

Inês Filipa Góis Sancho

Mieloma Múltiplo: Evolução e Novas Terapêuticas

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Alexandrina Maria Ferreira Santos Pinto Mendes e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Inês Filipa Góis Sancho

Mieloma Múltiplo: Evolução e Novas Terapias

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Inês Filipa Góis Sancho, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011148601, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 14 de setembro de 2016

Inês Filipa Góis Sancho

A Orientadora da Monografia

(Prof.^a Dr.^a Alexandrina Maria Ferreira Santos Pinto Mendes)

A Autora

(Inês Filipa Góis Sancho)

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela minha formação ao longo dos últimos 5 anos e que terminam nesta monografia.

À Professora Doutora Alexandrina Maria Ferreira Santos Pinto Mendes pela brilhante orientação, ajuda, disponibilidade e encorajamento.

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão por me inspirar a voar cada vez mais alto.

À minha avó por ser a minha mãe a duplicar.

Uma palavra de reconhecimento muito especial para aqueles que, pelo amor incondicional e pela forma como ao longo de todos estes anos, tão bem, souberam ajudar-me.

Ao João, por ter caminhado ao meu lado, pela sua paciência, compreensão e ajuda. Ouvinte atento de algumas dúvidas, inquietações, desânimos e sucessos, pelo apoio, pela confiança e pela valorização sempre tão entusiasta do meu trabalho.

Aos meus amigos de longa data por me inspirarem a ser o que sempre sonhei, e por não permitirem que o tempo passe pela nossa amizade, pois sei que a posso encontrar em qualquer momento, em qualquer cidade, em qualquer idade.

Aos meus amigos de faculdade que eternizaram Coimbra no meu coração e por me permitirem voltar a estes verdes anos sempre que estivermos juntos.

Ao meu avô, que me ensinou o que é a coragem e a vontade de viver, cuja derradeira luta originou esta monografia, na esperança que o conhecimento seja a chave para compreensão.

A Coimbra, a cidade do conhecimento e do amor, que continuará a fazer-me feliz.

ÍNDICE

RESUMO.....	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
INTRODUÇÃO.....	6
MIELOMA MÚLTIPLO.....	7
DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO DO MIELOMA MÚLTIPLO	10
CARACTERÍSTICAS DE DOENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO	14
1. Idade.....	15
2. Sexo e Raça	15
3. Doença de alto risco	15
4. Insuficiência renal	16
5. Neuropatia periférica	16
TERAPÊUTICA ATUAL DO MIELOMA MÚLTIPLO	16
NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS	19
Para a prevenção da progressão de MGUS.....	19
Para o MM sintomático	21
1. miRNA.....	21
2. Imunoterapia – Anticorpos Monoclonais	22
3. Inibidor do proteassoma: ixazomib.....	25
4. Inibidor de histona desacetilase: panobinostat.....	26
5. Novas terapias Celulares.....	26
6. O <i>Stress</i> oxidativo como alvo farmacológico.....	27
DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA NO MIELOMA MÚLTIPLO	28
CONCLUSÃO	30
BIBLIOGRAFIA.....	31

RESUMO

O Mieloma Múltiplo é uma doença hematológica maligna caracterizada pela proliferação excessiva de plasmócitos na medula óssea. Desta proliferação resulta uma extensa destruição do esqueleto ósseo, provocando lesões osteolíticas.

A gamapatia monoclonal de significado incerto precede virtualmente todos os casos de mieloma múltiplo, integrando o diagnóstico diferencial juntamente com a forma indolente de mieloma múltiplo.

A presente revisão tem como objetivo reunir as informações mais pertinentes que retratem a evolução da abordagem terapêutica e novas terapêuticas do mieloma múltiplo.

O tratamento é uma das componentes mais importantes da abordagem do doente com mieloma múltiplo. A aplicação das diferentes estratégias terapêuticas ao longo do tempo alterou de forma significativa a história natural do mieloma múltiplo. Estas englobam o uso de corticosteroides, imunomoduladores, inibidores do proteassoma, e o transplante autólogo de células hematopoiéticas. Recentemente, as principais áreas de investigação incluem, entre outras, o desenvolvimento de estratégias imunes, terapias celulares e miRNAs para a prevenção e tratamento do mieloma múltiplo.

Apesar de todos os avanços alcançados no que diz respeito ao tratamento, o mieloma múltiplo continua a ser uma doença incurável na maioria dos doentes, fazendo com que seja necessário investir em estudos futuros de modo a que se possam desenvolver estratégias terapêuticas que ofereçam uma qualidade de vida superior e prolonguem a sobrevivência, tornando a cura um objetivo realista para uma grande proporção de doentes.

Palavras-chave: Mieloma Múltiplo; Gamapatia Monoclonal de Significado Incerto; Progressão; miRNA; Anticorpos, Inibidor do Proteassoma, Inibidor da histona desacetilase; Terapia Celular; *Stress Oxidativo*.

ABSTRACT

Multiple myeloma is a malignant hematological disease characterized by an excessive proliferation of plasma cells in the bone marrow. This proliferation leads to an extensive destruction of the skeletal bone, causing osteolytic lesions.

Monoclonal gammopathy of undetermined significance precedes virtually all cases of multiple myeloma, being part of the differential diagnosis along with the indolent form of multiple myeloma.

The present review aims to gather the most relevant information that reflects the evolution of the therapeutic approach and new therapies of multiple myeloma. The use of different therapeutic strategies over time significantly changed the natural history of multiple myeloma. These include the use of corticosteroids, immunomodulators, proteasome inhibitors and autologous stem cell transplantation. Recently, the main research areas include the development of immune strategies, cellular therapies and miRNAs for prevention and treatment of multiple myeloma.

The use of different therapeutic strategies over time significantly changed the natural history of multiple myeloma. Despite all the breakthroughs, myeloma remains an incurable disease in most patients, making it necessary to invest in future studies in order to develop therapeutic strategies that offer a higher quality of life and prolong survival, making the cure a realistic goal for a large proportion of patients.

Key words: Multiple Myeloma; Monoclonal Gammopathy of Uncertain Significance; Progression: miRNA; Antibody; Proteasome Inhibitor; Histone deacetylase inhibitors; Cellular therapy; Oxidative Stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos
ADCP	Fagocitose Celular dependente de Anticorpo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Allo-SCT	Transplante de Células Estaminais Alogénicas
ASCT	Transplante de Células Estaminais Autólogas
CDC	Citotoxicidade mediada por células dependente do complemento
CRAB	Hipercalcemia, insuficiência renal crónica, anemia, lesões ósseas (<i>Calcium elevation, Renal insufficiency, Anemia, Bone abnormalities</i>)
CT	Tomografia Computorizada
Del	Deleção
DKK1	Dickkopf1
DUB	Enzimas desubiquitinadoras
ERO-1	<i>Endoplasmatic Reticulum Oxidoreductin</i>
ESMO	Sociedade Europeia de Medicina Oncológica (<i>European Society for Medical Oncology</i>)
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (Fluorescence In Situ Hybridization)
FLC	Cadeia leve livre (Free Light Chain)
HDAC	Histona Desacetilase
Ig	Imunoglobulina
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
ISS	Sistema de Estadiamento Internacional (<i>International Staging System</i>)
KRD	Carfilzomib, Lenalidomida e Dexametasona
LDH	Desidrogenase Láctica
MFC	Citometria de Fluxo Multiparamétrica
MGUS	Gamapatia Monoclonal de Significado Incerto (<i>Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance</i>)
MM	Mieloma Múltiplo
MMI	Mieloma Múltiplo Indolente
mRNAs	RNAs mensageiros
miRNA	microRNA
OPG	Osteoprotegerina
PDI	Proteína Dissulfeto Isomerase
PET	Tomografia por Emissão de Positrões

PET-CT	Tomografia por Emissão de Positrões com Tomografia Computorizada
RANKL	Ligando do Receptor Activador do NF-kB
Rd	Lenalidomida associada a dexametasona
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigénio
t	Translocação
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRXI	Tiorredoxina-I
VCD	Bortezomib, ciclofosfamida e dexametasona
VGR	Resposta Muito Boa (<i>Very Good Response</i>)
VGPR	Resposta Parcial Muito Boa (<i>Very Good Partial Response</i>)
VRD	Bortezomib, lenalidomida e dexametasona
VTD	Bortezomib, talidomida e dexametasona

INTRODUÇÃO

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia maligna caracterizada pela proliferação clonal de plasmócitos na medula óssea, da qual resulta a produção excessiva de uma proteína monoclonal (M) anómala detetável no soro e/ou na urina. (1) O tipo de proteína M é, maioritariamente IgG (50%), podendo também ser IgA (20%), uma das cadeias leves kappa ou lambda das imunoglobulinas (20%), IgD (2%) e IgM (0,5%). (2)

O MM representa a segunda neoplasia hematológica maligna mais comum, compreendendo 1% de todas as neoplasias malignas e 10 a 15% das hematológicas. (3) A sua incidência aumenta com a idade, sendo os 66 anos a idade média para o seu diagnóstico, onde 62,4% dos doentes apresentam idade igual ou superior a 65 anos no momento do diagnóstico e raramente é detetado antes dos 40 anos. Os indivíduos afroamericanos são duas vezes mais atingidos relativamente aos caucasianos, existindo um ligeiro predomínio no sexo masculino. (4) A incidência de MM é cerca de 15.000 novos casos por ano nos EUA e Europa, com a sobrevivência média de 4-5 anos. (5)

A etiologia desta patologia permanece desconhecida, resultando possivelmente da interação genético-ambiental. A exposição a radiação ionizante, pesticidas e metais, como o níquel, parece precipitar a progressão para neoplasia em células B portadoras de defeitos genéticos. (1,6)

O MM está na extremidade de um espectro de doenças que vão desde a Gamapatia Monoclonal de Significado Incerto (MGUS, sigla da designação em inglês “Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance”), que não necessita de tratamento, passando pelo Mieloma Múltiplo Indolente (MMI), que exige vigilância, até ao verdadeiro mieloma, o Mieloma Múltiplo que requer um tratamento adequado.

Esta monografia tem por objetivo abordar os progressos verificados no domínio da definição, diagnóstico e tratamento do Mieloma Múltiplo, abordando mais especificamente a investigação de novas terapias e a recente aprovação de agentes terapêuticos inovadores, como por exemplo dois anticorpos monoclonais que já ganharam a definição de “breakthrough therapy” (7) e prometem o início do mieloma múltiplo como uma doença curável.

MIELOMA MÚLTIPLO

O mieloma múltiplo constitui a neoplasia plasmocitária maligna mais comum, caracterizada pela proliferação clonal de plasmócitos, associada à sobreprodução de imunoglobulinas. (1) É uma neoplasia das células B caracterizada por expansão aberrante de células plasmáticas, tipicamente na medula óssea, porém, com a progressão da doença, há o aumento em locais extramedulares. (8) A proliferação dos plasmócitos resulta em dano ósseo e na libertação sistêmica de imunoglobulina clonal que, por sua vez, é responsável por danos nos tecidos, particularmente no rim. (7)

Durante décadas, o diagnóstico de mieloma múltiplo implicava a verificação da destruição de órgãos-alvo, critérios conhecidos como CRAB, que incluíam aumento da concentração plasmática de cálcio, disfunção renal, anemia e lesões ósseas destrutivas. Os critérios atualizados permitem o diagnóstico precoce e a iniciação da terapia em pacientes com risco iminente de dano em órgãos-alvo. Neste sentido, a atualização dos critérios de diagnóstico de MM, em 2014, por parte do *International Myeloma Working Group* (IMWG) consistiu na adição de três biomarcadores específicos (plasmócitos medulares $\geq 60\%$, taxa de cadeias leves livres séricas¹ (FLC) ≥ 100 e mais que uma lesão focal na ressonância magnética) aos critérios CRAB. (2)

Diversas sociedades científicas e clínicas e grupos de estudo do MM elaboraram *guidelines* acerca dos critérios de diagnóstico e tratamento de MM, incluindo o *National Comprehensive Cancer Network*, a *European Society for Medical Oncology* (ESMO) e o IMWG. Como exemplos, referem-se as *guidelines* do IMWG por, essencialmente, ser um grupo internacional com uma revisão recente e os critérios da ESMO por serem *guidelines* Europeias, mais próximas da nossa realidade.

Assim, segundo os critérios do IMWG (9), o MM é clinicamente definido pela presença de plasmócitos medulares $\geq 10\%$ e/ou presença de plasmocitoma confirmado por biópsia, e, pelo menos, um ou mais dos critérios CRAB e eventos definidores de mieloma:

I. Disfunção orgânica associada, sintomatologia designada pelo acrónimo CRAB (Hipercalcemia: cálcio sérico superior ao valor normal em mais de 1 mg/dL ou > 11 mg/dL; insuficiência renal com clearance de creatinina < 40 mL por minuto ou creatinina sérica > 2 mg/dL; anemia com hemoglobina inferior ao valor normal em mais do que 20 g/L ou hemoglobina < 100 g/L; presença de lesões ósseas (uma ou mais lesões líticas ou osteoporóticas na radiografia, CT, ou PET-CT).

¹ Razão entre as concentrações plasmáticas da cadeia leve livre, kappa ou lambda, afetada e da não afetada, entendendo-se como afetada a cadeia produzida pelo clone neoplásico e maligno.

2. Presença de um ou mais dos biomarcadores malignos (60% ou mais plasmócitos no exame de medula óssea, taxa de cadeias leves livres séricas ≥ 100 e/ou mais do que uma lesão focal na ressonância magnética que seja de pelo menos 5 mm).

Desta forma, os exames necessários para o diagnóstico incluem hemograma com contagem celular completa, quantificação do cálcio e creatinina séricos, eletroforese proteica com imunofixação do soro e da urina colhida durante 24h, análise das cadeias leves livres séricas e exame microscópico da medula óssea. (2) A avaliação da medula óssea pode não ser necessária caso a progressão seja claramente identificada pelos testes supracitados. (8)

Segundo os critérios da ESMO, o diagnóstico de MM requer $\geq 10\%$ de plasmócitos no exame da medula óssea ou uma biópsia que prove plasmocitoma e evidência de lesão de órgão-alvo, isto é, presença dos critérios CRAB. (10)

A presença de proteína monoclonal (M) no soro ou urina é uma característica central no MM, mas é apenas detectada por eletroforese em 82% dos doentes. (2) Antigamente, o algoritmo laboratorial proposto para a avaliação de pacientes com suspeita de MM, amiloidose primária e gamopatias monoclonais relacionadas, recomendava o doseamento da proteína monoclonal através da realização de uma eletroforese e imunofixação proteica (soro e urina) bem como, relação sérica de cadeias leves livres (FLC). Contudo, em 2003, o IMWG veio a reconhecer que cerca de 2 a 3% dos casos de MM têm proteína M indetetável, sendo designados por MM não secretor. (2) Assim sendo, a presença da proteína M como requisito mínimo para o diagnóstico de MM, não é obrigatória. A sua presença ou ausência apenas permite afirmar se estamos perante um MM do tipo secretor ou não.

A sintomatologia da doença decorre da ação direta das cadeias de Ig ou da infiltração tumoral. Dado que a produção em grandes quantidades de proteína monoclonal tem tendência a precipitar, formam-se depósitos amiloides que lesam os tecidos, como o rim, conduzindo à nefropatia e insuficiência renal associadas ao MM. A restante sintomatologia inclui ainda fadiga, dor óssea, fratura patológica em virtude da localização óssea predominante, alterações da hemostase e infeções. A anemia ocorre em aproximadamente 75% dos pacientes e contribui para a fadiga. Por sua vez, as lesões ósseas osteolíticas são detetadas em aproximadamente 80% dos pacientes. (2) A polineuropatia sintomática verifica-se em 3 a 20% dos doentes, etiologicamente relacionada ou não com a gamapatia monoclonal presente. Eventos cerebrovasculares podem ocorrer em virtude da hiperviscosidade do sangue, sendo superior nas discrasias por IgA ou IgM. Os plasmocitomas provocam sintomatologia associada a compressão e invasão de estruturas ósseas ou extra-ósseas. Outras características comuns são a hipercalcémia (15%) e elevado nível de

creatinina (20%). A doença extramedular ocorre em 1 ou 2% dos doentes no momento do diagnóstico inicial e 8% desenvolvem esta doença no decurso da evolução do MM. (2)

A sobrevivência dos doentes ao MM varia altamente consoante as características do doente, comorbilidades, o estadio da doença e a sua biologia (anomalias citogenéticas) e a resposta à terapia. (2)

O estadio da doença é avaliado com recurso ao sistema de estadiamento Durie-Salmon e classifica em três estadios, I, II e III, através da análise de quatro parâmetros: níveis de proteína M, número de lesões líticas, valores de hemoglobina e níveis de cálcio séricos. Surgiu ainda um outro sistema, o Sistema de Estadiamento Internacional (ISS), cujo algoritmo é baseado em dois parâmetros: microglobulina β_2 , que reflete a massa tumoral e a função renal; e a concentração sérica de albumina, cujos baixos níveis em MM são causados por citocinas inflamatórias como a interleucina-6, secretada pelo microambiente do mieloma. O estadio III corresponde ao estadio mais avançado da doença. (11)

Embora estes sistemas tenham sido amplamente utilizados no passado, novas técnicas utilizando marcadores moleculares atualizam estes sistemas, melhorando a definição dos diferentes subgrupos e do prognóstico. Assim, surgiu a Revisão do Sistema de Estadiamento Internacional (R-ISS). Esta revisão propõe a estratificação de risco através de um modelo simples, pragmático e fidedigno, que inclui os dois parâmetros do tradicional ISS em combinação com a desidrogenase láctica (LDH) e avaliação de anomalias cromossómicas. De acordo com o estudo realizado (11), o estadio de R-ISS I inclui o estadio ISS I (microglobulina β_2 sérica $< 3,5$ mg/L e albumina sérica $\geq 3,5$ g/dL), nenhuma anomalias cromossómicas de alto risco detetadas e LDH normal; o estadio R-ISS III inclui o estadio ISS III (microglobulina β_2 sérica $\geq 5,5$ mg/L) associado a anomalias cromossómicas de alto risco e/ou níveis elevados de LDH; o estadio II engloba todas as restantes condições.

A fase inicial do estudo da medula óssea para diagnóstico de MM deve incluir a avaliação citogenética convencional (cariótipo) e desejavelmente a deteção por FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) das seguintes anomalias genéticas: t(11;14), t(6;14), t(4;14), t(14;16), t(14;20), del 17p13 e trissomias (hiperdiploidia). Consoante a presença de cada uma destas alterações, os doentes são classificados em 3 grupos de risco: alto risco, risco intermédio, e risco *standard*. (12)

DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO DO MIELOMA MÚLTIPLO

O mieloma múltiplo e a Gamapatia Monoclonal de Significado Incerto (MGUS) são doenças das células plasmáticas.

De acordo com o IMWG (2012), a MGUS é caracterizada pela presença de proteína monoclonal sérica em concentração inferior a 3,0 g/100 ml, proteinúria de Bence-Jones² inferior a 1 g em 24 horas e infiltração plasmocitária medular inferior ou igual a 10%, na ausência de lesões ósseas líticas ou escleróticas, anemia, hipercalcemia e insuficiência renal crónica, bem como ausência de características clínicas ou laboratoriais de amiloidose ou deposição de cadeias leves. (1) A MGUS está presente em cerca de 3 a 4% da população maior de 50 anos. (2)

Recentemente foram identificados três subtipos de MGUS definidos com base na imunoglobulina envolvida: não-IgM MGUS, IgM MGUS e MGUS de cadeia leve. (1)

A etiologia desta gamapatia permanece desconhecida. É provável que a MGUS tenha origem numa resposta anormal de plasmócitos à estimulação antigénica que conduz a anomalias citogénicas primárias e a outras alterações genómicas. O resultado final é a expansão clonal dos plasmócitos e, em alguns casos, doença clinicamente significativa. Os plasmócitos em expansão normalmente produzem quantidades aumentadas da imunoglobulina monoclonal completa ou de parte dela (apenas cadeias leves). (1)

O processo de transformação desde um plasmócito normal até ao estado de MGUS pré-maligno, MMI e, por fim, até ao MM sintomático envolve diversos eventos oncológicos, tanto nos plasmócitos como no microambiente da medula óssea. De acordo com Agarwal and Ghobrial (1), uma das diferenças evidenciadas num estudo comparativo entre MGUS, MMI e MM foi a incidência de alterações genéticas de uma média de 5 por caso para MGUS, para 7,5 por caso para MMI e para 12 por caso para MM. Esse mesmo estudo associou ainda com a MGUS certas anomalias que se pensou até aí serem exclusivas de MM, como as adições em 11q e 21q e deleções em 16q e 22q, indicando que a maioria, senão todas, das alterações cromossómicas podem já estar presentes na MGUS.

A transição de MGUS para MM está associada a mutações genéticas e anomalias cromossómicas, incluindo anomalias do número de cópias e expressão de genes. (13) Uma vez que suceda a progressão de MGUS para MM, inicia-se o dano nos órgãos-alvo mediado quer por infiltração dos plasmócitos neoplásicos nos ossos e sistemas de órgãos, quer por proteínas monoclonais circulantes, quer por ambos os mecanismos.

² Proteinúria de Bence Jones significa a eliminação urinária de um tipo de proteína M constituída por cadeias leves livres kappa ou lambda produzidas em excesso.

Em geral, a detecção de trissomias indica um melhor prognóstico para a progressão da doença e esses doentes são classificados como “baixo risco”. As anomalias t(14;16), t(14;20) e del 17p13 estão relacionadas com um mau prognóstico, classificando o doente como de “alto risco”. Doentes com deleção 13, t(4;14) e hiperdiploidia têm doença classificada de “risco intermédio”. O “risco *standard*” é atribuído a doentes que não têm nenhuma das anomalias supracitadas. (14)

A expressão de microRNAs (miRNA), isto é, moléculas de RNA de cadeia simples que regulam a expressão genética na fase de pós-transcrição, aumenta progressivamente de indivíduos saudáveis, para doentes com MGUS e destes para doentes com MM. (15) Entre outros, os miRNA-21 e miRNA-106a-92 estão em excesso em MGUS e MM, enquanto miRNA-32 e miRNA-17-92 estão sobreexpressos em MM. (16) De acordo com Chi e colaboradores (15), dependendo dos diferentes subtipos genéticos de MM, a expressão dos perfis de miRNA varia.

Desregulações únicas de miRNA em MM ou MGUS podem estar diretamente envolvidas em funções críticas de plasmócitos malignos, tais como o controlo do ciclo celular, reparação do ADN e comunicação cruzada com componentes celulares do microambiente envolvente. (16) Os reguladores das funções de miRNA também se mostraram altamente desregulados em MM, tais como proteína Argonaut-2 e DICER, contribuindo para a relevância clínica dos miRNA na patogénese do MM. (16)

Os miRNAs representam um papel preponderante neste risco de progressão, pelo que a análise das anomalias que possam estar presentes e estejam associadas a um mau prognóstico, tal como os exemplos supracitados, é especialmente importante.

Durante a MGUS evidencia-se uma sobrerregulação da expressão do Ligando do Recetor Ativador do NF-kB (RANKL) por osteoblastos (uma citocina da família TNF) e diminuição na osteoprotegerina (OPG) (um recetor solúvel secretado por osteoblastos e células do estroma da medula óssea essencial para a maturação e ativação de osteoclastos). O RANKL vai ligar-se à OPG, prevenindo deste modo a sua interação com o seu recetor RANK, presente na superfície dos percussores dos osteoclastos, inibindo a diferenciação do osteoclasto e a reabsorção óssea. Embora as lesões osteolíticas não estejam presentes na MGUS, é nesta fase que a taxa RANKL/OPG está mais elevada e maior é o risco de fraturas. O papel de outros mecanismos, como o DKK1 cujo aumento da expressão inibe os osteoblastos, também contribui para o desequilíbrio entre a deposição e a reabsorção ósseas e consequente osteólise associada ao MM. (1)

As alterações complexas que ocorrem no microambiente, juntamente com as alterações genéticas supracitadas, propiciam a transição de MGUS para MM e serão descritas brevemente na secção seguinte.

A evasão do sistema imunitário é um passo importante na progressão da doença, nomeadamente um defeito na função de células T. Embora a expansão de células T oligoclonais esteja presente tanto na MGUS como no MM, os estadios menos avançados da doença estão associados a uma expansão mais robusta de células T. (1)

Um amplo espectro de alterações malignas e benignas tem sido associado à presença de MGUS, como o caso do MM, da amiloidose e das doenças linfoproliferativas. Além das mencionadas, a osteoporose, fraturas da anca ou vertebrais, alterações iónicas e metabólicas, doenças hepáticas, patologia cardíaca, renal, infecciosa e neuropatia desmielinizante crónica e autónoma, apresentam uma associação confirmada com a MGUS. (1)

A patogénese exata de MM e MGUS não é compreendida. Desde sempre foi reconhecido que alguns casos de MGUS progridem para MM. Porém, estudos recentes (17) apoiam que o MM é consistentemente precedido pela MGUS, associado a um risco de progressão de 1% por ano, aproximadamente. (2) Desta forma, a MGUS é considerada a lesão precursora pré-maligna que precede todos os casos de mieloma. A MGUS é mais frequente do que o MM e ocorre em 3% dos indivíduos após os 70 anos e em 1% após os 50 anos. (1) Por conseguinte, a prevalência de MGUS aumenta com a idade. Uma vez que a MGUS é maioritariamente assintomática e é detetada acidentalmente numa análise laboratorial, apenas 10% dos pacientes com MM diagnosticado têm história de MGUS pré-existente. (2)

Entre MGUS e MM há uma fase intermédia, intitulada Mieloma Múltiplo Indolente (MMI), que constitui um avanço da fase MGUS, mas em que o dano de órgãos alvo é ausente. O MMI é definido pela presença de uma proteína M superior a 3 g/dL e/ou mais de 10% de plasmócitos na medula óssea e, concomitantemente, ausência de sintomas ou lesões de órgãos ou tecidos. (1) O MMI está associado a um maior risco de progressão, 10% por ano, comparativamente à MGUS. (2,3)

Diversos estudos debatem a importância da taxa de translocações em MGUS, MMI e MM. (1,18–23) Contudo as opiniões e resultados divergem em vários pontos. Assim, considera-se que a presença destas translocações em MGUS e MMI não afeta a taxa de progressão da doença, enquanto no MM algumas destas translocações, como por exemplo t(11;14)(q13;q32) e t(4;14)(p16;q32), estão associadas com *outcomes* adversos. (1)

Sendo a prevalência de MGUS/MMI muito mais elevada que a de MM, é muito importante identificar os doentes com maior risco de progressão. Assim, estudam-se

algumas ferramentas que possam ajudar na identificação e prognóstico. Entre elas temos a proteína M, cujo aumento progressivo no primeiro ano de evolução de MGUS mostrou ser um fator negativo de prognóstico. O tipo de imunoglobulina, mais especificamente IgA e IgM, tem associado um aumento de risco de progressão para MM em relação a doentes com IgG. (1)

Outros fatores de risco identificados são a exposição a radiação e pesticidas, histórico de doenças autoimunes ou infecciosas crônicas. No entanto, a maioria dos doentes com MM ou MGUS não têm fatores de risco identificáveis. Talvez o fator de risco mais importante para estas doenças seja a idade avançada. MGUS é muito prevalente e progride para MM numa pequena percentagem de doentes, não havendo nenhuma estratégia para prevenir essa progressão. (1) Por conseguinte, recomenda-se a monitorização destes doentes em intervalos periódicos por forma a evidenciar essa progressão.

Os eventos associados à oncogénese de um plasmócito têm lugar no centro germinal, durante os processos de conversão de isotipo e de hipermutação somática, muito sujeitos à ocorrência de mutações. O passo seguinte, em que o clone original se diferencia em plasmócito maligno, acontece na medula óssea. É a medula óssea que permite a progressão para a doença maligna, uma vez que estimula a proliferação das células do tumor e a resistência à apoptose. Neste nicho, os clones pré-malignos participam na comunicação cruzada mediada por citocinas, que caracteriza o *milieu* e inclui diversas células residentes como as células estaminais da medula óssea, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliais vasculares, fibroblastos, adipócitos, monócitos, células T e células Natural Killer. As citocinas e outros fatores produzidos neste microambiente promovem a proliferação clonal e inibem as vias apoptóticas, dando oportunidade para mutações oncológicas adicionais. Estas citocinas e fatores solúveis, tais como o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-1), IL-6, IL-12, IL-15, TNF- α e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), constituem alvos potenciais para o desenho de fármacos. (14)

As células mielóticas expressam antígenos CD38 e CD138 na sua superfície, que funcionam como alvos para os agentes terapêuticos recentemente aprovados. (5)

Os plasmócitos têm a capacidade de secretar anticorpos e, assim, sintetizam, reúnem e segregam Ig. Inclusivamente, devido a este facto, mesmo os plasmócitos não transformados sofrem *Stress* oxidativo e endoplasmático significativo, normalmente associado com a biossíntese e secreção. A transformação oncogénica conduz à exacerbação do *Stress* oxidativo e *Stress* do retículo endoplasmático. (24)

Um dos eventos que pode ser considerado comum a quase todos os casos de MM, com ou sem translocação de imunoglobulinas, é a sobreexpressão dos genes das ciclinas D.(1)

As ciclinas D são proteínas responsáveis pela regulação da progressão do ciclo celular. (25)
As translocações de IgH desregulam diretamente a ciclina D1 ou D3 e os fatores de transcrição *C-MAF* ou *MAFB* desregulam a ciclina D2. (1)

De acordo com as alterações cromossomais encontradas, podem ocorrer duas vias distintas de patogênese: tumores não hiperdiploides com alta incidência de translocações IgH, e tumores hipodiploides com trissomias múltiplas. (5)

CARACTERÍSTICAS DE DOENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO

A seleção do tratamento a administrar em doentes com MM recidivante é cada vez mais um desafio, uma vez que o número e diversidade de regimes e tratamentos que os pacientes possam já ter recebido pode afetar a resposta a tratamentos subsequentes. Os fatores relacionados com o paciente e a doença são importantes na escolha do tratamento tendo em conta a eficácia e a tolerância. Desta forma, o conhecimento da heterogeneidade dos pacientes é importante para a escolha do tratamento. (4)

Assim, torna-se importante distinguir os termos recidivante e refratário. Entre pacientes que já receberam tratamento, o termo recidivante identifica os casos em que a doença voltou após remissão ou casos em que os doentes respondem a terapia “*salvage*”³ mas a progressão da doença continua, quer estejam a ser seguidos com ou sem tratamento de manutenção. Por outro lado, o termo refratário diz respeito aos casos que não respondem ou têm resposta limitada a terapia “*salvage*” ou em que nos 60 dias após o último tratamento, se verifica a progressão da doença. (4) Ambos os termos distinguem-se de MM refratário primário, que se refere aos casos em que a doença é incapaz de atingir pelo menos uma resposta mínima a qualquer tratamento. (8)

A progressão de MM é caracterizada pelo aumento de 25% da concentração basal ou inicial da proteína monoclonal sérica. Pode ainda ser determinada pela presença de novas lesões ósseas definitivas e/ou plasmacitomas de tecidos moles, por um aumento claro no tamanho dos plasmacitomas existentes, ou por hipercalcemia que não pode ser atribuída a outra causa. (8)

Compreender a heterogeneidade de doentes com MM recidivante pode apresentar oportunidades para o tratamento personalizado. Os doentes com MM são caracterizados de

³ A terapia *salvage* refere-se à terapia aplicada aos casos em que o doente não responde ou tem doença progressiva após o transplante de células estaminais ou não são elegíveis para o transplante. A terapia *salvage* consiste na administração de terapias que não foram previamente selecionadas, para os doentes nas condições mencionadas.

acordo com critérios, como a idade, sexo, raça, risco da doença, insuficiência renal e neuropatia periférica. (4)

1. Idade

A idade é um fator de prognóstico significativo para doentes com MM, dado que pacientes com idade superior ou igual a 50 anos no diagnóstico apresentam esperança média de vida significativamente inferior em relação a doentes mais novos. A idade média de diagnóstico é 66 anos e apenas 2% dos doentes têm menos de 40 anos no momento do diagnóstico. (2) Embora os novos tratamentos tenham aumentado as perspetivas de sobrevivência dos doentes, esses benefícios ficaram confinados ao grupo de doentes com idade inferior a 70 anos, e só recentemente estas vantagens na sobrevivência se tornaram evidentes em pacientes mais velhos. Mesmo entre pacientes da mesma faixa etária, as funções física e cognitiva podem variar significativamente. (4)

2. Sexo e Raça

O MM tem incidência maior em homens comparativamente a mulheres, no entanto, as recomendações de tratamento são similares para homens e mulheres.

No que diz respeito à incidência nas diferentes raças, o mieloma múltiplo tem maior incidência em indivíduos de raça negra. Esta disparidade racial está também relacionada com a maior prevalência de MGUS em indivíduos de raça negra. (2) Contudo, a taxa de progressão de MGUS para MM é similar entre as raças negra e caucasiana. (1) Existem diferenças clínicas entre indivíduos caucasianos e de raça negra, tais como a diferença de idade na altura do diagnóstico, a concentração de imunoglobulina monoclonal isotipo IgM e taxas de cadeias leves livres séricas. (4)

Os indivíduos de raça negra têm mais frequentemente características associadas a maior risco de progressão da doença. Embora a sobrevivência tenha aumentado nos últimos anos, esta não é uniformemente observada entre as diferentes raças. Aliás, é reconhecido que a sobrevivência global ao longo de 5 anos (1998 a 2009) foi maior para caucasianos comparativamente à raça negra. (26)

3. Doença de alto risco

Anomalias cromossómicas de alto risco, tais como a deleção de 17p13 (del17p), ou as translocações cromossómicas t(4;14), t(14;16) e t(14;20) estão associadas a taxas de resposta à terapêutica reduzidas e menor tempo de sobrevivência.

Outros indicadores de doença de alto risco incluem a carga tumoral e o estadio. A microglobulina β_2 é um marcador sérico de carga tumoral em doentes com MM e tem mostrado ser um fator de prognóstico para a sobrevivência dos pacientes. A maioria dos pacientes com MM recidivante tem valores elevados de microglobulina β_2 , tipicamente acima dos 2,5 mg/dL.

Doentes com MM recidivante podem apresentar níveis de LDH elevados e/ou envolvimento extramedular, o que indica doença de alto risco. Níveis de LDH elevados são considerados indicadores de prognóstico adversos para a sobrevivência em pacientes com MM. (27) A doença extramedular é geralmente associada a um mau prognóstico, enquanto reincidências extramedulares são associadas a sobrevivência global diminuída e aumento do risco de plasmocitomas ósseos ou fraturas. (4)

4. Insuficiência renal

A função renal é uma característica importante em doentes com MM, uma vez que a falência renal é um fator de prognóstico negativo. A disfunção renal é uma consequência comum nos doentes de MM, dado que a produção excessiva de cadeias leves monoclonais associada à doença conduz a complicações renais. Em casos de reincidência, esta sobreprodução pode levar a nefropatia, que pode ou não estar presente no diagnóstico.

Como vários agentes anti-MM são eliminados por via renal, como por exemplo a prednisona e lenalidomida, é necessária uma seleção criteriosa dos regimes de tratamento para doentes com insuficiência/disfunção renal. Desta forma, estes doentes devem receber tratamentos com agentes que sejam excretados por via extrarenal, o que acontece com os inibidores do proteassoma, tais como o bortezomib. (4)

5. Neuropatia periférica

A neuropatia periférica é comum em doentes com MM recidivante, resultando de complicações da doença e toxicidade relacionada com o tratamento. Pacientes que tenham recibo tratamento com talidomida ou bortezomib podem ter neuropatia periférica residual devido ao uso prévio destes fármacos. Assim, doentes com neuropatia prévia não devem ser tratados com estes fármacos. (4)

TERAPÊUTICA ATUAL DO MIELOMA MÚLTIPLO

Mesmo com o progresso no tempo de sobrevivência dos doentes com MM, tendo em conta a disponibilidade de novos agentes anticancerígenos, uma grande parte dos

doentes sofre reincidência, e a cura permanece limitada, embora caminhe para se tornar uma doença crónica.

A escolha do tratamento inicial está dependente da estratificação do risco e da elegibilidade do candidato para quimioterapia de alta dose seguida de transplante de células estaminais autólogas (ASCT).

Até ao ano 2000, a principal opção terapêutica para o MM incluía o recurso a agentes alquilantes e corticosteroides e, em pacientes selecionados, dose elevada de quimioterapia com transplante de células estaminais autólogas. Desde então, surgiram os inibidores do proteassoma, como o bortezomib e o carfilzomib, agentes imunomoduladores como a talidomida e lenalidomida que emergiram como terapêuticas efetivas e melhoraram o resultado clínico, em combinação com corticosteroides, agentes alquilantes e antraciclinas. (2,27)

A terapia aplicada ao MM sucede-se em várias fases: terapia inicial, transplante de células estaminais, se elegível, manutenção da terapia de acordo com a presença ou ausência de características citogénicas de alto risco, e tratamento em caso de reincidência. Os doentes considerados elegíveis para transplante recebem, por norma, quatro ciclos de terapia inicial [melfalan em dose elevada (27)] seguida de colheita e transplante de células estaminais autólogas (2), que intensifica e prolonga a resposta terapêutica, especialmente quando integrado com outros agentes terapêuticos. (8) Relativamente ao melfalan, embora ainda possa ser utilizado em casos particulares de acordo com o doente, é cada vez menos usado dado as vantagens dos agentes terapêuticos descritos na secção seguinte.

Mediante o diagnóstico de MM, a sequência de tratamento típico inclui a combinação de um inibidor do proteassoma, com dexametasona e/ou um agente imunomodulador ou um agente alquilante durante 3 a 4 ciclos, seguido por ASCT. A maioria dos doentes acaba por necessitar de terapias de segunda linha e terapias subsequentes. As opções disponíveis passam pela repetição do tratamento inicial, e combinação com medicamentos mais recentemente aprovados. Assim, um doente que já tenha realizado um transplante pode voltar a ser elegível para uma segunda quimioterapia se a sobrevivência livre de progressão tiver sido pelo menos de 18 a 24 meses. (8)

Uma linha de tratamento é definida como pelo menos um ciclo de tratamento completo de um fármaco, um regime terapêutico de combinação de vários fármacos ou uma sequência de tratamentos (por exemplo terapia inicial com bortezomib e dexametasona, seguido de transplante de células estaminais e lenalidomida como terapia de manutenção. (31)

Os regimes com recurso a talidomida, lenalidomida, e/ou bortezomib são o tratamento padrão para doentes recentemente diagnosticados.

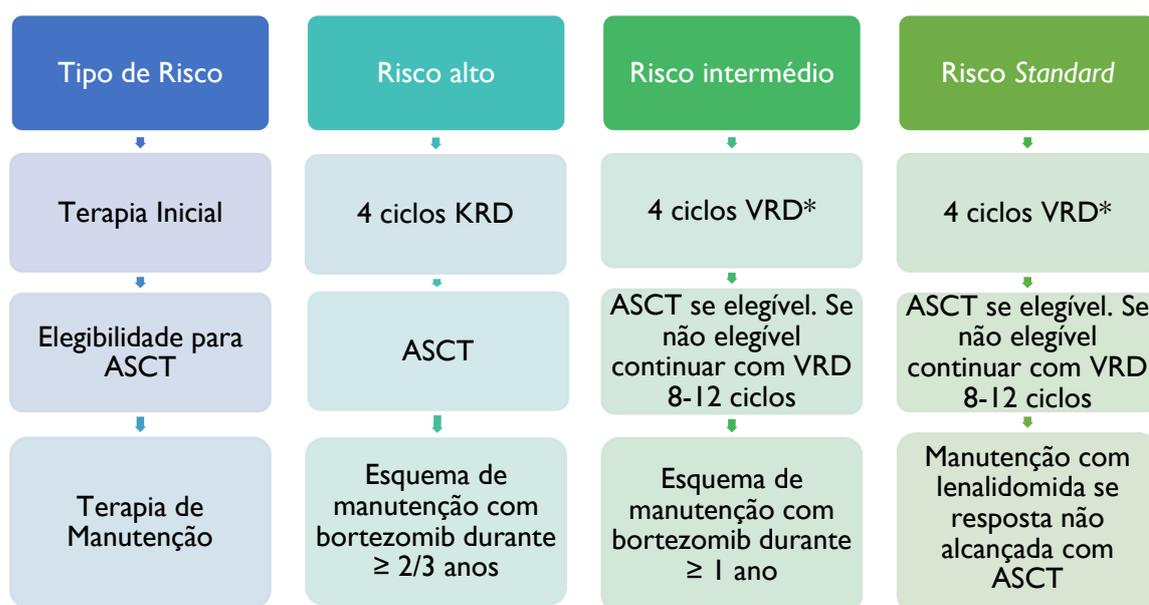
Os regimes mais utilizados na terapia inicial são lenalidomida e dexametasona (Rd), bortezomib, lenalidomida e dexametasona (VRD), bortezomib, talidomida e dexametasona (VTD) e bortezomib, ciclofosfamida e dexametasona (VCD). A terapia contendo carfilzomib, lenalidomida e dexametasona (KRD) é reservada para doentes com MM de alto risco, devido a toxicidades e custos superiores. Estudos realizados comparando a eficácia e toxicidade dos diferentes regimes demonstraram a superioridade em eficácia do regime VTD. A baixa dose de dexametasona (40 mg uma vez por semana) é preferida em todos os regimes para minimização da toxicidade. (2)

O regime Rd é preferido em doentes com idade superior a 75 anos por não tolerarem o regime triplo. (2)

No que diz respeito à terapêutica de manutenção pós-transplante, recomenda-se na maior parte das vezes uma vigilância clínica, exceto em doentes de risco *standard* que não alcançaram uma resposta parcial muito boa (VGPR) após o transplante e em doentes de risco intermédio ou alto. Nestas situações, deve-se optar por uma terapia de manutenção com talidomida ou lenalidomida para os doentes de baixo risco ou então um esquema terapêutico contendo bortezomib para os de risco intermédio/alto.

A tabela I esquematiza as opções terapêuticas das diferentes fases do tratamento para doentes classificados de acordo com o risco alto, intermédio ou *standard*.

Tabela I – Opções terapêuticas para MM recentemente diagnosticado.



*Rd se idade ≥ 75 anos. ASCT: transplante de células estaminais alógenas; KRD: Carfilzomib, Lenalidomida e Dexametasona; Rd: Lenalidomida associada a dexametasona; VRD: Bortezomib, lenalidomida e dexametasona; adaptado de (2,12).

Contudo, mesmo doentes que atingem uma resposta de alta qualidade e de longa duração com o tratamento inicial acabam por sofrer reincidências. Assim, torna-se importante o tratamento de manutenção.

NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

A terapêutica atual do MM é baseada na combinação da quimioterapia convencional com inibidores do proteassoma e/ou fármacos imunomoduladores. Contudo, mesmo com as novas terapias, o doente acaba invariavelmente por sofrer reincidência da doença e necessitar de tratamentos adicionais. Os recentes avanços quanto ao papel de microRNAs e vias de sinalização especificamente alteradas no desenvolvimento e progressão do cancro, nomeadamente do MM, abriram um novo paradigma na investigação, diagnóstico e terapêutica do cancro. Concretamente em relação ao MM, estão em desenvolvimento estratégias e processos direcionados tanto para o diagnóstico e estratificação do risco de progressão de MGUS para MM, como para a terapêutica.

Para a prevenção da progressão de MGUS

Até ao momento, não existe nenhum tratamento específico para impedir ou pelo menos reduzir a progressão de MGUS para MM. Tendo em conta os processos patológicos subjacentes que se conhece terem influência, é necessário estratificar este risco de progressão, uma vez que nem todos os doentes de MGUS desenvolvem MM. Esta estratificação apenas permite iniciar a terapia aprovada para MM mais precocemente, tentando evitar as suas consequências mais severas.

Deste modo, esta prevenção depende grandemente da existência de métodos específicos para definir o risco de progressão de MGUS para MM e da eficácia das terapias disponíveis, a seguir explicadas. No âmbito da definição do risco de progressão, a identificação de miRNAs que possam constituir potenciais biomarcadores tem vindo a assumir especial relevância.

Os miRNA têm a capacidade de controlar a expressão genética após a transcrição, regulando assim as vias intracelulares em diferentes níveis, podendo resultar em atividades que atuam desde o ciclo celular à apoptose, ao metabolismo celular e ao envelhecimento. Embora seja uma participação muito complexa, é agora claro que a homeostase de miRNA está desregulada em situações cancerígenas, quer no seu aparecimento quer na sua progressão. (16)

Recentemente, tem sido investigada a eficácia de miRNAs como biomarcadores de diagnóstico ou prognóstico. Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes que regulam a expressão genética. (3) Os miRNAs podem ligar-se a RNAs mensageiros (mRNAs) alvo, normalmente nas regiões 3' não traduzidas, causando a diminuição da expressão proteica por repressão da tradução ou quebra e degradação do mRNA alvo. (28) Os miRNAs têm funções cruciais em diversos processos biológicos, e podem contribuir para a formação e desenvolvimento tumorais. Para o MM e MGUS foram identificados vários miRNAs cuja expressão está alterada em tecidos afetados relativamente aos normais, tendo-se verificado uma associação entre a expressão desses miRNAs e a sobrevida e prognóstico dos doentes, pelo que esses miRNAs constituem potenciais biomarcadores de prognóstico e diagnóstico para o MM e MGUS. (29) A expressão diferencial de miRNAs pode estar parcialmente relacionada com a presença de anomalias cromossómicas complexas. Estudos recentes (16) demonstrando a associação entre aberrações genómicas e desregulações específicas de miRNAs, mostraram que é possível usar miRNAs como ferramentas prognósticas para estratificar doentes de MM em diferentes estadios de risco.

Os miRNA circulantes são biomarcadores promissores dado que se mantêm estáveis por longos períodos de tempo, são relativamente fáceis de medir e refletem todo o tumor. (3) O uso de miRNAs como biomarcadores aumentou grandemente como resultado da descoberta que estes circulam no sangue. (3) Foi demonstrado que os miRNAs são detetados no plasma ou soro humano, onde se pensa que estejam protegidos de degradação, um vez que estão encapsulados em microvesículas ou exossomas e/ou estão ligados a proteínas específicas, tal como Argonaut2 e nucleofosmina. (29)

De acordo com Jones *et al.* (30), os miRNA-720 e miRNA-1308 constituem biomarcadores característicos que podem distinguir doentes com MGUS e doentes com MM de indivíduos saudáveis. Por um lado, o miRNA-720 encontra-se em concentrações mais elevadas em doentes com MM do que em controlos saudáveis. Por outro lado, o miRNA-1308 encontra-se significativamente mais baixo em doentes com MGUS e MM quando comparado a controlos saudáveis. Naturalmente, o uso associado de ambos os miRNAs constitui uma ferramenta de diagnóstico mais poderosa, mostrando excelente especificidade e seletividade para distinguir estes grupos de pacientes. Por sua vez, os miRNA-1308 e miRNA-1246 constituem biomarcadores característicos que podem distinguir doentes com outras patologias de doentes com MGUS e MM. Uma característica que define um bom marcador é o facto de não sofrer alterações apreciáveis com a idade ou sexo, atributo este partilhado pelo miRNA-720, miRNA-1245 e miRNA-1308. (30)

Embora tenha sido esclarecido o envolvimento dos miRNAs nos mecanismos moleculares de MM, ainda existem limitações ao seu uso em testes minimamente invasivos, uma vez que as alterações têm lugar nos plasmócitos da medula óssea, podendo a sua presença no sangue refletir alterações noutros tipos de células. Por outro lado, não foi ainda possível identificar miRNAs suficientemente específicos para permitirem distinguir MGUS de MM, nem para prever o risco de progressão de MGUS para MM, sendo necessários mais estudos funcionais para esclarecer o papel fisiopatológico de diferentes miRNAs, bem como estudos de validação que permitam confirmar a especificidade e a sensibilidade de determinado miRNA para distinguir MGUS de MM. (31)

Para o MM sintomático

I. miRNA

O paradigma inicial para tratamento com miRNA proposto por Slack and Duchaine (32) consistia na manipulação da atividade de miRNA através da substituição de miRNAs cuja expressão estivesse suprimida ou da inibição de miRNAs sobreexpressos. Desde então, cada vez mais informação se conhece acerca da sua intervenção na doença e, acredita-se que possam ser usados de forma mais complexa do que o simples conceito de substituição/inibição. De facto, o miRNA pode ser regulado para sinalizar certas moléculas cruciais em vias celulares que influenciam a proliferação e sobrevivência das células mielóticas. Assim, o desenho das terapias baseadas em miRNAs depende da definição dos níveis de miRNAs seleccionados e identificação de alvos essenciais que suportam as células de MM ou o microambiente da medula óssea. Associado a estas terapias, impõe-se a questão do sistema de entrega dos miRNA mais adequado para maximização do seu efeito e diminuição da toxicidade, que, neste caso, passa por modificações químicas, uma das formas mais simples de garantir também a sua estabilidade. A encapsulação dos miRNAs começa também a ser investigada na sequência do tratamento por miRNAs. (16) A terapia com miRNAs está a tornar-se rapidamente numa realidade clínica, sendo o MM um alvo atrativo.

▪ miRNA associado a remissão

No estudo de Navarro *et al.* (3) foi examinada a expressão de vários miRNAs séricos em pacientes com MM no momento do diagnóstico e de resposta completa após transplante de células estaminais autólogas (ASCT), em pacientes com MGUS estável e em controlos saudáveis.

Neste estudo, verificou-se que a expressão dos miRNA-16, miRNA-17, miRNA-19b, miRNA-20a e miRNA-660 aumentou o tempo de resposta completa, enquanto níveis diminuídos de miRNA-19b e miRNA-331 foram associados a menor tempo de sobrevivência livre de progressão após o transplante de células estaminais.

Verificou-se ainda uma tendência para menores níveis de miRNA-25 em doentes com lesões ósseas no diagnóstico. A regulação negativa do miRNA-25 e miRNA-16 está ainda associada a um prognóstico pobre no cenário de MM. De notar que o miRNA-16 tem um papel de supressão do tumor na patogénese de MM, tendo como alvo plasmócitos clonais, reduzindo a neoangiogénese na medula óssea e limitando a interação entre células tumorais e da medula óssea. (3)

2. Imunoterapia – Anticorpos Monoclonais

O comprometimento imune é uma característica latente no MM. Tendo em conta este acontecimento, a imunoterapia poderá ser uma escolha alternativa.

Na última década, a sobrevivência de doentes com MM tem aumentado significativamente. Com este progresso em mente, as estratégias imunoterapêuticas emergem presentemente como uma terapêutica promissora no MM, com vários anticorpos monoclonais já aprovados e em desenvolvimento clínico. Estas aprovações permitem o acesso a novas classes de agentes terapêuticos que podem ser combinadas com os regimes de tratamento atuais.

Os anticorpos monoclonais que atuam contra antígenos expressos nas células de MM podem induzir a morte das células tumorais via mecanismos que incluem a citotoxicidade mediada por células como os linfócitos T citotóxicos e células NK, dependente do complemento (CDC) e dependente de anticorpos (ADCC), e a fagocitose mediada por macrófagos e dependente de anticorpos (ADCP).

Em 2015, foram aprovados pela FDA dois anticorpos monoclonais para a terapia do MM, o daratumumab e o elotuzumab que atuam independentemente das mutações genéticas que conduzem o mieloma, constituindo terapias que podem ser aplicadas a todos os subtipos de mieloma. (7)

▪ Daratumumab

O daratumumab é um anticorpo cujo alvo é o recetor CD38. O CD38 é expresso em níveis elevados nas células de MM e em níveis baixos em células linfoides e mieloides normais. CD38 é uma glicoproteína transmembranar com atividade ectoenzimática no

catabolismo de nucleótidos extracelulares. Outras funções incluem a adesão mediada por recetor ao interagir com CD31 ou ácido hialurónico, regulação da migração e eventos de sinalização. (33) A ligação do daratumumab ao CD38 não só estimula as células do sistema imune a matar as células de MM via CDC, ADCC, ADCP, como também induz diretamente a apoptose de células alvo e a inibição da função ectoenzima do CD38. (34) É, desta forma, uma excelente sinergia de mecanismos.

O daratumumab é um anticorpo monoclonal, IgG1k humanizado. Daratumumab intravenoso foi recentemente aprovado, em Novembro de 2015 nos EUA, para MM em doentes que tenham recebido previamente pelo menos três linhas de tratamento, incluindo um inibidor do proteassoma e um agente imunomodulador, ou que sejam refratários a um inibidor do proteassoma ou imunomodulador. No ensaio clínico de Fase II desenvolvido em pacientes com as características acima mencionadas, recorrendo ao tratamento em monoterapia com daratumumab 16mg/kg, foi atingida uma taxa de resposta global de, aproximadamente, 30%. Nos dois ensaios principais, 2 dos 42 doentes cuja dose de tratamento foi 16 mg/kg tiveram resposta completa ao tratamento e 2 atingiram uma resposta muito boa (VGR). A continuidade da aprovação para MM pode estar dependente da verificação e descrição dos benefícios clínicos em ensaios clínicos confirmatórios. (35)

O daratumumab está em pré-registo para MM refratário ou recidivante nos EUA e Canadá, e está correntemente em desenvolvimento na Fase II para esta indicação em várias regiões do globo. A Janssen, empresa responsável pelo seu desenvolvimento, está ainda a desenvolver ensaios de Fase II e III do daratumumab em combinação com imunomoduladores e/ou inibidores do proteassoma, uma vez que em estudos pré-clínicos, a adição de daratumumab mostrou ser sinérgica com outras terapias de MM, particularmente com a lenalidomida. (35)

A dose recomendada para daratumumab intravenoso é 16 mg/kg, administrado semanalmente, desde a semana 1 a 8, a cada duas semanas desde a semana 9 a 24 e a cada quatro semanas desde a semana 25 até progressão da doença. Contudo, a Janssen está a colaborar com a Halozyme para desenvolver e comercializar uma formulação subcutânea de daratumumab. (35)

- **Elotuzumab**

O elotuzumab é um anticorpo monoclonal IgG1 humanizado que foi aprovado nos EUA, em Novembro de 2015, para terapia de combinação com a lenalidomida e a dexametasona em MM recidivante e refratário. (36)

O elotuzumab liga-se ao recetor de superfície designado por molécula sinalizadora de ativação de linfócito F7 (SLAMF7), também conhecido como CSI, como CD319, e como recetor CD2-like ativador de células citotóxicas (CRACC). O elotuzumab é seletivo e altamente expresso em células de mieloma, levando à citotoxicidade celular dependente de anticorpo e ativação direta de células NK, tornando o recetor um alvo atraente para a terapia anti-mieloma. (36)

O elotuzumab tem a capacidade de inibir, *in vitro*, a ligação das células do MM às células do estroma da medula óssea, indicando potencial para interromper mecanismos de resistência medicamentosa mediados por adesão das células tumorais à fibronectina da matriz extracelular. (5) Este anticorpo demonstrou também citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) específica do SLAMF7 em células de mieloma, inclusivamente daquelas resistentes ao bortezomib. Para além disso, estudos *in vitro* mostraram que o elotuzumab pode induzir a ativação das células NK, por ligação do SLAMF7 a estas células. A lise induzida pelo elotuzumab em células de MM é aumentada com o tratamento prévio com a dexametasona, bortezomib e lenalidomida. (36)

O elotuzumab está indicado no tratamento de doentes com MM que tenham recebido uma a três terapias prévias. A dose recomendada é de 10 mg/kg por via intravenosa, semanalmente por dois ciclos, e bi-semanalmente a partir daí. A aprovação teve como base a análise de um ensaio clínico de fase III, realizado em 646 pacientes com mieloma recidivante ou refratário que tinham recebido uma média de duas terapias, excluindo a lenalidomida. Contrariamente ao daratumumab, o elotuzumab foi testado em combinação com a lenalidomida+dexametasona uma vez que os primeiros ensaios não tinham mostrado atividade do elotuzumab como agente terapêutico único. Aos dois anos, a sobrevivência livre de progressão foi verificada em 41% dos doentes que tinham recebido elotuzumab, comparativamente aos 27% que tinham recebido unicamente lenalidomida+dexametasona. A taxa de resposta global foi de 79 e 66%, respetivamente. Na análise aos 3 anos, foi mostrado que o elotuzumab melhorou significativamente a sobrevivência, de 39.6 meses para 43.7 meses. (36)

Na sequência dos ensaios clínicos, foram detetados certos efeitos adversos com maior incidência em pacientes tratados com elotuzumab. Exemplos desses efeitos adversos incluem fadiga, diarreia, pirexia, obstipação, tosse, neuropatia periférica, faringite, infeção do trato respiratório superior, pneumonia, dor, vômitos, perda de peso, linfopenia e dor orofaríngea. (36)

3. Inibidor do proteassoma: ixazomib

O ixazomib é um inibidor da subunidade 20S do proteassoma sendo o primeiro para administração oral testado num ensaio clínico. Uma das vantagens deste novo inibidor, realçada nos ensaios pré-clínicos, é a sua atividade em linhas celulares resistentes ao bortezomib e efeitos sinérgicos com a lenalidomida e dexametasona. Os efeitos secundários demonstrados em diversos ensaios clínicos de Fase I incluem trombocitopenia, anemia, neutropenia, pneumonia, diarreia, náusea, fadiga, vômitos e incidência de neuropatia na ordem dos 12%. (14) Para além disso, os resultados pré-clínicos demonstraram que o ixazomib reduz a progressão do tumor por estimular a apoptose das células mielóticas e interrompe a interação das células de MM com o microambiente da medula óssea, resultando na diminuição da angiogénese e lesões osteolíticas. O ensaio clínico de Fase III, TORMALINE-MMI, que levou à aprovação deste inibidor pela FDA em Novembro de 2015, mostrou uma sobrevivência livre de progressão de 20,6 meses para o ixazomib, comparativamente aos 14,7 meses no grupo controlo. Inclusivamente, a média deste parâmetro mostrou ser similar em doentes de alto risco, de risco *standard* e da população de doentes em geral. (14)

Este inibidor está aprovado para terapia em combinação com a lenalidomida e dexametasona, para doentes com MM que já tenham recebido pelo menos uma terapia prévia.

Comparativamente ao bortezomib, o ixazomib mostrou melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico, nomeadamente maior atividade anti-tumoral em ensaios pré-clínicos. Nos ensaios clínicos, a toxicidade aparenta ser mais favorável, particularmente a respeitante à neuropatia periférica, possivelmente devido ao facto de ser mais seletivo quanto ao seu alvo, o sítio proteolítico ($\beta 5$) responsável pela atividade tipo quimotripsina da subunidade 20S do proteassoma. (37) Apesar dos estudos realizados sugerirem que pode ter um perfil de eficácia e segurança significativamente melhor que o de outros inibidores do proteassoma, o reduzido número de doentes em que o ixazomib foi avaliado e o facto de estarem apenas disponíveis os resultados de ensaios clínicos de fase I não permite ainda tirar conclusões acerca da sua potencial superioridade, em particular, relativamente ao bortezomib cuja utilização clínica envolve já milhares de doentes. (38)

4. Inibidor de histona desacetilase: panobinostat

A acetilação e desacetilação das histonas tem um papel importante na regulação da expressão genética, uma vez que a cromatina hiper-acetilada é passível de ser transcrita, contrariamente à cromatina hipo-acetilada. Assim, regulando a acetilação da cromatina, a expressão dos genes supressores tumorais pode ser alterada, influenciando o processo de oncogênese. Através da inibição da histona desacetilase (HDAC) 6, o panobinostat não só aumenta a expressão de genes supressores tumorais, como previne também a degradação das proteínas ubiquitinadas no proteassoma, o que explica a sua ação sinérgica com os inibidores do proteassoma. Tal deverá impedir a multiplicação das células cancerosas e ativar processos que matam a célula, abrandando, desta forma, o crescimento do tumor. (14)

O ensaio clínico de Fase III, PANAMORA I, avaliou a combinação do panobinostat ou placebo com bortezomib e dexametasona em doentes com MM recidivante ou refratário. Os efeitos secundários mais comuns no grupo que recebeu panobinostat foram trombocitopenia (67%), neutropenia (35%) e diarreia (26%). O ensaio demonstrou a clara superioridade do tratamento com panobinostat quanto à sobrevivência livre de progressão (12 meses vs 8.1 meses).

Dados os resultados supracitados, o panobinostat foi aprovado pela FDA em fevereiro de 2015 em combinação com bortezomib e dexametasona para o tratamento de MM em pacientes que já tenham recebido duas terapias prévias (incluindo bortezomib e um agente imunomodulador). (14)

5. Novas terapias Celulares

A terapia celular com células estaminais autólogas constitui umas das opções menos utilizadas, mas talvez a que possui um mecanismo de ação mais potente para o controlo da doença. Atualmente, existe evidência clara de casos de cura com o transplante de células estaminais alogénicas (allo-SCT). Contudo o papel do transplante mantém-se controverso devido aos relatórios de vantagens variáveis e mortalidade elevada associada ao transplante.

Tendo em conta as evidências inconsistentes quanto ao tratamento recorrendo a allo-SCT, tanto em recentemente diagnosticados como recidivantes, este deve ser restrito ao tratamento personalizado e específico, e não considerado com tratamento padrão. Contudo, para pacientes com MM de alto risco, com sobrevivência esperada de 24 meses ou menos, e mau prognóstico, o allo-SCT é uma opção importante como parte do tratamento inicial. (39)

Embora o transplante alogénico não seja uma nova terapia, poderá ser uma importante opção de tratamento para pequenos grupos de doentes considerados de alto risco. Para tal é necessário a melhoria das ferramentas de estratificação de risco. A combinação do alotransplante com imunoterapias e os novos agentes serão a nova geração de ensaios clínicos de transplantes. (39)

Uma nova alternativa poderá passar pelo efeito imunomodulador das células dendríticas e células *cytokine-induced killer* (CIK) em combinação com a quimioterapia (bortezomib e dexametasona para o estudo em questão). As células dendríticas são as células apresentadoras de antígenos mais potentes e despoletam/estimulam a resposta específica anti-tumor. As células CIK constituem um grupo heterogéneo de células com elevada atividade anti-tumoral. (40) As células dendríticas podem estimular e aumentar a resposta das células T, enquanto ativam o efeito anti-tumoral das células NK e macrófagos. As células CIK possuem a atividade apoptótica específica das células T e a atividade das células NK. Estas células CIK conseguem induzir a morte das células tumorais, incluindo as células resistente a fármacos, sem danificar as células normais. A terapia com recurso a células dendríticas e CIK pode matar e limpar (*kill and clear*) as células tumorais ocultas, reduzindo a hipótese de recidiva e estando associada a uma elevada segurança com poucos efeitos secundários. O MM está associado com um desequilíbrio Th1/Th2, cuja taxa desempenha um papel crucial na imunidade. No MM, verifica-se uma alteração no perfil de células Th, havendo um deslocamento de Th1 para Th2. Como a resposta Th1 está enfraquecida e é essencial para a eliminação de células tumorais, torna-se mais fácil a sua evasão ao sistema imune. (40)

Assim, a combinação das células dendríticas com as células CIK apresenta atividade sinérgica na redução da atividade imuno-supressora das células T CD8⁺ e inibe a secreção de TGF- β (citocina imunossupressora) pelas células tumorais e células T reguladoras (Treg). Através desta terapia, o equilíbrio Th1/Th2 é também restabelecido pela redução da ativação das células Treg CD4⁺CD25⁺ e pela ativação dos mediadores das células NK. (40)

6. O Stress oxidativo como alvo farmacológico

A descoberta do inibidor do proteassoma, Bortezomib, revolucionou a terapia do MM e aumentou a sobrevivência dos doentes. A inibição do proteassoma resulta na acumulação de proteínas desenroladas, que induzem o Stress do Retículo Endoplasmático (RE). Este é considerado um mediador da citotoxicidade dos inibidores do proteassoma, causando morte celular por diversos mecanismos, incluindo a sobreprodução de espécies reativas de

oxigênio (ROS). De facto, o *Stress* oxidativo é um dos mecanismos pelos quais o bortezomib atua. Por exemplo, a produção de ROS precede a iniciação da cascata apoptótica desencadeada pelo bortezomib. (24)

Os componentes enzimáticos envolvidos no *Stress* do RE dependente da produção de ROS incluem a proteína dissulfeto isomerase (PDI), *endoplasmatic reticulum oxidoreductin* (ERO-1), complexos oxidativos NADPH e enzimas da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. Durante o *Stress* oxidativo a atividade destas enzimas aumenta. (24) As células tumorais possuem um nível basal de ROS superior ao das células normais e podem, por conseguinte, ser mais vulneráveis ao *Stress* oxidativo induzido pelos agentes quimioterapêuticos. Vários agentes que aumentam diretamente os níveis intracelulares de ROS já foram aprovados para diversas doenças malignas. Embora nenhum esteja aprovado para o MM, ensaios realizados em culturas de células sugerem que a indução do *Stress* oxidativo é uma estratégia terapêutica promissora. (24)

O tratamento de células de MM com o inibidor seletivo da tiorredoxina-I (TRX1), PX-12 (*1-metilpropil-2-imidazolil dissulfureto*) ou *auranofina*, um composto que inibe as tiorredoxina redutases 1 e 2 (TXNRD1,2), conduz à apoptose dependente de ROS. A *auranofina* pode ser usada como agente terapêutico único ou em combinação com inibidores do proteassoma. (24)

Ao longo dos últimos 15 anos foram identificados vários agentes indutores de *Stress* oxidativo com capacidade citotóxica nas células de MM. Contudo, antes de poderem realizar-se estudos clínicos, são necessários mais ensaios para identificar a sua eficácia e a sua capacidade para cooperar com inibidores do proteassoma. (24)

A indução de *Stress* oxidativo pode ter elevados efeitos secundários. Contudo, o *Stress* oxidativo pode ser específico para as células cancerosas, dado que existe diferente espectro e atividade das fontes oxidativas e das enzimas antioxidantes entre as células normais e células malignas. (41)

DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA NO MIELOMA MÚLTIPLO

As novas terapêuticas mudaram radicalmente o tratamento de MM, associando à doença maior tempo de sobrevivência. Contudo, a maioria dos doentes sofre recidivas apesar da qualidade da resposta aos tratamentos, evidenciando uma doença persistente que não é detetada com as técnicas recomendadas de avaliação. Consequentemente, são necessários novos métodos de deteção e quantificação do nível de doença de residual mínima, para além dos critérios de deteção de resposta clínica. (42)

O exame à medula óssea tem sido o pilar da avaliação da doença. Para esta avaliação têm sido adotados ensaios mais sensíveis, incluindo a citometria de fluxo multiparamétrica (MFC) e técnicas de sequenciação das sequências VDJ de nova geração, como a Reação da Polimerase em Cadeia com oligonucleótido específico de alelo (ASO)-qPCR, por forma a aumentar a sensibilidade da deteção das células de MM. (42)

Os avanços tecnológicos da citometria de fluxo multiparamétrica permitem a análise simultânea de um elevado número de células ou diferentes características do mesmo tipo de células de uma forma rápida e eficiente. A ASO-qPCR e outras técnicas de sequenciação de última geração, através da identificação dos rearranjos genéticos da cadeia pesada das imunoglobulinas (IgH) específicos das células do MM, como os rearranjos IgH-VDJ_H, IgH-DJ_H, e IGK, permitem a deteção de números muito pequenos de células plasmáticas de MM. Uma vez amplificado, o gene da imunoglobulina é sequenciado e as frequências dos diferentes clones na amostra são determinadas. (42) Assim, a deteção da doença residual mínima poderá ser progressivamente incluída nos ensaios clínicos e, tendo como base amostras de vários ensaios, será avaliada a sua utilidade como uma variável preditiva na monitorização da doença. (42)

Dado o aumento da incidência de doença extramedular, a sua presença deve ser excluída como parte da avaliação da doença residual mínima. O papel da tomografia por emissão de positrões (PET) na avaliação da doença residual mínima está a ser avaliado, particularmente quando é atingida doença residual mínima negativa na medula óssea. (42)

Para além disso, a taxa de cadeias pesadas/leves pode ser importante nesta avaliação, dado que a combinação de um ensaio celular negativo, PET negativo e taxa de cadeias pesadas/leves normal provavelmente representa um *endpoint* que reflete a erradicação das células tumorais e recuperação da população de plasmócitos. (42)

CONCLUSÃO

O MM é ainda uma doença incurável e a compreensão do mecanismo da doença torna-se importante, especialmente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. O prognóstico para estes pacientes tem melhorado ao longo da última década com o desenvolvimento de agentes e regimes quimioterapêuticos novos e mais eficazes. Apesar deste progresso, quase todos os doentes de MM acabam por recidivar, mesmo os que respondem totalmente ao tratamento inicial. Eventualmente, alguns acabam por se tornar resistentes tanto aos imunomoduladores, como aos inibidores do proteassoma, e essa possibilidade confere-lhes um mau prognóstico. O MM recidivante ou refratário é uma realidade para vários doentes, o que faz com que sejam necessárias novas classes terapêuticas e novos fármacos com mecanismos de ação diferentes dos já conhecidos. O ano de 2015 foi caracterizado pela aprovação de novas classes terapêuticas que prometem revolucionar o tratamento e classificação do MM. Neste momento, várias novas moléculas encontram-se em ensaios clínicos para a terapia do MM, nomeadamente anticorpos monoclonais e inibidores de cinases. Além disso, a estratificação do risco baseado em anomalias cromossómicas e expressão de genes torna-se uma área emergente cuja evolução contribuirá significativamente para melhorar a eficácia terapêutica. (8)

Hoje em dia a prevenção da doença é tão importante quanto a cura da mesma. Para tal, os biomarcadores, nomeadamente os miRNAs, prometem beneficiar as duas opções, na medida em que poderão identificar os casos com maior risco de progressão, permitindo o tratamento precoce e podem constituir uma perspetiva futura para a terapia de MM.

Atualmente possuímos mais opções terapêuticas e maior conhecimento da doença do que há um ano atrás. Grande esperança é depositada nos resultados práticos dos novos fármacos e novas terapêuticas recém-aprovados no sentido da evolução e da tão desejada cura do Mieloma Múltiplo.

BIBLIOGRAFIA

1. AGARWAL, A., GHOBRIAL, I.M. - **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.** Clin Cancer Res. 19:5 (2013) 985–994.
2. RAJKUMAR, S.V., KUMAR, S. - **Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment.** Mayo Clin Proc. 91:1 (2016) 101–119.
3. NAVARRO, A., DÍAZ, T., TOVAR, N., PEDROSA, F., TEJERO, R., CIBEIRA, M.T., MAGNANO, L., ROSIÑOL, L., MONZÓ, M., BLADÉ, J., LARREA, C.F. - **A serum microRNA signature associated with complete remission and progression after autologous stem-cell transplantation in patients with multiple myeloma.** Oncotarget. 6:3 (2015) 1874–1883.
4. DIMOPOULOS, M.A., TERPOS, E., NIESVIZKY, R., PALUMBO, A. - **Clinical characteristics of patients with relapsed multiple myeloma.** Cancer Treat Rev 41:10 (2015) 827–835.
6. PINGALI, S.R., HADDAD, R.Y., SAAD, A. - **Current Concepts of Clinical Management of Multiple Myeloma.** Dis Mon. 58:4 (2012) 195–207.
7. KINGWELL, K. - **Age of antibody therapeutics dawns for multiple myeloma.** Nat Rev Drug Discov. 15:1 (2016) 5–6.
8. LAUBACH, J., GARDERET, L., MAHINDRA, A., GAHRTON, G., CAERS, J., SEZER, O., et al - **Management of relapsed multiple myeloma: Recommendations of the international myeloma working group.** Leukemia. 30:5 (2015) 1005–1017.
9. IMWG - **International Myeloma Working Group (IMWG) Criteria for the Diagnosis of Multiple Myeloma** [Em linha]. [Acedido a 27 julho 2016]. Disponível em: <http://imwg.myeloma.org/international-myeloma-working-group-imwg-criteria-for-the-diagnosis-of-multiple-myeloma/>
10. MOREAU, P., MIGUEL, J.S., LUDWIG, H., SCHOUTEN, H., MOHTY, M., DIMOPOULOS, M., DREYLING, M. - **Clinical practice guidelines Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** Ann Oncol. 24:6 (2013) 133–137.
11. PALUMBO, A., AVET-LOISEAU, H., OLIVA, S., LOKHORST, H.M., GOLDSCHMIDT, H., ROSINOL, L., et al - **Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group.** J Clin Oncol. 33:26 (2015) 2863–2869.
12. RAJKUMAR, S.V. - **Multiple Myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management.** Am J Hematol. 91:7 (2016) 719–734.
13. NIKESITCH, N., LING, S.C.W. - **Molecular mechanisms in multiple myeloma drug resistance.** J Clin Pathol. 69:2 (2015) 97–101.
14. NAYMAGON, L., ABDUL-HAY, M. - **Novel agents in the treatment of multiple myeloma: a review about the future.** J Hematol Oncol. 9:52 (2016) 1–20.
15. CHI, J., BALLABIO, E., CHEN, X.H., KUŠEC, R., TAYLOR, S., HAY, D., TRAMONTI, D., SAUNDERS, N.J., LITTLEWOOD, T., PEZZELLA, F., BOULTWOOD, J., WAINSCOAT, J., HATTON, C., LAWRIE, C.H. - **MicroRNA expression in multiple myeloma is associated with genetic subtype, isotype and survival.** Biol Direct. 6:23 (2011).
16. ROSSI, M., TAGLIAFERRI, P., TASSONE, P. - **MicroRNAs in multiple myeloma and related bone disease.** Ann Transl Med. 3:21 (2015) 334–345.

17. LANDGREN, O., KYLE, R.A., PFEIFFER, R.M., KATZMANN, J.A., CAPORASO, N.E., HAYES, R.B., DISPENZIERI, A., KUMAR, S., CLARK, R.J., BARIS, D., HOOVER, R., RAJKUMAR, S.V. - **Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study.** *Blood First.* 113:22 (2009) 5412–5418.
18. AVET-LOISEAU, H., FACON, T., GROSBOIS, B., MAGRANGEAS, F., RAPP, M.J., HAROUSSEAU, J.L., MINVIELLE, S., BATAILLE, R. - **Advances in Brief 14q32 Translocations and Monosomy 13 Observed in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance Delineate a Multistep Process for the Oncogenesis of Multiple Myeloma.** *Cancer Res.* 59:18 (1999) 4546–4550.
19. LOPEZ-CORRAL, L.C., GUTIERREZ, N., BELEN VIDRIALES, M., MATEOS, M.V., RASILLO, A., GARCÍA-SANZ, R., PAIVA, B., SAN MIGUEL, J.F. - **The Progression from MGUS to Smoldering Myeloma and Eventually to Multiple Myeloma Involves a Clonal Expansion of Genetically Abnormal Plasma Cells.** *Clin Cancer Res.* 17:7 (2011) 1692–1700.
20. 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. - **Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context.** *Haematologica.* 94:12 (2009) 1708–1713.
21. 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. - **Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance.** *Blood.* 100:4 (2002) 1417–1425.
22. AVET-LOISEAU, H., FACON, T., DAVIET, A., GODON, C., HAROUSSEAU, J., GROSBOIS, B. - **Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation.** *Blood.* 99:6 (2002) 2185–2192.
23. LÓPEZ-CORRAL, L., MATEOS, M.V., CORCHETE, L.A., SARASQUETE, M.E., DE RUBIA, J., DE ARRIBA, F., LAHUERTA, J., GARCÍA-SANZ, R., SAN MIGUEL, J.F., GUTIÉRREZ, N.C. - **Genomic analysis of high-risk smoldering multiple myeloma.** *Haematologica.* 97:9 (2012) 1439–1443.
24. LIPCHICK, B.C., FINK EE, NIKIFOROV, M.A. - **Oxidative stress and proteasome inhibitors in multiple myeloma.** *Pharmacol Res.* 105 (2016) 210–215.
25. MUSGROVE, E.A., CALDON, C.E., BARRACLOUGH, J., STONE, A., SUTHERLAND, R.L. - **Cyclin D as a therapeutic target in cancer.** *Nat Publ Gr.* 11:8 (2011) 558–572.
26. BHATNAGAR, V., WU, Y., GOLOUBEVA, O.G., RUEHLE, K.T., MILLIRON, T.E. - **Disparities in Black and White Patients With Multiple Myeloma Referred for Autologous Hematopoietic Transplantation: A Single Center Study.** *Cancer.* 121:7 (2015) 1064–1070.
27. GIRALT, S., GARDERET, L., DURIE, B., COOK, G., GAHRTON, G., BRUNO, B., et al - **American Society of Blood and Marrow Transplant, European Society of Blood and Marrow Transplantation, Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network and International Myeloma Working Group Consensus Conference on Salvage Hematopoietic Cell Transplant.** *Biol Blood Marrow Transplant.* 21:12 (2015) 2039–2051.
28. WANG, W., CORRIGAN-CUMMINS, M., BARBER, EA., SALEH, LM., ZINGONE, A.,

- GHAFOOR, A., COSTELLO, R., ZHANF, Y., KURLANDER, R.J., KORDE, N., ROCCARO, A.M., GHOBRIAL, I.M., LANDGREN, O., CALVO, KR. - **Aberrant Levels of miRNAs in Bone Marrow Microenvironment and Peripheral Blood of Myeloma Patients and Disease Progression.** *J Mol Diagnostics.* 17:6 (2015) 669–678.
29. KUBICZKOVA, L., KRYUKOV, F., SLABY, O., DEMENTYEVA, E., JARKOVSKY, J., NEKVINDOVA, J., RADOVA, L., GRESLIKOVA, H., KUGLIK, P., VETESNIKOVA, E., POUR, L., ADAM Z, SEVCIKOVA S, HAJEK R - **Circulating serum microRNAs as novel diagnostic and prognostic biomarkers for multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance.** *Haematologica.* 99:3 (2014) 511–518.
 30. JONES, C.I., ZABOLOTSKAYA, M. V., KING, A.J., STEWART, H.J.S., HORNE, G.A., CHEVASSUT, T.J., NEWBURY, S.F. - **Identification of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for use in multiple myeloma.** *Br J Cancer.* 107:12 (2012) 1987–1996.
 31. CALVO, K.R., LANDGREN, C.O., ROCCARO, A.M., GHOBRIAL, I.M. - **Role of microRNAs from monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) to multiple myeloma.** *Semin Hematol.* 48:1 (2011) 39–45.
 32. DUCHAINE, T.F., SLACK, F.J - **RNA interference and micro-RNA – oriented therapy in cancer: rationales, promises, and challenges.** *Curr Oncol.* 16:4 (2009) 61–66.
 33. RAJKUMAR, S.V. - **Daratumumab in multiple myeloma.** *Lancet.* 387:10027 (2016) 1490–1492.
 34. VAN DE DONK, N.W.C.J., MOREAU, P., PLESNER, T., PALUMBO, A., GAY, F., LAUBACH, J.P., MALAVASI, F., MATEOS M-V., SONNEVELD, P., RICHARDSON, P.G. - **Clinical efficacy and management of monoclonal antibodies targeting CD38 and SLAMF7 in multiple myeloma.** *Blood First.* 127:6 (2016) 681–695.
 35. MCKEAGE, K. - **Daratumumab: First Global Approval.** *Drugs.* 76:2 (2016) 275-281.
 36. MARKHAM, A. - **Elotuzumab: First Global Approval.** *Drugs.* 76:3 (2016) 397–403.
 37. OFFIDANI, M., CORVATTA, L., CARAFFA, P., GENTILI, S., MARACCI, L., LEONI, P. - **An evidence-based review of ixazomib citrate and its potential in the treatment of newly diagnosed multiple myeloma.** *Onco Targets Ther.* 7 (2014) 1793–1800.
 38. MOREAU, P. - **Oral therapy for multiple myeloma: ixazomib arriving soon.** *Blood.* 124:7 (2014) 986–987.
 39. DHAKAL, B., VESOLE, D.H., HARI, P.N. - **Allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma: is there a future?** *Bone Marrow Transplantation.* 51:4 (2016) 492–500.
 40. ZHAO, X., JI, C., LIU, G., MA, D., DING, H., XU, M., XING, J. - **Immunomodulatory effect of DC/CIK combined with chemotherapy in multiple myeloma and the clinical efficacy.** *Int J Clin Exp Pathol.* 8:10 (2015) 13146–13155.
 41. CHANDRA, J. - **Oxidative Stress by Targeted Agents Promotes Cytotoxicity in Hematologic Malignancies.** *Antioxid Redox Signal.* 11:5 (2009) 1123–1137.
 42. KUMAR, S., PAIVA, B., ANDERSON, K.C., DURIE, B., LANDGREN, O., MOREAU, P., et al. **International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma.** *Lancet Oncol.* 17:8 (2016) 328–346.