, 211–220.
- Martinaulet, D., Zhu, P. & Lieberman, J. (2005) Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, **22**, 355–370.
- Marx J (2008) All in the Stroma: Cancer's Cosa Nostra, 38–40.
- Massoudi, B.L., Talbott, E.O., Day, R.D., Swerdlow, S.H., Marsh, G.M. & Kuller, L.H. (1997) A case-control study of hematopoietic and lymphoid neoplasms: The role of work in the chemical industry. *American Journal of Industrial Medicine*, **31**, 21–27.
- Masters, S.C., Yang, H., Datta, S.R., Greenberg, M.E. & Fu, H. (2001) 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Molecular pharmacology*, **60**, 1325–1331.
- Mateos, M. V, García-Sanz, R., López-Pérez, R., Balanzategui, A., González, M.I., Fernández-Calvo, J., Moro, M.J., Hernández, J., Caballero, M.D., González, M. & San Miguel, J.F. (2001) p16/INK4a gene inactivation by hypermethylation is associated with aggressive variants of monoclonal gammopathies. *The hematology journal: the official journal of the European Haematology Association / EHA*, **2**, 146–149.
- Mateos, M. V, García-Sanz, R., López-Pérez, R., Moro, M.J., Ocio, E., Hernández, J., Megido, M., Caballero, M.D., Fernández-Calvo, J., Báez, A., Almeida, J., Orfão, A., González, M. & San Miguel, J.F. (2002) Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *British journal of haematology*, **118**, 1034–1040.
- Mateos, M.-V., Hernández, M.-T., Giraldo, P., de la Rubia, J., de Arriba, F., López Corral, L., Rosiñol, L., Paiva, B., Palomera, L., Bargay, J., Oriol, A., Prosper, F., López, J., Olavarría, E., Quintana, N., García, J.-L., Bladé, J., Lahuerta, J.-J. & San Miguel, J.-F. (2013a) Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, **369**, 438–47 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23902483>.
- Mateos, M.-V., Hernández, M.-T., Giraldo, P., de la Rubia, J., de Arriba, F., López Corral, L., Rosiñol, L., Paiva, B., Palomera, L., Bargay, J., Oriol, A., Prosper, F., López, J., Olavarría, E., Quintana, N., García, J.-L., Bladé, J., Lahuerta, J.-J. & San Miguel, J.-F. (2013b) Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, **369**, 438–47 Available at: <http://www.nejm.org.ezp-prod1.hul.harvard.edu/doi/full/10.1056/NEJMoa1300439>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23902483>.
- Matsuda, T., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Okuyama, Y., Fujitani, Y., Hanazono, Y., Hirai, H. & Hirano, T. (1995) Activation of Fes tyrosine kinase by gp130, an interleukin-6 family cytokine signal transducer, and their association. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 11037–11039.
- Mazumder, A., Vesole, D.H. & Jagannath, S. (2010) Vorinostat plus bortezomib for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma: a case series illustrating utility in clinical practice.
- McCarthy, M.M., DiVito, K.A., Sznol, M., Kovacs, D., Halaban, R., Berger, A.J., Flaherty, K.T., Camp, R.L., Lazova, R., Rimm, D.L. & Kluger, H.M. (2006) Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors 1 and 2 in melanoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **12**, 3856–3863.
- Meads, M.B., Gatenby, R.A. & Dalton, W.S. (2009) Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nature reviews. Cancer*, **9**, 665–674.
- Medeiros, R.B., Burbach, B.J., Mueller, K.L., Srivastava, R., Moon, J.J., Highfill, S., Peterson, E.J. & Shimizu, Y. (2007) Regulation of NF-κB Activation in. *Science*, **316**, 754–758 Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17478723](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17478723).
- Melo, S.A. & Esteller, M. (2011) Dysregulation of microRNAs in cancer: Playing with fire. *FEBS Letters*, **585**, 2087–2099.
- Mercurio, F. & Manning, A.M. (1999) Multiple signals converging on NF-κB. *Current Opinion in Cell Biology*, **11**, 226–232.
- Mérino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E. & Micheau, O. (2006) Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Molecular and cellular biology*, **26**, 7046–7055.

- Mérimo, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Solary, E. & Micheau, O. (2007) TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. *Expert opinion on therapeutic targets*, **11**, 1299–314 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2976473&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Merlo, A., Herman, J.G., Mao, L., Lee, D.J., Gabrielson, E., Burger, P.C., Baylin, S.B. & Sidransky, D. (1995) 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature medicine*, **1**, 686–692.
- Meyer, N. & Penn, L.Z. (2008) Reflecting on 25 years with MYC. *Nature reviews. Cancer*, **8**, 976–990.
- Micheau, O., Shirley, S. & Dufour, F. (2013) Death receptors as targets in cancer. *British Journal of Pharmacology*, **169**, 1723–1744.
- Miguel-García, A., Orero, T., Matutes, E., Carbonell, F., Miguel-Sosa, A., Linares, M., Tarín, F., Herrera, M., García-Talavera, J. & Carbonell-Ramón, F. (1998) bcl-2 Expression in plasma cells from neoplastic gammopathies and reactive plasmacytosis: A comparative study. *Haematologica*, **83**, 298–304.
- Mills, P.K., Beeson, W.L., Fraser, G.E. & Phillips, R.L. (1992) Allergy and cancer: organ site-specific results from the Adventist Health Study. *American journal of epidemiology*, **136**, 287–295.
- Misso, G., Zappavigna, S., Castellano, M., De Rosa, G., Di Martino, M.T., Tagliaferri, P., Tassone, P. & Caraglia, M. (2013) Emerging pathways as individualized therapeutic target of multiple myeloma. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **13**, S95–S109 Available at: <Go to ISI>://000320859000007.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Poulaki, V., Schlossman, R., Akiyama, M., Chauhan, D., Hideshima, T., Treon, S.P., Munshi, N.C., Richardson, P.G. & Anderson, K.C. (2002) Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene*, **21**, 5673–5683.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N.S., McMullan, C.J., Poulaki, V., Shringarpure, R., Akiyama, M., Hideshima, T., Chauhan, D., Joseph, M., Libermann, T.A., Garc??a-Echeverr??a, C., Pearson, M.A., Hofmann, F., Anderson, K.C. & Kung, A.L. (2004) Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell*, **5**, 221–230.
- Mitsiades, C.S., Treon, S.P., Mitsiades, N., Shima, Y., Richardson, P., Schlossman, R., Hideshima, T. & Anderson, K.C. (2001) TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: Therapeutic applications. *Blood*, **98**, 795–804.
- Mittag, F., Kuester, D., Vieth, M., Peters, B., Stolte, B., Roessner, A. & Schneider-Stock, R. (2006) DAPK promotor methylation is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Letters*, **240**, 69–75.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B. & Reed, J.C. (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, **9**, 1799–1805.
- Modur, V., Nagarajan, R., Evers, B.M. & Milbrandt, J. (2002) FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression: Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 47928–47937.
- Mohamed, A.N., Bentley, G., Bonnett, M.L., Zonder, J. & Al-Katib, A. (2007) Chromosome aberrations in a series of 120 multiple myeloma cases with abnormal karyotypes. *American Journal of Hematology*, **82**, 1080–1087.
- Momparler, R.L. (2005) Pharmacology of 5-aza-2-deoxycytidine (decitabine). *Seminars in Hematology*, **42**.
- Momparler, R.L., Côté, S., Momparler, L.F. & Idaghdour, Y. (2014) Epigenetic therapy of acute myeloid leukemia using 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in combination with inhibitors of histone methylation and deacetylation. *Clinical epigenetics*, **6**, 19 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4194463&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mora, L.B., Buettner, R., Seigne, J., Diaz, J., Ahmad, N., Garcia, R., Bowman, T., Falcone, R., Fairclough, R., Cantor, A., Muro-Cacho, C., Livingston, S., Karras, J., Pow-Sang, J. & Jove, R. (2002) Cons-

- titive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer research*, **62**, 6659–6666.
- Moreau, P., Facon, T., Leleu, X., Morineau, N., Huyghe, P., Harousseau, J.L., Bataille, R. & Avet-Loiseau, H. (2002) Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood*, **100**, 1579–1583.
- Moreno-Bost, A., Szmania, S., Stone, K., Garg, T., Hoerring, A., Szymonifka, J., Shaughnessy, J., Barlogie, B., Prentice, H.G. & van Rhee, F. (2011) Epigenetic modulation of MAGE-A3 antigen expression in multiple myeloma following treatment with the demethylation agent 5-azacitidine and the histone deacetylase inhibitor MGCD0103. *Cytotherapy*, **13**, 618–628.
- Morgan, G.J., Walker, B.A. & Davies, F.E. (2012a) The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*, **12**, 335–348.
- Morgan, G.J., Walker, B.A. & Davies, F.E. (2012b) The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*, **12**, 335–348.
- Moubarak, R.S., Yuste, V.J., Artus, C., Bouharrour, A., Greer, P.A., Menissier-de Murcia, J. & Susin, S.A. (2007) Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Molecular and cellular biology*, **27**, 4844–4862.
- Mu, R., Lu, N., Wang, J., Yin, Y., Ding, Y., Zhang, X., Gui, H., Sun, Q., Duan, H., Zhang, L., Zhang, Y., Ke, X. & Guo, Q. (2010) An oxidative analogue of gambogic acid-induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 is involved in its anticancer activity in vitro. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, **19**, 61–67.
- Mulligan, G., Mitsiades, C., Bryant, B., Zhan, F., Chng, W.J., Roels, S., Koenig, E., Fergus, A., Huang, Y., Richardson, P., Trepicchio, W.L., Broyl, A., Sonneveld, P., Shaughnessy, J.D., Bergsagel, P.L., Schenkein, D., Esseltine, D.L., Boral, A. & Anderson, K.C. (2007) Gene expression profiling and correlation with outcome in clinical trials of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood*, **109**, 3177–3188.
- Munshi, N.C. & Avet-loiseau, H. (2011) Genomics in Multiple Myeloma, 1234–1242.
- Muthukkumar, S., Ramesh, T.M. & Bondada, S. (1995) Rapamycin, a potent immunosuppressive drug, causes programmed cell death in B lymphoma cells. *Transplantation*, **60**, 264–270.
- Myung, J., Kim, K.B. & Crews, C.M. (2001) The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Medicinal research reviews*, **21**, 245–273.
- Nahi, H., Sutlu, T., Jansson, M., Alici, E. & Gahrton, G. (2011) Clinical impact of chromosomal aberrations in multiple myeloma. *Journal of Internal Medicine*, **269**, 137–147.
- Nakagawara, A., Nakamura, Y., Ikeda, H., Hiwasa, T., Kuida, K., Su, M.S.S., Zhao, H., Cnaan, A. & Sakiyama, S. (1997) High levels of expression and nuclear localization of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme (ICE) and CPP32 in favorable human neuroblastomas. *Cancer Research*, **57**, 4578–4584.
- Nakanishi, C. & Toi, M. (2005) Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nature reviews. Cancer*, **5**, 297–309.
- Nakopoulou, L., Alexandrou, P., Stefanaki, K., Panayotopoulou, E., Lazaris, A.C. & Davaris, P.S. (2001) Immunohistochemical expression of caspase-3 as an adverse indicator of the clinical outcome in human breast cancer. *Pathobiology*, **69**, 266–273.
- Nakshatri, H., Rice, S.E. & Bhat-Nakshatri, P. (2004) Antitumor agent parthenolide reverses resistance of breast cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through sustained activation of c-Jun N-terminal kinase. *Oncogene*, 0 Available at: PM.
- Neben, K., Jauch, A., Bertsch, U., Heiss, C., Hielscher, T., Seckinger, A., Mors, T., Müller, N.Z., Hillengass, J., Raab, M.S., Ho, A.D., Hose, D. & Goldschmidt, H. (2010) Combining information regarding chromosomal aberrations t(4;14) and del(17p13) with the International Staging System classification allows stratification of myeloma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Haematologica*, **95**, 1150–1157.

- Neben, K., Jauch, A., Hielscher, T., Hillengass, J., Lehnert, N., Seckinger, A., Granzow, M., Raab, M.S., Ho, A.D., Goldschmidt, H. & Hose, D. (2013) Progression in smoldering myeloma is independently determined by the chromosomal abnormalities del(17p), t(4;14), gain 1q, hyperdiploidy, and tumor load. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **31**, 4325–32 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24145347>.
- Negrin, G., Eiroa, J.L., Morales, M., Triana, J., Quintana, J. & Estevez, F. (2010) Naturally occurring asteriscunolide A induces apoptosis and activation of mitogen-activated protein kinase pathway in human tumor cell lines. *Mol Carcinog*, **49**, 488–499 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20232365>.
- Neri, P., Ren, L., Gratton, K., Stebner, E., Johnson, J., Klimowicz, A., Duggan, P., Tassone, P., Mansoor, A., Stewart, D.A., Lonial, S., Boise, L.H. & Bahlis, N.J. (2011) Bortezomib-induced 'BRCAness' sensitizes multiple myeloma cells to PARP inhibitors. *Blood*, **118**, 6368–6379.
- Neumann, C., Zehentmaier, G., Danhauser-Riedl, S., Emmerich, B. & Hallek, M. (1996) Interleukin-6 induces tyrosine phosphorylation of the Ras activating protein Shc, and its complex formation with Grb2 in the human multiple myeloma cell line LP-1. *European Journal of Immunology*, **26**, 379–384.
- Newmeyer, D.D., Bossy-Wetzell, E., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Beere, H.M. & Green, D.R. (2000) Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell death and differentiation*, **7**, 402–407.
- Ng, M.H., To, K.W., Lo, K.W., Chan, S., Tsang, K.S., Cheng, S.H. & Ng, H.K. (2001) Frequent death-associated protein kinase promoter hypermethylation in multiple myeloma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **7**, 1724–1729.
- Ngan, B.Y., Chen-Levy, Z., Weiss, L.M., Warnke, R.A. & Cleary, M.L. (1988) Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. *The New England journal of medicine*, **318**, 1638–1644.
- Ni, H., Ergin, M., Huang, Q., Qin, J.-Z., Amin, H.M., Martinez, R.L., Saeed, S., Barton, K. & Alkan, S. (2001) Analysis of expression of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) in multiple myeloma: downregulation of NF-kappaB induces apoptosis. *British Journal of Haematology*, **115**, 279–286 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2141.2001.03102.x>.
- Niesvizky, R., Ely, S., Mark, T., Aggarwal, S., Gabrilove, J.L., Wright, J.J., Chen-Kiang, S. & Sparano, J.A. (2011) Phase 2 trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin for the treatment of refractory multiple myeloma. *Cancer*, **117**, 336–342.
- Nikiforov, M.A., Riblett, M., Tang, W.-H., Gratchouck, V., Zhuang, D., Fernandez, Y., Verhaegen, M., Varambally, S., Chinnaiyan, A.M., Jakubowiak, A.J. & Soengas, M.S. (2007) Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 19488–19493.
- Nimmanapalli, R., Gerbino, E., Dalton, W.S., Gandhi, V. & Alsina, M. (2008) HSP70 inhibition reverses cell adhesion mediated and acquired drug resistance in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, **142**, 551–561.
- Nishihori, T., & Alsina, M. (2011). Advances in the autologous and allogeneic transplantation strategies for multiple myeloma. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, **18**, 258–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976244>.
- Van Noesel, M.M., Van Bezouw, S., Salomons, G.S., Voûte, P.A., Pieters, R., Baylin, S.B., Herman, J.G. & Versteeg, R. (2002) Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Research*, **62**, 2157–2161.
- Nojima, M., Maruyama, R., Yasui, H., Suzuki, H., Maruyama, Y., Tarasawa, I., Sasaki, Y., Asaoku, H., Sakai, H., Hayashi, T., Mori, M., Imai, K., Tokino, T., Ishida, T., Toyota, M. & Shinomura, Y. (2009) Genomic screening for genes silenced by DNA methylation revealed an association between RASD1 inactivation and dexamethasone resistance in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, **15**, 4356–4364.
- Nussbaum, A.K., Dick, T.P., Keilholz, W., Schirle, M., Stevanović, S., Dietz, K., Heinemeyer, W., Groll, M., Wolf, D.H., Huber, R., Rammensee, H.G. & Schild, H. (1998) Cleavage motifs of the yeast

- 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 12504–12509.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan, F. (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 5421–5426.
- O'Brien, S., Moore, J.O., Boyd, T.E., Larratt, L.M., Skotnicki, A.B., Koziner, B., Chanan-Khan, A.A., Seymour, J.F., Gribben, J., Itri, L.M. & Rai, K.R. (2009) 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen.
- O'Connor, R., Ooi, M.G., Meiller, J., Jakubikova, J., Klippel, S., Delmore, J., Richardson, P., Anderson, K., Clynes, M., Mitsiades, C.S. & O'Gorman, P. (2013) The interaction of bortezomib with multi-drug transporters: Implications for therapeutic applications in advanced multiple myeloma and other neoplasias. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **71**, 1357–1368.
- Oancea, M., Mani, A., Hussein, M.A. & Almasan, A. (2004) Apoptosis of multiple myeloma. *International journal of hematology*, **80**, 224–231.
- Obeng, E.A., Carlson, L.M., Gutman, D.M., Harrington, W.J., Lee, K.P. & Boise, L.H. (2006) Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*, **107**, 4907–4916.
- Ocqueteau, M., Orfao, a, Almeida, J., Bladé, J., González, M., García-Sanz, R., López-Berges, C., Moro, M.J., Hernández, J., Escribano, L., Caballero, D., Rozman, M. & San Miguel, J.F. (1998) Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *The American journal of pathology*, **152**, 1655–1665.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, **288**, 1053–1058.
- Oerlemans, R., Franke, N.E., Assaraf, Y.G., Cloos, J., Van Zantwijk, I., Berkers, C.R., Scheffer, G.L., Debipersad, K., Vojtekova, K., Lemos, C., Van Der Heijden, J.W., Ylstra, B., Peters, G.J., Kaspers, G.L., Dijkmans, B.A.C., Scheper, R.J. & Jansen, G. (2008) Molecular basis of bortezomib resistance: Proteasome subunit 25 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*, **112**, 2489–2499.
- Oka, D., Nishimura, K., Shiba, M., Nakai, Y., Arai, Y., Nakayama, M., Takayama, H., Inoue, H., Okuyama, A. & Nonomura, N. (2007) Sesquiterpene lactone parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of renal cell carcinoma by inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B. *International Journal of Cancer*, **120**, 2576–2581.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. & Li, E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, **99**, 247–257.
- Olteanu, H., Wang, H.-Y., Chen, W., McKenna, R.W. & Karandikar, N.J. (2008) Immunophenotypic studies of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *BMC clinical pathology*, **8**, 13 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2606678&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ong F, van N.J.A. de G.-S.G.M.H.J.H.M.S.K.P.M.K.-N.J.C. (1995) Bcl 2 protein expression is not related to short survival in multiple myeloma. *Leukemia*, **9**, 1282–1284.
- Orlowski, R.Z., Stinchcombe, T.E., Mitchell, B.S., Shea, T.C., Baldwin, A.S., Stahl, S., Adams, J., Esseltine, D.-L., Elliott, P.J., Pien, C.S., Guerciolini, R., Anderson, J.K., Depcik-Smith, N.D., Bhagat, R., Lehman, M.J., Novick, S.C., O'Connor, O.A. & Soignet, S.L. (2002) Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies.
- Oshiro, N., Yoshino, K.I., Hidayat, S., Tokunaga, C., Hara, K., Eguchi, S., Avruch, J. & Yonezawa, K. (2004) Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes to Cells*, **9**, 359–366.
- Paiva, B., Almeida, J., Pérez-Andrés, M., Mateo, G., López, A., Rasillo, A., Vidriales, M.-B., López-Berges, M.-C., Miguel, J.F.S. & Orfao, A. (2010) Utility of flow cytometry immunophenotyping



- in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, **78**, 239–252.
- Palmero, E.I., Achatz, M.I., Ashton-Prolla, P., Olivier, M. & Hainaut, P. (2010) Tumor protein 53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni syndrome. *Current opinion in oncology*, **22**, 64–69.
- Palumbo, A. & Anderson, K. (2011a) Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, **364**, 1046–60.
- Palumbo, A. & Anderson, K. (2011b) Multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, **364**, 1046–1060.
- Palumbo, A., Bringhen, S., Larocca, A., Rossi, D., Di Raimondo, F., Magarotto, V., ... Cavo, M. (2014a). Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: Updated follow-up and improved survival. *Journal of Clinical Oncology*, **32**, 634–640. <http://doi.org/10.1200/JCO.2013.52.0023>.
- Palumbo, A., Rajkumar, S. V., San Miguel, J. F., Larocca, A., Niesvizky, R., Morgan, G., ... Orłowski, R. Z. (2014b). International Myeloma Working Group consensus statement for the management, treatment, and supportive care of patients with myeloma not eligible for standard autologous stem-cell transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, **32**, 587–600. <http://doi.org/10.1200/JCO.2013.48.7934>.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y.F., Yu, G., Gentz, R. & Dixit, V.M. (1997a) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science (New York, N.Y.)*, **277**, 815–818.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J. & Dixit, V.M. (1997b) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science (New York, N.Y.)*, **276**, 111–113.
- Pandey, M.K., Sung, B., Kwang, S.A., Kunnumakkara, A.B., Chaturvedi, M.M. & Aggarwal, B.B. (2007) Gambogic acid, a novel ligand for transferrin receptor, potentiates TNF-induced apoptosis through modulation of the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway. *Blood*, **110**, 3517–3525.
- Patel, N.M., Nozaki, S., Shortle, N.H., Bhat-Nakshatri, P., Newton, T.R., Rice, S., Gelfanov, V., Boswell, S.H., Goulet, R.J., Sledge, G.W. & Nakshatri, H. (2000) Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF- $\kappa$ B is enhanced by I $\kappa$ B $\alpha$  super-repressor and parthenolide. *Oncogene*, **19**, 4159–4169.
- Patrawala, S. & Puzanov, I. (2012) Vemurafenib (RG67204, PLX4032): a potent, selective BRAF kinase inhibitor. *Future Oncology*, **8**, 509–523.
- Pearse, R.N., Sordillo, E.M., Yaccoby, S., Wong, B.R., Liau, D.F., Colman, N., Michaeli, J., Epstein, J. & Choi, Y. (2001) Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 11581–11586.
- Pei, H., Zhang, L., Luo, K., Qin, Y., Chesi, M., Fei, F., Bergsagel, P.L., Wang, L., You, Z. & Lou, Z. (2011) MMS19 regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature*, **470**, 124–128.
- Pennati, M., Folini, M. & Zaffaroni, N. (2007) Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions. *Carcinogenesis*, **28**, 1133–1139.
- Pérez-Persona, E., Mateo, G., García-Sanz, R., Mateos, M.V., De Las Heras, N., De Coca, A.G., Hernández, J.M., Galende, J., Martín-Nuñez, G., Báñez, A., Alonso, J.M., Martín, A., López-Berges, C., Orfao, A., San Miguel, J.F. & Vidriales, M.B. (2010) Risk of progression in smouldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: Comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. *British Journal of Haematology*, **148**, 110–114.
- Pérez-Persona, E., Vidriales, M.B., Mateo, G., García-Sanz, R., Mateos, M.V., De Coca, A.G., Galende, J., Martín-Nuñez, G., Alonso, J.M., De Heras, N., Las, Hernández, J.M., Martín, A., López-Berges, C., Orfao, A. & San Miguel, J.F. (2007) New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*, **110**, 2586–2592.

- Perraud, A., Akil, H., Nouaille, M., Petit, D., Labrousse, F., Jauberteau, M.O. & Mathonnet, M. (2011) Expression of p53 and DR5 in normal and malignant tissues of colorectal cancer: Correlation with advanced stages. *Oncology Reports*, **26**, 1091–1097.
- Persad, R., Liu, C., Wu, T.-T., Houlihan, P.S., Hamilton, S.R., Diehl, A.M. & Rashid, A. (2004) Overexpression of caspase-3 in hepatocellular carcinomas. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, **17**, 861–867.
- Pestell, R.G. (2013) New roles of cyclin D1. *The American journal of pathology*, **183**, 3–9 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3702737&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S. & Sabatini, D.M. (2009) DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival. *Cell*, **137**, 873–886.
- Pezzella, F., Tse, A.G., Cordell, J.L., Pulford, K.A., Gatter, K.C. & Mason, D.Y. (1990) Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *The American journal of pathology*, **137**, 225–32 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1877598&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pham, C.G., Bubici, C., Zazzeroni, F., Knabb, J.R., Papa, S., Kuntzen, C. & Franzoso, G. (2007) Upregulation of Twist-1 by NF-kappaB blocks cytotoxicity induced by chemotherapeutic drugs. *Molecular and cellular biology*, **27**, 3920–3935.
- Pietenpol, J.A. & Stewart, Z.A. (2002) Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, **181-182**, 475–481.
- Piette, J., Neel, H. & Maréchal, V. (1997) Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene*, **15**, 1001–1010.
- Podar, K. & Anderson, K.C. (2005) The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: Therapeutic implications. *Blood*, **105**, 1383–1395.
- Podar, K., Catley, L.P., Tai, Y.-T., Shringarpure, R., Carvalho, P., Hayashi, T., Burger, R., Schlossman, R.L., Richardson, P.G., Pandite, L.N., Kumar, R., Hideshima, T., Chauhan, D. & Anderson, K.C. (2004) GW654652, the pan-inhibitor of VEGF receptors, blocks the growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Blood*, **103**, 3474–3479.
- Podar, K., Richardson, P.G., Chauhan, D. & Anderson, K.C. (2007) Targeting the vascular endothelial growth factor pathway in the treatment of multiple myeloma. *Expert review of anticancer therapy*, **7**, 551–566.
- Podar, K., Tai, Y., Davies, F.E., Lentzsch, S., Sattler, M., Hideshima, T., Lin, B.K., Gupta, D., Shima, Y., Chauhan, D., Mitsiades, C., Raje, N., Richardson, P. & Anderson, K.C. (2001a) Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. **98**, 428–436.
- Podar, K., Tai, Y.T., Davies, F.E., Lentzsch, S., Sattler, M., Hideshima, T., Lin, B.K., Gupta, D., Shima, Y., Chauhan, D., Mitsiades, C., Raje, N., Richardson, P. & Anderson, K.C. (2001b) Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood*, **98**, 428–435.
- Pozarowski, P., Grabarek, J. & Darzynkiewicz, Z. (2003) Flow cytometry of apoptosis. *Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.]*, **Chapter 7**, Unit 7.19.
- Preston, D.L., Ron, E., Tokuoka, S., Funamoto, S., Nishi, N., Soda, M., Mabuchi, K. & Kodama, K. (2007) Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiation research*, **168**, 1–64.
- Prideaux, S.M., Conway O'Brien, E. & Chevassut, T.J. (2014) The genetic architecture of multiple myeloma. *Advances in hematology*, **2014**, 1–16 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3996928&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pro, B., Leber, B., Smith, M., Fayad, L., Romaguera, J., Hagemester, F., Rodriguez, A., McLaughlin, P., Samaniego, F., Zwiebel, J., Lopez, A., Kwak, L. & Younes, A. (2008) Phase II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with rituximab in patients with recurrent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *British Journal of Haematology*, **143**, 355–360.



- Prorok, P.C., Andriole, G.L., Bresalier, R.S., Buys, S.S., Chia, D., Crawford, E.D., Fogel, R., Gelmann, E.P., Gilbert, F., Hasson, M.A., Hayes, R.B., Johnson, C.C., Mandel, J.S., Oberman, A., O'Brien, B., Oken, M.M., Rafla, S., Reding, D., Rutt, W., Weissfeld, J.L., *et al.* (2000) Design of the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial.
- Pruneri, G., Fabris, S., Baldini, L., Carboni, N., Zagano, S., Colombi, M.A., Ciceri, G., Lombardi, L., Rocchi, M., Buffa, R., Maiolo, A.T. & Neri, A. (2000) Immunohistochemical analysis of cyclin D1 shows deregulated expression in multiple myeloma with the t(11;14). *The American journal of pathology*, **156**, 1505–1513.
- Puthier, D., Pellat-Deceunynck, C., Barillé, S., Robillard, N., Rapp, M.J., Juge-Morineau, N., Harousseau, J.L., Bataille, R. & Amiot, M. (1999) Differential expression of Bcl-2 in human plasma cell disorders according to proliferation status and malignancy.
- Qin, J.-Z., Ziffra, J., Stennett, L., Bodner, B., Bonish, B.K., Chaturvedi, V., Bennett, F., Pollock, P.M., Trent, J.M., Hendrix, M.J.C., Rizzo, P., Miele, L. & Nickoloff, B.J. (2005) Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer research*, **65**, 6282–6293.
- Qin, Y., Meng, L., Hu, C., Duan, W., Zuo, Z., Lin, L., Zhang, X. & Ding, J. (2007) Gambogic acid inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by binding to its ATPase domain. *Molecular cancer therapeutics*, **6**, 2429–2440.
- Qin, Z.H., Wang, Y., Kikly, K.K., Sapp, E., Kegel, K.B., Aronin, N. & DiFiglia, M. (2001) Pro-caspase-8 Is Predominantly Localized in Mitochondria and Released into Cytoplasm upon Apoptotic Stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 8079–8086.
- Quintás-Cardama, A., Santos, F.P.S. & Garcia-Manero, G. (2011) Histone deacetylase inhibitors for the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **25**, 226–35.
- Raj, K. & Mufti, G.J. (2006) Azacytidine (Vidaza®) in the treatment of myelodysplastic syndromes. *The Clin Risk Mang. Dec*; **2**(4), 377–388.
- Rajkumar, S. V, Gupta, V., Fonseca, R., Dispenzieri, A., Gonsalves, W.I., Larson, D., Ketterling, R.P., Lust, J.A., Kyle, R.A. & Kumar, S.K. (2013) Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Leukemia*, **27**, 1738–44 Available at: <http://www.nature.com.ezp-prod1.hul.harvard.edu/leu/journal/v27/n8/full/leu201386a.html><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3773463&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Rajkumar, S. V. & Greipp, P.R. (2001) Angiogenesis in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, **113**, 565.
- Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M.A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastritis, E., Richardson, P., Landgren, O., Paiva, B., Dispenzieri, A., Weiss, B., LeLeu, X., Zweegman, S., Lonial, S., Rosinol, L., Zamagni, E., Jagannath, S., *et al.* (2014) International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, **15**, e538–e548 Available at: <http://www.thelancet.com/article/S1470204514704425/fulltext> [Accessed October 27, 2014].
- Rajkumar, S.V., Kyle, R.A., Therneau, T.M., Melton, L.J., Bradwell, A.R., Clark, R.J., Larson, D.R., Plevak, M.F., Dispenzieri, A. & Katzmann, J.A. (2005) Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, **106**, 812–817.
- Rajkumar, S.V., Mesa, R.A., Fonseca, R., Schroeder, G., Plevak, M.F., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Lust, J.A., Witzig, T.E., Gertz, M.A., Kyle, R.A., Russell, S.J. & Greipp, P.R. (2002) Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clinical Cancer Research*, **8**, 2210–2216.
- Rampersad, S.N. (2012) Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors*, **12**, 12347–12360.
- Rasmussen, T., Haaber, J., Dahl, I.M., Knudsen, L.M., Kerndrup, G.B., Lodahl, M., Johnsen, H.E. & Kuehl, M. (2010) Identification of translocation products but not K-RAS mutations in memory B cells from patients with multiple myeloma. *Haematologica*, **95**, 1730–1737.

- Rasmussen, T., Kuehl, M., Lodahl, M., Johnsen, H.E. & Dahl, I.M.S. (2005) Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood*, **105**, 317–323.
- Rawstron, A.C., Orfao, A., Beksac, M., Bezdicikova, L., Brooimans, R.A., Bumbea, H., Dalva, K., Fuhler, G., Gratama, J., Hose, D., Kovarova, L., Lioznov, M., Mateo, G., Morilla, R., Mylin, A.K., Omedé, P., Pellat-Deceunynck, C., Andres, M.P., Petrucci, M., Ruggeri, M., *et al.* (2008) Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*, **93**, 431–438.
- Rayburn, E., Zhang, R., He, J. & Wang, H. (2005) MDM2 and human malignancies: expression, clinical pathology, prognostic markers, and implications for chemotherapy. *Current cancer drug targets*, **5**, 27–41.
- Reddy, J., Shivapurkar, N., Takahashi, T., Parikh, G., Stastny, V., Echebiri, C., Crumrine, K., Zöchbauer-Müller, S., Drach, J., Zheng, Y., Feng, Z., Kroft, S.H., McKenna, R.W. & Gazdar, A.F. (2005) Differential methylation of genes that regulate cytokine signaling in lymphoid and hematopoietic tumors. *Oncogene*, **24**, 732–736.
- Reece, D., Song, K.W., Fu, T., Roland, B., Chang, H., Horsman, D.E., Mansoor, A., Chen, C., Masih-Khan, E., Trieu, Y., Bruyere, H., Stewart, D.A. & Bahlis, N.J. (2009) Influence of cytogenetics in patients with relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone: Adverse effect of deletion 17p13. *Blood*, **114**, 522–525.
- Reed, J.C. (1997) Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Seminars in hematology*, **34**, 9–19.
- Renner, S., Weisz, J., Krajewski, S., Krajewska, M., Reed, J.C. & Lichtenstein, A. (2000) Expression of BAX in plasma cell dyscrasias. *Clinical Cancer Research*, **6**, 2371–2380.
- Riccardi, C. & Nicoletti, I. (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*, **1**, 1458–1461.
- Richardson, P., Mitsiades, C., Colson, K., Reilly, E., McBride, L., Chiao, J., Sun, L., Ricker, J., Rizvi, S., Oerth, C., Atkins, B., Fearen, I., Anderson, K. & Siegel, D. (2008) Phase I trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with advanced multiple myeloma.
- Richardson, P.G., Schlossman, R.L., Alsina, M., Weber, D.M., Coutre, S.E., Gasparetto, C., Mukhopadhyay, S., Ondovik, M.S., Khan, M., Paley, C.S. & Lonial, S. (2013) PANORAMA 2: Panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. *Blood*, **122**, 2331–2337.
- Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M.W., Irwin, D., Stadtmauer, E.A., Facon, T., Harousseau, J.-L., Ben-Yehuda, D., Lonial, S., Goldschmidt, H., Reece, D., San-Miguel, J.F., Bladé, J., Boccardo, M., Cavenagh, J., Dalton, W.S., Boral, A.L., Esseltine, D.L., Porter, J.B., Schenkein, D., *et al.* (2005) Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma.
- Rinsky, R.A., Hornung, R.W., Silver, S.R. & Tseng, C.Y. (2002) Benzene exposure and hematopoietic mortality: A long-term epidemiologic risk assessment. *American Journal of Industrial Medicine*, **42**, 474–480.
- Rius, M., Stresemann, C., Keller, D., Brom, M., Schirmacher, E., Keppler, D. & Lyko, F. (2009) Human concentrative nucleoside transporter 1-mediated uptake of 5-azacytidine enhances DNA demethylation. *Molecular cancer therapeutics*, **8**, 225–231.
- Robert, T., Vanoli, F., Chiolo, I., Shubassi, G., Bernstein, K.A., Rothstein, R., Botrugno, O.A., Parazzoli, D., Oldani, A., Minucci, S. & Foiani, M. (2011) HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature*, **471**, 74–79.
- Romagnoli, M., Trichet, V., David, C., Clément, M., Moreau, P., Bataille, R. & Barillé-Nion, S. (2007) Significant impact of survivin on myeloma cell growth. *Leukemia*.
- Ronchetti, D., Greco, A., Compasso, S., Colombo, G., Dell’Era, P., Otsuki, T., Lombardi, L. & Neri, A. (2001) Deregulated FGFR3 mutants in multiple myeloma cell lines with t(4;14): comparative analysis of Y373C, K650E and the novel G384D mutations. *Oncogene*, **20**, 3553–3562.

- Rong, J.J., Hu, R., Song, X.M., Ha, J., Lu, N., Qi, Q., Tao, L., You, Q.D. & Guo, Q.L. (2010) Gambogic acid triggers DNA damage signaling that induces p53/p21Waf1/CIP1 activation through the ATR-Chk1 pathway. *Cancer Letters*, **296**, 55–64.
- Roodman, G.D. (2010) Pathogenesis of myeloma bone disease. *Journal of Cellular Biochemistry*, **109**, 283–291.
- Rosiñol, L., Oriol, A., Teruel, A.I., Hernández, D., López-Jiménez, J., De La Rubia, J., Granell, M., Besalduch, J., Palomera, L., González, Y., Etxebeste, M.A., Díaz-Mediavilla, J., Hernández, M.T., De Arriba, F., Gutiérrez, N.C., Martín-Ramos, M.L., Cibeira, M.T., Mateos, M.V., Martínez, J., Alegre, A., *et al.* (2012) Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: A randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. *Blood*, **120**, 1589–1596.
- Ross, F.M., Chiecchio, L., Dagrada, G., Protheroe, R.K.M., Stockley, D.M., Harrison, C.J., Cross, N.C., Szubert, A.J., Drayson, M.T. & Morgan, G.J. (2010) The t(14;20) is a poor prognostic factor in myeloma but is associated with long-term stable disease in monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Haematologica*, **95**, 1221–1225.
- Roux, S., Meignin, V., Quillard, J., Meduri, G., Guiochon-Mantel, A., Ferman, J.-P., Milgrom, E. & Mariette, X. (2002) RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) and RANKL expression in multiple myeloma. *British journal of haematology*, **117**, 86–92.
- Rozenblat, S., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H., Cohen, Y. & Dovrat, S. (2008) Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochemical Pharmacology*, **75**, 369–382.
- Rudek, M.A., Zhao, M., He, P., Hartke, C., Gilbert, J., Gore, S.D., Carducci, M.A. & Baker, S.D. (2005) Pharmacokinetics of 5-azacitidine administered with phenylbutyrate in patients with refractory solid tumors or hematologic malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 3906–3911.
- Rudin, C.M., Hann, C.L., Garon, E.B., Ribeiro De Oliveira, M., Bonomi, P.D., Camidge, D.R., Chu, Q., Giaccone, G., Khaira, D., Ramalingam, S.S., Ranson, M.R., Dive, C., McKeegan, E.M., Chyla, B.J., Dowell, B.L., Chakravarty, A., Nolan, C.E., Rudersdorf, N., Busman, T.A., Mabry, M.H., *et al.* (2012) Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, **18**, 3163–3169.
- Ryan, A.E., Shanahan, F., O’Connell, J. & Houston, A.M. (2005) Addressing the ‘Fas counterattack’ controversy: blocking fas ligand expression suppresses tumor immune evasion of colon cancer in vivo. *Cancer research*, **65**, 9817–9823.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. & Vandenabeele, P. (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, **23**, 2861–2874.
- Saha, M.N., Jiang, H., Yang, Y., Zhu, X., Wang, X., Schimmer, A.D., Qiu, L. & Chang, H. (2012) Targeting p53 via JNK pathway: A novel role of RITA for apoptotic signaling in multiple myeloma. *PLoS ONE*, **7**.
- Saha, M.N., Qiu, L. & Chang, H. (2013) Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies. *Journal of hematology & oncology*, **6**, 23 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3614876&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Salhia, B., Baker, A., Ahmann, G., Auclair, D., Fonseca, R. & Carpten, J.D. (2010) DNA methylation analysis determines the high frequency of genic hypomethylation and low frequency of hypermethylation events in plasma cell tumors. *Cancer Research*, **70**, 6934–6944.
- San Miguel, J.F., Schlag, R., Khuageva, N.K., Dimopoulos, M.A., Shpilberg, O., Kropff, M., Spicka, I., Petrucci, M.T., Palumbo, A., Samoilova, O.S., Dmoszynska, A., Abdulkadyrov, K.M., Schots, R., Jiang, B., Mateos, M.-V., Anderson, K.C., Esseltine, D.L., Liu, K., Cakana, A., van de Velde, H., *et al.* (2008a) Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma.
- San Miguel, J.F., Schlag, R., Khuageva, N.K., Dimopoulos, M.A., Shpilberg, O., Kropff, M., Spicka, I., Petrucci, M.T., Palumbo, A., Samoilova, O.S., Dmoszynska, A., Abdulkadyrov, K.M., Schots, R., Jiang, B., Mateos, M.-V., Anderson, K.C., Esseltine, D.L., Liu, K., Cakana, A., van de Velde, H., *et al.* (2008b) Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma.

- San-Miguel, J.F. *et al.*. (2011) Update on a Phase III Study of Panobinostat with Bortezomib and Dexamethasone in Patients with Relapsed Multiple Myeloma: PANORAMA 1. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, **118**, 3976.
- Sanlioglu, A.D., Dirice, E., Elpek, O., Korcum, A.F., Ozdogan, M., Suleymanlar, I., Balci, M.K., Griffith, T.S. & Sanlioglu, S. (2009) High TRAIL death receptor 4 and decoy receptor 2 expression correlates with significant cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Pancreas*, **38**, 154–160.
- Sanlioglu, A.D., Korcum, A.F., Pestereli, E., Erdogan, G., Karaveli, S., Savas, B., Griffith, T.S. & Sanlioglu, S. (2007) TRAIL Death Receptor-4 Expression Positively Correlates With the Tumor Grade in Breast Cancer Patients With Invasive Ductal Carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, **69**, 716–723.
- Santra, M., Zhan, F., Tian, E., Barlogie, B. & Shaughnessy, J. (2003) A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains an IGH/MMSET fusion transcript. *Blood*, **101**, 2374–2376.
- Sanz-Rodríguez, F., Hidalgo, A. & Teixidó, J. (2001) Chemokine stromal cell-derived factor-1 modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood*, **97**, 346–351.
- Sarmiento-Ribeiro, a. B., Dourado, M., Paiva, a., Freitas, a., Silva, T., Regateiro, F. & Oliveira, C.R. (2012) Apoptosis Deregulation Influences Chemoresistance to Azaguanine in Human Leukemic Cell Lines. *Cancer Investigation*, **30**, 331–342.
- Sati, H.I., Apperley, J.F., Greaves, M., Lawry, J., Gooding, R., Russell, R.G. & Croucher, P.I. (1998) Interleukin-6 is expressed by plasma cells from patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol*, **101**, 287–295 Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9609524](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9609524).
- Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J. & Shimizu, K. (2011) MicroRNAs and epigenetics. *FEBS Journal*, **278**, 1598–1609.
- Sawyer, J.R. (2011) The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genetics*, **204**, 3–12.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1999) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 1541–1548.
- Scambia, G., De Vincenzo, R., Ranelletti, F.O., Panici, P.B., Ferrandina, G., D'Agostino, G., Fattorossi, A., Bombardelli, E. & Mancuso, S. (1996) Antiproliferative effect of silybin on gynaecological malignancies: Synergism with cisplatin and doxorubicin. *European Journal of Cancer*, **32**, 877–882.
- Schimmer, A.D., Dalili, S., Batey, R.A. & Riedl, S.J. (2006) Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell death and differentiation*, **13**, 179–188.
- Schmidt-Hieber, M., Gutierrez, M.L., Perez-Andres, M., Paiva, B., Rasillo, A., Tabernero, M.D., Sayagues, J.M., Lopez, A., Barcena, P., Sanchez, M.L., Gutierrez, N., San Miguel, J. & Orfao, A. (2012) Cytogenetic profiles in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a study in highly purified aberrant plasma cells. *Haematologica*.
- Schneider, P., Olson, D., Tardivel, A., Browning, B., Lugovskoy, A., Gong, D., Dobles, M., Hertig, S., Hofmann, K., Van Vlijmen, H., Hsu, Y.-M., Burkly, L.C., Tschopp, J. & Zheng, T.S. (2003) Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *The Journal of biological chemistry*, **278**, 5444–5454.
- Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J.L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N. & Tschopp, J. (1997) TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-κB. *Immunity*, **7**, 831–836.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. & Peter, M.E. (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *European journal of biochemistry / FEBS*, **254**, 439–459.

- Seidl, S., Ackermann, J., Kaufmann, H., Keck, A., Nösslinger, T., Zielinski, C.C., Drach, J. & Zöchbauer-Müller, S. (2004) DNA-methylation analysis identifies the E-cadherin gene as a potential marker of disease progression in patients with monoclonal gammopathies. *Cancer*, **100**, 2598–2606.
- Sewify, E.M., Afifi, O.A., Mosad, E., Zaki, A.H. & El Gammal, S.A. (2014) Cyclin D1 amplification in multiple myeloma is associated with multidrug resistance expression. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, **14**, 215–222.
- Shah, J.J., Orłowski, R.Z., Thomas, S.K., Alexanian, R., Wang, M., Qazilbash, M.H., Popat, U.R., Parmar, S., Shah, N., Bashir, Q., Champlin, R.E. & Weber, D.M. (2012a) Final Results of a Phase III Trial of the Combination of Concurrent Lenalidomide, Thalidomide and Dexamethasone in Patients with Relapsed and/or Refractory Myeloma. *ASH Annual Meeting Abstracts*, **120**, 75 Available at: <http://abstracts.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/ashmtg120/21/75>.
- Shah, J.J., Thomas, S.K., Weber, D.M., Wang, M., Alexanian, R., Qazilbash, M.H., Bashir, Q., Parmar, S., Shah, N., Popat, U.R. & Orłowski, R.Z. (2012b) Phase 1/1b Study of the Efficacy and Safety of the Combination of Panobinostat + Carfilzomib in Patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *ASH Annual Meeting Abstracts*, **120**, 4081– Available at: <http://abstracts.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/ashmtg120/21/4081>.
- Shain, K.H. & Dalton, W.S. (2001) Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR. *Molecular cancer therapeutics*, **1**, 69–78.
- Sharma, A., Heuck, C.J., Fazzari, M.J., Mehta, J., Singhal, S., Grealley, J.M. & Verma, A. (2010a) DNA methylation alterations in multiple myeloma as a model for epigenetic changes in cancer. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, **2**, 654–669.
- Sharma, S., Kelly, T.K. & Jones, P.A. (2010b) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, **31**, 27–36.
- Shaughnessy, J., Gabrea, A., Qi, Y., Brents, L., Zhan, F., Tian, E., Sawyer, J., Barlogie, B., Leif Bergsagel, P. & Kuehl, M. (2001) Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood*, **98**, 217–223.
- Shaughnessy, J.D., Zhan, F., Burington, B.E., Huang, Y., Colla, S., Hanamura, I., Stewart, J.P., Kordsmeier, B., Randolph, C., Williams, D.R., Xiao, Y., Xu, H., Epstein, J., Anaissie, E., Krishna, S.G., Cottler-Fox, M., Hollmig, K., Mohiuddin, A., Pineda-Roman, M., Tricot, G., et al. (2007) A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*, **109**, 2276–2284.
- Shaw, G.R. (2006) Nonsecretory plasma cell myeloma - Becoming even more rare with serum free light-chain assay: A brief review. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, **130**, 1212–1215.
- Sheridan, J.P., Marsters, S.A., Pitti, R.M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C.L., Baker, K., Wood, W.I., Goddard, A.D., Godowski, P. & Ashkenazi, A. (1997) Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science (New York, N.Y.)*, **277**, 818–821.
- Shi, L., Wang, S., Zangari, M., Xu, H., Cao, T.M., Xu, C., Wu, Y., Xiao, F., Liu, Y., Yang, Y., Salama, M., Li, G., Tricot, G. & Zhan, F. (2010) Over-expression of CKS1B activates both MEK/ERK and JAK/STAT3 signaling pathways and promotes myeloma cell drug-resistance. *Oncotarget*, **1**, 22–33.
- Shi, X., Chen, X., Li, X., Lan, X., Zhao, C., Liu, S., Huang, H., Liu, N., Liao, S., Song, W., Zhou, P., Wang, S., Xu, L., Wang, X., Dou, Q.P. & Liu, J. (2014) Gambogic acid induces apoptosis in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells via inducing proteasome inhibition and caspase-dependent bcr-abl downregulation. *Clinical Cancer Research*, **20**, 151–163.
- Shi, Y., Frankel, A., Radvanyi, L.G., Penn, L.Z., Miller, R.G. & Mills, G.B. (1995) Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. *Cancer research*, **55**, 1982–1988.
- Shirley, S. & Micheau, O. (2013) Targeting c-FLIP in cancer. *Cancer Letters*, **332**, 141–150.
- Shirley, S., Morizot, A. & Micheau, O. (2011) Regulating TRAIL Receptor-Induced Cell Death at the Membrane: A Deadly Discussion. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, **6**, 311–323.
- Shivapurkar, N., Reddy, J., Chaudhary, P.M. & Gazdar, A.F. (2003) Apoptosis and lung cancer: A review. *Journal of Cellular Biochemistry*, **88**, 885–898.



- Shivapurkar, N., Toyooka, S., Toyooka, K.O., Reddy, J., Miyajima, K., Suzuki, M., Shigematsu, H., Takahashi, T., Parikh, G., Pass, H.I., Chaudhary, P.M. & Gazdar, A.F. (2004) Aberrant methylation of trail decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types. *International Journal of Cancer*, **109**, 786–792.
- Shojaei, F. (2012) Anti-angiogenesis therapy in cancer: Current challenges and future perspectives. *Cancer Letters*, **320**, 130–137.
- Short, K.D., Rajkumar, S. V, Larson, D., Buadi, F., Hayman, S., Dispenzieri, A., Gertz, M., Kumar, S., Mikhael, J., Roy, V., Kyle, R.A. & Lacy, M.Q. (2011) Incidence of extramedullary disease in patients with multiple myeloma in the era of novel therapy, and the activity of pomalidomide on extramedullary myeloma. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, **25**, 906–908.
- Shukla, A., Chaurasia, P. & Bhaumik, S.R. (2009) Histone methylation and ubiquitination with their cross-talk and roles in gene expression and stability. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **66**, 1419–1433.
- Shukla, V., Vaissière, T. & Herceg, Z. (2008) Histone acetylation and chromatin signature in stem cell identity and cancer. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **637**, 1–15.
- Siegel, D.S.; Dimopoulos, M.A.; Yoon, S.-S.; Laubach, J.P.; Kaufman, J.L.; Goldschmidt, H.; Reece, D.E.; Leleu, X.; Durrant, S.; Offner, F.C.; Siegel, D.S.; Dimopoulos, M.A.; Yoon, S.-S.; Laubach, J.P.; Kaufman, J.L.; Goldschmidt, H.; Reece, D.E.; L, F.C., *et al.* (2011) Vantage 095: Vorinostat in Combination with Bortezomib in Salvage Multiple Myeloma Patients: Final Study Results of a Global Phase 2b. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, **118**, 480.
- Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopoulos, N., Yin, H.L. & Hayoz, D. (2004) Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, **61**, 2614–2623.
- Silke, J., Hawkins, C.J., Ekert, P.G., Chew, J., Day, C.L., Pakusch, M., Verhagen, A.M. & Vaux, D.L. (2002) The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites. *The Journal of cell biology*, **157**, 115–124.
- Silvestris, F., Cafforio, P., Calvani, N. & Dammacco, F. (2004) Impaired osteoblastogenesis in myeloma bone disease: Role of upregulated apoptosis by cytokines and malignant plasma cells. *British Journal of Haematology*, **126**, 475–486.
- Singh, R.P., Deep, G., Chittechath, M., Kaur, M., Dwyer-Nield, L.D., Malkinson, A.M. & Agarwal, R. (2006) Effect of silibinin on the growth and progression of primary lung tumors in mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **98**, 846–855.
- Sjöström, J., Blomqvist, C., Von Boguslawski, K., Bengtsson, N.O., Mjaaland, I., Malmström, P., Ostensadt, B., Wist, E., Valvere, V., Takayama, S., Reed, J.C. & Saksela, E. (2002) The predictive value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clinical Cancer Research*, **8**, 811–816.
- Skiriute, D., Vaitkiene, P., Saferis, V., Asmoniene, V., Skauminas, K., Deltuva, V. & Tamasauskas, A. (2012) MGMT, GATA6, CD81, DR4, and CASP8 gene promoter methylation in glioblastoma. *BMC Cancer*, **12**, 218.
- Slee, E.A., Adrain, C. & Martin, S.J. (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 7320–7326.
- Smith, E.M., Boyd, K. & Davies, F.E. (2010) The potential role of epigenetic therapy in multiple myeloma. *British journal of haematology*, **148**, 702–13 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19912222> [Accessed May 8, 2014].
- Smyth, M.J., Godfrey, D.I. & Trapani, J.A. (2001) A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature immunology*, **2**, 293–299.
- Solary, E., Guiguet, M., Zeller, V., Casasnovas, R.O., Caillot, D., Chavanet, P., Guy, H. & Mack, G. (1992) Radioimmunoassay for the measurement of serum IL-6 and its correlation with tumour cell mass parameters in multiple myeloma. *American journal of hematology*, **39**, 163–171.

- Solly, S. (1844) Remarks on the pathology of mollities ossium; with cases. *Med Chir Trans.*, **27** [435]–461, 498–3–498–8.
- Song, Y.-F., Xu, R., Zhang, X.-H., Chen, B.-B., Chen, Q., Chen, Y.-M. & Xie, Y. (2006) High-frequency promoter hypermethylation of the deleted in liver cancer-1 gene in multiple myeloma. *Journal of clinical pathology*, **59**, 947–951.
- Sonneveld, P. (1995) Modulation of multidrug resistance in multiple myeloma. *Baillieres Clin Haematol*, **8**, 831–844 Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8845575](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8845575).
- Sonneveld, P., Suci, S., Weijermans, P., Beksac, M., Neuwirtova, R., Solbu, G., Lokhorst, H., van der Lelie, J., Dohner, H., Gerhartz, H., Segeren, C.M., Willemze, R. & Lowenberg, B. (2001) Cyclosporin A combined with vincristine, doxorubicin and dexamethasone (VAD) compared with VAD alone in patients with advanced refractory multiple myeloma: an EORTC-HOVON randomized phase III study (06914). *British journal of haematology*, **115**, 895–902 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11843823>.
- Spencer, G.J., Utting, J.C., Etheridge, S.L., Arnett, T.R. & Genever, P.G. (2006) Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Journal of cell science*, **119**, 1283–1296.
- Spets, H., Strömberg, T., Georgii-Hemming, P., Siljason, J., Nilsson, K. & Jernberg-Wiklund, H. (2002) Expression of the bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells: regulation during interleukin-6(IL-6)-induced growth and survival. *European journal of haematology*, **69**, 76–89.
- Srivastava, R.K., Kurzrock, R. & Shankar, S. (2010) MS-275 sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells, inhibits angiogenesis and metastasis, and reverses epithelial-mesenchymal transition in vivo. *Molecular cancer therapeutics*, **9**, 3254–3266.
- Stanganelli, C., Arbelbide, J., Fantl, D.B., Corrado, C. & Slavutsky, I. (2010) DNA methylation analysis of tumor suppressor genes in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Annals of hematology*, **89**, 191–199.
- Staudt, L.M. (2010) Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2**, a000109.
- Steensma, D.P. (2009) Decitabine treatment of patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, **33**.
- Sternberg, C.N., Dumez, H., Van Poppel, H., Skoneczna, I., Sella, A., Daugaard, G., Gil, T., Graham, J., Carpentier, P., Calabro, F., Collette, L. & Lacombe, D. (2009) Docetaxel plus oblimersen sodium (Bcl-2 antisense oligonucleotide): an EORTC multicenter, randomized phase II study in patients with castration-resistant prostate cancer.
- Stewart, A.K., Bergsagel, P.L., Greipp, P.R., Dispenzieri, A., Gertz, M.A., Hayman, S.R., Kumar, S., Lacy, M.Q., Lust, J.A., Russell, S.J., Witzig, T.E., Zeldenrust, S.R., Dingli, D., Reeder, C.B., Roy, V., Kyle, R.A., Rajkumar, S. V & Fonseca, R. (2007) A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patient counseling and choice of therapy. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **21**, 529–534.
- Stewart, A.K., Richardson, P.G. & San-Miguel, J.F. (2009) How I treat multiple myeloma in younger patients. *Blood*, **114**, 5436–5443.
- Strahl, B.D. & Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41–45.
- Surget, S., Descamps, G., Brosseau, C., Normant, V., Maïga, S., Gomez-Bougie, P., Gouy-Colin, N., Godon, C., Béné, M.C., Moreau, P., Le Gouill, S., Amiot, M. & Pellat-Deceunynck, C. (2014) RITA (Reactivating p53 and Inducing Tumor Apoptosis) is efficient against TP53 abnormal myeloma cells independently of the p53 pathway. *BMC cancer*, **14**, 437 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4094448&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 25, 2014].
- Suzuki, Y., Takahashi-Niki, K., Akagi, T., Hashikawa, T. & Takahashi, R. (2004) Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways. *Cell death and differentiation*, **11**, 208–216.



- Swann, J.B. & Smyth, M.J. (2007) Immune surveillance of tumors. *The Journal of clinical investigation*, **117**, 1137–1146.
- Sweeney, C.J., Mehrotra, S., Sadaria, M.R., Kumar, S., Shortle, N.H., Roman, Y., Sheridan, C., Campbell, R.A., Murry, D.J., Badve, S. & Nakshatri, H. (2005) The sesquiterpene lactone parthenolide in combination with docetaxel reduces metastasis and improves survival in a xenograft model of breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*, **4**, 1004–1012.
- Taberlay, P.C. & Jones, P.A. (2011) DNA methylation and cancer. *Progress in Drug Research*, **67**, 1–23.
- Taheri, M. & Mahjoubi, F. (2013) MRP1 but not MDR1 is associated with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Disease Markers*, **34**, 387–393.
- Tai, Y.-T., Li, X.-F., Breitkreutz, I., Song, W., Neri, P., Catley, L., Podar, K., Hideshima, T., Chauhan, D., Rajee, N., Schlossman, R., Richardson, P., Munshi, N.C. & Anderson, K.C. (2006) Role of B-cell-activating factor in adhesion and growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer research*, **66**, 6675–6682.
- Takata, T., Tanaka, F., Yamada, T., Yanagihara, K., Otake, Y., Kawano, Y., Nakagawa, T., Miyahara, R., Oyanagi, H., Inui, K. & Wada, H. (2001) Clinical significance of caspase-3 expression in pathologic-stage I, nonsmall-cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, **96**, 54–60.
- Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H. & Okumura, K. (2002) Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *The Journal of experimental medicine*, **195**, 161–169.
- Tartaglia, L.A. & Goeddel, D. V (1992) Two TNF receptors. *Immunology today*, **13**, 151–153.
- Tashiro, E., Tsuchiya, A. & Imoto, M. (2007) Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Science*, **98**, 629–635.
- Templeton, A.J., Dutoit, V., Cathomas, R., Rothermundt, C., Bäertschi, D., Dröge, C., Gautschi, O., Borner, M., Fechter, E., Stenner, F., Winterhalder, R., Müller, B., Schiess, R., Wild, P.J., Rüschoff, J.H., Thalmann, G., Dietrich, P.-Y., Aebbersold, R., Klingbiel, D. & Gillessen, S. (2013) Phase 2 trial of single-agent everolimus in chemotherapy-naive patients with castration-resistant prostate cancer (SAKK 08/08). *European urology*, **64**, 150–8 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0302283813002947>.
- Terpos, E., Szydlo, R., Apperley, J.F., Hatjiharissi, E., Politou, M., Meletis, J., Viniou, N., Yataganas, X., Goldman, J.M. & Rahemtulla, A. (2003) Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood*, **102**, 1064–1069.
- Tian, E., Zhan, F., Walker, R., Rasmussen, E., Ma, Y., Barlogie, B. & Shaughnessy, J.D. (2003) The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, **349**, 2483–2494.
- Tiedemann, R.E., Gonzalez-Paz, N., Kyle, R.A., Santana-Davila, R., Price-Troska, T., Van Wier, S.A., Chng, W.J., Ketterling, R.P., Gertz, M.A., Henderson, K., Greipp, P.R., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Rajkumar, S. V, Bergsagel, P.L., Stewart, A.K. & Fonseca, R. (2008) Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **22**, 1044–1052.
- Timmer, T., De Vries, E.G.E. & De Jong, S. (2002) Fas receptor-mediated apoptosis: A clinical application? *Journal of Pathology*, **196**, 125–134.
- Todoerti, K., Barbui, V., Pedrini, O., Lionetti, M., Fossati, G., Mascagni, P., Rambaldi, A., Neri, A., Introna, M., Lombardi, L. & Golay, J. (2010) Pleiotropic anti-myeloma activity of ITF2357: Inhibition of interleukin-6 receptor signaling and repression of miR-19a and miR-19b. *Haematologica*, **95**, 260–269.
- Tomlinson, E., Palaniyappan, N., Tooth, D. & Layfield, R. (2007) Methods for the purification of ubiquitinated proteins. *Proteomics*, **7**, 1016–1022.
- Toor, A.A., Payne, K.K., Chung, H.M., Sabo, R.T., Hazlett, A.F., Kmiecik, M., Sanford, K., Williams, D.C., Clark, W.B., Roberts, C.H., Mccarty, J.M. & Manjili, M.H. (2012) Epigenetic induction of adaptive immune response in multiple myeloma: Sequential azacitidine and lenalidomide generate cancer testis antigen-specific cellular immunity. *British Journal of Haematology*, **158**, 700–711.

- Trudel, S., Zhi, H.L., Rauw, J., Tiedemann, R.E., Xiao, Y.W. & Stewart, A.K. (2007) Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood*, **109**, 5430–5438.
- Tsai, H.C., Li, H., Van Neste, L., Cai, Y., Robert, C., Rassool, F. V., Shin, J.J., Harbom, K.M., Beatty, R., Pappou, E., Harris, J., Yen, R.W.C., Ahuja, N., Brock, M. V., Stearns, V., Feller-Kopman, D., Yarmus, L.B., Lin, Y.C., Welm, A.L., Issa, J.P., *et al.* (2012) Transient Low Doses of DNA-Demethylating Agents Exert Durable Antitumor Effects on Hematological and Epithelial Tumor Cells. *Cancer Cell*, **21**, 430–446.
- Tshuikina, M., Jernberg-Wiklund, H., Nilsson, K. & Oberg, F. (2008) Epigenetic silencing of the interferon regulatory factor ICSBP/IRF8 in human multiple myeloma. *Experimental hematology*, **36**, 1673–1681.
- Tsuruta, T., Oh-hashi, K., Kiuchi, K. & Hirata, Y. (2008) Degradation of caspase-activated DNase by the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, **1780**, 793–799.
- Tu, Y., Gardner, A. & Lichtenstein, A. (2000) The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: Roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Research*, **60**, 6763–6770.
- Tu, Y., Renner, S., Xu, F., Fleishman, A., Taylor, J., Weisz, J., Vescio, R., Rettig, M., Berenson, J., Krajewski, S., Reed, J.C. & Lichtenstein, A. (1998) BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. *Cancer research*, **58**, 256–262.
- Turesson, I., Kovalchik, S.A., Pfeiffer, R.M., Kristinsson, S.Y., Goldin, L.R., Drayson, M.T. & Landgren, O. (2014) Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of lymphoid and myeloid malignancies: 728 cases followed up to 30 years in Sweden. *Blood*, **123**, 338–345.
- Turker, M.S. (2002) Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene*, **21**, 5388–5393.
- Turner, J.G., Gump, J.L., Zhang, C., Cook, J.M., Marchion, D., Hazlehurst, L., Munster, P., Schell, M.J., Dalton, W.S. & Sullivan, D.M. (2006) ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood*, **108**, 3881–3889.
- Turner, N. & Grose, R. (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 116–129.
- U.S. National Institutes of Health (2013) ClinicalTrials.gov. *clinicaltrials.gov* Available at: <http://clinicaltrials.gov/>.
- Uchida, T., Kinoshita, T., Ohno, T., Ohashi, H., Nagai, H. & Saito, H. (2001) Hypermethylation of p16INK4A gene promoter during the progression of plasma cell dyscrasia. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **15**, 157–165.
- UK, C.R. (2013) Cancer Incidence for Common Cancers. *Cancer Research UK*, 1.
- Ullah, M.F. (2008) Cancer multidrug resistance (MDR): A major impediment to effective chemotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **9**, 1–6.
- Urashima, M., Chauhan, D., Uchiyama, H., Freeman, G.J. & Anderson, K.C. (1995) CD40 ligand triggered interleukin-6 secretion in multiple myeloma. *Blood*, **85**, 1903–1912.
- Vacca, A. & Ribatti, D. (2006) Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **20**, 193–199.
- Vaitkieniė, P., Skiriutė, D., Skauminas, K. & Tamašauskas, A. (2013) GATA4 and DcR1 methylation in glioblastomas. *Diagnostic pathology*, **8**, 7 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3599597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Valente, L.J., Gray, D.H.D., Michalak, E.M., Pinon-Hofbauer, J., Egle, A., Scott, C.L., Janic, A. & Strasser, A. (2013) P53 Efficiently Suppresses Tumor Development in the Complete Absence of Its Cell-Cycle Inhibitory and Proapoptotic Effectors p21, Puma, and Noxa. *Cell Reports*, **3**, 1339–1345.
- Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D. & Ashkenazi, A. (2005) Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 40599–40608.
- Vaux, D.L., Cory, S. & Adams, J.M. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, **335**, 440–442.

- Velangi, M.R., Matheson, E.C., Morgan, G.J., Jackson, G.H., Taylor, P.R., Hall, A.G. & Irving, J.A.E. (2004) DNA mismatch repair pathway defects in the pathogenesis and evolution of myeloma. *Carcinogenesis*, **25**, 1795–1803.
- Villunger, A., Huang, D.C., Holler, N., Tschopp, J. & Strasser, A. (2000) Fas ligand-induced c-Jun kinase activation in lymphoid cells requires extensive receptor aggregation but is independent of DAXX, and Fas-mediated cell death does not involve DAXX, RIP, or RAIDD. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **165**, 1337–1343.
- Virmani, A.K., Muller, C., Rath, A., Zochbauer-Mueller, S., Mathis, M. & Gazdar, A.F. (2001) Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **7**, 584–589.
- Vivanco, I. & Sawyers, C.L. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer*, **2**, 489–501.
- Voorhees, P.M., Chen, Q., Kuhn, D.J., Small, G.W., Hunsucker, S.A., Strader, J.S., Corringham, R.E., Zaki, M.H., Nemeth, J.A. & Orlowski, R.Z. (2007) Inhibition of interleukin-6 signaling with CNTO 328 enhances the activity of bortezomib in preclinical models of multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, **13**, 6469–6478.
- Voorhees, P.M., Manges, R.F., Sonneveld, P., Jagannath, S., Somlo, G., Krishnan, A., Lentzsch, S., Frank, R.C., Zweegman, S., Wijermans, P.W., Orlowski, R.Z., Kranenburg, B., Hall, B., Casneuf, T., Qin, X., Van de Velde, H., Xie, H. & Thomas, S.K. (2013) A phase 2 multicentre study of siltuximab, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, **161**, 357–366.
- De Vos, J., Jourdan, M., Tarte, K., Jasmin, C. & Klein, B. (2000) JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *British Journal of Haematology*, **109**, 823–828.
- Voso, M.T., Scardocci, A., Guidi, F., Zini, G., Di Mario, A., Pagano, L., Hohaus, S. & Leone, G. (2004) Aberrant methylation of DAP-kinase in therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood*, **103**, 698–700.
- Van Criekinge, W., Bosch, L.J.W., Trooskens, G., Snaebjornsson, P., Haan, J., Pelosof, L.C., Koopman, M., Tol, J., Louwagie, J., Dehaspe, L., Van Grieken, N.C.T., Ystra, B., Verheul, H.M.W., Van Engeland, M., Nagtegaal, I.D., Herman, J.G., Punt, C.J.A., Carvalho, B., Meijer, G.A. (2013) Association of DNA promoter hypermethylation of decoy receptor 1 (DCR1) with poor response to irinotecan in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **31**, Available at: [http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/31/15\\_suppl/3552?sid=3122b00d-310b-4929-be88-2229ca8de289](http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/31/15_suppl/3552?sid=3122b00d-310b-4929-be88-2229ca8de289) <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=71098656>.
- Wajant, H. (2003) Death receptors. *Essays in biochemistry*, **39**, 53–71.
- Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., Schuh, J.C. & Lynch, D.H. (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature medicine*, **5**, 157–163.
- Waldeyer, W. (1875) Ueber Bindegewebszellen. *Arch. Micros. Anat.*, **11**, 176.
- Walker, B.A., Leone, P.E., Chiecchio, L., Dickens, N.J., Jenner, M.W., Boyd, K.D., Johnson, D.C., Gonzalez, D., Dagrada, G.P., Protheroe, R.K.M., Konn, Z.J., Stockley, D.M., Gregory, W.M., Davies, F.E., Ross, F.M. & Morgan, G.J. (2010) A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*, **116**.
- Walker, B.A., Wardell, C.P., Chiecchio, L., Smith, E.M., Boyd, K.D., Neri, A., Davies, F.E., Ross, F.M. & Morgan, G.J. (2011) Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood*, **117**, 553–562.
- Vande Walle, L., Lamkanfi, M. & Vandenabeele, P. (2008) The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell death and differentiation*, **15**, 453–460.

- Wang, D., Lu, J. & Tindall, D.J. (2013) Androgens regulate TRAIL-induced cell death in prostate cancer cells via multiple mechanisms. *Cancer Letters*, **335**, 136–144.
- Wang, N. (2014) Recent advances in antimultiple myeloma drug development. **3**, 261–277.
- Wang, T., Wei, J., Qian, X., Ding, Y., Yu, L. & Liu, B. (2008) Gambogic acid, a potent inhibitor of survivin, reverses docetaxel resistance in gastric cancer cells. *Cancer Letters*, **262**, 214–222.
- Wang, X., Chen, Y., Han, Q. Bin, Chan, C.Y., Wang, H., Liu, Z., Cheng, C.H.K., Yew, D.T., Lin, M.C.M., He, M.L., Xu, H.X., Sung, J.J.Y. & Kung, H.F. (2009) Proteomic identification of molecular targets of gambogic acid: Role of stathmin in hepatocellular carcinoma. *Proteomics*, **9**, 242–253.
- Wang, X., Zhang, Z. & Yao, C. (2010) Survivin is upregulated in myeloma cell lines cocultured with mesenchymal stem cells. *Leukemia Research*, **34**, 1325–1329.
- Wang, X.W. & Harris, C.C. (1997) p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *Journal of cellular physiology*, **173**, 247–255.
- Waring, P. & Müllbacher, A. (1999) Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunology and cell biology*, **77**, 312–317.
- Weber, D.M., Graef, T., Hussein, M., Sobeks, R.M., Schiller, G.J., Lupinacci, L., Hardwick, J.S. & Jagannath, S. (2012) Phase I trial of vorinostat combined with bortezomib for the treatment of relapsing and/or refractory multiple myeloma. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, **12**, 319–324.
- Wegener, E. & Krappmann, D. (2008) NF- $\kappa$ B Signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 237–259 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18491055>.
- Weinstock, M. & Ghobrial, I.M. (2013) Extramedullary multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*, **54**, 1135–41 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23210572>.
- Widlak, P. & Garrard, W.T. (2005) Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *Journal of cellular biochemistry*, **94**, 1078–1087.
- Wilda, M., Bruch, J., Harder, L., Rawer, D., Reiter, A., Borkhardt, A. & Woessmann, W. (2004) Inactivation of the ARF-MDM-2-p53 pathway in sporadic Burkitt's lymphoma in children. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **18**, 584–588.
- Wilop, S., van Gemmeren, T.B., Lentjes, M.H.F.M., van Engeland, M., Herman, J.G., Brümmendorf, T.H., Jost, E. & Galm, O. (2011) Methylation-associated dysregulation of the suppressor of cytokine signaling-3 gene in multiple myeloma. *Epigenetics*, **6**, 1047–1052.
- De Wilt, L.H. a M., Jansen, G., Assaraf, Y.G., Van Meerloo, J., Cloos, J., Schimmer, A.D., Chan, E.T., Kirk, C.J., Peters, G.J. & Kruyt, F. a E. (2012) Proteasome-based mechanisms of intrinsic and acquired bortezomib resistance in non-small cell lung cancer. *Biochemical Pharmacology*, **83**, 207–217 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2011.10.009>.
- Winter, R.N., Kramer, A., Borkowski, A. & Kyprianou, N. (2001) Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. *Cancer Research*, **61**, 1227–1232.
- Wolffe, A.P. & Pruss, D. (1996) Hanging on to histones. Chromatin. *Current biology: CB*, **6**, 234–237.
- Wright, J.H. (1900) MYELOMA, A CASE OF MULTIPLE. *J Boston Soc Med Sc.*
- Wu, C.P., Sim, H.M., Huang, Y.H., Liu, Y.C., Hsiao, S.H., Cheng, H.W., Li, Y.Q., Ambudkar, S. V. & Hsu, S.C. (2013) Overexpression of ATP-binding cassette transporter ABCG2 as a potential mechanism of acquired resistance to vemurafenib in BRAF(V600E) mutant cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, **85**, 325–334.
- Xiang, Y., Remily-Wood, E.R., Oliveira, V., Yarde, D., He, L., Cheng, J.Q., Mathews, L., Boucher, K., Cubitt, C., Perez, L., Gauthier, T.J., Eschrich, S.A., Shain, K.H., Dalton, W.S., Hazlehurst, L. & Koomen, J.M. (2011) Monitoring a nuclear factor-kappaB signature of drug resistance in multiple myeloma. *Mol Cell Proteomics*, **10**, M110 005520 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21846842>.
- Xie, P., Shen, Y.F., Shi, Y.P., Ge, S.M., Gu, Z.H., Wang, J., Mu, H.J., Zhang, B., Qiao, W.Z. & Xie, K.M. (2008) Overexpression of glucosylceramide synthase is associated with multidrug resistance of leukemia cells. *Leukemia Research*, **32**, 475–480.

- Yamashita, T., Takahashi, N. & Udagawa, N. (2012) New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World journal of orthopedics*, **3**, 175–81 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3547111&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, **80**, 285–291.
- Yang, H.H., Ma, M.H., Vescio, R.A. & Berenson, J.R. (2003a) Overcoming drug resistance in multiple myeloma: the emergence of therapeutic approaches to induce apoptosis. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **21**, 4239–4247.
- Yang, S.H., Lin, J.K., Chen, W.S. & Chiu, J.H. (2003b) Anti-angiogenic effect of silymarin on colon cancer LoVo cell line. *Journal of Surgical Research*, **113**, 133–138.
- Yelamos, J., Farres, J., Llacuna, L., Ampurdanes, C. & Martin-Caballero, J. (2011) PARP-1 and PARP-2: New players in tumour development. *American journal of cancer research*, **1**, 328–346 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3180065&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yeung, J. & Chang, H. (2008) Genomic aberrations and immunohistochemical markers as prognostic indicators in multiple myeloma. *Journal of clinical pathology*, **61**, 832–836.
- Yi, T., Yi, Z., Cho, S.-G., Luo, J., Pandey, M.K., Aggarwal, B.B. & Liu, M. (2008) Gambogic acid inhibits angiogenesis and prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling. *Cancer research*, **68**, 1843–1850.
- Yim, K.L. (2012) Everolimus and mTOR inhibition in pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Management and Research*, **4**, 207–214.
- Youle, R.J. & Strasser, A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9**, 47–59.
- Yu, J., Guo, Q.L., You, Q.D., Lin, S., Sen, Li, Z., Gu, H.Y., Zhang, H.W., Tan, Z. & Wang, X. (2006) Repression of telomerase reverse transcriptase mRNA and hTERT promoter by gambogic acid in human gastric carcinoma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **58**, 434–443.
- Zagouri, F., Sergentanis, T.N., Chrysikos, D., Filipits, M. & Bartsch, R. (2012) MTOR inhibitors in breast cancer: A systematic review. *Gynecologic Oncology*, **127**, 662–672 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.08.040>.
- Zahreddine, H. & Borden, K.L.B. (2013) Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, **4** MAR.
- Zeng, J., Sun, Y., Wu, K., Li, L., Zhang, G., Yang, Z., Wang, Z., Zhang, D., Xue, Y., Chen, Y., Zhu, G., Wang, X. & He, D. (2011) Chemopreventive and chemotherapeutic effects of intravesical silibinin against bladder cancer by acting on mitochondria. *Molecular cancer therapeutics*, **10**, 104–116.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & Korsmeyer, S.J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, **87**, 619–628.
- Zhan, F., Colla, S., Wu, X., Chen, B., Stewart, J.P., Kuehl, W.M., Barlogie, B. & Shaughnessy, J.D. (2007) CKS1B, overexpressed in aggressive disease, regulates multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27Kip1-dependent and -independent mechanisms. *Blood*, **109**, 4995–5001.
- Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J.P., Hanamura, I., Gupta, S., Epstein, J., Yaccoby, S., Sawyer, J., Burington, B., Anaissie, E., Hollmig, K., Pineda-Roman, M., Tricot, G., van Rhee, F., Walker, R., Zangari, M., Crowley, J., Barlogie, B. & Shaughnessy Jr., J.D. (2006) The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*, **108**, 2020–2028 Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/108/6/2020.full.pdf>.
- Zhang, B., Gojo, I. & Fenton, R.G. (2002) Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood*, **99**, 1885–1893.
- Zhang, H., Sun, K., Ding, J., Xu, H., Zhu, L., Zhang, K., Li, X. & Sun, W. (2013) Harmine induces apoptosis and inhibits tumor cell proliferation, migration and invasion through down-regulation of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer. *Phytomedicine: international journal of*



*phytotherapy and phytopharmacology*, **21**, 348–355 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24176842>.

- Zhang, H.Z., Kasibhatla, S., Wang, Y., Herich, J., Guastella, J., Tseng, B., Drewe, J. & Cai, S.X. (2004) Discovery, characterization and SAR of gambogic acid as a potent apoptosis inducer by a HTS assay. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **12**, 309–317.
- Zhang, L. & Fang, B. (2005) Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer gene therapy*, **12**, 228–237.
- Zhang, Y. & Reinberg, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes and Development*, **15**, 2343–2360.
- Zhao, C.Y., Grinkevich, V. V., Nikulenkov, F., Bao, W. & Selivanova, G. (2010) Rescue of the apoptotic-inducing function of mutant p53 by small molecule RITA. *Cell Cycle*, **9**, 1847–1855.
- Zhao, L., Guo, Q.-L., You, Q.-D., Wu, Z.-Q. & Gu, H.-Y. (2004) Gambogic acid induces apoptosis and regulates expressions of Bax and Bcl-2 protein in human gastric carcinoma MGC-803 cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*, **27**, 998–1003.
- Zheng, Y., Cai, Z., Wang, S., Zhang, X., Qian, J., Hong, S., Li, H., Wang, M., Yang, J. & Yi, Q. (2009) Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood*, **114**, 3625–3628.
- Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. (2010) Cell death mechanisms: Cross-talk and role in disease. *Experimental Cell Research*, **316**, 1374–1383.
- Zhou, W., Yang, Y., Xia, J., Wang, H., Salama, M.E., Xiong, W., Xu, H., Shetty, S., Chen, T., Zeng, Z., Shi, L., Zangari, M., Miles, R., Bearss, D., Tricot, G. & Zhan, F. (2013) NEK2 Induces Drug Resistance Mainly through Activation of Efflux Drug Pumps and Is Associated with Poor Prognosis in Myeloma and Other Cancers. *Cancer Cell*, **23**, 48–62.
- Zhu, X., Zhang, H., Lin, Y., Chen, P., Min, J., Wang, Z., Xiao, W. & Chen, B. (2009) Mechanisms of gambogic acid-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells in relation to transferrin receptors. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, **21**, 666–672.
- Zhu, Y.X., Tiedemann, R., Shi, C.X., Yin, H., Schmidt, J.E., Bruins, L.A., Keats, J.J., Braggio, E., Sereduk, C., Mousses, S. & Stewart, A.K. (2011) RNAi screen of the druggable genome identifies modulators of proteasome inhibitor sensitivity in myeloma including CDK5. *Blood*, **117**, 3847–3857.
- Zilfou, J.T. & Lowe, S.W. (2009) Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **1**, a001883.
- Zochbauer-Muller, S. (2002) Aberrant DNA Methylation in Lung Cancer: Biological and Clinical Implications. *The Oncologist*, **7**, 451–457.
- Zong, W.-X., Ditsworth, D., Bauer, D.E., Wang, Z.-Q. & Thompson, C.B. (2004) Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes & development*, **18**, 1272–1282.
- Zong, W.-X. & Thompson, C.B. (2006) Necrotic death as a cell fate. *Genes & development*, **20**, 1–15.
- Zunino, S.J., Ducore, J.M. & Storms, D.H. (2007) Parthenolide induces significant apoptosis and production of reactive oxygen species in high-risk pre-B leukemia cells. *Cancer Letters*, **254**, 119–127.





## ANEXO

### Avaliação da percentagem de plasmócitos (%) que expressam moléculas pró-apoptóticas e respetivos níveis de expressão, em doentes com gamapatias monoclonais e em controlos não neoplásicos

TABELA A1

Moléculas pró-apoptóticas	Gamapatias monoclonais		Controlos	p (1 vs 3)	p (1 vs 2)
	Plasmócitos CD138+/CD19+ Média ± EP (1)	Plasmócitos CD138+/CD19- Média ± EP (2)	Plasmócitos CD138+/CD19+ Média ± EP (3)		
BAX (%)	52,5 ± 2,8	33,5 ± 2,4	39,8 ± 2,3	0,001	0,0001
BAX (MIF)	46,7 ± 1,7	44 ± 2,4	39,5 ± 1,8	0,008	NS
BAX/BCL-2	2 ± 0,3	1,4 ± 0,6	0,8 ± 0,5	0,015	NS
TRAIL (%)	63 ± 1,9	37,2 ± 2,2	46,2 ± 0,9	0,0001	0,0001
TRAIL (MIF)	40,6 ± 1,7	36,1 ± 1,4	41,3 ± 0,7	NS	0,049
TRAIL-R1 (%)	59,8 ± 2,4	42,8 ± 2,7	13,2 ± 1	0,0001	0,0001
TRAIL-R1 (MIF)	34,9 ± 0,9	44,9 ± 2,6	27,5 ± 0,7	0,0001	0,0001
TRAIL-R2 (%)	61,3 ± 2,2	56,3 ± 2,4	17 ± 0,5	0,0001	0,008
TRAIL-R2 (MIF)	52,1 ± 1,5	44,1 ± 1,7	24,8 ± 0,7	0,0001	0,0001
FAS (%)	33,9 ± 2,2	18,6 ± 1	43,4 ± 0,8	0,0001	0,0001
FAS (MIF)	36,9 ± 1,5	28,8 ± 1,3	24,6 ± 0,9	0,0001	0,0001
FAS Lig (%)	25,1 ± 1,9	11,3 ± 1,3	1,1 ± 0,4	0,0001	0,0001
FAS Lig (MIF)	26,4 ± 0,8	28,2 ± 1	21,7 ± 1,4	0,021	0,0001
Caspase 3 (%)	9 ± 0,7	6,8 ± 0,6	2,5 ± 0,3	0,0001	0,011
Caspase 3 (MIF)	38,5 ± 1,7	32,1 ± 0,9	17,3 ± 0,9	0,0001	0,001
TNF-α (%)	56,1 ± 2,3	36,3 ± 2,4	29,1 ± 0,9	0,0001	0,0001
TNF-α (MIF)	37,1 ± 2	30,2 ± 0,8	48,8 ± 1,5	0,0001	0,003
TNF-α Rec (%)	27,9 ± 2,7	12,9 ± 0,5	25,1 ± 0,7	NS	0,0001
TNF-α Rec (MIF)	28,8 ± 1,05	28,2 ± 0,8	49,5 ± 1	0,0001	NS

Os valores apresentados indicam a média da percentagem (%) ± erro-padrão (EP) e os respetivos níveis de expressão (em média de intensidade de fluorescência, MIF) ± EP, dos plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- de doentes com gamapatias monoclonais e de controlos não neoplásicos (Ctr) que expressam as moléculas referidas. Estão ainda representadas análises comparativas entre a expressão das moléculas nos diferentes subtipos de plasmócitos estudados. As análises molecular e estatística foram efetuadas de acordo com o descrito na secção *Materiais e Métodos*. MGUS: gamapatia monoclonal de significado indeterminado; MMI: mieloma múltiplo indolente; MM: mieloma múltiplo sintomático ao diagnóstico; MMRR: mieloma múltiplo refratário. EP: erro-padrão da média. NS: sem significado estatístico. NS: não significativo.

TABELA A2

### Avaliação da percentagem de plasmócitos (%) que expressam moléculas anti-apoptóticas e respetivos níveis de expressão, em doentes com gamapatias monoclonais e em controlos não neoplásicos

Moléculas antiapoptóticas	Gamapatias monoclonais		Controlos	p (1 vs 3)	p (1 vs 2)
	Plasmócitos CD138+/CD19+ Média ± EP (1)	Plasmócitos CD138+/CD19- Média ± EP (2)	Média ± EP (3)		
BCL-2 (%)	51,8 ± 2,6	38,2 ± 2,6	50 ± 0,7	NS	0,0001
BCL-2 (MIF)	43,7 ± 2,6	33,9 ± 1,3	33,5 ± 0,8	0,0001	0,0001
TRAIL-R3 (%)	45,3 ± 2,2	48,4 ± 2,5	72,3 ± 0,7	0,0001	NS
TRAIL-R3 (MIF)	38,1 ± 1,3	47 ± 2,6	32,2 ± 2,6	NS	0,001
TRAIL-R4 (%)	57,2 ± 2,3	42,2 ± 2,4	66,1 ± 0,7	0,0001	0,0001
TRAIL-R4 (MIF)	42,6 ± 1,2	44,8 ± 3	38,1 ± 1,7	NS	NS
Survivina (%)	39,7 ± 2,6	38,4 ± 2,8	46,3 ± 0,7	0,016	NS
Survivina (MIF)	34,8 ± 1,6	32,2 ± 1,2	17,6 ± 0,9	0,0001	0,0001

Os valores apresentados indicam a média da percentagem (%) ± erro-padrão (EP) e os respetivos níveis de expressão (em média de intensidade de fluorescência, MIF) ± EP, dos plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- de doentes com gamapatias monoclonais e de controlos não neoplásicos (Ctr) que expressam as moléculas referidas. Estão ainda representadas análises comparativas entre a expressão das moléculas nos diferentes subtipos de plasmócitos estudados. As análises molecular e estatística foram efetuadas de acordo com o descrito na secção *Materiais e Métodos*. MGUS: gamapatia monoclonal de significado indeterminado; MMI: mieloma múltiplo indolente; MM: mieloma múltiplo sintomático ao diagnóstico; MMRR: mieloma múltiplo refratário. EP: erro-padrão da média. NS: sem significado estatístico. NS: não significativo.

TABELA A3

### Determinação da percentagem de plasmócitos (%) que expressam p53 e ciclina D1 e respetivos níveis de expressão, em doentes com gamapatias monoclonais e em controlos não neoplásicos

Moléculas	Gamapatias monoclonais		Controlos	p (1 vs 3)	p (1 vs 2)
	Plasmócitos CD138+/CD19+ Média ± EP (1)	Plasmócitos CD138+/CD19- Média ± EP (2)	Média ± EP (3)		
P53 (%)	23,5 ± 1,4	18,7 ± 0,9	38,7 ± 2,9	0,004	0,001
P53 (MIF)	43,7 ± 1,3	34 ± 1,5	31,7 ± 3,5	0,008	0,0001
Ciclina D1 (%)	39,7 ± 2,6	27,3 ± 1,9	43,1 ± 0,9	NS	0,0001
Ciclina D1 (MIF)	42,4 ± 2,4	31,6 ± 1,1	53,5 ± 4,1	0,031	0,0001

Os valores apresentados indicam a média da percentagem (%) ± erro-padrão (EP) e os respetivos níveis de expressão (em média de intensidade de fluorescência, MIF) ± EP, dos plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- de doentes com gamapatias monoclonais e de controlos não neoplásicos (Ctr) que expressam as moléculas referidas. Estão ainda representadas análises comparativas entre a expressão das moléculas nos diferentes subtipos de plasmócitos estudados. As análises molecular e estatística foram efetuadas de acordo com o descrito na secção *Materiais e Métodos*. MGUS: gamapatia monoclonal de significado indeterminado; MMI: mieloma múltiplo indolente; MM: mieloma múltiplo sintomático ao diagnóstico; MMRR: mieloma múltiplo refratário. EP: erro-padrão da média. NS: sem significado estatístico. NS: não significativo.

TABELA A4

### Determinação da percentagem de plasmócitos (%) que expressam conjugados de ubiquitina (UBQ) e NF-κB e respetivos níveis de expressão, em doentes com gamapatias monoclonais e em controlos não neoplásicos

Moléculas	Gamapatias monoclonais		Controlos	p (1 vs 3)	p (1 vs 2)
	Plasmócitos CD138+/CD19+ Média ± EP (1)	Plasmócitos CD138+/CD19- Média ± EP (2)	Média ± EP (3)		
UBQ (%)	41,4 ± 2,4	21,9 ± 1,7	28 ± 6,6	NS	0,0001
UBQ (MIF)	33,3 ± 1,5	33,1 ± 1,6	65,6 ± 9,7	0,008	NS
NF-κB (%)	68,3 ± 2	46 ± 2,1	36,5 ± 5,5	0,0001	0,0001
NF-κB (MIF)	36,7 ± 0,9	26,2 ± 0,8	71 ± 9,3	0,004	0,0001

Os valores apresentados indicam a média da percentagem (%) ± erro-padrão (EP) e os respetivos níveis de expressão (em média de intensidade de fluorescência, MIF) ± EP, dos plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- de doentes com gamapatias monoclonais e de controlos não neoplásicos (Ctr) que expressam as moléculas referidas. Estão ainda representadas análises comparativas entre a expressão das moléculas nos diferentes subtipos de plasmócitos estudados. As análises molecular e estatística foram efetuadas de acordo com o descrito na secção *Materiais e Métodos*. MGUS: gamapatia monoclonal de significado indeterminado; MMI: mieloma múltiplo indolente; MM: mieloma múltiplo sintomático ao diagnóstico; MMRR: mieloma múltiplo refratário. EP: erro-padrão da média. NS: sem significado estatístico. NS: não significativo.

**Avaliação da média da percentagem de plasmócitos (%) com fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- de doentes com gamopatias monoclonais e de plasmócitos CD138+/CD19+ de controlos não neoplásicos (Ctr) que expressam o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), a interleucina-6 (IL-6), os seus recetores (VEGF-Rec e IL-6 Rec), e respetivos níveis de expressão, expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF)**

**TABELA A5**

Moléculas	Gamopatias monoclonais		Controlos	p (1 vs 3)	p (1 vs 2)
	Plasmócitos CD138+/CD19+ Média ± EP (1)	Plasmócitos CD138+/CD19- Média ± EP (2)	Média ± EP (3)		
VEGF (%)	41,5 ± 2,7	33,2 ± 2,5	13,5 ± 0,5	0,0001	0,0001
VEGF (MIF)	40,3 ± 1,2	71,8 ± 4,3	32,8 ± 1,5	0,001	0,0001
VEGF - Rec (%)	27,2 ± 1,9	16 ± 1,4	8,1 ± 0,5	0,0001	0,0001
VEGF - Rec (MIF)	32,1 ± 1,2	32 ± 1,2	21,5 ± 0,8	0,0001	NS
IL-6 (%)	26,3 ± 1,2	23,7 ± 1,8	23,5 ± 0,7	0,047	NS
IL-6 (MIF)	31,2 ± 1,0	28 ± 0,9	27,7 ± 1,2	0,035	0,0001
IL-6 Rec (%)	78,2 ± 0,8	65,9 ± 2,4	17,3 ± 0,4	0,0001	0,0001
IL-6 Rec (MIF)	43 ± 1,8	51,6 ± 2,7	33,9 ± 1	0,0001	0,005

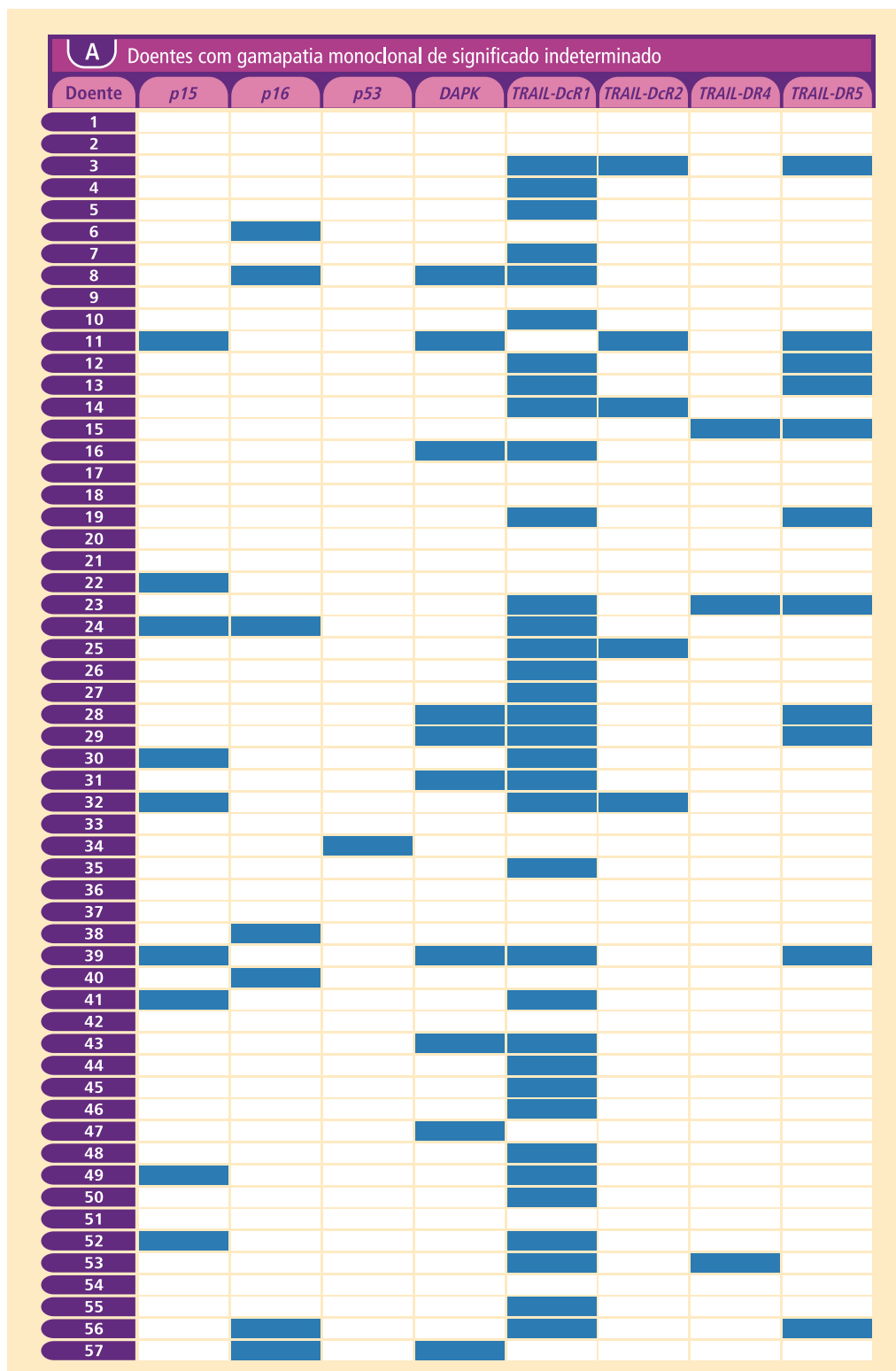
Os valores apresentados indicam a média da percentagem (%) ± erro-padrão (EP) e os respetivos níveis de expressão (em média de intensidade de fluorescência, MIF) ± EP, dos plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- de doentes com gamopatias monoclonais e de controlos não neoplásicos (Ctr) que expressam as moléculas referidas. Estão ainda representadas análises comparativas entre a expressão das moléculas nos diferentes subtipos de plasmócitos estudados. As análises molecular e estatística foram efetuadas de acordo com o descrito na secção *Materiais e Métodos*. MGUS: gamapatia monoclonal de significado indeterminado; MMI: mieloma múltiplo indolente; MM: mieloma múltiplo sintomático ao diagnóstico; MMRR: mieloma múltiplo refratário. EP: erro-padrão da média. NS: sem significado estatístico. NS: não significativo.

**Avaliação da expressão das proteínas MRP-1 citoplasmática, MRP-1 membranar, Glicoproteína P citoplasmática e Glicoproteína P membranar nos plasmócitos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- em doentes com gamopatias monoclonais e em controlos não neoplásicos**

**TABELA A6**

Moléculas	Gamopatias monoclonais		Controlos	p (1 vs 3)	p (1 vs 2)
	Plasmócitos CD138+/CD19+ Média ± EP (1)	Plasmócitos CD138+/CD19- Média ± EP (2)	Média ± EP (3)		
MRP-1 cit (%)	53,8 ± 2,4	23,4 ± 1,5	22,2 ± 3	0,0001	0,0001
MRP-1 cit (MIF)	34,3 ± 1,0	29,9 ± 1,3	28,5 ± 1,7	0,008	0,002
MRP-1 memb (%)	22,4 ± 2,1	8,8 ± 0,3	36,8 ± 1	0,0001	0,0001
MRP-1 memb (MIF)	39,6 ± 1,9	38 ± 1,8	23,2 ± 0,9	0,0001	0,005
Gp-P cit (%)	47,8 ± 2,1	61,4 ± 2,4	80,9 ± 1,3	0,0001	0,0001
Gp-P cit (MIF)	58,9 ± 2,0	119,8 ± 4,6	23,5 ± 0,7	0,0001	0,0001
Gp-P memb (%)	34,2 ± 9,9	13,4 ± 1,1	43,3 ± 7,2	NS	0,0001
Gp-P memb (MIF)	33,8 ± 0,7	28,4 ± 0,8	48,1 ± 6,6	0,002	0,0001

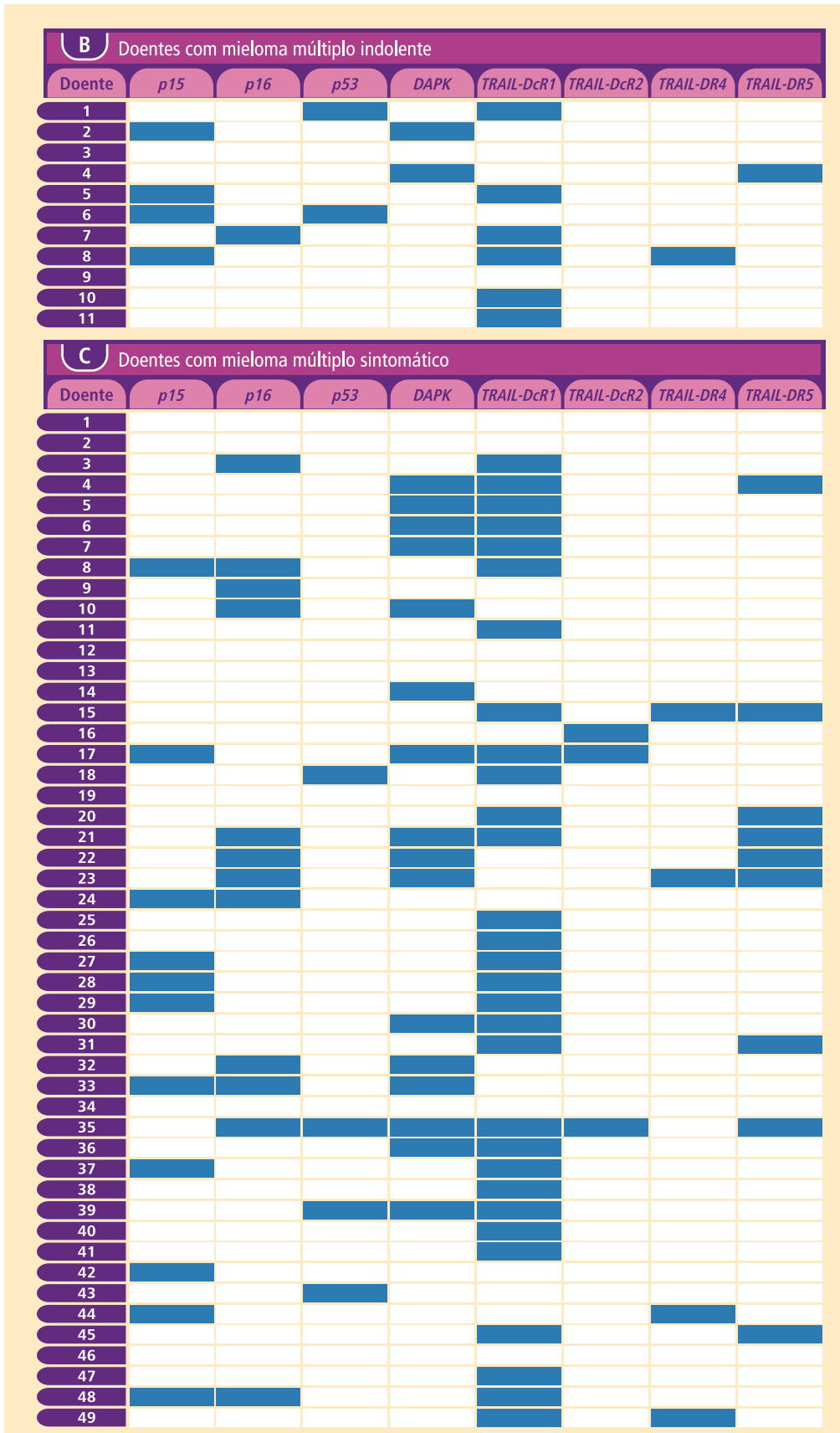
Os valores apresentados indicam a média da percentagem (%) ± erro-padrão (EP) e os respetivos níveis de expressão (em média de intensidade de fluorescência, MIF) ± EP, dos plasmócitos com fenótipos CD138+/CD19+ e CD138+/CD19- de doentes com gamopatias monoclonais e de controlos não neoplásicos (Ctr) que expressam as moléculas referidas. Estão ainda representadas análises comparativas entre a expressão das moléculas nos diferentes subtipos de plasmócitos estudados. As análises molecular e estatística foram efetuadas de acordo com o descrito na secção *Materiais e Métodos*. MGUS: gamapatia monoclonal de significado indeterminado; MMI: mieloma múltiplo indolente; MM: mieloma múltiplo sintomático ao diagnóstico; MMRR: mieloma múltiplo refratário. EP: erro-padrão da média. NS: sem significado estatístico. NS: não significativo.



**FIGURA A1** Estado de metilação dos genes *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK*, *TRAIL-R1*, *TRAIL-R2*, *TRAIL-R3* e *TRAIL-R4* nos doentes com gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) (A), mieloma múltiplo indolente (MMI) (B) e mieloma múltiplo sintomático (MM) (C), mieloma múltiplo em recidiva/refratário (D) e em controlos não neoplásicos (E).

(cont.)

Os retângulos a vermelho representam presença de metilação e os retângulos em branco indicam ausência de metilação do gene em análise. Cada linha representa um doente.



(cont.)

**FIGURA A1**

D Doentes com mieloma múltiplo em recidiva/refratário								
Doente	p15	p16	p53	DAPK	TRAIL-DcR1	TRAIL-DcR2	TRAIL-DR4	TRAIL-DR5
1								
2								
3								
4								

E Controlos								
Controlos	p15	p16	p53	DAPK	TRAIL-DcR1	TRAIL-DcR2	TRAIL-DR4	TRAIL-DR5
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								

**FIGURA A1** (conclusão)

