Camila da Cruz Gouveia Linardi

**Anormalidades citogenéticas e sua relação com a
proliferação e a apoptose celular em portadores de
mieloma múltiplo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia
Orientador: Prof. Dr. Pedro Enrique Dorlhiac Llacer

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Linardi, Camila da Cruz Gouveia

Anormalidades citogenéticas e sua relação com a proliferação e a apoptose celular em portadores de mieloma múltiplo / Camila da Cruz Gouveia Linardi. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.
Orientador: Pedro Enrique Dorlhiac Llacer.

Descritores: 1.Mieloma múltiplo 2.Citogenética 3.Proliferação de células
4.Apoptose

USP/FM/DBD-444/10

***Dedico este trabalho aos
queridos pacientes***

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Pedro Enrique Dorlhiac Llacer, meu orientador, por ter me aceitado como aluna e por ter acreditado em meu trabalho. Agradeço por todo apoio e incentivo prestados durante este longo caminho percorrido.

À Dra. Gracia Aparecida Martinez, pelo carinho com que me recebeu, pelo incentivo e por ter me ensinado tanto ao longo de todos estes anos de convivência. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me apoiando nos momentos mais difíceis.

À Dra. Elvira D. Rodrigues Pereira Velloso, cuja participação foi essencial para a realização deste trabalho. Agradeço pelos ensinamentos, pela paciência, pela disponibilidade irrestrita e principalmente, pelo otimismo com que sempre me apoiou.

Às amigas Cristina Aiko Kumeda e Aline de Medeiros Leal, para quem não existem palavras que traduzam minha gratidão. Agradeço pela grande ajuda, por estarem sempre disponíveis, pelas intermináveis leituras de FISH (nem sempre nas melhores horas!) e principalmente, por suportarem a minha teimosia.

À Dra. Valeria Buccheri, querida amiga, pelo entusiasmo, pelo incentivo à investigação científica e por contribuir de forma tão importante para a minha formação profissional. Agradeço, principalmente, por estar sempre disposta a ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética, Dra. Monika Conchon, Patrícia de Barros Ferreira, Andrea Fauze Mascarenhas, Vania Aikawa, Leandro Peliçario, Tiago Vicente e Marcela Cavalcante pelo carinho, companheirismo e pela solidariedade, fundamentais para a realização deste trabalho.

À Dra. Beatriz Beitler de Maurino e à Dra. Juliana Pereira, pelo carinho com que me receberam no Laboratório de Imunopatologia.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia, em especial à Suely Satiko, Carla Godoy e Lis Villela, por me auxiliarem desde os primeiros passos deste trabalho. Agradeço também à Graciela Brocardo, Adriano Pereira e Lucilla Vianna.

À amiga Debora Levy, pelo apoio, conselhos e auxílios prestados a qualquer hora.

À Dra. Sandra Gualandro e aos amigos do Laboratório de Hematologia, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Prof. Dr. Israel Bendit, Mafalda Novaes e amigos do Laboratório de Biologia Tumoral, pela oportunidade de trabalharmos lado a lado e pelo auxílio prestado a qualquer momento.

Ao Prof. Dr. Raymundo Azevedo, pela gentil colaboração na realização das análises estatísticas deste trabalho.

Ao Sr. Ivaldo Olímpio da Silva e ao Prof. Dr. Claudio Leone, pela delicadeza e pela forma atenciosa com que me auxiliaram nas análises estatísticas.

À Dra. Juliana Pereira, Dra. Vania Hungria e Dra. Maria de Lourdes Chauffaille, pelas valiosas contribuições durante a minha qualificação.

Ao Prof. Dr. Dalton de Alencar Fisher Chamone, pela confiança e pela oportunidade de trabalhar em sua equipe.

Ao Dr. Jesús María Hernández-Rivaz e sua equipe, por terem me aceitado carinhosamente como visitante no Laboratório de Citogenética do Hospital Universitario de Salamanca. Agradeço pelos ensinamentos, fundamentais para a realização deste projeto de pesquisa.

A todos os médicos do Serviço de Hematologia, aos profissionais do Hospital Dia e a todos os médicos residentes, que me acompanharam desde o início deste trabalho, sempre me ajudando na captação de pacientes e na coleta de material biológico.

Agradeço também aos amigos e familiares, por acreditarem em mim, pelo ombro amigo, pelos conselhos, por compreenderem a minha ausência, o meu mau humor e a minha impaciência. Em especial, agradeço aos amigos Juliano Julio Cerci, Maura Salaroli de Oliveira, Douglas Vasconcelos Cancherini e Isolmar Schetttert, dispostos a ajudar a qualquer momento. Agradeço também aos meus pais, Denise e Fernando e à minha querida amiga, Alessandra Mantovani Dabgab.

Por fim, agradeço ao meu companheiro de sempre, Rodrigo Ito, por ter me apoiado tanto nesta longa jornada.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
SUMMARY	
1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Características clínicas e epidemiológicas do mieloma múltiplo	8
2.2 O mieloma múltiplo e a importância dos fatores de prognóstico clínicos e laboratoriais.....	11
2.3 Características intrínsecas dos plasmócitos e prognóstico.....	16
2.3.1 Estudo das características dos plasmócitos malignos por citometria de fluxo.....	18
2.3.1.1 Estudo da fração de plasmócitos malignos em proliferação por citometria de fluxo.....	22
2.3.1.2 Determinação da fração de plasmócitos em apoptose por citometria de fluxo.....	26
2.3.2 Alterações citogenéticas presentes no mieloma múltiplo.....	33
2.3.2.1 A importância das alterações cromossômicas na patogenia e nas características biológicas do mieloma múltiplo.....	40
3.Objetivos.....	49
4.Casuística e Métodos.....	51
4.1 Casuística.....	52
4.2 Métodos.....	54
4.2.1 Fluxograma do trabalho.....	54
4.2.2 Obtenção de material para estudo.....	55
4.2.3 Separação das células mononucleares por gradiente de densidade.....	55
4.2.4 Preparação de lâminas de citocentrifugação para o FISH.....	56
4.2.5 Citogenética molecular-hibridação <i>in situ</i> por fluorescência (FISH).....	56
4.2.5.1 Sondas de DNA utilizadas.....	56
4.2.5.2 Procedimentos.....	57
4.2.5.3 Interpretação técnica dos resultados.....	60
4.2.5.4 Valores de corte das sondas utilizadas no estudo.....	63
4.2.6 Citometria de fluxo.....	65
4.2.6.1 Estudo Imunológico.....	65
4.2.6.3 Determinação da marcação de plasmócitos com anexina V por citometria de fluxo.....	67
4.2.6.4 Determinação da expressão de Ki-67 por citometria de fluxo.....	69
4.2.6.5 Identificação e quantificação de células plasmocitárias circulantes por citometria de fluxo.....	71
4.2.6.6 Aquisição das amostras em citômetro de fluxo.....	72
4.2.6.7 Avaliação da apoptose e da expressão de Ki-67 nos plasmócitos.....	73
4.2.6.8 Quantificação de células plasmocitárias circulantes.....	75
4.2.7 Análise do prontuário médico.....	76
4.2.8 Análise estatística.....	77
5.Resultados.....	79

5.1 Características clínicas e laboratoriais	80
5.2 Evolução clínica dos pacientes.....	82
5.3 Análise citogenética molecular- técnica de FISH	86
5.4 Análise dos dados obtidos através da técnica de imunofluorescência direta por citometria de fluxo.....	92
5.4.1 Análise dos resultados da expressão de Ki-67 nos plasmócitos.....	92
5.4.2 - Análise dos resultados da marcação de plasmócitos com anexina V....	93
5.4.3 Análise da razão expressão de Ki-67 em plasmócitos sobre a marcação com anexina V.....	94
5.4.4 Análise da detecção de plasmócitos circulantes por citometria de fluxo..	94
5.5 Associação entre alterações citogenéticas e características biológicas da célula tumoral determinadas por citometria de fluxo.....	95
5.6 Associação entre características clínicas e laboratoriais e as variáveis obtidas pela técnica de FISH (del(13q14), t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)) e por citometria de fluxo (Ki-67, Anexina V, razão Ki-67/Anexina V, plasmócitos em sangue).....	99
5.7 Associação entre as diferentes variáveis estudadas e resposta à terapêutica, sobrevida livre de eventos e sobrevida global.....	103
6.Discussão.....	114
6.1 Características clínicas e laboratoriais dos 84 pacientes.....	115
6.2 Citogenética molecular-técnica de FISH.....	116
6.2 Citogenética molecular-técnica de FISH.....	123
6.4 Associação entre alterações citogenéticas e características biológicas da célula tumoral determinadas por citometria de fluxo.....	128
7 Conclusões.....	135
8 Anexos.....	139
9. Referências Bibliográficas.....	167

Lista de Figuras

Figura 1 - Sobrevida global em 756 pacientes portadores de MM de acordo com o ISS-estudo multicêntrico brasileiro (Hungria <i>et al.</i> , 2008).....	15
Figura 2 - Identificação de plasmócitos pela marcação destes com anticorpos anti-cadeia leve ligado ao fluorocromo FITC (fluorescência verde). A célula da direita está na fase S do ciclo celular e apresenta captação de BrdU (Kumar <i>et al.</i> , 2004).....	17
Figura 3 - Detecção de plasmócitos circulantes por citometria de fluxo: (A) paciente sem nenhum plasmócito em sangue periférico, (B) paciente com sete plasmócitos a cada 50 000 células e (C) paciente com 2 946 plasmócitos a cada 50 000 células (Nowakowski <i>et al.</i> , 2005).....	21
Figura 4 - Determinação da fase S por citometria de fluxo (proveniente do laboratório de imunopatologia do serviço de hematologia do HC-FMUSP).....	24
Figura 5 - Esquema comparativo das fases da doença e eventos genéticos do mieloma múltiplo com a ontogênese dos linfócitos B (Falcão, Dalmazzo, 2007).....	47
Figura 6 - Plasmócitos (células com o citoplasma azul fluorescente) ao lado de células não plasmocitárias (células sem citoplasma fluorescente), submetidas à hibridação com a sonda LSI RB1 (13q14) para pesquisa de del(13q14). Estes plasmócitos não apresentam del(13q14).....	57
Figura 7 - Sonda de dupla fusão em célula com translocação entre dois cromossomos: um sinal verde, um sinal laranja e dois sinais de fusão (Kearney, 1999).....	61
Figura 8 - Sonda de dupla fusão para pesquisa de t(4;14)(p16;q32) em célula com translocação entre o cromossomo 14 e outro cromossomo que não o 4 (por exemplo: cromossomo 16 ou 20): três sinais verdes e dois sinais laranja.	62
Figura 9 - Análise da marcação de plasmócitos com anexina V.....	75
Figura 10 - Curva de sobrevida global dos 84 pacientes-taxa de 54% em dois anos.....	85
Figura 11 - Curva de sobrevida livre de evento dos 84 pacientes-taxa de 22% em dois anos.....	85
Figura 12 - Caso 13 - dois plasmócitos com del(13q14): apenas um sinal laranja.....	87

Figura 13

- (A) Caso 53 - Plasmócito (célula à esquerda) com rearranjo IGH/FGFR3 (dois sinais de fusão, um sinal laranja e um sinal verde) ao lado de célula não plasmocitária normal (dois sinais laranja e dois sinais verdes)
- (B) Caso 12 - Plasmócito com presença de três sinais verdes na utilização da sonda LSI IGH/FGFR3: provável rearranjo do IGH com outro parceiro cromossômico, sem envolvimento do gene FGFR3..... 89

Figura 14

- (A) Caso 5 - Plasmócito com rearranjo IGH/FGFR3 e amplificação do sinal de fusão (três sinais de fusão, um sinal laranja e um sinal verde)
- (B) Caso 65 - Plasmócito com presença de dois sinais de fusão, três sinais verdes e dois sinais laranja na utilização da sonda LSI IGH/FGFR3: clone tetraplóide seguido de t(4;14)(p16;q34)..... 89

- Figura 15** - Caso 15 - Plasmócitos com provável tetrassomia dos cromossomos 4 e 14 (sonda LSI IGH/FGFR3)..... 90

Figura 16

- (A) Caso 72 - del(17p13)
- (B) Caso 50 - trissomia do cromossomo 17 seguido de del(17p13)..... 91

- Figura 17** - Caso 34 - paciente com expressão de Ki-67 em plasmócitos de 3,04%..... 92

- Figura 18** - Caso 40 - paciente com expressão de Ki-67 em plasmócitos de 20,89%..... 92

- Figura 19** - Caso 55 - paciente com marcação de plasmócitos com anexina V de 8,0%..... 93

- Figura 20** - Correlação de Spearman entre porcentagem de células com del(13q14) e expressão de Ki-67..... 96

- Figura 21** - Correlação de Spearman entre porcentagem de células com del(13q14) e marcação com anexina V..... 97

- Figura 22** - Correlação de Spearman entre porcentagem de células com del(13q14) e razão Ki-67/anexina V..... 97

- Figura 23** - Correlação de Spearman entre porcentagem de células com del(13q14) e quantidade de plasmócitos em sangue..... 98

- Figura 24** - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,29) e de sobrevida global (p=0,25) de acordo com estágio clínico Durie & Salmon..... 108

- Figura 25** - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,031) e de sobrevida global (p=0,0006) de acordo com ISS..... 108

Figura 26 - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,03) e de sobrevida global (p=0,07) de acordo com ausência ou presença de lesão lítica.....	108
Figura 27 - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,84) e de sobrevida global (p=0,19) de acordo com nível sérico de cálcio.....	109
Figura 28 - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,025) e de sobrevida global (p=0,0008) de acordo com nível sérico de creatinina.....	109
Figura 29 - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,13) e de sobrevida global (p=0,0069) de acordo com nível de hemoglobina.....	109
Figura 30 - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,17) e de sobrevida global (p=0,01) de acordo com nível sérico de albumina.....	110
Figura 31 - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,85) e de sobrevida global (p=0,055) de acordo com nível sérico de β_2 -microglobulina.....	110
Figura 32 - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,0005) e de sobrevida global (p=0,01) de acordo com nível sérico de desidrogenase láctica.....	110
Figura 33 - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,06) e de sobrevida global (p=0,03) de acordo com nível sérico de proteína C reativa.....	111
Figura 34 - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,04) e de sobrevida global (p=0,01) de acordo com realização de QTAD.....	111
Figura 35: Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,43) e de sobrevida global (p=0,36) de acordo com expressão de Ki-67 em plasmócitos.....	111
Figura 36 - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,65) e de sobrevida global (p=0,77) de acordo com marcação de plasmócitos com anexina.....	112
Figura 37 - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,49) e de sobrevida global (p=0,25) de acordo com quantidade de plasmócitos em sangue.....	112
Figura 38 - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,4) e de sobrevida global (p=0,059) de acordo com porcentagem de plasmócitos com del(13q14).....	112
Figura 39 - Curvas de sobrevida livre de eventos (p=0,0073) e de sobrevida global (p=0,0045) de acordo com anormalidades cromossômicas.....	113
Figura 40 - Curva ROC: expressão de Ki-67 em pacientes que apresentaram óbito ou não.....	164

Figura 41 - Curva ROC: marcação de plasmócitos com anexina V em pacientes que apresentaram óbito ou não.....	164
Figura 42 - Curva ROC: Razão Ki-67/ Anexina V em pacientes que apresentaram óbito ou não.....	165
Figura 43 - Curva ROC: quantificação de plasmócitos em sangue em pacientes que apresentaram óbito ou não.....	166

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Estadiamento clínico de Durie & Salmon em MM (1975).....	13
Tabela 2 - Sistema internacional de estadiamento para MM (Greipp <i>et al.</i> , 2005).....	14
Tabela 3 - Regiões cromossômicas envolvidas em translocações com o IgH e sua associação com a sobrevida global (Hideshima <i>et al.</i> , 2004).....	35
Tabela 4 - Sobrevida global de acordo com diferentes alterações cromossômicas, detectadas por técnica de FISH (Fonseca <i>et al.</i> , 2003).....	37
Tabela 5 - Critérios diagnósticos para mieloma múltiplo (The International Myeloma Working Group, 2003).....	53
Tabela 6 – Sondas de DNA utilizadas para a técnica de FISH.....	56
Tabela 7 – Anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos de citometria de fluxo.....	66
Tabela 8 - Critérios de resposta ao tratamento por Durie <i>et. al.</i> , 2006.....	78
Tabela 9 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes.....	80
Tabela 10 – Interpretação de sinais da sonda LSI 13 (RB1) 13q14.....	87
Tabela 11 - Interpretação de sinais da sonda LSI IGH/FGFR3.....	88
Tabela 12 - Interpretação de sinais da CEP 17 (D17Z1)/LSI p53 (17p13.1).....	91
Tabela 13 - Associação entre as alterações cromossômicas e as variáveis detectadas por citometria de fluxo.....	95
Tabela 14 - Associação entre citogenética e características clínicas e laboratoriais.....	100
Tabela 15 -Associação entre variáveis obtidas por citometria de fluxo e características clínicas e laboratoriais.....	101
Tabela 16 - Associação entre resposta à terapêutica e as variáveis clínicas, laboratoriais, citogenéticas e características biológicas da célula tumoral.....	103
Tabela 17 - Associação entre características clínicas, laboratoriais, citogenéticas e obtidas por citometria de fluxo e sobrevida livre de eventos....	106
Tabela 18 - Associação entre características clínicas, laboratoriais, citogenéticas e obtidas por citometria de fluxo e sobrevida global.....	107

Tabela 19 - Valores de corte das sondas LSI 13 (RB1) 13q14, LSI IGH/FGFR3 Dual Color Dual Fusion e CEP 17 (D17Z1)/LSI p53 (17p13.1).....	140
Tabela 20 - Dados clínicos e laboratoriais, no momento do diagnóstico.....	142
Tabela 21 - Evolução clínica dos pacientes.....	146
Tabela 22 – Combinações de fármacos utilizadas para o tratamento dos pacientes.....	150
Tabela 23 - Resultados dos experimentos de FISH.....	151
Tabela 24 - Expressão de Ki-67, marcação com anexina V, razão Ki-67/anexina V e quantificação de plasmócitos circulantes.....	160

Resumo

Linardi CCG. *Anormalidades citogenéticas e sua relação com a proliferação e a apoptose celular em portadores de mieloma múltiplo*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Anormalidades citogenéticas recorrentes são encontradas nas células tumorais de portadores de mieloma múltiplo. No momento do diagnóstico a t(4;14)(p16;q32) e a del(17p13) ocorrem em 10-20% e 5-10% dos casos, respectivamente, e são associadas à evolução clínica desfavorável. A del(13q14), por sua vez, ocorre em cerca de metade dos pacientes, porém não apresenta valor prognóstico importante. Entretanto, há evidências na literatura de que a del(13q14) seja um pré requisito para a expansão tumoral. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência destas anormalidades cromossômicas em portadores de mieloma múltiplo recém diagnosticado e correlacioná-las com as taxas de proliferação e apoptose celular na medula óssea e a quantificação de plasmócitos em sangue. Amostras de aspirado de medula óssea provenientes de 84 portadores de mieloma múltiplo recém diagnosticado foram avaliadas quanto à presença de del(13q14), t(4;14)(p16;q32) e del(17p13) pela técnica de marcação fluorescente dos plasmócitos seguida pela hibridação *in situ* por fluorescência (cIg-FISH). Desta forma, foi realizada a correlação entre estas alterações e a quantificação de plasmócitos em sangue periférico, a proporção de plasmócitos positivos para o marcador de proliferação celular Ki-67 e para o marcador de apoptose anexina V, obtidos pela técnica de citometria de fluxo. Concomitantemente, foram avaliados parâmetros clínicos e laboratoriais e realizada a análise de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de eventos (SLE). Os pacientes foram divididos em quatro grupos de acordo com a anormalidade citogenética presente: (1) grupo com t(4;14)(p16;q32), (2) grupo com del(17p13), (3) grupo com del(13q14) e sem nenhuma das outras alterações e (4) grupo sem nenhuma das anormalidades pesquisadas. Foi possível realizar a pesquisa de todas as anormalidades cromossômicas em 76 pacientes dos quais: vinte nove

(38,1%) possuíam somente del(13q14), seis (7,89%) possuíam t(4;14)(p16;q32) e seis (7,89%) possuíam del(17p13). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos de anormalidades citogenéticas quanto à mediana de expressão de Ki-67 em plasmócitos ($p=0,7$), a mediana de marcação dos plasmócitos com anexina V ($p=0,94$), a razão entre expressão de Ki-67 e marcação com anexina V ($p=0,57$) e a quantidade de plasmócitos em sangue periférico ($p=0,07$). Entretanto, observou-se tendência à correlação entre porcentagem de células acometidas pela del(13q14) e expressão de Ki-67 ($p=0,06$). A maior expressão de Ki-67 e a maior quantidade de plasmócitos circulantes se associaram a características clínicas e laboratoriais de mau prognóstico. Em análise multivariada somente níveis séricos elevados de desidrogenase láctica (DHL) ($p=0,002$) se associaram à SLE e DHL elevado ($p=0,013$), a não realização de quimioterapia em altas doses com resgate de células tronco hematopoéticas ($p=0,016$), sistema de estadiamento internacional (ISS) III ($p=0,001$) e t(4;14)(p16;q32) ($p=0,04$) se associaram à pior SG.

Descritores: Mieloma Múltiplo; Citogenética; Proliferação de células; Apoptose.

Summary

Linardi CCG. *Cytogenetic abnormalities and their relation to cell proliferation and apoptosis in multiple myeloma patients* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2010.

Recurrent cytogenetic abnormalities are found in multiple myeloma tumour cells. Among them, t(4;14)(p16;q32) e a del(17p13) occur respectively in 10-20% and 5-10% cases in the moment of diagnosis, and are associated with unfavorable clinical outcome. Del(13q14) occurs in half of patients, although, it has no important prognostic value. However, there are evidence in literature that del(13q14) is a pre requisite for tumour expansion. The purpose of this work was to determine the prevalence of chromosomal abnormalities in newly diagnosed multiple myeloma patients and correlate these abnormalities with the quantification of plasmocytes in blood and the rates of cellular proliferation and apoptosis. Bone marrow samples from eighty four newly diagnosed multiple myeloma patients were evaluated for the presence of del(13q14), t(4;14)(p16;q32) and del(17p13) by fluorescent in situ hybridization coupled to cytoplasmic staining of specific imunoglobulin (cIg-FISH). Therefore, a correlation between these alterations and the proportion of plasmocytes positive for the proliferation antigen Ki-67 and for the apoptosis marker annexin V, measured by flow cytometry, was done. The quantification of plasmocytes in peripheral blood by flow cytometry was also made. Concurrently, clinical and laboratorial parameters, overall survival (OS) and event free survival (EFS) were also evaluated. Patients were divided in four groups accordingly to the cytogenetical abnormality present (1) t(4;14)(p16;q32), (2) del(17p13), (3) del(13q14) and none of the other alterations and (4) group with no researched abnormality. The research of all chromosomal abnormalities was possible in 76 patients: 29 (38,1%) had only del(13q14), six (7,89%) had t(4;14)(p16;q32) and six (7,89%) had del(17p13). No significant statistical difference was observed between different groups comparing the median expression of Ki-67 in plasmocytes ($p=0,7$), the median plasmocytes positive for annexin V (0,94), the ratio between Ki-67

and annexin V ($p=0,57$), and the quantity of plasmocytes in peripheral blood ($p=0,07$). However, there was a tendency for a correlation between proportion of cells with del(13q14) and Ki-67 expression ($p=0,06$). Higher Ki-67 expression and higher number of blood plasmocytes correlated to clinical and laboratorial features associated with unfavorable outcome. In multivariate analyses, only elevated lactate dehydrogenase ($p=0,002$) was associated to inferior EFS, and elevated lactate dehydrogenase ($p=0,013$), treatment without high dose chemotherapy with stem cell support ($p=0,016$), International Staging System III ($p=0,001$) and presence of t(4;14)(p16;q32) ($p=0,04$) were associated to inferior OS.

Descriptors: Multiple Myeloma; Cytogenetics; Cell proliferation; Apoptosis.

Introdução

1. Introdução

O mieloma múltiplo (MM) é uma doença caracterizada pelo acúmulo de plasmócitos clonais na medula óssea que, em grande parte das vezes, produz uma proteína monoclonal característica. Clinicamente os pacientes com MM se apresentam com dor óssea, anemia, hipercalcemia e insuficiência renal (*The UK Myeloma Forum Guidelines Working Group*, 2001). Apesar dos avanços no tratamento clínico do MM ao longo dos últimos anos ainda não se conhece tratamento curativo para a doença. A evolução clínica desta doença é heterogênea, sendo que alguns pacientes sobrevivem somente algumas semanas enquanto outros mais de 10 anos. Esta heterogeneidade clínica e prognóstica decorre de diversos fatores do próprio paciente, relacionados à massa tumoral e de características intrínsecas da célula tumoral (Magrangeas *et al.*, 2005).

Dentre as características intrínsecas dos plasmócitos mais estudadas está a determinação da fração de plasmócitos em proliferação celular. Esta avaliação pode ser realizada pela quantificação de plasmócitos que estão na fase S do ciclo celular, onde ocorre a síntese de DNA, obtida por técnicas que utilizam a timidina triciada ou o anticorpo monoclonal anti 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) e ainda pela avaliação por citometria de fluxo da captação de iodeto de propídio (PI) pelo DNA celular (Durie, Salmon, 1975; San Miguel 1995; Greipp, Kumar, 2005). Outra maneira de se avaliar a fração de plasmócitos em divisão celular é pela utilização do anticorpo monoclonal Ki-67 que reage seletivamente com um antígeno presente no

núcleo de células humanas em proliferação e se liga a células que estão em todas as fases do ciclo celular (G_1 , S, G_2 e mitose), mas está ausente em células que estão na fase G_0 (Gerdes *et al.*, 1983).

Diversos estudos, utilizando-se destas metodologias, evidenciaram que no MM com proporção elevada de células tumorais em divisão ocorre evolução clínica adversa (Durie, Salmon, 1975; Durie *et al.*, 1980; Gerdes *et al.*, 1983; Lokhorst *et al.*, 1988; Drach *et al.*, 1992; Schlüter *et al.*, 1993; Thaler *et al.*, 1994; Garcia-Sanz *et al.*, 1995; San Miguel *et al.*, 1995; Garcia-Sanz *et al.*, 1999; Alexandrakis *et al.*, 2004a; Alexandrakis *et al.*, 2004b; Greipp, Kumar, 2005; Gastinne *et al.*, 2007). Por outro lado, não existem muitos dados na literatura a respeito da importância da fração de plasmócitos em apoptose na evolução destes pacientes (Lichtenstein *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1997; Witzig *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2002; Scudla *et al.*, 2006).

Outra característica intrínseca da célula tumoral é a presença de anormalidades genéticas nas células do MM, e está cada vez mais evidente que estas anormalidades influenciam a evolução clínica da doença. Diversos estudos que utilizaram a análise citogenética convencional, a determinação do índice de DNA celular por citometria de fluxo (DNA ploidia) ou técnicas de citogenética molecular como hibridação “*in situ*” por fluorescência (FISH) demonstraram que mais de 80% dos pacientes apresentam anormalidades cromossômicas (Dewald *et al.*, 1985; Gould *et al.*, 1988; Lai *et al.*, 1995; Zandecki *et al.*, 1996; Tricot *et al.*, 1995; Harrison *et al.*, 2003; Willeme *et al.*, 2005).

O MM é caracterizado pela presença de anormalidades cromossômicas complexas, com múltiplas alterações estruturais e numéricas, sendo as mais frequentes a hiperdiploidia, a perda do cromossomo 13, alterações estruturais do cromossomo 1 e translocações envolvendo a região 14q32 do cromossomo 14 (Gould *et al.*, 1988; Laï *et al.*, 1995; Seong *et al.*, 1998).

Mais da metade dos pacientes com MM apresentam alterações cromossômicas envolvendo a região 14q32, que resulta na justaposição do gene da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH) junto a oncogenes, induzindo o aumento da expressão destes. As translocações envolvendo a região 14q32 com as regiões 4p16 do cromossomo 4 e 16q23 do cromossomo 16 levam à super expressão dos oncogenes FGFR3/MMSET (receptor de fator de crescimento de fibroblasto tipo 3 e domínio SET do mieloma múltiplo) e c-MAF, respectivamente, e estão associadas a uma evolução clínica desfavorável (Avet-Loiseau *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2002a; Fonseca *et al.*, 2003; Fonseca *et al.*, 2004).

As anormalidades do cromossomo 13, por sua vez, são também bastante frequentes no MM e ocorrem em cerca de metade dos pacientes, podendo ocorrer monossomia, observada na maioria dos casos, ou somente deleção da região 13q14 [del(13q14)] (Avet-Loiseau *et al.*, 1999; Shaughnessy *et al.*, 2000). Estas alterações, quando detectadas por citogenética convencional ou FISH, também apresentam prognóstico adverso (Fonseca *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005).

Sabe-se atualmente que o prognóstico desfavorável de pacientes com del(13q14) ocorre pela associação frequente desta com outras anormalidades cromossômicas de mau prognóstico como a t(4;14)(p16;q32), a t(14;16)(q32;q23) ou ainda a del(17p13), outra alteração cromossômica também encontrada no MM, que leva à perda do “locus” do gene supressor de tumor p53. Na ausência destas, a del(13q14) não tem importância na determinação do prognóstico da doença (Avet-Loiseau *et al.*, 2007b).

Apesar das evidências mostrando o valor limitado da del(13q14) na estratificação prognóstica do MM, existem estudos na literatura demonstrando que esta alteração é importante para a expansão clonal das células tumorais (Fonseca *et al.*, 2009).

Além disso, não está bem estabelecido se os plasmócitos de pacientes com a del(13q14) apresentam comportamento biológico diferente dos plasmócitos de pacientes sem esta anormalidade cromossômica. Os estudos que investigaram a associação entre a del(13q14) e maior taxa proliferativa de células tumorais são controversos (Zojer *et al.*, 2000; Gutierrez *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2002c; Gastinne *et al.*, 2007). Também, é ignorado se outras características biológicas da célula tumoral, como a taxa de apoptose ou a independência do microambiente medular, são diferentes em pacientes com ou sem del(13q14).

Desta forma, este estudo foi formulado para verificar se as principais alterações citogenéticas encontradas no MM, como del(13q14), t(4;14)(p16;q32) e del(17p13) apresentam correlação com o comportamento biológico das células tumorais como uma maior ou menor taxas de

proliferação, de apoptose e quantidade de células malignas circulantes. Estas alterações citogenéticas foram avaliadas também quanto à associação com as características clínicas e laboratoriais no momento do diagnóstico e com a evolução clínica dos pacientes.

Revisão de literatura

2. Revisão da literatura

2.1 - Características clínicas e epidemiológicas do mieloma múltiplo

O MM é uma neoplasia hematológica caracterizada pela infiltração e proliferação de plasmócitos clonais na medula óssea. Na maioria dos casos, estes plasmócitos produzem uma imunoglobulina monoclonal, encontrada no soro ou na urina. Esta imunoglobulina monoclonal é IgG em 50% dos casos, IgA em 20% e em 15% é produzida somente a cadeia leve da imunoglobulina, que pode ser “*kappa*” ou “*lambda*”. Aproximadamente 3% dos casos são não secretores e menos de 10% produzem IgD, IgM, IgE ou são biclonais. Clinicamente o MM manifesta-se com anemia, lesões ósseas, hipercalcemia, suscetibilidade a infecções, podendo ocorrer ou não comprometimento da função renal (*The UK Myeloma Forum Guidelines Working Group*, 2001).

Esta patologia é responsável por cerca de 10% dos cânceres hematológicos e geralmente ocorre em indivíduos idosos, sendo a mediana de idade de aparecimento da doença de 70 anos. Raramente o MM ocorre antes dos 40 anos, sendo que após esta idade a incidência aumenta rapidamente até os 84 anos, e então passa a declinar (Alexander *et al*, 2007).

A incidência anual do MM na população norte-americana é de 4,3 para cada 100.000 habitantes, sendo duas vezes mais comum em negros que em brancos e mais frequente em homens, com uma razão do sexo

masculino sobre o feminino de 1,4:1 (Kyle *et al.*, 2004; Kyle, Rajkumar, 2008).

O MM pode ser precedido por um estágio pré-maligno assintomático denominado gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) presente em mais de 3% da população com idade superior a 50 anos (Kyle, Rajkumar, 2004). Os indivíduos portadores de GMSI apresentam um pico monoclonal na eletroforese de proteínas sérica, que representa uma paraproteína anômala e que não excede o valor de 3,0g/dL. Pode ocorrer infiltração da medula óssea, por plasmócitos malignos, inferior a 10% sem outros sinais de comprometimento sistêmico pelo MM como anemia, insuficiência renal, hipercalcemia ou lesões ósseas. Portadores de GMSI apresentam um risco de progressão para MM ou outras discrasias plasmocitárias, como a macroglobulinemia de Waldenstrom ou a amiloidose sistêmica, de cerca de 1% ao ano (Kyle *et al.*, 2002; Kyle *et al.*, 2006; Weiss *et al.*, 2009).

Pacientes com MM podem ser assintomáticos ou sintomáticos. O MM assintomático é um estágio intermediário entre a GMSI e o MM sintomático, e se caracteriza pela presença de alterações laboratoriais sem repercussões clínicas. O diagnóstico de MM assintomático é realizado quando o paciente apresenta um pico monoclonal sérico superior a 3,0g/dL e/ou infiltração da medula óssea por plasmócitos malignos superior a 10%, na ausência de sinais de comprometimento sistêmico pelo MM. O MM sintomático, por sua vez, caracteriza-se por presença de pico monoclonal sérico ou urinário, infiltração da medula óssea por plasmócitos malignos superior a 10% e/ou

evidência de plasmocitoma, associado a sinais de comprometimento sistêmico pelo MM como anemia, insuficiência renal, hipercalcemia e/ou lesões ósseas (*The International Myeloma Working Group*, 2003).

O MM pode ainda se apresentar como leucemia de células plasmocitárias (LCP) que é caracterizada pela presença de no mínimo 2.000/mL plasmócitos em sangue periférico ou quando mais de 20% dos leucócitos de um paciente são plasmócitos. Em geral, apresenta uma maior agressividade e evolução clínica desfavorável (*The International Myeloma Working Group*, 2003).

Até recentemente a incidência e as características clínicas dos portadores de MM no Brasil eram pouco conhecidas. A partir de 2000, estudos multicêntricos foram realizados com o objetivo de caracterizar o perfil dos portadores de MM em nosso país. Hungria *et al* (2005) avaliaram 844 pacientes diagnosticados entre 1998 e 2004 quanto às suas características clínicas. A mediana de idade dos pacientes foi de 64 anos; 50,6% dos pacientes eram do sexo feminino; 80,5% eram brancos ou mulatos, enquanto 18,8% eram negros e 0,7% asiáticos. O componente monoclonal mais comum foi IgG em 64% dos casos, seguido pela IgA em 21% e por cadeias leves em 11%. O MM não secretor foi responsável por 3,5% dos casos. Anemia no momento do diagnóstico foi observada em 79,3% dos pacientes.

2.2 - O mieloma múltiplo e a importância dos fatores de prognóstico clínicos e laboratoriais

O MM é uma doença de evolução crônica, com mediana de sobrevida de 3,5 anos em pacientes tratados com terapia convencional e de aproximadamente 6,5 anos em pacientes tratados com terapias mais agressivas como quimioterapia em altas doses com resgate de células tronco hematopoéticas (Ludwig *et al.*, 2008).

No entanto, a evolução clínica dos portadores de MM é extremamente heterogênea. Enquanto parte dos pacientes que apresentam sintomas de doença agressiva sobrevivem somente algumas semanas, outros sobrevivem mais de 10 anos. Provavelmente, isto é decorrente tanto de fatores relacionados à massa tumoral e de diferenças na biologia da célula tumoral como de diversos fatores do próprio paciente (Magrangeas *et al.*, 2005).

A identificação de fatores prognósticos é necessária para que seja possível determinar a expectativa de vida do paciente e adequar a terapêutica. Esta determinação é importante frente às novas modalidades de tratamento, como a talidomida ou seu análogo, a lenalidomida, o inibidor de proteasoma bortezomibe, o transplante autólogo de células tronco hematopoéticas e o transplante alogênico não mieloablativo (Anderson *et al.*, 2003; Child *et al.*, 2003; Kyle *et al.*, 2004; Harousseau *et al.*, 2005).

Estudos conduzidos desde a década de 1960 até meados da década de 1970 tentaram identificar parâmetros clínicos e laboratoriais como fatores

preditivos de sobrevida. Os parâmetros identificados foram idade, concentração sérica do componente monoclonal, nível sérico de albumina, nível de hemoglobina, cálcio sérico, creatinina sérica e grau de acometimento ósseo. Em 1975, Salmon e Durie (1975) introduziram um sistema de classificação denominado estadiamento de Durie & Salmon, onde foi demonstrado que a massa tumoral correlacionava-se com as seguintes características clínicas: (1) valores de hemoglobina no sangue, (2) cálcio sérico, (3) concentração do componente monoclonal no soro ou na urina e (4) acometimento ósseo avaliado pelo estudo radiológico do esqueleto.

A análise dos resultados definiu um sistema de estadiamento baseado em três níveis de massa tumoral: I, II, III. Neste sistema de estadiamento ficou estabelecido que no estadio I nenhum dos parâmetros avaliados isoladamente correlacionou-se à baixa massa tumoral, todavia um conjunto de características estava associado à baixa massa tumoral. Este conjunto de variáveis é formado pela associação de níveis de hemoglobina superior a 10,0 g/dL, nível sérico do cálcio normal, radiografia do esqueleto normal ou com presença de lesão óssea isolada e componente monoclonal pequeno (Tabela 1). Por outro lado, todos os parâmetros citados no estágio III se correlacionaram isoladamente com presença de massa tumoral elevada (Tabela 1). Neste estudo, Salmon e Durie também determinaram que a associação da massa tumoral e o nível sérico de creatinina são indicadores de sobrevida. Por este motivo todos os estádios foram subclassificados em A ou B, dependendo da função renal (Tabela 1).

Tabela 1 - Estadiamento clínico de Durie & Salmon em Mieloma Múltiplo

Estádio I	Hemoglobina > 10.0g/dL Calcio sérico normal IgG < 5,0g/dL, IGA < 3,0g/dL ou proteinúria < 4,0g/24horas Radiografia de esqueleto normal ou plasmocitoma isolado
Estádio II	Não preenche critérios para estágio I ou III
Estádio III	Hemoglobina < 8,5g/dL Calcio sérico > 12,0mg/dL Lesões líticas extensas ou fraturas ósseas IgG > 7,0g/dL, IGA > 5,0g/dL ou proteinúria > 12,0g/24 horas
A	Creatinina sérica < 2,0mg/dL
B	Creatinina sérica ≥ 2,0mg/dL

Na década de 1980, demonstrou-se que a β_2 -microglobulina sérica é um fator prognóstico importante em portadores de MM. A β_2 -microglobulina é uma pequena molécula presente na superfície das células nucleadas, principalmente nos linfócitos, necessária para a inserção e estabilização da molécula de HLA (antígeno humano leucocitário) na membrana celular. Sua determinação é simples e confiável tendo sido demonstrado que existe correlação entre os níveis de β_2 microglobulina sérica e a massa tumoral (Greipp *et al.*, 1988). Subsequentemente, outros fatores prognósticos na determinação da sobrevida global foram introduzidos como, por exemplo, o nível sérico de proteína C reativa (PCR) e de desidrogenase láctica (DHL), que quando elevados estão associados a uma pior evolução clínica. Níveis

reduzidos de albumina, por sua vez, também, associam-se a mau prognóstico (Barlogie *et al.*, 1989; Bataille *et al.*, 1986; Bataille *et al.*, 1992).

Recentemente, foi definido um novo sistema de estadiamento baseado nos valores séricos da β_2 -microglobulina e da albumina denominado Sistema Internacional de Estadiamento (ISS) (Greipp *et al.*, 2005). Pacientes com níveis elevados de β_2 -microglobulina e níveis reduzidos de albumina apresentam pior evolução que pacientes sem alterações destes parâmetros (Tabela 2).

Tabela 2 -Sistema Internacional de Estadiamento para Mieloma Múltiplo

Estadio	β_2 microglobulina		albumina	mediana de sobrevida
I	< 3,5 μ g/mL	e	$\geq$ 3,5g/dL	62 meses
II	$\geq$ 3,5 e < 5,5 μ g/mL	e/ou	< 3,5g/dL	44 meses
III	$\geq$ 5,5 μ g/mL	e	qualquer valor	29 meses

Em trabalho de tese apresentado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Martinez G, 1998; dados não publicados) avaliou-se um grupo de 54 pacientes portadores de MM admitidos entre abril de 1993 e junho de 1996. Neste estudo foi observado que fatores prognósticos como presença de anemia, hipercalcemia, hipoalbuminemia e níveis séricos de desidrogenase láctica (DHL) tiveram distribuição semelhante à encontrada na literatura. No entanto, houve uma maior incidência de insuficiência renal em relação ao observado em países desenvolvidos (44% vs 20%). A mediana de sobrevida dos pacientes, tratados com quimioterapia

convencional, foi de 27 meses, semelhante ao encontrado por outros autores. Na análise multivariada, excluída a resposta à quimioterapia, a única variável que demonstrou ser fator prognóstico desfavorável para a sobrevida foi nível de albumina inferior a 3,0g/dL.

Hungria *et al.* (2008) em outro estudo realizado no Brasil, com a participação de 16 centros, avaliaram 1112 portadores de MM diagnosticados entre 1998 e 2004, sendo que em 756 foi realizado o estadiamento ISS (Hungria *et al.*, 2008). Estes pacientes tiveram uma mediana de seguimento de 20,5 meses e uma sobrevida global de 57,7 meses. No estágio I (20,1%) a mediana de sobrevida não foi alcançada, no estágio II (48,7%) a mediana de sobrevida foi de 65,5 meses e no estágio III (31,2%) a mediana de sobrevida foi de 26 meses ($p<0.001$) (Figura 1).

Figura 1 - Sobrevida global em 756 pacientes portadores de MM de acordo com o ISS-estudo multicêntrico brasileiro (Hungria *et al.*, 2008)

2.3 - Características intrínsecas dos plasmócitos e prognóstico

A maioria dos estudos realizados até a década de 1990 baseou-se em achados clínicos e laboratoriais que refletiam indiretamente os processos biológicos do tumor. No entanto, a possibilidade de se estudar diretamente as características intrínsecas do plasmócito se tornou importante para a melhor compreensão do comportamento biológico da doença e para a pesquisa de fatores de prognóstico.

Durie e Salmon (1975) demonstraram que, dentre as características dos plasmócitos malignos, o índice de proliferação dos plasmócitos ou “*plasma cell labelling index*” (PCLI), obtido por autoradiografia, é um dos principais fatores de prognóstico para os portadores de MM. Esta técnica determina a porcentagem de plasmócitos da medula óssea que incorpora timidina triciada e indica a fração de células que estão sintetizando DNA, isto é na fase S do ciclo celular. Em 1980, Durie *et al*, utilizando esta técnica, determinaram que a mediana de sobrevida dos pacientes com PCLI inferior a 1% e com PCLI superior ou igual a 1% foi de 36 e 25 meses, respectivamente ($p=0,02$). Apesar de sua importância como fator preditivo de sobrevida, esta técnica não tem sido realizada rotineiramente na prática médica devido às dificuldades inerentes para sua realização: a técnica é extremamente trabalhosa, necessita de células viáveis e há a necessidade de utilização de material radioativo (Durie *et al*, 1980).

Em anos recentes, esta avaliação tem sido feita através de técnica de imunofluorescência, utilizando-se o anticorpo monoclonal anti 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), que é ativamente incorporado ao DNA de células em fase S do ciclo celular (Greipp, Kumar, 2005) (Figura 2).

Figura 2 - Identificação de plasmócitos pela marcação destes com anticorpos anti-cadeia leve ligado ao fluorocromo fluoresceína (FITC - fluorescência verde). A célula da direita está na fase S do ciclo celular e apresenta captação de BrdU (Kumar *et al.*, 2004)

2.3.1 - Estudo das características dos plasmócitos malignos por citometria de fluxo

Estudos mais detalhados dos plasmócitos passaram a ser realizados a partir de 1990, empregando-se a citometria de fluxo, quando foi demonstrado que a expressão peculiar do antígeno CD38 nestas células, de forte intensidade na membrana, pode diferenciá-las dos linfócitos. Utilizando-se desta característica dos plasmócitos e empregando-se dupla ou tripla marcação com outros anticorpos monoclonais, pode-se pesquisar a expressão de uma dada característica do plasmócito. Sabe-se hoje que estas células tipicamente expressam CD38 de forte intensidade e não expressam o antígeno CD45, ou o expressam com fraca intensidade (Witzig *et al.*, 1996a,b).

A partir de 1996, foi demonstrado que os anticorpos monoclonais B-B4 e MI15 reconhecem epítomos próximos, porém não idênticos, do mesmo antígeno, o syndecan-1, que é expresso predominantemente em células epiteliais, mas também em plasmócitos, não sendo expresso em nenhuma outra célula da linhagem hematopoética, com a possível exceção de células pré-B. Estes anticorpos pertencem ao “*cluster*” CD138 (Sanderson *et al.*, 1989; Wijdenes *et al.*, 1996; Costes *et al.*, 1999; Sanderson *et al.*, 2002; Rawstron *et al.*, 2008).

Os syndecans são uma família de proteoglicanos de superfície celular compostos por uma proteína central às quais polímeros de carboidratos se

ligam covalentemente, sendo estes denominados glicosaminoglicanos. Dos quatro membros da família, o syndecan-1 é o mais estudado. Durante a diferenciação B normal, o syndecan-1 é expresso em células pré-B, deixa de ser expresso em células B circulantes e passa a ser novamente expresso em plasmócitos. Na medula óssea humana, os anticorpos monoclonais B-B4 e MI15 só reagem com células plasmocitárias normais e tumorais. No entanto, vale ressaltar que plasmócitos malignos que entram em apoptose têm uma diminuição na expressão de CD138 (Bernfield *et al.*, 1992; Wijdenes *et al.*, 1996; Jourdan *et al.*, 1998; Costes *et al.*, 1999).

Dados recentes mostram que praticamente todos os plasmócitos normais e malignos expressam CD38 e CD138, no entanto o nível de expressão difere nos plasmócitos malignos já que expressam mais CD138 e menos CD38 que plasmócitos normais (Bataille *et al.*, 2006). Além disso, os plasmócitos malignos possuem fenótipos aberrantes: há uma expressão forte de CD56 em grande parte dos casos e ausência de expressão de CD19, além de restrição de cadeia leve citoplasmática “*kappa*” ou “*lambda*”. Já os plasmócitos normais apresentam fraca intensidade de expressão do antígeno CD19 e geralmente não expressam CD56 (Ocqueteau *et al.*, 1998).

O antígeno CD56 auxilia na identificação de plasmócitos clonais e possui importante papel na definição de prognóstico da doença. Trata-se de uma molécula de adesão envolvida no ancoramento de plasmócitos malignos ao estroma da medula óssea e a sua ausência em plasmócitos clonais está relacionada à doença agressiva, com progressão extramedular

e evolução adversa (Pellat-Deceunynck *et al.*, 1998; Sahara *et al.*, 2002; Sahara, Takeshita, 2004).

Outro importante fator prognóstico que foi identificado com a utilização da citometria de fluxo multiparamétrica é a relação de plasmócitos anormais/normais na medula óssea. A presença de plasmócitos clonais superior a 97% do total de plasmócitos da medula óssea é tipicamente visto no MM sintomático. A GMSI, por sua vez, é caracterizada pela presença de mais de 3% de plasmócitos normais, não clonais, na medula óssea. No entanto, portadores de GMSI que, na sua evolução, apresentem taxa de plasmócitos anormais superior a 95% têm maior risco de evoluir para MM sintomático (Ocqueteau *et al.*, 1998; Perez-Persona *et al.*, 2007).

Plasmócitos circulantes podem ser detectados no sangue periférico de portadores de MM (Witzig *et al.*, 1996b). Foi demonstrado que pacientes com presença de plasmócitos em sangue periférico no momento do diagnóstico possuem menor sobrevida. Este fator de risco é independente da carga tumoral e pode representar alterações na adesão entre células e entre células e estroma, evidenciando uma possível independência dos plasmócitos malignos do microambiente medular (Witzig *et al.*, 1996a; Nowakowski *et al.*, 2005) (Figura 3).

Além disso, em estudo realizado na Clínica Mayo, foi observado que a detecção de plasmócitos circulantes por citometria de fluxo antes de quimioterapia em altas doses com resgate de células tronco hematopoéticas

é preditor de menor sobrevida global e sobrevida livre de progressão após o procedimento (Dingli *et al.*, 2006).

Figura 3 - Detecção de plasmócitos circulantes por citometria de fluxo: (A) paciente sem nenhum plasmócito em sangue periférico, (B) paciente com sete plasmócitos a cada 50.000 células e (C) paciente com 2.946 plasmócitos a cada 50.000 células (Nowakowski *et al.*, 2005)

Apesar dos conhecimentos atuais a respeito do fenótipo de plasmócitos normais e anormais, o uso de citometria de fluxo multiparamétrica em discrasias plasmocitárias em muitos laboratórios é restrito a estudos clínicos e ao diagnóstico diferencial em casos atípicos. Estabelecer o fenótipo de células do MM e sua diferença dos plasmócitos normais é útil para identificar claramente as células malignas e caracterizá-las, identificar marcadores prognósticos, evitar o falso diagnóstico de MM, avaliar doença residual mínima e sugerir terapias baseadas em drogas alvo (Lin *et al.*, 2004; Bataille *et al.*, 2006; Mateo *et al.*, 2008; Rawstron *et al.*, 2008).

2.3.1.1 - Estudo da fração de plasmócitos malignos em proliferação por citometria de fluxo

Mais recentemente, o conteúdo de DNA e a fase S do ciclo celular passaram a ser determinados por citometria de fluxo (San Miguel *et al.*, 1995; Garcia-Sanz *et al.*, 1995; Garcia-Sanz *et al.*, 1999). Esta técnica avalia de maneira rápida a presença de anormalidades clonais relacionadas ao conteúdo de DNA (DNA-aneuploidia) e determina a fração de células em síntese de DNA (fase S).

Realizando-se dupla marcação dos plasmócitos com o anticorpo monoclonal anti-CD38 e o iodeto de propídio (PI) (que se liga ao DNA da célula) é possível determinar a fração de plasmócitos que está na fase S do ciclo celular pela citometria de fluxo. As células que não estão em fase S apresentam quantidade de DNA equivalente a 2N (fases G₀ e G₁) enquanto as células que entrarão em mitose (fase M), ou seja, que estão na fase G₂ do ciclo celular, apresentam uma quantidade de DNA equivalente a 4N e as células que estão na fase S tem uma quantidade de DNA intermediária a 2N e 4N (Figura 4).

Com o uso desta técnica foi demonstrado que pacientes com mais de 3% de seus plasmócitos em fase S possuem menor sobrevida global ($p=0.02$) (San Miguel *et al.*, 1995).

Figura 4 - Determinação da fase S por citometria de fluxo (proveniente do laboratório de imunopatologia do serviço de hematologia do HC-FMUSP)

A utilização desta técnica de determinação da fase S, assim como a determinação do “*plasma cell labeling index*” (PCLI) por autoradiografia ou pela marcação com anticorpo anti-BrdU, tem um papel muito bem definido no prognóstico do MM. No entanto, estas técnicas mostram valores extremamente baixos de células que estão no processo de divisão celular, pois determinam a fração de células que estão produzindo DNA, não sendo capazes de detectar a presença de células que possam estar em outras fases do ciclo celular, como as fases G_1 , G_2 e M (Alexandrakis *et al.*, 2004b).

O anticorpo monoclonal Ki-67, descrito em 1983, reage seletivamente com um antígeno presente no núcleo de células humanas em proliferação e se liga a células que estão nas fases G_1 , S, G_2 e M do ciclo celular, mas não naquelas em fase G_0 (Gerdes *et al.*, 1983). A utilização deste anticorpo

monoclonal para determinar a fração de células em divisão tem sido uma ferramenta importante no estudo de neoplasias humanas em geral (Schlüter *et al.*, 1993). No entanto, raramente é utilizada no estudo do MM e somente alguns pesquisadores avaliaram o papel da expressão do Ki-67 como fator de prognóstico nesta doença.

Em 1988, foi publicado um estudo em que a expressão de Ki-67 foi avaliada através da imunocitoquímica em plasmócitos de aspirados de medula óssea de 30 pacientes com MM recém diagnosticado, sendo observada grande variação na expressão deste antígeno: 0,5 a 30% ($9,6\% \pm 8,1$). Três de dez pacientes com expressão de Ki-67 superior a 10% morreram em seis meses após o diagnóstico. Dos 20 pacientes com expressão de Ki-67 inferior a 10%, somente um paciente morreu em seis meses (Lockhorst *et al.*, 1988).

Drach *et al.* (1992) avaliaram a expressão de Ki-67 em plasmócitos, determinada por citometria de fluxo, através de dupla marcação com os anticorpos monoclonais anti-CD38 e anti-Ki-67, em 49 amostras de medula óssea de portadores de MM. O valor médio da expressão de Ki-67 em 23 pacientes estudados no momento do diagnóstico foi de $11,9\% \pm 8,4$. Sete (30%) destes 23 pacientes apresentaram expressão de Ki-67 acima de 14%; três apresentaram resistência primária ao tratamento e três dos inicialmente responsivos apresentaram recidiva da doença após três meses da suspensão da quimioterapia. Em contraste, nos 16 pacientes com expressão de Ki-67 inferior a 14% houve apenas um (6%) caso com doença resistente e nenhuma recidiva precoce.

Em 2004, foram publicados outros dois estudos por Alexandrakis *et al* (2004a,b) a respeito da expressão de Ki-67 no MM por técnica de imunohistoquímica, sendo que houve associação entre a expressão de Ki 67 e estágio clínico avançado ($p=0,01$). Além disso, foi observada uma maior expressão de Ki-67 em plasmócitos de regiões caracterizadas por maior densidade microvascular e tendência a pior sobrevida em pacientes que apresentaram expressão de Ki-67 em plasmócitos superior a 8%, embora estatisticamente não significativa ($p=0,07$).

Por fim, um trabalho realizado nas células da medula óssea de 174 pacientes não tratados, em que foi feita imunocitoquímica com dupla marcação com os anticorpos monoclonais Ki-67 e anti-CD138, mostrou uma associação entre a expressão de Ki-67 em plasmócitos e marcadores de carga tumoral como hemoglobina, cálcio, componente monoclonal, grau de infiltração da medula óssea e estadió clínico Durie & Salmon. Igualmente, houve correlação com outros fatores de prognóstico como proteína C reativa, albumina e presença de plasmócitos circulantes. Houve associação significativa entre níveis de Ki-67 superiores a 4% e sobrevida global inferior a de pacientes com níveis de Ki-67 inferiores a 4% (26 ± 4 meses vs. 49 ± 10 meses, respectivamente; $p < 0.0001$) (Gastinne *et al.*, 2007).

A determinação da expressão do antígeno nuclear Ki-67 em plasmócitos, além de ter uma função potencialmente importante na determinação de prognóstico no MM, pode colaborar para a compreensão da patogênese desta doença. Esta avaliação pode ser facilmente realizada no momento do diagnóstico com o uso de imunofenotipagem por citometria

de fluxo, utilização de técnicas de imunocitoquímica em lâminas de citocentrifugação realizadas com material proveniente de aspirado de medula óssea ou por imunohistoquímica em tecido proveniente de biópsia de medula óssea. Uma grande vantagem em relação à determinação de plasmócitos em fase S por marcação com iodeto de propídio é a capacidade do Ki-67 de reconhecer células nas fases G1, G2 e mitose, além de reconhecer as células na fase S.

2.3.1.2 - Determinação da fração de plasmócitos em apoptose por citometria de fluxo

Apesar das evidências demonstrando o valor prognóstico da determinação da fração de plasmócitos em proliferação, não existem muitos dados na literatura a respeito da importância da fração de plasmócitos em apoptose nos portadores de MM.

Nos tecidos normais existe um equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular. Distúrbios neste equilíbrio podem levar a acúmulo patológico de células como, por exemplo, no câncer. Para que haja uma adequada manutenção da homeostase, sem acúmulo patológico de células, é necessário que ocorra a morte celular programada ou apoptose (van Engeland *et al.*, 1998).

Atualmente são reconhecidos dois tipos de morte celular: necrose e apoptose. A necrose é uma forma de morte não controlada que ocorre quando as células sofrem danos agudos e graves que danificam a

membrana citoplasmática. Estas células necróticas causam alterações nas células vizinhas provocando uma resposta inflamatória local. Por outro lado, a apoptose é um mecanismo de morte celular controlada que é observado em condições fisiológicas. A morte celular nestas condições afeta apenas as células programadas para morrer, sem causar alterações nas células vizinhas. Este processo envolve a ativação de programas genéticos com manutenção da integridade da membrana até o final do processo apoptótico (Kerr *et al.*, 1972).

Um dos eventos mais precoces da apoptose é a desidratação celular. A perda de água intracelular leva à condensação do citoplasma seguido por uma mudança no tamanho e na morfologia da célula. As células originalmente arredondadas podem se tornar alongadas e são geralmente menores. Em seguida ocorre a condensação da cromatina e o envelope nuclear se desintegra com consequente fragmentação nuclear (cariorrexe). Os fragmentos nucleares, juntamente com constituintes do citoplasma, são empacotados e envolvidos por fragmentos da membrana celular. Estas estruturas, denominadas corpos apoptóticos, são fagocitadas (Darzynkiewicz *et al.*, 1997). Outra característica da apoptose é a preservação, pelo menos durante as fases iniciais da morte celular, da integridade estrutural e da função da maioria das organelas e da membrana plasmática (Kerr *et al.*, 1972).

Atualmente, existe uma variedade de métodos para a detecção de células em apoptose. Ensaio utilizados para medir a apoptose incluem a

detecção de alterações presentes à microscopia óptica, microscopia eletrônica e citometria de fluxo, utilizando corantes fluorescentes. A detecção de apoptose por microscopia é trabalhosa e sujeita à análise subjetiva enquanto o método por citometria de fluxo permite a obtenção de informações rápidas, análises precisas e detalhadas, além da facilidade na quantificação das células em processo de apoptose.

Todas as alterações morfológicas que ocorrem durante o processo de apoptose, bem como a expressão das diversas proteínas envolvidas neste processo, podem ser analisadas por citometria de fluxo por meio de técnicas que utilizam corantes vitais e anticorpos monoclonais (Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

Na citometria de fluxo, as células mortas são diferenciadas das vivas pela propriedade de emissão de luz de acordo com o tamanho (“*forward scatter*”) e a complexidade interna ou granulosidade celular (“*side scatter*”). As células que se encontram em processo inicial de apoptose podem apresentar uma redução no “*forward scatter*” ou um aumento no “*side scatter*”: no estágio tardio da apoptose ambas estão reduzidas (van Eeden *et al.*, 1999).

Outras características capazes de distinguir células mortas das vivas incluem perda de função de transporte pela membrana plasmática e perda de sua integridade estrutural. Alguns ensaios capazes de avaliar a viabilidade celular têm sido desenvolvidos baseados em mudanças nas propriedades da membrana plasmática. Como a membrana intacta de

células vivas faz com que estas não absorvam corantes como o azul de trypan, o iodeto de propídio (PI) e a 7-amino-actinomicina D (7AAD), a incubação com estes corantes resulta em marcação seletiva e intensa de células mortas, enquanto células vivas mostram captação mínima destes corantes (Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

Além disso, durante a apoptose, a função da membrana celular se torna transitoriamente defeituosa antes de perder totalmente a habilidade de não absorver estes corantes. No entanto, nas fases finais da apoptose, a taxa de captação destes corantes é maior que em células vivas e assim é possível diferenciar populações de células em apoptose, que apresentam marcação moderada, das células vivas, que apresentam marcação muito baixa com estes corantes. A maioria dos corantes fluorescentes usados na citometria de fluxo são não vitais e coram células apoptóticas somente após o dano da membrana plasmática; ou seja, não são capazes de identificar células nas fases iniciais da apoptose (Koopman *et al.*, 1994).

Em células vivas, os fosfolípides de membrana plasmática estão assimetricamente distribuídos entre a face interna e externa da mesma. Enquanto a fosfatidilcolina e a esfingomiélinina estão expostas na superfície externa da bicamada lipídica, a fosfatidilserina está localizada na face interna (Fadok *et al.*, 1992). Sabe-se que a perda da assimetria dos fosfolípides levando à exposição da fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática acontece já nas fases iniciais da apoptose e

permanece até a fase final, quando a célula é transformada em corpos apoptóticos.

A anexina V é um anticoagulante de natureza protéica com propriedade de se ligar a fosfolípidos dependentes de cálcio, com maior afinidade para a fosfatidilserina (Fadok *et al.*, 1992). Esta proteína foi primeiramente descrita por Inaba *et al.* (1984) e Reutelingsperger *et al.* (1985) que a isolaram da placenta humana e do cordão umbilical, respectivamente. A propriedade da anexina V de se ligar à fosfatidilserina confere a habilidade de utilizá-la como discriminador entre células viáveis e apoptóticas. Ao se conjugar fluoresceína à anexina V, foi possível usar um marcador para identificar células apoptóticas por citometria de fluxo. Durante a apoptose, as células se ligam à anexina V após o início da condensação celular e antes da membrana perder a habilidade de excluir o iodeto de propídio (PI). Portanto, ao se marcar as células com uma combinação de anexina V-FITC (conjugada ao fluorocromo isotiocianato) e PI, é possível detectar células não apoptóticas (anexina V negativas, PI negativas), células em apoptose (anexina V positivas e PI negativas) e células em apoptose tardia ou necróticas (PI positivas) (Koopman *et al.*, 1994).

Portadores de MM com uma elevada taxa de plasmócitos monoclonais em proliferação celular têm tipicamente uma sobrevida menor quando comparados com pacientes com baixas taxas de plasmócitos em fases de divisão celular. No entanto, mesmo neste último grupo de pacientes, pode ocorrer progressão da doença, o que sugere que estas

células possam apresentar uma diminuição na taxa de apoptose (Witzig *et al.*, 1999). Fatores de crescimento importantes para a proliferação dos plasmócitos malignos, como a interleucina-6 (IL-6) e os fatores de crescimento insulina-símile (IGF) I e II, demonstraram ser capazes de inibir a sua entrada no processo de apoptose (Lichtenstein *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1997).

Apesar destas evidências, o processo da apoptose no MM tem sido muito pouco estudado. Foi demonstrado, por Witzig *et al.* (1999), que portadores de MM recém diagnosticado possuem uma menor taxa de plasmócitos no processo de apoptose em comparação com pacientes portadores de GMSI. Esta análise foi feita através da marcação das células da medula óssea destes pacientes com o corante 7AAD e com os anticorpos monoclonais anti-CD38PE (conjugado ao fluorocromo ficoeritrina) e anti-CD45FITC ou anti-CD138FITC e também pela marcação tripla das células com anexina V FITC e anticorpos monoclonais anti-CD38PE e anti-CD45PercP (conjugado ao fluorocromo complexo peridina clorofila), com posterior detecção em citômetro de fluxo. Desta maneira, foi possível avaliar somente a região de plasmócitos para a análise da apoptose especificamente nesta população.

Xu *et al.* (2002) estudaram a apoptose em plasmócitos por microscopia óptica em tecido proveniente de biopsia de medula óssea em 54 portadores de MM recém diagnosticados, não observando correlação entre apoptose de plasmócitos e estágio clínico.

Em um trabalho publicado por Minarik *et.al.* (2005), 117 portadores de MM foram analisados no momento do diagnóstico quanto à taxa proliferativa de seus plasmócitos, com a marcação dos núcleos destas células com iodeto de propídio e quanto à taxa de apoptose de seus plasmócitos pela marcação com anexina V. Foi demonstrado que indivíduos com mais de 2,8% de seus plasmócitos em fase S evoluíram com pior sobrevida global ($p=0,0005$). Os pacientes com fração de plasmócitos em apoptose inferior a 4%, por sua vez, apresentaram mediana de sobrevida global somente de 16 meses, enquanto pacientes com fração de plasmócitos em apoptose superior a 4% tiveram mediana de sobrevida não alcançada ($p=0,01$).

Em outro estudo mais recente, do mesmo grupo de pesquisadores, foi demonstrado que pacientes com mais de 2,9% de seus plasmócitos em fase S e pacientes com marcação de plasmócitos com anexina V menor ou igual a 4,4% apresentaram pior sobrevida. Ainda foi realizada a razão entre fase S e marcação com anexina V, sendo que indivíduos com razão superior a 0,71 apresentaram pior sobrevida em relação ao grupo com razão inferior a 0,71 ($p=0,032$) (Scudla *et al.*, 2006).

Um terceiro trabalho deste grupo de pesquisadores mostrou que em pacientes tratados que obtiveram resposta ao tratamento, houve diminuição da fração de plasmócitos em fase S e aumento da fração de plasmócitos em apoptose. Nos pacientes em que houve recidiva ou progressão, houve um aumento na fração de plasmócitos em fase S e diminuição da sua taxa de apoptose (Minarik *et al.*, 2009).

2.3.2 - Alterações citogenéticas presentes no mieloma múltiplo

Nos últimos anos, a citogenética tem sido considerada uma das mais importantes técnicas na determinação de prognóstico no MM. Numerosos estudos abordando alterações cromossômicas por citogenética convencional mostram que anormalidades são observadas somente em 20 a 60% dos casos, com uma mediana de 30 a 40% (Dewald *et al.*, 1985; Gould *et al.*, 1988; Laï *et al.*, 1995; Tricot *et al.*, 1995; Zandecki *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 2003). Por outro lado, estudos realizados com a determinação da DNA ploidia por citometria de fluxo (índice de DNA celular) ou pela utilização de técnicas de citogenética molecular como hibridação “*in situ*” por fluorescência (FISH) demonstraram a presença de anormalidades cromossômicas na maior parte dos pacientes (Garcia-Sanz *et al.*, 1995; Zandecki *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 2003; Wuilleme *et al.*, 2005).

Esta discrepância é provavelmente decorrente de alguns fatores como: (a) um baixo índice mitótico dos plasmócitos malignos com consequente análise das células normais da medula óssea pela citogenética convencional; (b) a localização telomérica de algumas translocações cromossômicas que não são facilmente identificadas pela citogenética convencional e (c) grau variável de infiltração da medula óssea.

Apesar destas dificuldades o cariótipo, quando alterado, revela anormalidades complexas, com múltiplas alterações estruturais (translocações, derivativos e deleções) e numéricas. A hiperdiploidia, a perda do cromossomo 13 e alterações estruturais dos cromossomos 1 e 14

são as alterações mais frequentemente encontradas (Gould *et al.*, 1988; Lai *et al.*, 1995; Seong *et al.*, 1998).

Com a realização de estudos utilizando técnicas de citogenética convencional, FISH e determinação da DNA-ploidia por citometria de fluxo foi possível definir que a maioria dos casos de MM é aneuplóide, havendo então quatro principais grupos de alterações citogenéticas numéricas:

(a) Grupo hiperdiploide: grupo representado pelo ganho de diversos cromossomos (superior ou igual a 48 cromossomos, em geral entre 53 a 60 cromossomos). A hiperdiploidia é observada em cerca de metade dos casos com cariótipos anormais e é caracterizada pelo ganho dos cromossomos 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21;

(b) Grupo pseudo-diploide: caracterizado pela presença de 44 a 47 cromossomos;

(c) Grupo hipodiploide: caracterizado pela presença de menos de 44 cromossomos;

(d) Grupo quase tetraplóide: caracterizado pela presença de 75 ou mais cromossomos. Este grupo representa duplicações 4N de células com cariótipo pseudo-diplóide ou hipodiplóide.

Estes três últimos grupos (b, c e d) possuem alterações cromossômicas muito semelhantes, sendo assim classificados como grupo não hiperdiploide. O grupo não hiperdiploide é caracterizado pela perda de alguns cromossomos; em geral os cromossomos 13, 8, 14, 16 e 22.

Dentre as anormalidades estruturais cromossômicas podem ser encontradas aquelas envolvendo o braço longo do cromossomo 1 e

translocações envolvendo a região 14q32 do cromossomo 14, sendo esta a região onde se localiza o gene da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH) (Gould *et al.*, 1988; Drach *et al.*, 1995; Garcia-Sanz *et al.*, 1995; Perez-Simon *et al.*, 1998; Smadja *et al.*, 2001; Fonseca *et al.*, 2004, Avet-Loiseau, 2007a).

Cinquenta a 60% dos portadores de MM apresentam alterações cromossômicas envolvendo a região 14q32 (Avet-Loiseau *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2002b; Fonseca *et al.*, 2003). Estas translocações resultam na justaposição do IgH junto a oncogenes, levando ao aumento da expressão destes e ocorrem na maioria das vezes com um dos seguintes parceiros: os cromossomos 11, 4, 16, 20 e 6, como descrito na Tabela 3 (Fonseca *et al.*, 2004; Hideshima *et al.*, 2004).

Tabela 3 - Regiões cromossômicas envolvidas em translocações com o IgH e sua associação com a sobrevida global (Hideshima *et al.*, 2004)

Região	Oncogene	Incidência da translocação	Mediana de sobrevida
11q13	Ciclina D1	15%	49 meses
4p16.3	FGFR3/MMSET	15%	25 meses
16q23	C-MAF	5%	15.7 meses
20q11	MAFB	2%	Na
6p21	Ciclina D3	3%	Na

Na – não avaliado

A translocação t(11;14)(q13;q32) está associada a uma sobrevida comparável a dos pacientes que não apresentam outras anormalidades

citogenéticas estruturais ou hipodiploidia. Esta alteração resulta no aumento da expressão da ciclina D1 e é a translocação mais frequentemente encontrada no MM (Fonseca *et al.*, 2002b; Fonseca *et al.*, 2003).

A translocação t(4;14)(p16;q32), por sua vez, resulta no aumento da expressão do receptor de fator de crescimento de fibroblasto 3 (FGFR3) e do domínio MMSET, e possui impacto prognóstico negativo no MM (Gertz *et al.*, 2005).

As alterações do cromossomo 13 ocorrem em cerca de metade dos pacientes com cariótipos anormais, todas levando à perda de material genético. Análises realizadas com a técnica de FISH confirmam estes achados. Oitenta e cinco por cento das anormalidades do cromossomo 13 são monossomias, enquanto 15% são deleções, sempre envolvendo a região cromossômica 13q14. Existe uma associação entre anormalidades do cromossomo 13 e translocações envolvendo a região 14q32, pois em quase 90% dos casos com t(4;14)(p16;q32) ou t(14;16)(q32;q23) observa-se deleção da região 13q14 [del(13q14)], enquanto somente em 40 a 50% dos casos sem t(4;14)(p16;q32) ou t(14;16)(q32;q23) observa-se esta deleção. Uma associação semelhante foi observada entre alterações do cromossomo 13 e não hiperdiploidia. Enquanto as alterações do cromossomo 13 são observadas em 30-35% dos pacientes com cariótipo hiperdiploide, estão presentes em 85% dos pacientes com cariótipo não hiperdiploide (Avet-Loiseau *et al.*, 1999; Shaughnessy *et al.*, 2000; Magrangeas *et al.*, 2005).

As anormalidades do cromossomo 13, quando detectadas por citogenética convencional ou FISH eram associadas a um prognóstico

adverso. Entretanto, a presença desta anormalidade, quando detectada pela citogenética convencional, associava-se a pior prognóstico do que quando observada somente por FISH. Isto é explicado pelo fato da citogenética convencional mostrar alterações cromossômicas somente em células com alta taxa proliferativa, que estão em divisão celular, enquanto a detecção de alterações do cromossomo 13 somente por FISH mostra a presença desta alteração em células neoplásicas mesmo com baixa taxa proliferativa (Laï *et al.*, 1995; Tricot *et al.*, 1995; Seong *et al.*, 1998; Avet-loiseau *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2003).

Outra alteração que é encontrada em cerca de 10% dos casos é a deleção da região 17p13 [del(17p13)], o *locus* do gene supressor de tumor p53. Esta alteração também tem sido associada a uma evolução clínica adversa (Fonseca *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005).

Estudo utilizando a técnica de FISH definiu três grupos com diferentes evoluções clínicas, conforme descrito na Tabela 4 (Fonseca *et al.*, 2003).

Tabela 4 - Sobrevida global de acordo com diferentes alterações cromossômicas, detectadas por técnica de FISH (Fonseca *et al.*, 2003)

Grupo	Alterações cromossômicas	Sobrevida Global
Alto risco	t(4;14) e/ou t(14;16) e/ou del(17p13)	24,7 meses
Risco intermediario	monossomia 13 ou del(13q14)	42,3 meses
Baixo risco	t(11;14) ou sem alterações	50,5 meses

Em estudo posterior, realizado por Avet-loiseau *et al.* (2007), 1064 pacientes com idade abaixo de 66 anos foram avaliados, sendo analisados fatores prognósticos como del(13q14), t(4;14)(p16;q32), del(17p13), DNAploidia, β_2 -microglobulina, nível sérico de albumina, nível de hemoglobina e contagem plaquetária. Foi demonstrado em análise multivariada que somente a t(4;14)(p16;q32), a del(17p13), a β_2 -microglobulina e níveis de hemoglobina inferiores a 10,0g/dL correlacionavam-se com pior sobrevida livre de eventos e que somente t(4;14)(p16;q32), a del(17p13) e a β_2 -microglobulina correlacionavam-se com pior sobrevida global. Estas análises mostraram que o valor prognóstico da del(13q14) era totalmente dependente da sua associação frequente com a t(4;14)(p16;q32) e com a del(17p13). Na ausência destas duas últimas anormalidades, a del(13q14) deixa de ter importância na determinação do prognóstico da doença.

Outra alteração cromossômica que tem sido considerada importante no estudo do MM, principalmente na última década, é a amplificação da banda 1q21 do cromossomo 1, encontrada em cerca de metade dos pacientes. Estudos utilizando técnicas de FISH e hibridação genômica comparativa (“CGH-array”) mostraram que a amplificação da banda 1q21 está associada ao aumento do risco de progressão do MM assintomático e a uma diminuição da sobrevida global no MM sintomático (Rosinol *et al.*, 2005; Hanamura *et al.*, 2006).

Há pouca informação a respeito do perfil de anormalidades cromossômicas dos pacientes brasileiros. Chauffaille *et al.* (2007) estudaram anormalidades cromossômicas pelo método do FISH em 34 pacientes

portadores de MM ao diagnóstico. Mostrou-se que 97% dos casos apresentaram alteração cromossômica numérica e destes, 75% mostraram ser hiperdiplóides, 18% hipodiplóides, 3% triplóide e 3% pseudo-diplóide. A del(13q14) foi observada em 30% dos casos e o rearranjo envolvendo o IgH em 25% dos casos. Não foram observados casos com del(17p13) ou rearranjo envolvendo o “*locus*” da ciclina D1 no cromossomo 11.

Em outro estudo, 110 pacientes foram submetidos à detecção das anormalidades del(13q14), pesquisa de rearranjo do “*locus*” IgH no cromossomo 14, del(17p51), t(4;14)(p16;q32) e t(11;14)(q13;q32) com a utilização de técnica de FISH. A presença de del(13q14) foi evidenciada em 35% dos casos, o rearranjo do *locus* IgH no cromossomo 14 em 32,2%, a t(4;14)(p16;q32) em 20% e a t(11;14)(q13;q32) em 12,2%. A del(17p51) foi encontrada em apenas 6% dos casos (Segges *et al.*, 2008). Estes resultados diferem dos encontrados na literatura mundial, podendo ser variação decorrente apenas do pequeno número de pacientes estudados. No entanto, existe a necessidade de se conhecer melhor o perfil das alterações cromossômicas presentes nos pacientes portadores de MM no Brasil.

Apesar do papel do FISH no estudo dos fatores de prognóstico do MM estar muito bem estabelecido, sabe-se que pacientes com taxa de infiltração da medula óssea muito baixa podem apresentar resultado falso negativo devido à análise preferencial de células normais da medula óssea. Para resolver este problema, duas técnicas foram desenvolvidas para a seleção de células plasmocitárias.

Uma delas é a seleção de plasmócitos com o uso de anticorpos monoclonais anti-CD138 ligados a esferas magnéticas. Estes anticorpos anti-CD138 são colocados em contato com as células da medula óssea e se

ligam aos plasmócitos e este material então é colocado em contacto com uma placa de metal. Desta maneira, somente os plasmócitos ligados ao CD138 ficam ligados à placa, enquanto as outras células são eliminadas (Borset *et al.*, 1993).

A outra técnica é a realização de imunofluorescência direta com a utilização de anticorpo monoclonal anti-cadeia leve “*kappa*” ou “*lambda*” (dependendo do tipo de imunoglobulina produzido pelo plasmócito maligno) conjugado a um fluorocromo, mais comumente o 7-amino-4-methylcoumarim-3-ácido acético (AMCA). Esta imunofluorescência é realizada concomitantemente ao FISH, sendo que somente as células que apresentam cadeia leve “*kappa*” ou “*lambda*” da imunoglobulina em seu citoplasma são analisadas quanto à presença de alterações cromossômicas (técnica de clg-FISH) (Ahmann *et al.*, 1998).

2.3.2.1 - A importância das alterações cromossômicas na patogenia e nas características biológicas do mieloma múltiplo

Os linfócitos B sofrem, durante o processo de seleção de antígeno no centro germinativo dos linfonodos, uma sequência de mutações nos genes responsáveis pela expressão das moléculas de imunoglobulinas, chamado de processo de hipermutação somática. Ocorre também a substituição da cadeia pesada utilizada para a formação da molécula de imunoglobulina. Após a passagem pelo centro germinativo, os linfócitos B geram plasmablastos que migrarão para a medula óssea e ao interagirem com

células estromais, se transformarão em plasmócitos de longa vida (Rajkumar *et al.*, 1999).

Os processos de hipermutação somática e de substituição da IgH muitas vezes causam mutações ou quebras no DNA de outros genes. A desregulação de oncogenes pela ocorrência de uma translocação que os leva para junto da região cromossômica responsável pela expressão da cadeia pesada (IgH, região 14q32), da cadeia leve “*kappa*” (região 2p11) ou da cadeia leve “*lambda*” (região 22q11) da imunoglobulina é um evento recorrente em tumores de células B (Korsmeyer, 1992).

O MM é uma neoplasia linfóide B que se origina de plasmablastos ou plasmócitos anormais. Em mais de metade dos casos são observadas translocações cromossômicas decorrentes de erros nos processos que ocorrem no centro germinativo. A consequência destas translocações é a desregulação ou aumento da expressão de um oncogene que é posicionado próximo ao IgH (Bergsagel, Kuehl; 2005).

As translocações envolvendo o IgH têm sido detectadas desde os primeiros estágios das neoplasias plasmocitárias, inclusive sendo observadas nas GMSI. Por outro lado, as translocações IgH são altamente conservadas ao longo das diferentes fases do MM. Isto é consistente com a hipótese de que estas translocações sejam eventos primários que levam à imortalização do clone, porém insuficientes para a transformação maligna (Avet-Loiseau *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2003).

As translocações envolvendo o IgH ocorrem de forma recorrente com uma das seguintes regiões cromossômicas: (1) a região 4p16, local onde

estão presentes os oncogenes MMSET e FGFR3; (2) a região 6p21, local onde está presente o gene da ciclina D3; (3) a região 11q13, local onde está presente o gene da ciclina D1, (4) a região 16q23, local onde está presente o oncogene c-MAF e (5) a região 20q11, local onde está presente o oncogene MAFB. Estas translocações ocorrem em cerca de 40% dos pacientes. É observada menor prevalência de translocações envolvendo as regiões cromossômicas 4p16 e 16q23 na GMSI em relação ao MM, o que sugere que estas translocações podem causar MM de novo e/ou estão associadas com a rápida progressão da GMSI para MM (Bergsagel, Kuehl; 2005).

Foi demonstrado que a expressão das ciclinas D1, D2 e D3 no MM é maior do que em plasmócitos normais. As translocações envolvendo o IgH com as regiões cromossômicas 11q13 e 6p21 levam diretamente à desregulação da expressão da ciclina D1 e da ciclina D3, respectivamente. A $t(4;14)(p16;q32)$, por sua vez, cursa com aumento indireto da expressão da ciclina D2. Esta translocação resulta na hiperativação tanto do gene FGFR3 quanto do gene MMSET. Todos os casos com esta translocação cursam com elevada expressão do MMSET, mas em 30% deles não há aumento da expressão do FGFR3, o que sugere que o aumento na expressão do gene MMSET é mais importante para a patogenia do MM que a expressão do gene FGFR3. A $t(14;16)(q32;q23)$ também leva indiretamente à desregulação da ciclina D2. Nos casos em que não ocorrem translocações envolvendo o IgH é observada uma alta taxa de hiperdiploidia e a ciclina D1 ou D2 estão desreguladas por mecanismo desconhecido (Chesi *et al.*, 1998; Santra *et al.*, 2003).

Atualmente diversos centros têm realizado estudos com técnicas de microarranjos (“*microarrays*”) e hibridização comparativa do genoma “*CGH-array*” em portadores de MM (Bergsagel *et al.*, 2005; Zhan *et al.*, 2006). A capacidade do microarranjo de estratificar os pacientes de acordo com o seu perfil de expressão gênica associada à capacidade do “*CGH-array*” de avaliar perdas e ganhos recorrentes de material genético em células tumorais torna possível a introdução de sistemas de classificação prognóstica baseados na avaliação do DNA das células tumorais.

Um estudo realizado na Clínica Mayo classificou os pacientes com MM em sete grupos de acordo com sua expressão gênica, através da utilização de técnica de microarranjo. Os primeiros quatro grupos são caracterizados por translocações cromossômicas que envolvem o IgH (Zhan *et al.*, 2006):

(1) Grupo MS: caracterizado pela presença da $t(4;14)(p16;q32)$, com elevada expressão de ciclina D2;

(2) Grupo MF: as translocações $t(14;16)(q32;q23)$ e $t(14;20)(q32;q11)$ com aumento na expressão de ciclina D2;

(3) Grupo D1: caracterizado pela presença da $t(11;14)(q13;q32)$ com aumento da expressão de ciclina D1;

(4) Grupo D2: caracterizado pela presença da $t(6;14)(p21;q32)$, com aumento da expressão de ciclina D3.

Estes primeiros quatro grupos perfazem cerca de 40% dos casos de MM. Nos outros três grupos, citados abaixo, se observa aumento da expressão de uma ou mais ciclinas em comparação com plasmócitos

normais, no entanto, sem haver as translocações descritas nos grupos anteriores:

(5) Grupo HY: caracterizado por hiperdiploidia, superexpressão de genes presentes em cromossomos ímpares (frequentemente envolvidos em trissomias) e expressão de baixos níveis de ciclina D1;

(6) Grupo LB: caracterizado por baixa incidência de acometimento ósseo e elevada expressão de ciclina D2;

(7) Grupo PR: caracterizado pela hiperexpressão de inúmeros genes relacionados á proliferação celular. Este grupo está associado à pior sobrevida em comparação a todos os outros, sendo observada a presença tanto de casos hiperdiploides como não hiperdiploides. Sugere-se que as características observadas neste grupo sejam causadas por eventos secundários.

A desregulação de uma das três ciclinas pode tornar as células mais propensas a estímulos proliferativos, dentre eles a interleucina-6 (IL-6), que é produzida por células estromais da medula óssea (Tarte *et al.*, 2002; Zhan *et al.*, 2002, Hideshima *et al.*, 2004). A IL-6 estimula a sobrevivência e/ou expansão das células do mieloma não só por induzir a entrada da célula em processo de divisão celular, mas também por prevenir a apoptose (Kawano *et al.*, 1988; Klein *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1992; Klein, 1995).

Na doença em fase inicial, quando o crescimento celular depende da presença de IL-6, os plasmócitos são induzidos a proliferar no microambiente medular. Em estágios mais tardios da doença, mutações nos genes N ou K-*ras* substituem esta função, permitindo uma independência da

expansão tumoral em relação à IL-6, ocorrendo disseminação da doença para o ambiente extra-medular. Estudos mostram que mutações no gene *ras* ocorrem em 39% dos casos de MM no momento do diagnóstico sendo que a sua prevalência aumenta com a progressão da doença, porém estão ausentes na GMSI (Hallek *et al.*, 1998).

Assim como a mutação do gene *ras*, outras alterações cromossômicas estão presentes em maior proporção em doença mais avançada (Jonveaux *et al.*, 1992).

Apesar das alterações envolvendo a região 14q32 serem, em geral, alterações primárias, algumas variantes parecem ser secundárias e associadas à progressão da doença como, por exemplo, translocações envolvendo o gene *c-myc*, que se localiza na região cromossômica 8q24. Estas translocações estão presentes em cerca de 3% dos casos de MM e não ocorrem na GMSI. Além disso, esta alteração afeta muitas vezes somente uma pequena porcentagem dos plasmócitos pertencentes ao clone maligno, o que sugere evolução clonal (Fonseca *et al.*, 2004).

O gene supressor de tumor retinoblastoma (Rb) está envolvido na regulação do ciclo celular e na diferenciação celular. A proteína Rb suprime a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. A monossomia do cromossomo 13 ou a deleção da região 13q14, onde se localiza o gene do retinoblastoma, está presente em cerca de metade dos portadores de MM. Esta perda monoalélica do gene não está associada a qualquer alteração na expressão do gene Rb, não há mutações ou rearranjos do gene Rb e a perda bialélica do gene Rb é infrequente no MM. Portanto, é desconhecido

se a del(13q14), apesar de presente em quase metade dos portadores de MM, esteja envolvida na patogênese do MM (Corradini *et al.*, 1994; Dao *et al.*, 1994; Juge-Morineau *et al.*, 1995; Zandecki *et al.*, 1995; Garcia-Marco *et al.*, 1996). Em contraste com as translocações envolvendo o 14q32, que são observadas com frequência semelhante na GMSI e no MM e estão presentes na maioria das células plasmocitárias dos pacientes com estas alterações, as anormalidades do cromossomo 13 não são tão frequentes na GMSI e podem não estar presentes na maioria dos plasmócitos dos pacientes com esta anormalidade, o que favorece a idéia de que seja um evento posterior, porém precoce, associado à transformação da GMSI em MM (Magrangeas *et al.*, 2005). No entanto, esta hipótese é controversa, já que em estudo de Fonseca *et al.* (2002a) as alterações do cromossomo 13, quando pesquisadas por FISH, foram encontradas em 50% dos portadores de GMSI, o que sugere que esta alteração não tenha tanta importância na progressão da GMSI para MM.

Outra alteração que é encontrada em cerca de 10% dos casos é a deleção da região cromossômica 17p13, o “locus” do gene supressor de tumor p53. Esta alteração ocorre em 5% dos casos de MM assintomáticos ou em remissão clínica e em 20 a 40% dos casos de leucemia de células plasmáticas e parece ter muitos efeitos no crescimento e na diferenciação celular levando a um bloqueio da apoptose e na diferenciação plasmocitária. Geralmente, a del(17p13) afeta apenas uma pequena porcentagem dos plasmócitos envolvidos no clone maligno, o que sugere evolução clonal (Preudhomme *et al.*, 1992; Neri *et al.*, 1993; Willems *et al.*, 1993; Fonseca *et*

al., 2003; Huang *et al.*, 2005). A Figura 5 resume todos estes processos no desenvolvimento do MM.

Figura 5 - Esquema comparativo das fases da doença e eventos genéticos do mieloma múltiplo com a ontogênese dos linfócitos B (Falcão, Dalmazzo, 2007)

O estudo destas anormalidades cromossômicas tem permitido a correlação entre alterações genéticas, características clínicas e evolução clínica, bem como a utilização de técnicas como o microarranjos e o “CGH-array” permitem a melhor compreensão do perfil de expressão gênica associado às diferentes alterações cromossômicas. No entanto, informações escassas são encontradas na literatura médica a respeito da associação

entre alterações cromossômicas e o comportamento das células tumorais do MM, como, por exemplo, maior taxa proliferativa ou menor taxa de apoptose.

Este tipo de avaliação poderia contribuir para a compreensão do papel das diferentes alterações cromossômicas na patogenia da doença. Em especial, as anormalidades do cromossomo 13, que apesar de serem muito frequentes no MM, têm significado limitado na determinação de prognóstico. Entretanto, isto não significa que as anormalidades do cromossomo 13 não tenham papel na patogenia da doença. Alguns estudos mostraram uma associação entre del(13q14) e maior taxa proliferativa dos plasmócitos (Gutierrez *et al.*, 2000; Zojer *et al.*, 2000, Fonseca *et al.*, 2002c). Por outro lado, não é conhecido se os plasmócitos de pacientes com a del(13q14) apresentam outras características biológicas diferentes dos plasmócitos de pacientes sem esta anormalidade cromossômica, como diferente taxa de apoptose ou independência do microambiente medular.

Também não está claro se pacientes com outras alterações cromossômicas como translocações envolvendo o IgH ou del(17p13) apresentam plasmócitos com elevada taxa proliferativa, menor taxa de apoptose ou independência do microambiente medular.

Objetivos

3. Objetivos

Os objetivos primários do presente estudo são:

1. Determinar a prevalência da del(13q14), da t(4;14)(p16;q32) e da del(17p13) em portadores de MM do HCFMUSP no momento do diagnóstico, utilizando a técnica de clg-FISH;
2. Determinar as seguintes características biológicas dos plasmócitos, como:
 - (a) taxa de plasmócitos em divisão celular através da expressão de Ki-67 por citometria de fluxo;
 - (b) taxa de plasmócitos em apoptose através da marcação com anexina V por citometria de fluxo;
 - (c) avaliação da presença de plasmócitos circulantes por citometria de fluxo;
3. Verificar a associação entre as anormalidades cromossômicas estudadas e características biológicas da célula tumoral.

O objetivo secundário do presente estudo é:

4. Verificar a relação entre as características clínicas, laboratoriais, obtidas por citometria de fluxo e as anormalidades citogenéticas estudadas com a resposta à terapia, sobrevida global e sobrevida livre de eventos.

Casuística e métodos

4. Casuística e Métodos

4.1 - Casuística

Inicialmente foram analisados 104 pacientes do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SH-HC-FM/USP), diagnosticados como portadores de MM entre março de 2007 e abril de 2009, de acordo com os critérios diagnósticos estabelecidos pelo *The International Myeloma Working Group* (2003) (Tabela 5). Os pacientes foram submetidos à coleta de aspirado de medula óssea para diagnóstico, sendo o material suficiente para realização de técnicas de citometria de fluxo e FISH. Foram excluídos pacientes cuja amostra não foi submetida a nenhuma das análises de citometria de fluxo com sucesso e pacientes que receberam corticosteróides nos últimos três meses, passando a casuística final a ser composta por 84 pacientes.

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob protocolo de pesquisa nº 016/06.

Tabela 5 - Critérios diagnósticos para Mieloma Múltiplo estabelecidos pelo *The International Myeloma Working Group*

Mieloma Múltiplo Assintomático	<p>Paraproteína no soro $\geq 3,0\text{g/dL}$ e/ou</p> <p>Infiltração da medula óssea por plasmócitos $\geq 10\%$ e</p> <p>Ausência de sinais de acometimento de órgãos alvo</p>
Mieloma Múltiplo Sintomático	<p>Paraproteína no soro ou na urina e/ou</p> <p>Infiltração de medula óssea por plasmócitos clonais ou presença de plasmocitoma e</p> <p>Sinais de acometimento de órgãos alvo</p>
Sinais de lesão de órgãos alvo	<p>Nível sérico de cálcio elevado e/ou</p> <p>Insuficiência renal e/ou</p> <p>Anemia: nível de hemoglobina abaixo de 2g/dL do limite inferior da normalidade ou inferior a 10g/dL e/ou</p> <p>Lesões líticas ou osteoporose com fraturas e/ou</p> <p>Outros: hiperviscosidade, amiloidose e infecções bacterianas recorrentes</p>

4.2 - Métodos

4.2.1 - Fluxograma do trabalho

4.2.2 - Obtenção de material para estudo

O aspirado de medula óssea foi obtido pela punção de medula óssea em crista ilíaca ou esterno sob anestesia local com lidocaína a 5% sem vasoconstritor com agulha de mielograma descartável na ocasião do diagnóstico. Foi coletado um frasco de material com cerca de 5 mL de medula óssea diluído em heparina. Também foi coletada uma amostra de sangue periférico em tubo de EDTA.

4.2.3 - Separação das células mononucleares por gradiente de densidade

Parte do material da medula óssea foi inicialmente transferido para um tubo Falcon de 15 mL e diluído em tampão salina fosfato (PBS) até completar 4 mL. Para a separação das células mononucleares por gradiente de densidade, o material foi colocado em um tubo Falcon de 15 mL já contendo 3 mL de Ficoll-Hypaque (GE-Healthcare). O material foi submetido à centrifugação a 1350 rpm por 30 minutos em centrífuga Beckman, e posteriormente foi retirada a camada de células mononucleares de aspecto leitoso interposta ao plasma e ao Ficoll-Hypaque.

Esta camada foi lavada duas vezes com tampão PBS a 1500 rpm por 10 minutos. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e o botão de células mononucleares foi ressuspenso em 5 mL de PBS. Em seguida verificou-se o número total de células desse material em contador automatizado Coulter T890.

4.2.4 - Preparação de lâminas de citocentrifugação para o FISH

Parte das células mononucleares separadas por gradiente de densidade foi diluída em PBS na concentração de 1×10^6 células/mL. Foi realizada a preparação de funis, sendo estes montados com uma lâmina de vidro sob papel filtro, nos quais foram colocados 100 μ L da suspensão das células mononucleares para posterior centrifugação a 2000 rpm por dois minutos em citocentrífuga. Após secagem das lâminas à temperatura ambiente, as mesmas foram fixadas com Etanol a 95% por cinco minutos e congeladas a -20°C .

4.2.5 - Citogenética molecular-hibridação “*in situ*” por fluorescência (FISH)

4.2.5.1 - Sondas de DNA utilizadas

As sondas de DNA da marca Vysis estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 – Sondas de DNA utilizadas para a técnica de FISH

Sonda de DNA Vysis	Fluorescência	Tampão de amplificação Laboratório Insitus	Sonda
LSI RB1 (13q14)	RB1: laranja	49 μ L	1 μ L
LSI IGH/FGFR3 duas cores/duas fusões	FGFR3: laranja IGH: verde	49 μ L	1 μ L
LSI p53 (17p13.1)	P53: laranja	48 μ L	1 μ L
CEP 17 (D17Z1)	CEP 17: verde		1 μ L

4.2.5.2 - Procedimentos

O procedimento de clg-FISH permite a identificação dos plasmócitos clonais com a utilização de anticorpos monoclonais anti-cadeia leve kappa, anti-cadeia leve lambda (produzidos em cabra) e anti-imunoglobulina G de cabra (produzido em coelho) conjugados ao 7-amino-4-methylcoumarim-3-ácido acético (AMCA) (Laboratórios Vector), que emitem imunofluorescência azul característica (Ahmann *et al.*, 1998) (Figura 6).

Figura 6 - Plasmócitos (células com o citoplasma azul fluorescente) ao lado de células não plasmocitárias (células sem citoplasma fluorescente), submetidas à hibridação com a sonda LSI RB1 (13q14) para pesquisa de del(13q14). Estes plasmócitos não apresentam del(13q14).

Antes do início dos experimentos foram feitos testes para a titulação destes anticorpos com amostras de medula óssea de pacientes sabidamente não portadores de doenças onco-hematológicas e de portadores de MM com infiltração maciça da medula óssea por plasmócitos.

As lâminas preparadas por citocentrifugação foram retiradas do congelador e imediatamente colocadas em solução de etanol a 95% por 5 minutos. Após a secagem, as lâminas foram incubadas com 10 μ L de anticorpo monoclonal anti-cadeia leve kappa ou anti-cadeia leve lambda conjugado a AMCA, diluído em 90 μ L de meio de cultura preparado com 90% de RPMI 1640 e 10% de soro fetal bovino, por 60 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com tween 20 0,05% (Sigma) (diluído em PBS) duas vezes por dois minutos e foram incubadas com 5 μ L de anticorpo anti-imunoglobulina G de cabra conjugado a AMCA, diluído em 95 μ L de meio de cultura, por 60 minutos, para intensificar o sinal. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente com tween 20 0,05% duas vezes por dois minutos e incubadas por cinco minutos em solução de paraformaldeído 2%, pH 7,2 (Sigma).

Foi realizada nova lavagem uma vez em tween 20 0,05% por dois minutos e uma vez em 2XSSC por dois minutos e as lâminas foram incubadas em 2XSSC por 30 minutos a 37°C. Em seguida as lâminas foram desidratadas em uma bateria de álcoois a 70%, 85% e 100%, ficando imersas em jarras plásticas contendo o álcool etílico nas respectivas concentrações por um minuto, à temperatura ambiente. Cerca de 3 μ L da

solução contendo a sonda para a realização do FISH foi colocada sobre as células.

Após a adição da sonda, uma lamínula de 10x10mm foi colocada sobre cada sítio de hibridação e as lâminas foram seladas e colocadas em uma placa a 77°C por cinco minutos para denaturação do DNA. Em seguida, as lâminas foram transferidas para uma estufa a 37°C para a hibridação do DNA por 12 a 16 horas.

Posteriormente as lamínulas foram retiradas e as lâminas lavadas por dois minutos em solução de lavagem 1 (0,4XSSC/ 0,3%Tween 20) e por até um minuto em solução de lavagem 2 (2XSSC/ 0,1% Tween 20). Após a secagem das lâminas foi adicionada solução “*antifade*” (Vectashield, Laboratórios Vector) às mesmas, que foram cobertas com uma lamínula.

Nos casos de pacientes portadores de MM não secretor, o primeiro experimento de clg-FISH foi realizado com duas lâminas, sendo que em uma lâmina foi utilizado o anticorpo anti-cadeia leve kappa e na outra foi utilizado o anticorpo anti-cadeia leve lambda, sendo possível detectar, em parte das vezes, a cadeia leve presente no citoplasma dos plasmócitos clonais. Em um caso em que nenhuma das lâminas apresentou plasmócitos com citoplasma fluorescente, foi realizada a identificação dos mesmos através da análise morfológica

A análise foi realizada em microscópio de fluorescência (Olympus BX60), com objetiva de imersão (100X), equipado com filtros de bandas

simples de espectros verde, vermelho e azul, e filtro de banda tripla (filtro triplo, contendo os três espectros em um só).

Cada caso foi analisado por dois observadores. Cada observador avaliou 100 núcleos interfásicos com morfologia de plasmócitos e fluorescência em citoplasma azul. Os resultados foram descritos de acordo com as normas do Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN-2009).

4.2.5.3 - Interpretação técnica dos resultados

A sonda LSI 13 (RB1) 13q14 (Spectrum OrangeTM)(Vysis) é específica para a região cromossômica 13q14, “*locus*” gênico para o RB1, com aproximadamente 220Kb, marcada com fluorocromo laranja. Em células normais com duas cópias intactas da região 13q14, são visualizados dois sinais laranja. Quando ocorre perda da região 13q14, é visualizado somente um sinal.

A sonda LSI IGH/FGFR3 duas cores duas fusões (Vysis) é composta de uma mistura de sonda específica para a região cromossômica 14q32, “*locus*” gênico do IgH, com aproximadamente 1.5Mb, marcada com fluorocromo verde (spectrum greenTM) e sonda específica para a região cromossômica 4p16, “*locus*” gênico para o oncogene FGFR3, com aproximadamente 900Kb, marcada com fluorocromo laranja (spectrum orangeTM). Esta sonda identifica a translocação t(4;14)(p16;q32). Em células

normais que não possuem a translocação são visualizados dois sinais laranja (que correspondem à região FGFR3 presente no cromossomo 4) e dois sinais verdes (que correspondem à região IgH no cromossomo 14). Na presença da translocação, são visualizados um sinal laranja, um sinal verde e dois sinais de fusão que correspondem à translocação (Figura 7). Em casos em que há translocação envolvendo a região 14q32 e outro cromossomo como, por exemplo, um dos cromossomos 11, 16, 20 e 6, podem ser visualizados três sinais verdes (um sinal corresponde à região IgH intacta e os outros dois sinais correspondem à outra região IgH envolvida em uma translocação cromossômica) e dois sinais laranja (Figura 8).

Figura 7 - Sonda de dupla fusão em célula com translocação entre dois cromossomos: um sinal verde, um sinal laranja e dois sinais de fusão (Kearney, 1999)

Figura 8 - Sonda de dupla fusão para pesquisa de t(4;14)(p16;q32) em célula com translocação entre o cromossomo 14 e outro cromossomo que não o 4 (por exemplo: cromossomo 16 ou 20): três sinais verdes e dois sinais laranja

A sonda LSI p53 (17p13.1) (Spectrum Orange™) (Vysis) mapeia a região cromossômica 17p13.1 contendo o gene p53, com aproximadamente 145Kb, marcada com fluorocromo laranja. A sonda CEP 17 (D17Z1) (spectrum green™) mapeia a região centromérica 17p11.1-q11.1 marcada com fluorocromo verde. Em uma célula normal, não contendo a deleção do 17p13, são observados dois sinais laranja e dois sinais verdes. Em uma célula que contém a deleção são observados dois sinais verdes e somente um sinal laranja.

Além da del(13q14), da t(4;14)(p16;q32) e da del(17p13), outras alterações cromossômicas são eventualmente encontradas com o uso de cada uma das sondas utilizadas. Podem ser observados, por exemplo, padrões de sinal sugestivos de trissomias e tetrassomias. Os casos em que

foi observado padrão sugestivo tetrassomia de pelo menos três cromossomos foram considerados portadores de clone quase tetraplóide.

Para estabelecer o valor de corte das três sondas foram realizados cinco testes com amostras de medula óssea de pacientes sabidamente não portadores de doenças onco-hematológicas. Foram analisados 100 núcleos de cada amostra e o número de sinais encontrados característicos da anormalidade procurada foi submetido ao teste estatístico de função β inversa usando o Microsoft Excel, segundo recomendação de Wolff *et al.* (2007) para validação da sonda.

As células não pertencentes ao clone de plasmócitos serviram como controle interno e foram avaliadas em cada reação, devendo apresentar padrão compatível com a normalidade.

4.2.5.4 - Valores de corte das sondas utilizadas no estudo

Para a sonda LSI 13 (RB1) 13q14 (Spectrum Orange™)(Vysis) o valor de corte obtido foi 16%. Portanto considerou-se positivo para del(13q14) o caso que apresentava mais de 16% dos núcleos interfásicos com apenas um sinal laranja.

Para a sonda LSI IGH/FGFR3 Dual Color Dual Fusion (Vysis) o valor de corte obtido foi 9%. Portanto considerou-se positivo para t(4;14)(p16;q32) o caso que apresentava mais de 9% dos núcleos interfásicos com um sinal laranja, um sinal verde e dois sinais de fusão amarelos.

Para a combinação de sondas CEP 17 (D17Z1) (spectrum greenTM) e LSI p53 (17p13.1) (Spectrum OrangeTM) (Vysis) o valor de corte obtido foi 19%. Portanto considerou-se positivo para del(17p13) o caso que apresentava mais de 19% dos núcleos interfásicos com um sinal laranja e dois sinais verdes.

No anexo I estão os valores de corte obtidos para outras alterações cromossômicas encontradas com o uso de cada uma das sondas utilizadas, além da del(13q14), da t(4;14)(p16;q32) e da del(17p13).

4.2.6 - Citometria de fluxo

4.2.6.1 - Estudo Imunológico

A técnica utilizada para a marcação de antígenos de membrana e citoplasma das células da medula óssea e de sangue periférico foi a de imunofluorescência direta (ID) com aquisição em citômetro de fluxo Becton Dickinson (B.D.) no programa *CELLquest* (FACScalibur, San Jose, CA).

4.2.6.2 - Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais utilizados eram conjugados ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), fluorocromo ficoeritrina (PE) e ao fluorocromo alofico-cianina (APC) (Tabela 7).

Estes anticorpos monoclonais foram titulados previamente à sua utilização.

Para a titulação da Anexina V conjugada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi utilizada amostra de sangue de indivíduos saudáveis. Foi considerado controle negativo a população de linfócitos destes indivíduos. Para a obtenção de controle positivo foi feita a incubação de células por 30 minutos no gelo com formaldeído a 3% diluído em tampão de ligação (DAKO), conforme orientação do fabricante do reagente.

Para a titulação do anticorpo monoclonal Ki-67 conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi utilizada amostra de sangue de indivíduos saudáveis e foi considerado controle negativo a

população de linfócitos destes indivíduos. Para controle positivo foram utilizadas células da linhagem celular MOLT-4.

Tabela 7 – Anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos de citometria de fluxo

Reagente	Fluorocromo	Clone	Marca	Quantidade utilizada
Anexina V	FITC		DAKO	Diluição: 1 μ L/100 μ L (PBS) Utilizados: 50 μ L
Ki-67	FITC	clone B56 IgG1k	Pharmingen	20 μ L
CD45	FITC	clone 2D1 IgG1k	Becton Dickinson	5 μ L
CD19	FITC	clone A3B1 IgG2a	Imunostep	5 μ L
Kappa	FITC	clone HP6062	Caltag	Diluição: 1 μ L/100 μ L (PBS) Utilizados: 50 μ L
Lambda	FITC	clone HP6054	Caltag	5 μ L
CD138	PE	clone MI15 IgG1k	DAKO	5 μ L
CD56	PE	clone B159 IgG1k	Pharmingen	2 μ L
CD45	PC5	clone J33 IgG1	Immunotech	5 μ L
CD38	APC	clone HIT2 IgG1k	eBioscience	3 μ L

4.2.6.3 - Determinação da marcação de plasmócitos com anexina V por citometria de fluxo

Três tubos de poliestireno 12 x 75 mm foram identificados com o nome do paciente e com os devidos anticorpos monoclonais, assim distribuídos:

Tubo 1 - gama1PE/CD45PC5

Tubo 2 - CD138 PE/CD45PC5

Tubo 3 - Anexina VFITC/CD138PE/CD45PC5

Após contagem automatizada das células mononucleares separadas por gradiente de densidade, uma suspensão com cerca de 1×10^6 células foi colocada em cada um dos tubos.

O tubo 1 serviu de controle para a marcação dos plasmócitos com anticorpo monoclonal anti-CD138. O tubo 2 serviu para identificar a população de plasmócitos (CD138+/CD45- ou +) e como controle para a marcação com anexina V nas células plasmáticas. O tubo 3 foi utilizado para a detecção da marcação de anexina V na população de plasmócitos. Devido à marcação das células com o anticorpo monoclonal anti-CD138PE não foi possível a utilização concomitante de iodeto de propídio para diferenciação de células em fases precoces da apoptose de células em fases tardias da apoptose.

Nos casos 62 a 84 foi utilizado também o anticorpo monoclonal anti-CD38APC para melhor caracterização dos plasmócitos. Nestes casos foi

realizada a preparação de quatro tubos identificados com o nome do paciente e com os devidos anticorpos monoclonais, assim distribuídos:

Tubo 1 - gama1PE/CD45PC5/gama1APC

Tubo 2 - CD138PE/CD45PC5/gama1APC

Tubo 3 - CD138PE/CD45PC5/CD38APC

Tubo 4 - Anexina VFITC/CD138PE/CD45PC5/CD38APC

Cada uma das suspensões foi lavada com PBS-azida uma vez, com posterior eliminação do sobrenadante. O botão de células foi então ressuspensão em 100 μ L de solução salina balanceada (PBS) com albumina bovina BSA (Biotest) a 1% e as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais CD138PE, CD45PC5, e CD38APC, e controles isotipos gama1PE e gama1APC, conforme a distribuição descrita no item acima, durante 20 minutos em câmara escura. Em seguida as células foram lavadas em PBS-azida uma vez e ressuspensas em 400 μ L de tampão de ligação (DAKO) (tubos 1 e 2 nos casos 1 a 61 e tubos 1, 2 e 3 nos casos 62 a 84). As células mononucleares do tubo 3 (casos 1 a 61) ou do tubo 4 (casos 62 a 84) foram ressuspensas em 100 μ L de tampão de ligação e marcadas com anexina V FITC. O material foi então incubado em câmara escura por 10 minutos a 4°C, conforme orientação do fabricante. Posteriormente, sem lavagem, a amostra foi ressuspensa em 300 μ L de tampão de ligação e imediatamente adquirida em citômetro de fluxo. O procedimento foi finalizado em até seis horas após a coleta do material.

4.2.6.4 - Determinação da expressão de Ki-67 por citometria de fluxo

Três tubos de poliestireno 12 x 75 mm foram identificados com o nome do paciente e com os devidos anticorpos monoclonais, assim distribuídos:

Tubo 1– cy-gama1FITC/gama1PE/CD45PC5

Tubo 2– cy-gama1FITC/CD138 PE/CD45PC5

Tubo 3– cy-Ki-67FITC/CD138PE/CD45PC5

Após contagem automatizada das células provenientes de amostra de medula óssea, uma suspensão com cerca de 1×10^6 células foi colocada em cada um dos tubos.

O tubo 1 serviu de controle para a marcação dos plasmócitos com anticorpo monoclonal anti-CD138. O tubo 2 serviu para identificar a população de plasmócitos (CD138+/CD45- ou +) e como controle para a marcação com Ki-67 nas células plasmáticas. O tubo 3 foi utilizado para a detecção da expressão de Ki-67 na população de plasmócitos.

Nos casos 54 a 84 foi realizada também a preparação dos seguintes tubos para melhor caracterização da população plasmocitária:

Tubo 4 - cy kappaFITC/CD138PE/CD45PC5

Tubo 5 - cy-lambdaFITC/CD138PE/CD45PC5

Tubo 6 - gama2aFITC/gama1PE/CD45PC5/CD38APC

Tubo 7 - CD19FITC/CD56 PE/CD45PC5/CD38APC

Para detecção do antígeno intracelular Ki-67 por citometria de fluxo foi utilizada a técnica de permeabilização celular com saponina (Pereira *et al.*, 2007). Cada uma das suspensões foi lavada com PBS duas vezes, com posterior eliminação do sobrenadante. O botão de células foi então ressuspenso em 100 μ L de tampão de lavagem contendo solução salina balanceada (PBS) com albumina bovina BSA (Biotest) a 1% e as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais CD45PC5, CD138PE, CD19FITC, CD56PE e controles isotipos gama2aFITC e gama1PE conforme a distribuição descrita no item acima durante 20 minutos em câmara escura à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram fixadas em 200 μ L de paraformaldeído 4% (Sigma) por 10 minutos em câmara escura à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com 2 mL de tampão de lavagem. Em seguida, adicionou-se solução tampão permeabilizante contendo albumina bovina BSA a 0,2%, azida sódica a 0,1% (Merck) e PBS com saponina a 0,5% (Merck) e, finalmente, o controle isotipo gama1FITC (tubos 1 e 2), anticorpo monoclonal anti-Ki-67 (tubo 3), anticorpo monoclonal anti-kappa (tubo 4) e anticorpo monoclonal anti-lambda (tubo 5). Após incubação por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro, as células foram novamente lavadas duas vezes com 2 mL de tampão de lavagem e ressuspensas em 400 μ L deste tampão para aquisição em citômetro de fluxo.

4.2.6.5 - Identificação e quantificação de células plasmocitárias circulantes por citometria de fluxo

Dois tubos de poliestireno 12 x 75 mm foram identificados com o nome do paciente e com os devidos anticorpos monoclonais, assim distribuídos:

Tubo 1 – gama1FITC/gama1PE

Tubo 2 – CD45FITC/CD138PE

Após contagem automatizada das células provenientes de amostra de sangue, uma suspensão com cerca de 1×10^6 células foi colocada em cada um dos tubos.

O tubo 1 serviu de controle para a marcação dos plasmócitos com anticorpos monoclonais anti-CD138PE e anti-CD45FITC. O tubo 2 serviu para identificar a população de plasmócitos (CD138+/CD45- ou +).

Cada uma das suspensões foi lavada com PBS duas vezes, com posterior eliminação do sobrenadante. As células foram então incubadas com controles isotipos gama1FITC e gama1PE (tubo 1) e CD138PE e CD45FITC (tubo 2) durante 20 minutos em câmara escura. Posteriormente, foi adicionado 2 mL de solução de lise (Becton Dickinson, San Jose, CA) a cada tubo e após 13 minutos as células foram centrifugadas com eliminação do sobrenadante para posterior lavagem com PBS-azida duas vezes. Finalmente, os botões de células foram ressuspensos em paraformaldeído a 1% (Sigma) para aquisição em citômetro de fluxo.

4.2.6.6 - Aquisição das amostras em citômetro de fluxo

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur (B.D.) equipado com um laser de argônio que emite luz de comprimento de onda de 488nm, capaz de excitar os diferentes fluorocromos utilizados (FITC, PE, PerCP) e com um laser de argônio que emite luz de comprimento de onda de 635nm, capaz de excitar o fluorocromo APC.

Previamente à aquisição das amostras, o aparelho foi calibrado com o objetivo de permitir um perfeito alinhamento da fonte excitatória com o centro do sistema fluido onde as células estavam dispostas.

Os ajustes iniciais para a calibração do aparelho foram feitos com a utilização de microesferas de poliestireno (“beads”), partículas comercialmente disponíveis sob a forma pura (não marcada) e conjugada aos fluorocromos FITC, PE, PC5 e APC. Sua utilização pelo programa *Facscomp* do aparelho permite ajustar a sensibilidade óptica e a compensação das fluorescências (FITC, PE, PC5, APC), evitando assim a superposição dos espectros de emissão dos fluorocromos e captação em outro canal inespecífico.

Para detecção e quantificação da expressão de Ki-67 em plasmócitos e da marcação de plasmócitos com anexina V foram adquiridos de 100.000 a 300.000 eventos de cada tubo, de modo que um mínimo de mil plasmócitos por tubo pudesse ser analisado. Para detecção e quantificação de plasmócitos circulantes foram adquiridos 50.000 eventos de cada tubo.

A análise dos dados foi feita pelo programa *CELLquest* do citômetro e a quantificação da fluorescência foi realizada em escala logarítmica e quando inferior a 10^1 foi considerada negativa sendo esta intensidade de fluorescência identificada pelo símbolo -, quando superior a 10^1 e inferior a 10^2 , foi considerada positiva, porém de intensidade fraca, sendo esta intensidade de fluorescência identificada pelo símbolo + e quando superior a 10^2 foi considerada positiva e de intensidade forte, sendo esta intensidade de fluorescência identificada pelo símbolo ++.

4.2.6.7 - Avaliação da apoptose e da expressão de Ki-67 nos plasmócitos

Para a detecção da proporção de plasmócitos com expressão de anexina V ou Ki-67 por citometria de fluxo foi utilizada a estratégia de delimitação de populações ("*gating*") sequencialmente, com o objetivo de selecionar a população de interesse e minimizar a interferência de células mortas.

Em um primeiro citograma a propriedade de dispersão frontal de luz das células ("*forward light scatter*"-FSC) (eixo das abscissas) *versus* a propriedade de dispersão lateral de luz das células ("*side light scatter*"-SSC) permitiu a delimitação de uma região ("*gate*"-R1) com a conseqüente eliminação de restos celulares.

Em um segundo citograma foram analisadas as células da região R1. A intensidade de fluorescência de CD45PC5 (eixo das abscissas) *versus* SSC permitiu a separação das células mononucleares da região R1 em

quatro populações distintas: granulócitos, monócitos, linfócitos e uma população de células CD45 fracamente positivas ou negativas que incluía eritrócitos e plasmócitos.

Neste segundo citograma uma nova região foi delimitada (“gate”-R2) que incluía todas as células presentes.

No terceiro citograma foram analisadas as células da região R2. Neste citograma a intensidade de fluorescência de CD45PC5 (eixo das ordenadas) *versus* a intensidade de fluorescência de CD138PE permitiu a identificação de células CD138PE positivas e CD45PC5 negativas ou fracamente positivas que representam a população de plasmócitos. Nesta população de células (“gate”-R3) a taxa de apoptose e a taxa de expressão do antígeno Ki-67 foram analisadas.

Foi então construído um 4º citograma apresentando a intensidade de fluorescência de anexina V ou de Ki-67 no eixo das abscissas *versus* a expressão de CD138 no eixo das ordenadas. A taxa de apoptose e a taxa de expressão de Ki67 foram analisadas nas células contidas na região R3. Como controle para a quantificação destes parâmetros, foi construído um citograma no tubo 2, com CD138PE (eixo das ordenadas) *versus* FL1 (eixo das abscissas), este último correspondendo ao canal para a detecção da fluorescência FITC. As taxas de apoptose e de expressão de Ki-67 foram definidas pelo percentual de células com marcação simultânea de CD138 e Ki-67 ou anexina V conforme visualizado na figura 9.

Figura 9 - Análise da marcação de plasmócitos com anexina V

4.2.6.8 - Quantificação de células plasmocitárias circulantes

Foi determinada, em cada uma das amostras, a quantidade de células CD138+/++ e CD45-/++ presentes.

4.2.7 - Análise do prontuário médico

Realizou-se a coleta de dados do prontuário médico dos 84 pacientes, enfatizando-se:

- (1) idade e sexo;
- (2) estadiamento clínico de Durie & Salmon: IA e IIA (precoce) e IIB, IIIA e IIIB (avançado);
- (3) estadiamento de acordo com Sistema Internacional de Estadiamento (ISS): I e II (precoce) e III (avançado);
- (4) dados clínicos e laboratoriais como: hemoglobina, creatinina, cálcio, β_2 -microglobulina, albumina, desidrogenase láctica (DHL), proteína C reativa (PCR) e presença ou não de lesões líticas ósseas;
- (5) porcentagem de óbito precoce, que foi definido como óbito antes de completar um mês após o diagnóstico ou óbito antes de completar pelo menos um mês de qualquer tratamento;
- (6) tipo de tratamento de primeira linha;
- (7) tratamento com quimioterapia em altas doses com resgate de células tronco hematopoéticas (QTAD);
- (8) resposta ao tratamento de primeira linha de acordo com os critérios estabelecidos pelo *International Myeloma Working Group* (Durie *et. al.*, 2006) (Tabela 8);
- (9) cálculo de sobrevida global (tempo decorrido desde a data do diagnóstico até a ocorrência de óbito em qualquer tempo e por

qualquer causa). Na ausência de óbito os pacientes foram censurados na data do último registro em prontuário.

- (10) cálculo de sobrevida livre de evento (tempo decorrido desde o diagnóstico até a ocorrência de evidências de progressão de doença ou óbito por qualquer causa). Na ausência de evento os pacientes foram censurados na data do último registro em prontuário.

4.2.8 - Análise estatística

Para a análise das variáveis contínuas, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Na presença de mais de duas categorias foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Para a análise de variáveis categóricas, foi utilizado o teste exato de Fisher. Para a análise de correlação entre duas variáveis contínuas foi utilizada a correlação de Spearman. Para a comparação entre medianas de amostras dependentes, foi utilizado o teste não paramétrico pareado de Wilcoxon.

Para as variáveis contínuas foram utilizados valores de corte estabelecidos pela literatura ou pela curva ROC.

A sobrevida global e a sobrevida livre de evento foram analisadas empregando-se o estimador produto limite de Kaplan-Meier. A comparação univariada das curvas de sobrevida foi realizada através do teste de log-rank. Após a identificação das variáveis significantes à análise univariada, as mesmas foram submetidas à análise multivariada, utilizando-se a regressão múltipla de Cox.

Todos os testes foram bicaudais, com nível de significância definido em 5%. Para a análise dos dados, foi utilizado o programa Stata para “Windows”, versão 10.

Tabela 8 – Critérios de resposta ao tratamento por Durie *et. al.*, 2006

Resposta	Critérios
Resposta completa (RC)	Desaparecimento do pico monoclonal na eletroforese de proteínas e na imunofixação sérica e urinária Infiltração da medula óssea por plasmócitos inferior a 5% e Ausência de aparecimento ou aumento de lesões líticas e Desaparecimento de plasmocitomas
Resposta parcial muito boa (RPMB)	Desaparecimento do pico monoclonal na eletroforese de proteínas, porém com imunofixação sérica e/ou urinária positiva ou redução de 90% da paraproteína sérica e/ou paraproteína urinária < 100mg/24 horas Ausência de aumento ou aparecimento de lesões líticas
Resposta parcial (RP)	Redução de 50% na paraproteína no soro e de 90% na paraproteína urinária (ou proteinúria < 200mg/24 horas) Redução de 50% na infiltração da medula óssea por plasmócitos em portadores de MM não secretor e Ausência de aumento ou aparecimento de lesões líticas e Redução de 50% no tamanho de plasmocitomas
Doença estável (DE)	Sem critérios para resposta parcial ou progressão
Progressão (P)	Aumento da paraproteína sérica e/ou urinária em 25% ou Aumento de 25% na infiltração da medula óssea por plasmócitos ou Aumento no tamanho de plasmocitomas, hipercalcemia ou novas lesões líticas

Resultados

5. Resultados

5.1 - Características clínicas e laboratoriais (Anexo II)

A casuística final foi composta por 84 pacientes sendo que 43 (51%) eram do sexo masculino, com mediana de idade de 63 anos (variando de 36 a 93 anos). Destes, sete pacientes possuíam idade inferior a 50 anos e um paciente, idade inferior a 40 anos.

A Tabela 9 representa as características clínicas e laboratoriais destes pacientes obtidas no momento do diagnóstico.

Tabela 9 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes

Variável	Pacientes
Sexo	n=84
Masculino	43 (51%)
Feminino	41 (49%)
Idade	n=84
mediana (variação)	63 anos (36 a 93 anos)
Estadio Clínico Durie & Salmon	n=81
IA	2 (2,46%)
IIA	10 (12,34%)
IIB	1 (1,23%)
IIIA	46 (56,79%)
IIIB	22 (27,16%)
Precoce	12 (14,8%)
Avançado	69 (85,2%)
Sistema internacional de Estadiamento (ISS)	n=74
I	10 (13,51%)
II	27 (36,49%)
III	37 (50,00%)
Precoce	37 (50%)
Avançado	37 (50%)
Porcentagem de plasmócitos no mielograma	n=83
Mediana (variação)	36% (3,33% a 98%)

Variável	Pacientes
Tipo de componente monoclonal	n=82
IgA kappa	11 (13,41%)
IgA lambda	5 (6,10%)
IgG kappa	37 (45,12%)
IgG lambda	16 (19,51%)
Kappa livre	4 (4,88%)
Lambda livre	6 (7,32%)
Não secretor	3 (3,66%)
Hemoglobina	n=84
Mediana (variação)	9,0g/dL (4,4 a 16,1g/dL)
Hemoglobina	n=84
< 10,0g/dL	54 (64,29%)
≥ 10,0g/dL	30 (35,71%)
Creatinina	n=84
< 2,0mg/dL	60 (71,43%)
≥ 2,0mg/dL	24 (28,57%)
Calcio	n=76
≤ 10,5mg/dL	46 (60,53%)
> 10,5mg/dL	30 (39,47%)
Lesões ósseas	n=70
(avaliadas por radiografia de esqueleto)	
Sim	62 (88,57%)
Não	8 (11,43%)
β2-microglobulina	n=74
< 3,5μg/mL	17 (22,97%)
≥ 3,5 < 5,5μg/mL	20 (27,03%)
≥ 5,5μg/mL	37 (50,00%)
Albumina	n=84
< 3,5g/dL	35 (41,67%)
≥ 3,5g/dL	49 (58,33%)
Desidrogenase láctica (DHL)	n=78
≤ 480U/L (limite superior da normalidade)	68 (87,18%)
> 480U/L	10 (12,82%)
Proteína C Reativa (PCR)	n=64
≤ 3mg/L(limite superior da normalidade)	18 (28,13%)
> 3mg/L	46 (71,88%)

5.2 - Evolução clínica dos pacientes (Anexo III)

Fluxograma do tratamento e resposta ao tratamento

Realizou-se a coleta prospectiva de dados do prontuário médico dos 84 pacientes. Doze (14,28%) pacientes apresentaram óbito precoce (óbito antes de iniciar terapia, ou antes de completar um ciclo de tratamento) e dois pacientes optaram por tratar em outro serviço. Foi tentado o contacto posterior com estes dois pacientes sem sucesso.

Dos 70 pacientes restantes, três não foram tratados: dois por apresentarem MM assintomático e um paciente por não aceitar iniciar tratamento.

Os 67 pacientes restantes foram submetidos a tratamento inicial que consistiu na administração de uma das seguintes combinações de fármacos (Anexo IV):

- (1) dexametasona em altas doses;
- (2) melfalano associado a dexametasona ou prednisona;
- (3) melfalano associado a dexametasona e talidomida e
- (4) dexametasona associada à talidomida.

Estas combinações, nos 55 pacientes que não foram submetidos à quimioterapia em altas doses com resgate de células tronco hematopoéticas (QTAD), foram administradas em ciclos mensais até a obtenção da melhor resposta possível, sendo o tratamento interrompido quando na presença de doença estável por cerca de quatro a seis meses.

Doze (17,9%) pacientes foram submetidos à QTAD. Estes pacientes foram tratados inicialmente por três a quatro ciclos de terapia inicial antes da realização da QTAD.

Dos 55 pacientes tratados com terapia convencional, quatro (7,2%) evoluíram para óbito antes do tempo necessário para a avaliação da resposta. Dos 51 pacientes restantes, cinco (9,8%) obtiveram resposta completa, cinco (9,8%) resposta parcial muito boa e dezessete (33,3%) resposta parcial. Portanto, 53% dos pacientes obtiveram resposta parcial ou superior.

Vinte e quatro (47%) pacientes não obtiveram resposta adequada: dezoito (37,1%) permaneceram com doença estável e cinco (9,8%) evoluíram com progressão de doença em vigência do tratamento.

Dos doze pacientes que foram submetidos a tratamento de indução seguido de quimioterapia em altas doses com resgate de células tronco hematopoéticas, cinco (41,6%) evoluíram com resposta completa, um (8,3%) evoluiu com resposta parcial muito boa e quatro (33,3%) evoluíram com resposta parcial. Dois (16,6%) pacientes apresentaram progressão da doença logo após o tratamento.

Em uma mediana de seguimento de 14,5 meses (0 a 37,7 meses), foram observados 33 óbitos dentre os 84 pacientes do estudo. Não foi possível estimar a mediana de sobrevida global, pois ocorreram menos de 50% dos óbitos durante o período do estudo. A probabilidade estimada de sobrevida global em dois anos foi de 54%. A curva de sobrevida global está representada na Figura 10.

Figura 10 - Curva de sobrevida global dos 84 pacientes-taxa de 54% em dois anos

Foram observados 51 eventos caracterizados como progressão de doença ou óbito. A mediana de sobrevida livre de evento foi de 10,3 meses (1 a 36,8 meses). A probabilidade estimada de sobrevida livre de evento em dois anos foi de 22% e sua curva está representada na Figura 11.

Figura 11 - Curva de sobrevida livre de evento dos 84 pacientes-taxa de 22% em dois anos

5.3 - Análise citogenética molecular- técnica de FISH (Anexo V)

Em todos os casos houve concordância dos dois observadores em relação à positividade ou negatividade na pesquisa da del (13q14), t(4;14)(p16;q32) e del(17p13).

Pesquisa da del(13q14)

A pesquisa da del(13q14) em plasmócitos pela técnica de FISH foi realizada com sucesso em 79 dos 84 pacientes, sendo que em 31 (39,24%) pacientes foi detectada esta anormalidade cromossômica (Figura 12).

Quatro casos considerados portadores de clone quase tetraplóide (com tetrassomia dos cromossomos 4, 14 e 17) apresentaram padrão de sinal da sonda LSI 13 (RB1) 13q14 compatível com a normalidade (dois sinais laranja). No entanto, levantou-se a hipótese de que nestes casos o clone quase tetraplóide seja decorrente de duplicação 4N de células com del(13q14). Portanto estes casos foram posteriormente reclassificados como portadores de del(13q14). Dessa maneira, 35 (44,3%) de 79 pacientes foram considerados portadores de del(13q14). Os diferentes padrões de sinais encontrados com a utilização da sonda LSI 13 (RB1) 13q14 (Spectrum OrangeTM)(Vysis) estão descritos na Tabela 10.

Figura 12 - Caso 13: dois plasmócitos com del(13q14): apenas um sinal laranja

Tabela 10 - Interpretação de sinais da sonda LSI 13 (RB1) 13q14

Número de casos	Padrão de sinais	Interpretação
31/79 (39,24%)	1 sinal laranja	del(13q14)
4/76 (5,2%)	2 sinais laranja-associado à tetrassomia dos cromossomos 4, 14 e 17	duplicação 4N de clones com del(13q14)
2/79 (2,53%)	3 sinais laranja	trissomia cromossomo 13
1/79 (1,26%)	4 sinais laranja	tetrassomia cromossomo 13

Pesquisa de t(4;14)(p16;q32)-rearranjo IGH/FGFR3

A pesquisa do rearranjo IGH/FGFR3 em plasmócitos foi realizada com sucesso em 76 dos 84 pacientes pela técnica de FISH, sendo que em seis (7,89%) pacientes foi detectada esta anormalidade cromossômica (Figura 13 -A). Foram detectados dez (13,15%) casos de portadores de clone com três sinais verdes e dois sinais laranja, o que pode significar trissomia do cromossomo 14 ou, mais provavelmente, translocação envolvendo o cromossomo 14, na região do IGH, com outro cromossomo que não o cromossomo 4, não havendo então envolvimento do gene FGFR3 (Figura

13-B). Os diferentes padrões de sinais encontrados com a utilização da sonda LSI IGH/FGFR3 duas cores, duas fusões (Vysis) estão descritos na Tabela 11 e com suas correspondentes Figuras 14 A e B e Figura 15.

Tabela 11 - Interpretação de sinais da sonda LSI IGH/FGFR3

Número de casos	Padrão de sinais	Interpretação
3/76 (3,94%)	2 sinais de fusão 1 sinal laranja 1 sinal verde	t(4;14)(p16;q32)
1/76 (1,31%)*	2 sinais de fusão 3 sinais laranja 3 sinais verdes	Tetrassomia dos cromossomos 4 e 14 seguido por t(4;14)(p16;q32)
2/76 (2,63%)**	3 sinais de fusão 1 sinal laranja 1 sinal verde	t(4;14)(p16;q32) com cópia extra do sinal de fusão
10/76 (13,15%)	2 sinais laranja 3 sinais verdes	rearranjo IGH ou trissomia cromossomo 14
2/76 (2,63%)	2 sinais laranja 3 sinais verdes 4 sinais laranja 6 sinais verdes 4 sinais laranja 4 sinais verdes	rearranjo IGH seguido de tetrassomia dos cromossomos 4 e 14
6/76 (7,89%***)	3 sinais laranja 3 sinais verdes 4 sinais laranja 4 sinais verdes	trissomia dos cromossomos 4 e 14 e tetrassomia dos cromossomos 4 e 14
2/76 (2,63%)	3 sinais laranja 2 sinais verdes	trissomia do cromossomo 4
3/76 (3,94%)	2 sinais laranja 1 sinal verde	monossomia do cromossomo 14
1/76 (1,31%)	1 sinal laranja 1 sinal verde	monossomia dos cromossomos 4 e 14
1/76 (1,31%)	3 sinais laranja 1 sinal verde	Trissomia do cromossomo 4 e monossomia do cromossomo 14

* Figura 14 B, ** Figura 14 A

*** Figura 15

Figura 13: (A) Caso 53 - Plasmócito (célula à esquerda) com rearranjo IGH/FGFR3 (dois sinais de fusão, um sinal laranja e um sinal verde) ao lado de célula não plasmocitária normal (dois sinais laranja e dois sinais verdes); (B) Caso 12 - Plasmócito com presença de três sinais verdes na utilização da sonda LSI IGH/FGFR3: provável rearranjo do IGH com outro parceiro cromossômico, sem envolvimento do gene FGFR3/MMSET.

Figura 14: (A) Caso 5 - Plasmócito com rearranjo IGH/FGFR3 e cópia extra do sinal de fusão (três sinais de fusão, um sinal laranja e um sinal verde); (B) Caso 65 - Plasmócito com presença de dois sinais de fusão, três sinais verdes e dois sinais laranja na utilização da sonda LSI IGH/FGFR3: clone tetraplóide seguido de t(4;14)(p16;q34).

Figura 15 - Caso 15 - Plasmócitos com provável tetrassomia dos cromossomos 4 e 14 (sonda LSI IGH/FGFR3)

Pesquisa da del(17p13)

A pesquisa da del(17p13) em plasmócitos foi realizada com sucesso em 78 dos 84 pacientes pela técnica de FISH, sendo que em cinco (6,41%) pacientes foi detectada esta anormalidade cromossômica (Figura 16-A).

Detectou-se um (1,28%) caso com dois clones: um clone com três sinais verdes e três sinais laranja e um clone com três sinais verdes e dois sinais laranja, indicando provável trissomia do cromossomo 17 seguido de deleção da região 17p13 em um dos três cromossomos 17. Portanto, este caso foi posteriormente reclassificado como portador de del(17p13) (Figura 16-B). Dessa maneira, seis (7,69%) de 78 pacientes foram considerados portadores de del(17p13). Os diferentes padrões de sinais encontrados com a utilização da combinação de sondas LSI p53 (17p13.1) e CEP 17 (D17Z1) estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Interpretação de sinais da CEP 17 (D17Z1)/LSI p53 (17p13.1)

Número de casos	Padrão de sinais	Interpretação
5/78 (6,41%)	1 sinal laranja 2 sinais verdes	del(17p13)
1/78 (1,28%)	3 sinais laranja 3 sinais verdes	trissomia do cromossomo 17 seguido por del(17p13)
	2 sinais laranja 3 sinais verdes	
4/78 (5,12%)	4 sinais laranja 4 sinais verdes	tetrassomia do cromossomo 17
4/78 (5,12%)	4 sinais laranja 4 sinais verdes	tetrassomia do cromossomo 17 e trissomia do cromossomo 17
	3 sinais laranja 3 sinais verdes

Figura 16 - (A) Caso 72 - del(17p13); (B) Caso 50 - trissomia do cromossomo 17 seguido de del(17p13)

Considerando a associação entre as diferentes alterações cromossômicas, quatro (66,67%) dos seis pacientes com presença do rearranjo IGH/FGFR3 apresentaram del(13q14). Dois (33,33%) dos seis pacientes com del(17p13) apresentaram del(13q14) concomitante e nenhum paciente apresentou o rearranjo IGH/FGFR3 e a del(17p13) ao mesmo tempo.

5.4 - Análises dos dados obtidos através da técnica de imunofluorescência direta por citometria de fluxo (Anexo VI)

5.4.1 - Análise dos resultados da expressão de Ki-67 nos plasmócitos

A análise da expressão de Ki-67 em plasmócitos foi realizada com sucesso em 78 dos 84 pacientes do estudo. A mediana de expressão de Ki-67 nos plasmócitos foi de 3,15% com variação de 0 a 26,44% (Figuras 17 e 18).

Figura 17 - Caso 34: paciente com expressão de Ki-67 em plasmócitos de 3,04%

Figura 18 - Caso 40: paciente com expressão de Ki-67 em plasmócitos de 20,89%

5.4.2 - Análise dos resultados da marcação de plasmócitos com anexina V

A análise da marcação de plasmócitos com anexina V foi realizada com sucesso em 69 dos 84 pacientes do estudo. A mediana de marcação positiva para anexina V foi de 8,11% com variação de 0,12 a 55,04% (Figura 19). Em 23 pacientes, submetidos à marcação concomitante com o anticorpo monoclonal anti-CD38APC, foi realizada análise paralela através da identificação dos plasmócitos pelo imunofenótipo CD38++ e CD45-/+ , que foram avaliados quanto à positividade para anexina V, não havendo diferença entre as duas estratégias ($p=0,44$).

Figura 19 - Caso 55: paciente com marcação de plasmócitos com anexina V de 8,0%

5.4.3 - Análise da razão expressão de Ki-67 em plasmócitos sobre a marcação com anexina V

O cálculo da razão entre expressão de Ki-67 e marcação com anexina V (Ki67/anexina V) foi possível em 63 pacientes dos 84 pacientes do estudo, sendo a mediana de 0,32, com variação de 0 a 57,54.

5.4.4-Análise da detecção de plasmócitos circulantes por citometria de fluxo

A detecção de plasmócitos em sangue periférico por citometria de fluxo foi realizada com sucesso em 63 dos 84 pacientes do estudo. A mediana de plasmócitos circulantes foi de 6 a cada 50.000 células, com variação de 0 a 8.741 células a cada 50.000 células.

5.5 - Associações entre alterações citogenéticas e características biológicas da célula tumoral determinadas por citometria de fluxo

As anormalidades citogenéticas estudadas foram avaliadas quanto à associação com as seguintes variáveis contínuas: expressão de Ki-67, marcação com anexina V, razão Ki-67/anexina V e quantidade de plasmócitos em sangue. Não houve diferença com significância estatística entre os grupos em relação à mediana de expressão de Ki-67 em plasmócitos, marcação de plasmócitos com anexina V, razão Ki-67/anexina V e quantidade de plasmócitos em sangue (Tabela 13).

Tabela 13 - Associação entre as alterações cromossômicas e as variáveis detectadas por citometria de fluxo

	Normal	del(13q14) (sem outras alterações)	t(4;14)(p16;q32)	del(17p13)	p
	n=35	n=29	n=6	n=6	
Ki-67					
Mediana (variação)	3,11% (0-17,84%)	3,12% (0,15%-26,44%)	2,42% (0-15,65%)	4,86% (0,82%-20,89%)	0,72
Anexina V					
Mediana (variação)	6,58% (0,12-43,65%)	11,39% (0,17-55,04%)	7,17% (3,78-27,1%)	7,76% (1,01-25,21%)	0,94
Ki-67/Anexina V					
Mediana (variação)	0,23 (0-57,54)	0,58 (0,08-45,97)	0,28 (0-0,55)	1,41 (0,06-6,42)	0,57
PLSP					
Mediana (variação)	5 (0-8 741)	28 (0-1 609)	159 (6-402)	2 (0-5)	0,07

Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa entre a mediana de Ki-67 nos quatro grupos de alterações citogenéticas, foi realizado o teste de correlação de Spearman para se verificar a correlação entre porcentagem de células com del(13q14) e expressão de Ki-67 nos grupos de pacientes sem nenhuma alteração citogenética e somente com del(13q14). Observou-se que indivíduos com elevada porcentagem de plasmócitos com del(13q14), especialmente acima de 80%, apresentaram tendência a maior expressão de Ki-67 ($r=0,23$, $p=0,06$) (Figura 20).

Figura 20 - Correlação de Spearman entre porcentagem de células com del(13q14) e expressão de Ki-67

O teste de correlação de Spearman não mostrou correlação entre porcentagem de células com del(13q14) (excluindo-se casos com t(4;14)(p16;q32) ou com del(17p13)) e marcação de plasmócitos com anexina V ($r=0,05$, $p=0,69$) (Figura 21), razão Ki-67/anexina V ($r=0,19$,

$p=0,17$) (Figura 22) e quantidade de plasmócitos em sangue ($r=0,09$, $p=0,51$) (Figura 23).

Figura 21 - Correlação de Spearman entre porcentagem de células com del(13q14) e marcação com anexina V

Figura 22 - Correlação de Spearman entre porcentagem de células com del(13q14) e razão Ki-67/anexina V

Figura 23 - Correlação de Spearman entre porcentagem de células com del(13q14) e quantidade de plasmócitos em sangue

5.6 - Associação entre características clínicas e laboratoriais e as variáveis obtidas pela técnica de FISH (del(13q14), t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)) e por citometria de fluxo (Ki-67, anexina V, razão Ki-67/anexina V, plasmócitos em sangue)

Para as variáveis detectadas pela técnica de FISH, não foi observada diferença estatística entre os grupos de alterações citogenéticas em relação às características clínicas e laboratoriais estudadas (Tabela 14). Entretanto, nota-se que todos os casos com t(4;14)(p16;q32) estavam associados a estágio avançado (sistema de estadiamento Durie & Salmon e ISS) e presença de lesão óssea.

Para as variáveis obtidas por citometria de fluxo, foi encontrada associação entre expressão de Ki-67 em plasmócitos e sistema de estadiamento Durie & Salmon, DHL e PCR. Quanto à avaliação da marcação de plasmócitos com anexina V, não foi observada associação com nenhuma das características clínicas e laboratoriais. Foi encontrada associação entre maior quantidade de plasmócitos em sangue periférico e ISS e β_2 -microglobulina. E finalmente, foi observada associação entre a razão Ki-67/anexina V e o sistema de estadiamento Durie & Salmon, cálcio e PCR (Tabela 15).

Tabela 14 - Associação entre citogenética e características clínicas e laboratoriais

	Normal (A) n=35	del(13q14) (B) (sem outras alterações) n=29	t(4;14)(p16;q32) n=6	del(17p13) n=6	p
EC					
Durie Salmon					
Precoce	6 (17,65%)	3 (11,11%)	0 (0%)	1 (16,67%)	(AxB)
Avançado	28 (82,35%)	24 (88,89%)	6 (100%)	5 (83,33%)	0,72
ISS					
Precoce	18 (58,06%)	12 (48%)	0 (0%)	4 (66,67%)	(AxB)
Avançado	13 (41,94%)	13 (52%)	5 (100%)	2 (33,33%)	0,59
Lesões ósseas					
Não	4 (13,33%)	3 (13,04%)	0 (0%)	0 (0%)	(AxB)
Sim	26 (86,67%)	20 (86,96%)	4 (100%)	6 (100%)	1,0
Hemoglobina					
Mediana (variação)	9,3g/dL (5,6-13,4g/dL)	8,2g/dL (4,4-16,1g/dL)	7,5g/dL (6,8-9,0g/dL)	11,2g/dL (9,1-13,0g/dL)	0,077
Creatinina					
Mediana (variação)	1,15mg/dL (0,56-12,2mg/dL)	1,27mg/dL (0,38-15,65mg/dL)	2,06mg/dL (1,19-5,18mg/dL)	1,15mg/dL (0,7-2,36mg/dL)	0,20
Cálcio					
Mediana (variação)	9,9mg/dL (7,7-15,1mg/dL)	10,5mg/dL (8,7-13,5mg/dL)	12,2mg/dL (8,9-15,6mg/dL)	9,5mg/dL (8,8-11,3mg/dL)	0,24
Albumina					
Mediana (variação)	3,7g/dL (2,3-4,6mg/dL)	3,6g/dL (1,7-4,8mg/dL)	3,2g/dL (2,6-3,7mg/dL)	3,6g/dL (3,2-5,1mg/dL)	0,24
β₂-microglobulina					
Mediana (variação)	4,9μg/mL (1,8-23μg/mL)	5,9μg/mL (1,9-87,0μg/mL)	14,3μg/mL (7,9-18,7μg/mL)	4,2μg/mL (3,0-7,6μg/mL)	0,06
DHL					
Mediana (variação)	326U/L (135-966U/L)	347U/L (192-698U/L)	435U/L (236-599U/L)	313U/L (180-433U/L)	0,42
PCR					
Mediana (variação)	10,9mg/L (1,3-147mg/dL)	14,3mg/L (0,88-118mg/dL)	39,3mg/dL (1,02-101mg/dL)	3,89mg/L (0,57-304mg/dL)	0,44

Tabela 15 - Associação entre variáveis obtidas por citometria de fluxo e características clínicas e laboratoriais

Características clínicas e laboratoriais	Ki-67 mediana (variação)	Anexina V mediana (variação)	Ki-67/Anexina V mediana (variação)	Plasmócitos em sangue mediana (variação)
Estadio Clínico Durie & Salmon	P=0,0033	P=0,5	P=0,03	P=0,12
Precoce	1,27% (0-6,27%)	4,22% (0,25%-25,21%)	0,13 (0-0,56)	7 (0-28)
Avançado	3,63% (0-26,44%)	8,61% (0,12%-55,04%)	0,37 (0-57,54)	6 (0-8 741)
ISS	P=0,82	P=0,82	P=0,73	P=0,01
Precoce	2,66% (0-26,44%)	8,25% (0,31%-35,84%)	0,33 (0-57,54)	3 (0-1609)
Avançado	3,19% (0-24,72%)	7,27% (0,12%-55,04%)	0,28 (0-47,83)	41,5 (0-8 741)
Lesões ósseas	P=0,26	P=0,75	P=0,41	P=0,25
Não	2,68% (0-6,27%)	10,86% (1,24%-36,45%)	0,22 (0-3,84)	2 (0-457)
Sim	3,21% (0-26,44%)	8,05% (0,12%-55,04%)	0,35 (0-57,54)	6 (0-8 741)
Hemoglobina	P=0,64	P=0,13	P=0,36	P=0,61
≥10,0g/dL	2,54% (0,37%-20,89%)	6,69% (0,12%-35,84%)	0,30 (0-57,54)	5 (0-8 741)
<10,0g/dL	3,61% (0-26,44%)	9,46% (0,17%-55,04%)	0,38 (0,42-47,83)	9,5 (0-1 609)
Creatinina	P=0,88	P=0,69	P=0,8	P=0,08
<2,0mg/dL	3,15% (0-26,44%)	8,11% (0,12%-55,04%)	0,29 (0-57,54)	4,5 (0-1 609)
≥2,0mg/dL	3,13% (0-18,88%)	8,65% (0,67%-49,46%)	0,41 (0-7,02)	50 (0-8 741)

Continua

Características clínicas e laboratoriais	Ki-67 mediana (variação)	Anexina V mediana (variação)	Ki-67/Anexina V mediana (variação)	Plasmócitos em sangue mediana (variação)
Cálcio	P=0,27	P=0,47	P=0,03	P=0,09
<10,5mg/dL	3,11% (0-20,89%)	9,81% (0,12%-49,46%)	0,22 (0-57,54)	5 (0-1 609)
≥10,5mg/dL	3,63% (0,37%-26,44%)	6,69% (0,74%-27,66%)	0,86 (0,08-14,05)	11 (0-8 741)
Albumina	P=0,75	P=0,42	P=0,26	P=0,57
≥3,5g/dL	2,7% (0-26,44%)	9,96% (0,12%-55,04%)	0,22 (0-57,54)	4,5 (0-1 609)
<3,5g/dL	3,65% (0-24,72%)	5,79% (0,17%-49,46%)	0,53 (0-8,58)	6 (0-8 741)
β₂-microglobulina	P=0,62	P=0,42	P=0,41	P=0,02
<3,5μg/mL	2,23% (0,75%-26,44%)	13,08% (0,79%-35,84%)	0,24 (0,04-1,43)	3 (0-45)
≥3,5μg/mL	3,15% (0-24,72%)	7,63% (0,12%-55,04%)	0,32 (0-57,54)	9 (0-8 741)
DHL	P=0,04	P=0,22	P=0,74	P=0,5
≤480U/L	2,78% (0-24,72%)	7,63% (0,12%-55,04%)	0,31 (0-57,54)	6 (0-8 741)
>480U/L	4,97% (0,39%-26,44%)	21,46% (0,34%-29,24%)	0,57 (0,02-45,97)	177,5 (1-402)
PCR	P=0,01	P=0,51	P=0,03	P=0,64
≤3,0mg/L	2,32% (0-6,49%)	8% (1%-32,11%)	0,20 (0-6,42)	6 (0-1 424)
>3,0mg/L	4,59% (0-26,44%)	6,39% (0,12%-55,04%)	0,61 (0-47,83)	9 (0-8 741)

5.7 - Associações entre as diferentes variáveis estudadas e resposta à terapêutica, sobrevida livre de eventos e sobrevida global

A obtenção de valores de corte para as variáveis obtidas por citometria de fluxo para a análise de sobrevida global e sobrevida livre de eventos está descrita no Anexo VII.

Todos os parâmetros clínicos e laboratoriais obtidos foram avaliados quanto à resposta à terapêutica, sobrevida livre de eventos e sobrevida global. Também foi realizada a comparação entre os grupos com mais e com menos de 80% dos seus plasmócitos acometidos pela del(13q14), em relação a estes desfechos. Nenhum dos parâmetros avaliados teve impacto na taxa de resposta à terapêutica (Tabela 16).

Tabela 16 - Associação entre resposta à terapêutica e as variáveis clínicas, laboratoriais, citogenéticas e características biológicas da célula tumoral

Variável	Inferior a resposta parcial	Resposta parcial ou superior	p
ECDS			0,14
Precoce	6 (24,0%)	3 (8,33%)	
Avançado	19 (76,0%)	33 (91,67%)	
ISS	12 (50%)	18 (54,55%)	0,79
Precoce	12 (50%)	15 (45,45%)	
Avançado			
Lesão óssea			0,38
não	1 (4,3%)	5 (13,9%)	
sim	22 (95,7%)	31 (86,1%)	
Hemoglobina			0,94
Mediana (variação)	9,0 g/dL (6,1-13,9g/dL)	9,4g/dL (6,3-16,1g/dL)	
Creatinina			0,64
Mediana (variação)	1,13mg/dL (0,56-15,65mg/dL)	1,19mg/dL (0,38-7,46mg/dL)	

Variável	Inferior a resposta parcial	Resposta parcial ou superior	p
Cálcio			
Mediana (variação)	9,9mg/dL (8,6-13,0mg/dL)	9,9mg/dL (7,7-15,1mg/dL)	0,73
Albumina			
Mediana (variação)	3,7g/dL (2,3-4,8g/dL)	3,7g/dl (2,2-5,1g/dL)	0,93
β2-microglobulina			
Mediana (variação)	5,55μg/mL (1,8-87,0μg/mL)	4,9μg/mL (1,9-22,0μg/mL)	0,93
DHL			
Mediana (variação)	359U/L (170-966U/L)	311U/L (135-545U/L)	0,20
PCR			
Mediana (variação)	8,15mg/L (0,36-304,0mg/L)	10,5mg/L (0,57-118mg/L)	0,87
QTAD			
Não	24 (92,31%)	27 (72,97%)	0,1
Sim	2 (7,69%)	10 (27,03%)	
Ki-67			
Mediana (variação)	2,43% (0-26,44%)	3,19% (0,15-18,34%)	0,78
Anexina V			
Mediana (variação)	9,66% (0,31-43,65%)	7,27% (0,12-55,04%)	0,38
Razão Ki-67/Anexina V			
Mediana (variação)	0,23 (0-57,54)	0,37 (0,02-47,83)	0,21
Plasmócitos em sangue			
Mediana (variação)	6,5 (0-351)	3,5 (0-8 741)	0,65
Grupos			
Normal (A)	11 (50%)	18 (51,43%)	(AxB) 1,0
del13q14 (B)	9 (40,91%)	11 (31,43%)	
t(4;14)	1 (4,55%)	2 (5,71%)	
del17p13	1 (4,55%)	4 (11,43%)	
Grupos			
del(13q14)<80%	18 (78,26%)	30 (85,71%)	0,49
del(13q14)≥80%	5 (21,74%)	5 (14,29%)	

As características que apresentaram associação com menor sobrevida livre de eventos (SLE) foram: ISS III, presença de lesões ósseas, creatinina superior ou igual a 2mg/dL, DHL superior a 480U/L, a não realização de quimioterapia em altas doses com resgate de células tronco hematopoéticas (QTAD) e presença de t(4;14)(p16;q32) (Tabela 17). Na análise multivariada, foram incluídas apenas as variáveis com nível de significância inferior a 0,05; à análise univariada de log-rank. Foi excluído o parâmetro creatinina, por estar relacionado ao sistema de estadiamento ISS (95% dos pacientes com creatinina superior ou igual a 2mg/dL apresentaram ISS III). O único parâmetro que permaneceu como fator preditor independente foi DHL superior a 480U/L ($p=0,002$), com risco relativo de 4,41 (IC95%:1,74-11,21).

As características que apresentaram associação com menor sobrevida global (SG) foram: ISS III, hemoglobina inferior a 10,0g/dL, creatinina superior ou igual a 2mg/dL, albumina inferior a 3,5mg/dL, DHL superior a 480U/L, PCR superior a 3mg/dL, a não realização de QTAD e presença de t(4;14)(p16;q32) (Tabela 18). Na análise multivariada, foram incluídas apenas as variáveis com nível de significância inferior a 0,05; à análise univariada de log-rank. Foram excluídos os parâmetros hemoglobina inferior a 10,0g/dL, creatinina superior ou igual a 2mg/dL e albumina inferior a 3,5g/dL, por estarem relacionados ao sistema de estadiamento ISS. Os parâmetros que permaneceram como fatores preditores independentes foram: ISS III ($p=0,001$) com risco relativo de 7,25 (IC95%: 2,28-23,00), DHL superior a 480U/L ($p=0,013$), com risco relativo de 3,88 (IC95%: 1,33-11,27),

não realização de TMO ($p=0,016$), com risco relativo de 12,94 (IC95%:1,61-103,99) e presença da $t(4;14)(p16;q32)$ ($p=0,04$) com risco relativo de 5,42 (IC95%:1,03-28,48).

Tabela 17 - Associação entre características clínicas, laboratoriais, citogenéticas, por citometria de fluxo e sobrevida livre de eventos

Variável	SLE mediana (meses)	p	Variável	SLE mediana (meses)	p
ECDS Precoce Avançado	24 meses 9,7 meses	0,29	DHL ≤480U/L >480U/L	18,8 meses 2,7 meses	0,0005
ISS Precoce Avançado	20,1 meses 6,8 meses	0,031	PCR ≤3mg/L >3mg/L	23,4 meses 7,9 meses	0,06
Lesão óssea não sim	19,9 meses 13,5 meses	0,03	QTAD Sim não	36,8 meses 8,8 meses	0,04
Hemoglobina ≥10,0g/dL <10,0g/dL	18,8 meses 6,8 meses	0,13	Ki-67 ≤3% >3% e ≤9% >9%	10,3 meses NA 4,5 meses	0,43
Creatinina <2mg/dL ≥2mg/dL	18,8 meses 2,7 meses	0,025	Anexina V ≤8,11% >8,11%	18,83 meses 8,11 meses	0,65
Cálcio ≤10,5mg/dL >10,5mg/dL	10,3 meses 6,8 meses	0,84	Plasmócitos em sangue ≤10 >10/	18,8 meses 9,7 meses	0,49
β2-microglobulina <3,5μg/mL ≥3,5μg/mL	13,5 meses 12,1 meses	0,85	Grupos Normal del(13q14) t(4;14) del(17p13)	NA 23,5 meses 0,3 meses NA	0,0073
Albumina ≥3,5g/dL <3,5g/dL	19,9 meses 5,7 meses	0,17	Grupos del(13q14)<80 % del(13q14)≥80 %	18,8 meses 6,8 meses	0,4

NA= não alcançada

Tabela 18 - Associação entre características clínicas, laboratoriais, citogenéticas e obtidas por citometria de fluxo e sobrevida global

Variável	SG-meses mediana	p	Variável	SG-meses mediana	P
ECDS Precoce Avançado	NA NA	0,25	DHL ≤480U/L >480U/L	NA 4,2 meses	0,01
ISS Precoce Avançado	NA 13,7 meses	0,0006	PCR ≤3mg/dL >3mg/dL	NA 16,5 meses	0,03
Lesão óssea não sim	NA NA	0,07	QTAD Sim não	NA 23,53	0,01
Hemoglobina ≥10,0g/dL <10,0g/dL	NA 16,5 meses	0,0069	Ki-67 ≤3% >3% e ≤9% >9%	NA 21,9 meses 16,2 meses	0,36
Creatinina <2mg/dL ≥2mg/dL	NA 2,8 meses	0,0008	Anexina V ≤8,11% >8,11%	NA NA	0,77
Cálcio ≤10,5mg/dL >10,5mg/dL	NA 21,9 meses	0,19	Plasmócitos em sangue ≤10 >10/	NA NA	0,25
β2- microglobuli na <3,5μg/mL ≥3,5μg/mL	NA 23,5 meses	0,055	Grupos Normal del13q14 t(4;14) del17p13	NA 23,5 meses 0,3 meses NA	0,0045
Albumina ≥3,5g/dL <3,5g/dL	NA 13,6 meses	0,01	Grupos del(13q14)<80% del(13q14)≥80%	NA 16,1 meses	0,059

NA= não alcançada

As curvas de sobrevida livre de eventos e sobrevida global, segundo as diversas características estudadas, estão representadas nas figuras 24 a 39.

Figura 24 - curvas de sobrevida livre de eventos ($p=0,29$) e de sobrevida global ($p=0,25$) de acordo com estágio clínico Durie & Salmon

Figura 25 - curvas de sobrevida livre de eventos ($p=0,031$) e de sobrevida global ($p=0,0006$) de acordo com ISS

Figura 26 - curvas de sobrevida livre de eventos ($p=0,03$) e de sobrevida global ($p=0,07$) de acordo com ausência ou presença de lesão lítica

Figura 27 - curvas de sobrevida livre de eventos ($p=0,84$) e de sobrevida global ($p=0,19$) de acordo com nível sérico de cálcio

Figura 28 - curvas de sobrevida livre de eventos ($p=0,025$) e de sobrevida global ($p=0,0008$) de acordo com nível sérico de creatinina

Figura 29 - curvas de sobrevida livre de eventos ($p=0,13$) e de sobrevida global ($p=0,0069$) de acordo com nível de hemoglobina

Figura 30 - curvas de sobrevivida livre de eventos ($p=0,17$) e de sobrevivida global ($p=0,01$) de acordo com nível sérico de albumina

Figura 31 - curvas de sobrevivida livre de eventos ($p=0,85$) e de sobrevivida global ($p=0,055$) de acordo com nível sérico de β_2 -microglobulina

Figura 32 - curvas de sobrevivida livre de eventos ($p=0,0005$) e de sobrevivida global ($p=0,01$) de acordo com nível sérico de desidrogenase láctica

Figura 33 - curvas de sobrevida livre de eventos ($p=0,06$) e de sobrevida global ($p=0,03$) de acordo com nível sérico de proteína C reativa

Figura 34 - curvas de sobrevida livre de eventos ($p=0,04$) e de sobrevida global ($p=0,01$) de acordo com realização de QTAD

Figura 35 - curvas de sobrevida livre de eventos ($p=0,43$) e de sobrevida global ($p=0,36$) de acordo com expressão de Ki-67 em plasmócitos

Figura 36 - curvas de sobrevida livre de eventos ($p=0,65$) e de sobrevida global ($p=0,77$) de acordo com marcação de plasmócitos com anexina V

Figura 37 - curvas de sobrevida livre de eventos ($p=0,49$) e de sobrevida global ($p=0,25$) de acordo com quantidade de plasmócitos em sangue

Figura 38 - curvas de sobrevida livre de eventos ($p=0,4$) e de sobrevida global ($p=0,059$) de acordo com porcentagem de plasmócitos com del(13q14)

Figura 39 - curvas de sobrevida livre de eventos ($p=0,0073$) e de sobrevida global ($p=0,0045$) de acordo com anormalidades cromossômicas

Discussão

6. Discussão

6.1 - Características clínicas e laboratoriais dos 84 pacientes

No atual trabalho, foi proposto o estudo de alterações cromossômicas detectadas pela técnica de FISH em um grupo de portadores de MM provenientes de uma instituição pública brasileira, o HC-FMUSP. Este grupo apresentou características clínicas semelhantes às encontradas no maior estudo clínico realizado no Brasil a respeito desta doença, desenvolvido por Hungria *et al.*(2008). A mediana de idade dos pacientes deste estudo foi de 60,5 anos, enquanto a mediana de idade dos pacientes da presente tese foi de 63 anos. Nos países desenvolvidos, por sua vez, a mediana de idade é ao redor dos 70 anos (Alexander *et al*, 2007).

Esta discrepância entre pacientes brasileiros e aqueles provenientes de países desenvolvidos pode ser decorrente das condições sócio-econômicas desfavoráveis encontradas neste país, levando ao difícil acesso da população aos serviços de saúde, sendo que indivíduos mais idosos muitas vezes acabam evoluindo para o óbito antes que o diagnóstico possa ser realizado.

Em comparação com o trabalho de Hungria *et al.*(2008), o grupo estudado nesta tese apresentou maior porcentagem de pacientes com doença avançada, identificada tanto pelo sistema de estadiamento clínico Durie & Salmon quanto pelo ISS. Também houve maior prevalência de hipercalcemia (39,47% vs 23,8%). Entretanto, não houve grande diferença

entre os dois grupos em relação à presença de outras características clínicas como níveis de hemoglobina inferiores a 10,0g/dL (64,3% vs 58%), creatinina superior a 2mg/dL (28,6% vs 23%), presença de lesões ósseas (88,6% vs 85,1%) e isotipos de imunoglobulina. Além disso, nos pacientes que foram tratados, a avaliação de resposta não foi diferente do que é encontrado na literatura com as combinações de fármacos que foram utilizadas (Harousseau; 2008).

6.2 - Citogenética molecular - técnica de FISH

Desde que a primeira anormalidade citogenética foi detectada na leucemia mieloide crônica em 1960, estudos dos cromossomos têm sido realizados para a melhor compreensão da base genética da tumorigênese. Nos primeiros estudos a respeito de alterações cromossômicas do MM, células da medula óssea eram cultivadas da mesma maneira que nas leucemias, e cariótipos anormais eram obtidos, porém em uma minoria dos casos, especialmente em pacientes com doença refratária e avançada. Entretanto, o uso da citogenética convencional foi fundamental e permitiu a identificação de anormalidades cromossômicas freqüentes no MM, como a hipodiploidia e a t(11;14)(q13;q32) (Liang *et al.*, 1979).

A técnica de hibridação “*in situ*” por fluorescência (FISH) levou à união entre a citogenética convencional e a genética molecular, sendo capaz de demonstrar que praticamente todos os pacientes portadores de MM

apresentam anormalidades cromossômicas (Drach *et.al*, 1995; Zandecki *et al.*, 1996).

O estudo de alterações citogenéticas por FISH no MM é caracterizado por certas particularidades como, por exemplo, a necessidade de se analisar somente células plasmocitárias. Duas estratégias são possíveis para que esta análise seja realizada de forma correta: (1) a purificação celular através de anticorpos anti-CD138 ligados a esferas magnéticas ou (2) a técnica de clg-FISH (Braggio, Renault, 2007). Ambas as estratégias são trabalhosas e aumentam o custo da realização do FISH.

Além disso, o MM é caracterizado por heterogeneidade genética dentro do clone neoplásico, mostrando que a sequência de eventos genéticos na célula tumoral é extremamente complexa. Como observado na presente tese, além dos padrões de sinais típicos encontrados com as sondas utilizadas, como del(13q14), t(4;14)(p16;q32) e del(17p13), podem ser encontrados padrões sugestivos de outras alterações cromossômicas, o que muitas vezes dificulta a interpretação do exame.

Outro problema encontrado é a dificuldade de se obter um material ideal para ser utilizado como controle negativo, ou seja, que tenha sido submetido ao mesmo preparo que o material proveniente dos pacientes. Desta maneira, faz-se necessária a utilização de material rico em células não plasmocitárias para o estabelecimento de valores de corte das sondas a serem utilizadas. Devido a esta restrição, o *European Myeloma network* recomenda valores de corte conservadores e uniformes: 10% para sondas de dupla fusão e 20% para pesquisa de anormalidades numéricas (Fonseca

et al., 2004). No atual trabalho, foram observados, com a utilização de controles provenientes de indivíduos não portadores de doenças hematológicas, valores de corte semelhantes aos recomendados: 16% e 19% para as pesquisas de del(13q14) e del(17p13), respectivamente; e 9% para a pesquisa de t(4;14)(p16;q32).

Apesar destas dificuldades, durante as últimas duas décadas, muitas instituições têm investido na pesquisa clínica e laboratorial do MM e o estudo das anormalidades genéticas e da expressão gênica das células do MM tem sido muito importante neste processo (Gould *et al.*, 1988; Lai *et al.*, 1995; Seong *et al.*, 1998, Bergsagel, Kuehl, 2005; Hungria, Maiolino, 2007).

A comunidade científica brasileira, nos últimos anos, tem mostrado um interesse especial em conhecer melhor os pacientes portadores de MM. Entretanto, ainda sabe-se pouco a respeito das características das células tumorais dos portadores de MM no Brasil, como a prevalência das diferentes anormalidades genéticas, importantes não só para a compreensão da patogênese da doença, mas também para a estratificação prognóstica destes indivíduos (Chauffaille *et al.*, 2007; Hungria *et al.*, 2008; Segges *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009).

Neste estudo foi realizada a pesquisa de três importantes alterações cromossômicas encontradas nas células malignas do MM: a del(13q14), a t(4;14)(p16.3;q32) e a del(17p13). Nos diversos estudos já publicados, a del(13q14) está presente em 33 a 54% dos casos, quando pesquisada pela técnica de FISH (Fonseca *et al.*, 2009). A del(13q14) foi detectada, no atual grupo de pacientes, em 35 (44,3%) de 79 casos. Destes 35 pacientes, 31

apresentaram padrão compatível com del(13q14) na análise da sonda LSI 13 (RB1) 13q14, ou seja, apenas um sinal laranja. Outros quatro pacientes haviam apresentado padrão compatível com a normalidade (dois sinais laranja), no entanto, estes casos tinham um clone com tetrassomia dos cromossomos 4, 14 e 17, sendo, provavelmente, quase tetraplóides. Deveriam, portanto, apresentar quatro cópias da região 13q14. Como possuíam somente duas cópias intactas da região 13q14, foram considerados portadores de deleção de outras duas cópias desta região cromossômica, conforme é orientado pelo *European Myeloma Network* (Fonseca *et al.*, 2004).

A presença da del(13q14) não esteve associada a características clínicas e laboratoriais de mau prognóstico. Este grupo de pacientes também não apresentou pior sobrevida livre de eventos e pior sobrevida global em relação aos pacientes sem nenhuma das alterações cromossômicas estudadas. Alguns estudos avaliaram características clínicas em pacientes com del(13q14), sendo que a associação entre esta anormalidade e estágio clínico III (Durie & Salmon), presença de anemia e presença de níveis elevados de β_2 -microglobulina e de desidrogenase láctica é controversa (Zojer *et al.*;2000, Facon *et al.*;2001, Fonseca *et al.*;2002c). Sabe-se atualmente que a del(13q14), quando não associada a alterações como t(4;14)(p16;q32), a t(14;16)(q32;q23) e a del(17p13), não possui valor prognóstico importante no MM (Avet-Loiseau *et al.*, 2007b).

A t(4;14)(p16.3;q32), por sua vez, está presente em 15 a 20% dos portadores de MM (Fonseca *et al.*; 2009). No entanto, foi encontrada em

somente 7,89% dos pacientes deste estudo. Este fato pode ser uma variação decorrente da pequena quantidade de pacientes na atual casuística. Em quase todos os pacientes com $t(4;14)(p16.3;q32)$ há coexistência da $del(13q14)$ e foi postulado que, pelo menos em alguns casos, a $del(13q14)$ precede a translocação. Entretanto, também é possível que a $t(4;14)(p16.3;q32)$ seja permissiva para a perda do cromossomo 13 (Malgeri *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2002a). Neste trabalho, quatro (66,67%) dos seis pacientes com a $t(4;14)(p16.3;q32)$ apresentaram a $del(13q14)$ concomitante.

A $t(4;14)(p16;q32)$ foi associada a mau prognóstico neste estudo. A associação entre $t(4;14)(p16;q32)$ e diversas características clínicas dos pacientes foi avaliada. Pode-se verificar que estes indivíduos apresentaram características sugestivas de maior agressividade clínica em relação aos outros pacientes. Por exemplo, todos os pacientes portadores desta anormalidade cromossômica apresentaram estágio clínico Durie & Salmon III e ISS III. Além disso, a mediana de hemoglobina e de albumina foram inferiores e a mediana de creatinina, cálcio, β_2 -microglobulina e proteína C reativa foram superiores ao observado em outros grupos. No entanto, devido ao pequeno número de pacientes com esta anormalidade cromossômica, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Foi também observada uma sobrevida extremamente curta nos pacientes com $t(4;14)(p16;q32)$, sendo que dos seis pacientes com esta anormalidade cromossômica, três evoluíram para o óbito antes que qualquer tratamento fosse iniciado.

Dentre os seis casos com $t(4;14)(p16.3;q32)$, dois (casos 5 e 13) possuíam três sinais de fusão, em vez de dois sinais de fusão, o que sugere a presença de uma cópia extra da fusão IGH/MMSET(Puig *et al.*, 2009). Ambos os casos evoluíram para óbito rapidamente, antes mesmo de iniciarem tratamento.

Também foi observado que dez (13,15%) pacientes apresentaram, na análise da sonda LSI IGH/FGFR3 para a pesquisa da $t(4;14)(p16.3;q32)$, padrão mostrando três sinais verdes e dois sinais laranja, o que sugere a presença de translocação envolvendo o IgH, no cromossomo 14, com algum outro parceiro, como os cromossomos 6, 11, 16 e 20. Entretanto, este padrão não é específico para esta anormalidade, já que eventualmente um caso com trissomia do cromossomo 14 também poderia apresentar-se desta maneira. Outro aspecto relevante é que a sensibilidade desta sonda para a detecção de translocações envolvendo o IgH com outros parceiros cromossômicos é baixa, já que a perda de um cromossomo derivativo, quando ocorre este tipo de translocação, é comum, levando à presença de somente dois sinais correspondentes ao IgH. Para saber se o IgH está envolvido em alguma outra translocação que não a $t(4;14)(p16.3;q32)$, deve-se utilizar uma sonda de ruptura dirigida para esta região cromossômica (Fonseca *et al.*, 2004).

Em vários centros, quando a pesquisa de translocação envolvendo o IgH é detectada pela sonda de ruptura, as translocações $t(11;14)(q13;q32)$, $t(4;14)(p16.3;q32)$ e $t(14;16)(q32;q23)$ são posteriormente pesquisadas.

Neste trabalho, foi optado somente por realizar a pesquisa da $t(4;14)(p16.3;q32)$, pois a $t(11;14)(q13;q32)$, apesar de ocorrer em cerca de 20% dos pacientes, não confere mau prognóstico e a $t(14;16)(q32;q23)$, apesar de estar associada à evolução clínica desfavorável, ocorre em menos de 5% dos casos.

A $del(17p13)$, por sua vez, foi encontrada em 7,69% dos pacientes. A sua prevalência é de somente 5% no momento do diagnóstico (Fonseca *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005). Esta alteração cromossômica está associada a mau prognóstico. No entanto, na atual casuística, o prognóstico dos pacientes com $del(17p13)$ não foi desfavorável. Existem evidências, na literatura, de que na realidade a simples presença da $del(17p13)$ não seja tão importante para o prognóstico do MM, e sim a porcentagem de células malignas que estão acometidas pela $del(17p13)$. Em dois estudos de Avet-Loiseau *et al.* (2007; 2010), foi demonstrado que, entre portadores de $del(17p13)$, o grupo que evoluiu de maneira desfavorável foi aquele com mais de 60% de suas células acometidas por $del(17p13)$.

No atual estudo, a mediana de acometimento dos plasmócitos malignos pela $del(17p13)$ foi de 35%, sendo que somente um paciente apresentava mais de 60% das células com $del(17p13)$, o que pode explicar a evolução clínica deste grupo, semelhante aos pacientes sem nenhuma das anormalidades citogenéticas estudadas.

6.3 - Análises dos dados obtidos por citometria de fluxo

Expressão de Ki-67 em plasmócitos

O MM é um tumor caracterizado por uma taxa proliferativa baixa, sendo que geralmente menos de 1% das células malignas estão sintetizando DNA (Hallek *et al.*, 1998). No entanto, foi demonstrado que pacientes com maior fração de plasmócitos em fase S possuem menor sobrevida global. (Durie *et al.*, 1980; San Miguel *et al.*, 1995; Garcia-Sanz *et al.*, 1995; Garcia-Sanz *et al.*, 1999; Greipp, Kumar, 2005).

A determinação da expressão, em plasmócitos, do antígeno nuclear Ki-67, útil para determinar a fração de células em proliferação, tem sido realizada há cerca de 20 anos. Diversos autores observaram maior expressão de Ki-67 em plasmócitos de pacientes com características clínicas e laboratoriais sugestivas de doença agressiva e que apresentaram pior evolução clínica (Lockhorst *et al.*, 1988; Drach *et al.*, 1992; Alexandrakis *et al.* 2004a; Alexandrakis *et al.*, 2004b, Gastinne *et al.*, 2007).

No presente trabalho, pacientes classificados como estágio clínico IIB e III (Durie & Salmon), com níveis de DHL elevados e com níveis de proteína C reativa elevados apresentaram maior expressão de Ki-67 em seus plasmócitos. A expressão elevada de Ki-67 em plasmócitos de indivíduos classificados como estágio clínico avançado sugere que a maior proliferação celular leva ao aumento da massa tumoral. Já a associação com níveis de DHL elevados mostram um aumento no “turnover” celular. A proteína C

reativa reflete a atividade da Interleucina-6 (IL-6), um fator de crescimento que estimula a proliferação de plasmócitos (Kyle, 1994). Apesar de não estatisticamente significativa, neste estudo foi observada tendência à pior sobrevida global em indivíduos com expressão de Ki-67 superior a 3%.

Marcação de plasmócitos com anexina V

Apesar das evidências demonstrando que casos de MM cujos plasmócitos apresentam uma maior taxa proliferativa evoluem clinicamente pior, observa-se que, mesmo nestes casos, a maior parte das células malignas não está em proliferação. Sugere-se que o MM seja uma doença caracterizada mais pelo acúmulo de plasmócitos na medula óssea decorrente da sua resistência à apoptose do que por uma alta taxa proliferativa dos mesmos. No entanto, o processo de apoptose no MM tem sido muito pouco estudado (Oancea *et al.*, 2004).

Atualmente, a relação entre a taxa de plasmócitos em apoptose e evolução clínica dos pacientes vem sendo estudada predominantemente por um grupo de pesquisadores da República Tcheca (Minarík *et al.*, 2005; Scudla *et al.*, 2006; Minarik *et al.*, 2009). Este grupo de pesquisadores demonstrou que pacientes com altas taxas de plasmócitos em apoptose apresentam sobrevida maior que pacientes com baixas taxas de plasmócitos em apoptose.

No atual trabalho, foi estudada a taxa de plasmócitos em apoptose, através da marcação destes com anexina V, em 69 pacientes, sendo que

não houve associação entre esta e outras características clínicas e laboratoriais dos pacientes. Também não houve relação entre taxa de apoptose e sobrevida global e sobrevida livre de eventos. Este resultado difere dos encontrados na literatura. Não há explicação para este achado, já que a técnica utilizada para a detecção de plasmócitos em apoptose foi semelhante àquela que vem sendo utilizada pelo grupo de Minarik *et al.* (2005).

O efeito da apoptose na evolução clínica do MM deveria ser estudado com maior frequência, principalmente com a utilização de mais de um método laboratorial. Uma opção seria utilizar concomitantemente à anexina V corantes como o iodeto de propídio (PI). O PI é um corante não vital e cora células apoptóticas somente após o dano da membrana plasmática; ou seja, não é capaz de identificar células nas fases iniciais da apoptose (Koopman *et al.*, 1994). A associação da anexina V com PI ajudaria a diferenciar células apoptóticas (que seriam positivas para a Anexina V e negativas para o PI) de células necróticas (que seriam positivas para a Anexina V e para o PI).

Outra opção seria realizar ensaios com substâncias como o substrato esterase não fluorescente denominado fluoresceína diacetato (FDA). Este substrato, após ser absorvido por células vivas, é hidrolisado por esterases intracelulares que estão presentes em todos os tipos celulares. O produto da hidrólise, fluoresceína, é altamente fluorescente. Neste caso; ao contrário do que ocorre com o PI, que identifica as células mortas, há a marcação fluorescente das células vivas (Darzynkiewicz *et al.*, 1994).

Neste trabalho foi optado por não se utilizar o PI, devido ao uso do anticorpo monoclonal anti-CD138 marcado com o fluorocromo ficoeritrina. As fluorescências emitidas pela ficoeritrina e pelo iodeto de propídio são detectadas pelo mesmo canal, impossibilitando seu uso concomitante.

Uma alternativa seria a utilização do anticorpo anti-CD138 ligado a outro fluorocromo, por exemplo o fluorocromo ficoeritrina-cianina 5 (PC5) ou alofco-cianina (APC), para que fosse possível a utilização do PI. Também seria interessante, em vez de utilizar a combinação de anticorpos anti-CD45 e anti-CD138 para a identificação dos plasmócitos, utilizar a combinação anti-CD38 e anti-CD138, mais confiável e atualmente utilizada pelos diversos centros de pesquisa (Mateo *et al.*, 2008).

Entretanto, a identificação correta dos plasmócitos neste trabalho provavelmente não foi o fator limitante para a determinação da fracção de plasmócitos em apoptose, já que em 23 casos foi realizada a identificação destes pela combinação de anticorpos anti-CD138 e anti-CD45, e posteriormente com a combinação de anticorpos anti-CD38 e anti-CD45, sendo os resultados praticamente idênticos.

Quando foi realizado o cálculo da razão entre expressão de Ki-67 em plasmócitos e a marcação destes com anexina V, foi possível observar que pacientes com características de mau prognóstico, como hipercalcemia, estágio clínico Durie & Salmon avançado (IIB, IIIA e IIIB) e proteína C reativa elevada, apresentaram esta razão aumentada em relação aos pacientes sem estas características.

Quantificação de plasmócitos circulantes

Neste trabalho, foi realizada também a detecção e quantificação de plasmócitos em sangue periférico. Esta característica tem mostrado ser um fator prognóstico interessante, pois a técnica de detecção e quantificação de plasmócitos em sangue por citometria de fluxo é fácil e pode ser rapidamente realizada. Este fator prognóstico parece não depender da carga tumoral dos pacientes e representa alterações na adesão entre células e entre células e o estroma (Witzig *et al.*, 1996a; Nowakowski *et al.*, 2005 ; Dingli *et al.*, 2006).

Em estudo de Nowakowski *et al.* (2005), foi determinado como ponto de corte para pior sobrevida global a presença de mais de dez plasmócitos para cada 50.000 células. No estudo de Dingli *et al.* (2006), por sua vez, a presença de qualquer quantidade de plasmócitos em sangue para cada 50.000 células no momento da coleta de células tronco hematopoéticas para a realização de transplante de medula óssea, foi preditora de pior sobrevida global após o procedimento. No atual trabalho, foi verificado que indivíduos com número de plasmócitos em sangue igual ou superior a 10 para cada 50.000 células apresentaram pior sobrevida global, porém sem significância estatística. Observou-se também que indivíduos classificados como ISS III possuem maior quantidade de plasmócitos em sangue. No estudo de Nowakowski *et al.* (2005), o risco relativo da presença de plasmócitos circulantes superior a 10 para cada 50.000 eventos, em análise univariada, foi somente de 1,57 (IC95%: 1,14-1,57). Na atual tese, o tamanho do grupo

de pacientes estudado foi insuficiente para detectar um risco relativo pequeno como este.

6.4- Associação entre alterações citogenéticas e características biológicas da célula tumoral determinadas por citometria de fluxo

O principal objetivo deste estudo foi determinar se há associação entre as principais alterações citogenéticas encontradas no MM e características biológicas dos plasmócitos malignos, como a taxa proliferativa, a taxa de apoptose e independência do microambiente medular determinada indiretamente pela quantificação de plasmócitos em sangue periférico.

A associação entre del(13q14) e a taxa proliferativa dos plasmócitos tem sido estudada por alguns pesquisadores, entretanto a relação entre esta alteração citogenética e a taxa de plasmócitos em apoptose, além da independência dos mesmos em relação ao microambiente medular, não foram avaliadas.

Em 2000, um trabalho foi publicado por Zojer *et al.*, que realizaram a marcação imunocitoquímica de plasmócitos para avaliação da expressão de Ki-67 em 74 portadores de MM recém diagnosticado. A porcentagem de positividade para Ki-67 variou de 2 a 33% (mediana 19%). Em 34 pacientes com del(13q14) detectado por FISH, a expressão de Ki-67 foi mais alta (média 22% $\pm$ 6,9%; IC 95% 19,6%-24,4%) do que em pacientes sem del(13q14) (média 15,6% $\pm$ 8,2%, IC 12,6%-17,7%, $p=0,0008$).

Em estudo de Gutierrez *et al* (2000) foi observado que pacientes com monossomia do cromossomo 13, detectada pela citogenética convencional, apresentaram uma maior porcentagem de células plasmocitárias em fase S, determinada por citometria de fluxo. No entanto, neste estudo não foi determinada a prevalência de del(13q14) pelo FISH e, portanto, não é possível concluir que todo o grupo de pacientes com esta alteração cromossômica apresenta maior taxa de proliferação em seus plasmócitos uma vez que o FISH é mais sensível do que a citogenética convencional para a sua detecção. Em outro estudo em que a del(13q14) foi detectada através de técnica de FISH, houve correlação entre esta anormalidade e a porcentagem de plasmócitos em fase S, demonstrando que provavelmente plasmócitos com del(13q14) apresentam maior taxa proliferativa (Fonseca *et al.*, 2002c).

No entanto, em trabalho mais recente, foi observado que pacientes com elevados níveis de Ki-67 possuíam cariótipo anormal com maior frequência, havendo uma associação forte com hipodiploidia. Neste trabalho, 128 pacientes foram submetidos a estudo de FISH para detecção de del(13q14), não havendo associação entre esta anormalidade e expressão de Ki-67 (Gastinne *et al.*, 2007).

Foi observado, na presente tese, que indivíduos com del(13q14) não apresentaram mediana de expressão de Ki-67 em plasmócitos superior a pacientes sem esta anormalidade cromossômica. No entanto, os pacientes apresentaram tendência a correlação positiva entre os níveis de expressão de Ki-67 e o número de células com del(13q14), principalmente nos casos

em que o acometimento pela del(13q14) ocorria em mais de 80% das células tumorais. Este fenômeno foi observado quando foram excluídos da análise pacientes com a presença de outras anormalidades cromossômicas, como a t(4;14)(p16;q32) e a del(17p13). Estes dados favorecem a hipótese de que esta alteração cromossômica seja um pré-requisito para a expansão tumoral (Fonseca *et al.*, 2009). Outra hipótese que poderia explicar esta correlação é a de que a elevada expressão de Ki-67 em plasmócitos acarreta em expansão do clone com del(13q14).

Não houve diferença na mediana de plasmócitos em apoptose entre os grupos com e sem del(13q14). Esta associação nunca foi estudada antes e seria interessante estudar a apoptose nestes indivíduos com a utilização de outros métodos laboratoriais e com maior número de pacientes. Pelos atuais resultados, o controle da apoptose celular no MM parece não estar relacionado à presença da del(13q14).

Também não foi observada diferença estatisticamente significativa na quantidade de plasmócitos em sangue entre os grupos de pacientes com e sem del(13q14). Entretanto, houve tendência à presença de maior quantidade de plasmócitos em sangue em indivíduos com del(13q14). Esta correlação também nunca foi antes estudada e seria interessante saber se a proliferação de células com del(13q14) independe de sua relação como o microambiente medular.

Em relação às alterações cromossômicas t(4;14)(p16;q32) e del(17p13), não foi possível observar associação com nenhuma das características estudadas por citometria de fluxo. Isto provavelmente é

devido à quantidade muito pequena de pacientes com estas alterações no atual estudo.

6.5 - Associação entre as variáveis estudadas e resposta ao tratamento, sobrevida livre de eventos e sobrevida global.

Foi observada, neste trabalho, associação entre DHL elevada e pior sobrevida livre de eventos e sobrevida global. Em um estudo realizado com 391 pacientes, 11% apresentaram níveis elevados de DHL. Isto estava associado à doença extra-óssea, elevada massa tumoral e pior resposta à terapia, resultando em mediana de sobrevida de nove meses (Dimopoulos *et al.*; 1991). Em nossa casuística, 12,82% dos pacientes apresentaram níveis elevados de DHL, sendo que a mediana de sobrevida destes pacientes foi de 4,2 meses. A DHL parece ser um excelente preditor de sobrevida. Entretanto, DHL elevada só está presente em cerca de 10 a 15% dos pacientes e muitos pacientes com DHL normal também apresentam evolução clínica desfavorável.

A ausência de lesões ósseas, por sua vez, esteve associada à melhor sobrevida livre de eventos. Neste trabalho, somente 11,43% dos pacientes adequadamente avaliados para esta característica não apresentaram lesões ósseas. Parece que este grupo caracteriza-se por uma evolução clínica excelente. No entanto, trata-se de um grupo extremamente pequeno de pacientes. Além disso, tanto a avaliação por radiografia de esqueleto a respeito da presença de lesões líticas quanto a determinação da extensão

destas lesões, muitas vezes podem ser comprometidas por subjetividade excessiva (Greipp *et al.*; 2005).

Esta duas variáveis, apesar de se relacionarem com a evolução clínica dos pacientes, identificam somente pacientes que se apresentam com prognóstico muito ruim, no caso de DHL elevada, ou muito bom, no caso da ausência de lesões ósseas. A maioria dos pacientes não se encontra em nenhum destes grupos, apresentando lesões ósseas e DHL com valor normal.

A característica creatinina elevada ($\geq 2\text{mg/dL}$) esteve associada tanto à pior sobrevida global quanto à pior sobrevida livre de eventos. Esta característica esteve presente em quase 30% dos pacientes deste trabalho. Destes, 38% evoluíram para óbito precoce, ou seja, não houve tempo de serem tratados. Dos pacientes com creatinina inferior a 2mg/dL , somente 3% apresentaram óbito precoce. Isto reflete a dificuldade no manejo clínico dos indivíduos com insuficiência renal, muitas vezes dando entrada nos serviços de saúde já necessitando de diálise.

Outros fatores que se correlacionaram com pior sobrevida global foram: ISS III, presença de hemoglobina inferior a $10,0\text{g/dL}$ e proteína C reativa elevada. O ISS reflete tanto massa tumoral quanto função renal, a hemoglobina baixa reflete a massa tumoral elevada, enquanto a proteína C reativa elevada reflete a atividade da Interleucina-6 (IL-6), um fator de crescimento que estimula a proliferação de plasmócitos (Kyle, 1994). A associação entre todas estas características e pior evolução clínica é previsível e esperada.

Na análise multivariada o sistema de estadiamento ISS, a presença de níveis elevados de DHL, a não realização de quimioterapia em altas doses com resgate de células tronco hematopoéticas e a presença da $t(4;14)(p16;q32)$ associaram-se à pior sobrevida global.

Foi observado que, dos 84 pacientes do estudo, 47 (56%) possuíam idade inferior a 65 anos, sendo candidatos a quimioterapia em altas doses com resgate de células tronco hematopoéticas. Destes 47 pacientes, oito evoluíram para óbito precoce. Dos 39 pacientes restantes, somente 12 (30,8%) foram submetidos à QTAD. Infelizmente, não foi possível analisar se a realização da QTAD leva à neutralização dos outros fatores de mau prognóstico, devido à pequena quantidade de pacientes submetidos a este tratamento.

A $t(4;14)(p16;q32)$, apesar de ser encontrada em somente 7,89% dos pacientes, mostrou-se de prognóstico extremamente desfavorável, ao contrário da $del(17p13)$, que não se mostrou, neste trabalho, capaz de estratificar os pacientes de acordo com sua evolução clínica.

A $del(13q14)$, quando na ausência da $t(4;14)(p16;q32)$ e da $del(17p13)$, não foi importante para determinar o prognóstico da doença, como esperado. Entretanto, foi observado que os indivíduos com mais de 80% de seus plasmócitos acometidos pela $del(13q14)$ apresentaram tendência a maior proliferação celular (medida pela expressão de Ki-67) e pior sobrevida global, com significância estatística limítrofe na análise univariada. Em trabalho de Avet Loiseau *et al.* (2007), foi observado que indivíduos com mais de 76% de seus plasmócitos acometidos pela

del(13q14) apresentaram menor sobrevida global em relação aos pacientes com menos de 76% de seus plasmócitos acometidos pela del(13q14).

Estes dados sugerem que a del(13q14), quando presente na maioria das células tumorais, possa ter valor prognóstico. No caso da del(17p13), mais do que a sua presença, o grau de acometimento dos plasmócitos parece ser muito importante para a estratificação de risco dos pacientes.

Conclusões

7. Conclusões

(1) A prevalência da del(13q14) foi de 44,3% e da del(17p13) foi de 7,69%, no momento do diagnóstico, semelhante ao descrito na literatura médica. A prevalência t(4;14)(p16;q32) foi de 7,89% no momento do diagnóstico, inferior ao descrito em outros estudos, o que pode ser explicado por variação decorrente do pequeno número de pacientes estudados;

(2) A mediana de expressão de Ki-67 em plasmócitos, por citometria de fluxo, foi de 3,15%, com variação de 0 a 26,44%. A presença de estágio clínico Durie & Salmon avançado (IIB e III) ($p=0,0033$), níveis séricos de desidrogenase láctica ($p=0,04$) e de proteína C reativa ($p=0,01$) elevados associaram-se à maior expressão de Ki-67;

(3) A mediana de plasmócitos em apoptose, medida pela marcação com anexina V, por citometria de fluxo, foi de 8,11%, com variação de 0,12% a 55,04%. Não foi observada associação entre nenhuma das características clínicas e laboratoriais estudadas e apoptose celular;

(4) A mediana da razão entre expressão de Ki-67 e marcação com anexina V foi de 0,32, com variação de 0 a 57,54. A presença de estágio clínico Durie & Salmon avançado (IIB e III) ($p=0,03$), níveis séricos de

proteína C reativa ($p=0,03$) e de cálcio ($p=0,03$) elevados associaram-se à maior razão Ki-67/anexina V;

(5) A mediana de plasmócitos em sangue foi de 6 a cada 50.000 células, com variação de 0 a 8.741 células. A presença de estágio clínico ISS III ($p=0,01$) e níveis séricos de β_2 -microglobulina ($p=0,02$) associaram-se à maior quantidade de plasmócitos em sangue;

(6) Foi observada tendência à correlação entre expressão de Ki-67 e acometimento de células pela del(13q14) ($p=0,06$);

(7) Nenhuma das características estudadas associou-se à resposta à terapêutica;

(8) Em análise univariada a presença de ISS III ($p=0,031$), lesões ósseas ($p=0,03$), creatinina superior ou igual a 2mg/dL ($p=0,025$), níveis séricos de desidrogenase láctica elevados ($p=0,0005$), terapia convencional (sem realização de quimioterapia em altas doses com resgate de células tronco hematopoéticas) ($p=0,04$) e t(4;14)(p16;q32) ($p=0,0073$) associaram-se à pior sobrevida livre de eventos. Em análise multivariada, somente a presença de níveis séricos de desidrogenase láctica elevados permaneceu como fator de risco independente para a pior sobrevida livre de eventos;

(9) Em análise univariada a presença de ISS III ($p=0,0006$), hemoglobina inferior a 10g/dL ($p=0,0069$), creatinina superior ou igual a 2mg/dL ($p=0,0008$), albumina inferior a 3,5g/dL ($p=0,01$), nível de desidrogenase láctica elevado ($p=0,01$), proteína C reativa elevada ($p=0,03$), terapia convencional ($p=0,01$) e $t(4;14)(p16;q32)$ ($p=0,0045$) associaram-se à pior sobrevida global. Em análise multivariada a presença de ISS III, nível sérico de desidrogenase láctica elevado, terapia convencional e $t(4;14)(p16;q32)$ permaneceram como fatores de risco independentes para pior sobrevida global.

Anexos

Anexo I

Tabela 19-Valores de corte das sondas LSI 13 (RB1) 13q14, LSI IGH/FGFR3 Dual Color Dual Fusion e CEP 17 (D17Z1)/LSI p53 (17p13.1)

LSI 13 (RB1) 13q14		LSI IGH/FGFR3		CEP 17 (D17Z1)/LSI p53 (17p13.1)	
sinais	Valor de corte	sinais	Valor de corte	sinais	Valor de corte
1 sinal laranja	16%	2 sinais de fusão, 1 sinal verde e 1 sinal laranja	9%	2 sinais verdes e 1 sinal laranja	19%
monossomia 13 ou del(13q14)		t(4;14)(p16;q32)		del(17p13)	
3 sinais laranja	12%	2 sinais de fusão, 3 sinais verdes e 3 sinais laranja	3%	3 sinais verdes e 3 sinais laranja	5%
trissomia 13		tetrassomia 4 e 14 seguido por t(4;14)(p16;q32)		trissomia 17	
4 sinais laranja	3%	3 sinais de fusão, 1 sinal verde e 1 sinal laranja	3%	4 sinais verdes e 4 sinais laranja	7%
tetrassomia 13		t(4;14)(p16;q32) com amplificação do sinal de fusão		tetrassomia 17	
		3 sinais verdes e 2 sinais laranja	10%	3 sinais verdes e 2 sinais laranja	9%
		trissomia 14 ou rearranjo IGH		trissomia 17 seguido por del(17p13)	
		2 sinais verdes e 3 sinais laranja	6%		
		trissomia 4			
		1 sinal verde e 1 sinal laranja	6%		
		monossomia 4 e 14			
		1 sinal verde e 3 sinais laranja	3%		
		trissomia 4 e monossomia 14			
		1 sinal verde e 2 sinais laranja	12%		
		monossomia 14			
		3 sinais verdes e 3 sinais laranja	5%		
		trissomia 4 e 14			

continua

LSI 13 (RB1) 13q14	Valor de corte	LSI IGH/FGFR3	Valor de corte	CEP 17 (D17Z1)/LSI p53 (17p13.1)	Valor de corte
sinais		sinais		sinais	
		4 sinais verdes e 4 sinais laranja	3%		
		tetrassomia 4 e 14			
		6 sinais verdes e 4 sinais laranja	3%		
		Rearranjo IGH e tetrassomia cromossomos 4 e 14			

Anexo II Tabela 20 - Dados clínicos e laboratoriais no momento do diagnóstico

Paciente	Sexo	Idade	EC DS	ISS	Paraproteína	Lesão lítica	Calcio (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Hemoglobina (g/dL)	Albumina (g/dL)	$\beta 2$ microglobulina ($\mu\text{g/mL}$)	DHL (U/L)	PCR (mg/L)
1	F	63	IIIA	II	IgG Kappa	sim	8,6	0,8	12,1	3,2	2,9	...	...
2	M	78	IIIA	III	kappa livre	sim	11,8	1,42	6,1	3,2	7,6	459	...
3	F	58	IIA	II	IgG Kappa	não	8,9	1,27	9,5	4,2	5,4	313	...
4	M	46	IIIB	III	não secretor	sim	14,4	7,46	12,7	3,3	15,6	361	35,7
5	F	73	IIIB	III	IgA Kappa	sim	13,3	2,47	7,5	2,7	18,7	561	33,3
6	F	50	IIIB	III	kappa livre	sim	11,9	13,57	7,1	2,8	40,9	554	74,9
7	F	67	IIIB	III	lambda	sim	11,3	6,57	7,3	2,9	17,9	389	...
8	F	70	IIIA	II	...	sim	7,9	0,59	6,9	4	4,4	392	3,41
9	M	62	...		IgA lambda	...	9,6	1,59	11,3	2,4	...	...	92,7
10	M	55	IIIB		IgG lambda	...	7,9	4,2	5,1	3,2	...	310	103
11	M	50	IIIB	III	IgG Kappa	sim	11,7	6,77	5,6	3,3	23	229	1,93
12	M	63	IIIA		IgA Kappa	sim	13,8	1,88	10,2	3,7	...	...	11,3
13	F	71	...	III	...	...	10,7	3,01	9	2,6	17	435	...
14	M	51	IIIB	III	IgA Kappa	sim	10,5	2,29	6,5	4,1	6,1	697	5,57
15	F	75	IIIB	III	IgG lambda	...	10,6	15,65	7,2	3,4	87	294	31,2
16	M	36	IIIB	III	IgG lambda	...	...	8,82	6,5	4,2	68	380	0,88
17	F	50	IIIA	III	IgG Kappa	...	9,7	1,17	7,3	4,2	6,9	312	414
18	F	57	IIIA	I	IgA lambda	sim	8,3	0,83	13,4	3,6	2,4	261	2,83
19	F	75	IIA	III	IgG lambda	sim	9,1	1,82	9,8	2,9	5,7	378	19,3
20	M	72	IIIA	II	lambda livre	sim	...	0,91	12,4	4,2	3,9	262	15,6
21	F	68	IIIA		não secretor	sim	9,1	0,38	10,8	2,2	...	347	4,42

Paciente	Sexo	Idade	EC DS	ISS	Paraproteína	Lesão lítica	Calcio (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Hemoglobina (g/dL)	Albumina (g/dL)	β2 microglobulina (μg/mL)	DHL (U/L)	PCR (mg/L)
22	M	65	IIIA	III	IgG Kappa	sim	...	0,94	6,3	3,8	8,7	277	14,3
23	M	63	IA	II	IgG lambda	sim	10,6	1,07	11,2	3,4	3,3	366	1,67
24	F	67	IIIA	II	IgG Kappa	sim	7,8	0,77	10,6	2,3	2,8	309	9,71
25	F	51	IIIA	I	IgG Kappa	sim	8,4	0,9	10,3	4,2	1,9	361	...
26	M	65	...	I	IgG Kappa	sim	10	0,76	12,7	4	1,9	314	...
27	F	86	IIIA	I	IgG Kappa	sim	9,4	0,88	7,9	3,8	3,3	293	0,96
28	M	73	IIIA	II	IgG lambda	sim	11,1	0,98	7,8	2,9	4,2	306	1,93
29	M	65	IIIB	III	kappa livre	sim	11	4,41	8,2	4,2	9,2	392	1,36
30	M	66	IIIA	...	IgG Kappa	sim	9,9	0,9	7,5	4	...	531	...
31	M	93	IIA	II	IgG Kappa	não	9,1	1,3	9	3,8	5,4	320	1,3
32	M	50	IIIB	III	IgG Kappa	sim	12,6	2,85	8	4	16,6	545	28,2
33	F	61	IIIA	...	IgG lambda	sim	9	1,2	7	3,3	...	266	14,2
34	F	60	IIIB	III	IgG Kappa	não	8,5	7,28	7,8	3,8	22	332	...
35	F	79	IIIA	III	IgG lambda	sim	8,9	1,19	8,1	4,3	9,1	237	0,36
36	F	43	IIIB	III	IgG Kappa	sim	...	2,36	9,1	3,8	5,7	226	5,13
37	F	79	IIIA	II	kappa livre	sim	12,1	1,08	11,6	3,6	4,9	358	27,5
38	F	57	IIIB	III	IgA Kappa	...	9,9	3,42	6,1	3,6	10,8	235	10,1
39	M	54	IIIA	I	IgG Kappa	sim	10,6	1,13	10,9	3,9	2,2	282	...
40	M	49	IIIA	II	IgG Kappa	sim	8,1	1,11	11	3,3	4,5	381	304
41	M	67	IIIA	III	IgA Kappa	...	10,9	0,93	8,2	2,3	6,1	256	...
42	M	64	IA	II	IgG Kappa	sim	8,9	1,26	12,6	4,1	4,2	245	3,23
43	M	56	IIA	II	IgG Kappa	sim	8,7	0,64	10,8	2,88	1,8	359	147
44	M	70	IIIB	III	IgG Kappa	não	8,8	2,64	7,8	4,2	10,7	333	1,62

Paciente	Sexo	Idade	EC DS	ISS	Paraproteína	Lesão lítica	Calcio (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Hemoglobina (g/dL)	Albumina (g/dL)	β2 microglobulina (μg/mL)	DHL (U/L)	PCR (mg/L)
45	M	68	IIIA	II	não secretor	sim	9	0,88	9,4	4,3	3,7	268	...
46	F	59	IIIA	II	IgG lambda	sim	8,9	0,9	11,9	3,4	3,4	360	1,85
47	F	61	IIA	I	IgG Kappa	não	10,9	1,33	9,3	4	3,4	299	4,68
48	M	72	IIIB	III	IgA lambda	...	8,8	6,6	8	2,8	49	406	25,4
49	M	52	IIIA	II	IgG Kappa	sim	9	1	11,5	4,5	3,7	206	6,88
50	M	76	IIA	I	IgA Kappa	sim	9,1	1,35	13	4,1	3	433	6,82
51	F	49	IIIA	II	IgG lambda	sim	8,4	1,34	7,7	1,7	3,9	698	1,87
52	M	57	IIIA	III	IgG Kappa	sim	7,2	1,4	7,4	3,5	5,5	465	37
53	F	56	IIIA	III	IgA Kappa	sim	8,5	1,38	7,2	3,6	7,9	...	101
54	F	66	IIIA	III	IgG lambda	...	8,3	1,15	9	3,7	9,3	377	5,8
55	M	54	IIIA	III	IgA Kappa	sim	12	1,65	6,8	3,7	14,3	236	1,02
56	M	45	IIIB	III	IgG Kappa	...	10,1	12,2	6,5	3,3	13,1	320	125
57	M	68	IIA	I	IgG Kappa	sim	...	1	11,6	4,6	2,4	362	...
58	M	61	IIIA	II	IgG Kappa	sim	...	0,8	11,1	2,3	1,9	...	...
59	F	59	...	I	IgG lambda	...	10,5	1,03	11,9	3,7	3,3	433	6,38
60	F	80	IIA	II	IgG Kappa	não	8,7	1,2	9,7	4,2	3,7	257	1,37
61	F	80	IIIB	...	IgG Kappa	sim	9,5	2,65	8,2	3,6	...	170	33,2
62	F	79	IIA	III	IgG Kappa	sim	9,1	0,96	9	3,8	8,7	342	2,17
63	M	74	IIIA	I	IgG Kappa	sim	12,7	0,94	9,2	3,7	3,2	515	23,4
64	M	52	IIIB	III	lambda livre	sim	9,5	2,12	7,5	3,6	11,5	399	84,2
65	F	62	IIIA	III	IgG lambda	sim	9,2	1,19	7,6	3,2	10,5	271	39,3
66	M	71	IIIA	II	IgA Kappa	sim	9,9	1,5	9,6	4	4	208	78
67	F	72	IIIA	II	IgA Kappa	sim	10,5	0,7	11,4	3,2	4	266	2,66

Paciente	Sexo	Idade	EC DS	ISS	Paraproteína	Lesão lítica	Calcio (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Hemoglobina (g/dL)	Albumina (g/dL)	β2 microglobulina (µg/mL)	DHL (U/L)	PCR (mg/L)
68	F	76	IIIA	II	IgG Kappa	...	...	0,79	7,9	2,9	4,9	448	...
69	M	68	IIIA	III	IgG Kappa	sim	9,3	0,94	7,5	3,4	6,7	966	10,5
70	F	59	IIIB	...	lambda livre	sim	12,7	3,27	4,4	3,2	...	400	47,7
71	F	48	IIIB	III	IgG Kappa	sim	13,6	2,01	7,5	3,2	8,5	403	84,5
72	M	56	IIIA	III	IgG lambda	sim	10,2	1,19	9,3	5,1	7,6	180	0,57
73	F	73	IIIA	III	IgG Kappa	não	8,5	1,11	7,1	2,6	7,4	135	49,5
74	F	62	IIIA	II	IgA lambda	sim	12,4	0,61	10,6	3,8	4,9	295	13,6
75	M	61	IIIA	III	IgG Kappa	sim	10,9	1,89	16,1	3,7	5,9	365	...
76	F	77	IIIA	III	IgG Kappa	sim		1,4	8,5	2,7	11,6	...	...
77	M	62	IIIA	II	lambda livre	sim	10	1,1	13,9	4,8	4,4	508	3,1
78	F	75	IA	II	IgA Kappa	não	8,9	1,16	13,1	4,2	3,5	192	2,7
79	M	54	IIIA	II	IgA lambda	sim	8,5	0,56	7,9	3,7	3,9	388	...
80	M	80	IIIA	...	IgG lambda	sim	9,7	1,16	10,1	4,1	...	298	...
81	F	56	IIIA	...	lambda livre		14,9	5,18	8	3,3	...	599	41,9
82	M	71	IIIA	II	IgG Kappa	sim	8,2	1,26	7,8	3,2	2,7	345	118
83	M	73	IIIB	II	IgG lambda	sim	9,1	2,38	12,1	4,1	4,4	253	...
84	F	60	IIIA	III	IgG Kappa	sim	9,4	0,96	11,2	3,5	8	405	112

Anexo III

Tabela 21-Evolução clínica dos pacientes

Paciente	diagnóstico	início do tratamento	QTAD	resposta	progressão	óbito	data do último registro
1	15/2/2007	...	...	...	...	não	26/3/2007
2	26/4/2007	14/5/2007	não	Doença estável	11/2/2008	sim	11/6/2008
3	26/4/2007	14/5/2007	sim	Resposta completa	...	não	23/4/2010
4	23/5/2007	31/5/2007	sim	Resposta completa	1/6/2010	não	28/6/2010
5	29/5/2007	...	...	...	...	sim	2/6/2007
6	22/5/2007	...	...	...	...	sim	2/7/2007
7	25/6/2007	30/6/2007	não	Progressão	10/12/2007	não	17/5/2010
8	5/7/2007	3/9/2007	não	não avaliável	...	não	17/12/2007
9	16/7/2007	...	...	...	...	não	18/7/2007
10	20/7/2007	...	...	...	...	sim	15/8/2007
11	25/7/2007	25/7/2007	não	não avaliável	...	sim	19/10/2007
12	30/7/2007	3/8/2007	não	Resposta parcial	12/12/2007	sim	18/5/2009
13	31/8/2007	...	...	...	...	sim	9/9/2007
14	14/9/2007	18/9/2007	sim	Progressão	3/12/2007	sim	11/1/2009
15	17/9/2007	20/9/2007	não	Doença estável	...	sim	22/2/2008
16	26/9/2007	26/9/2007	não	não avaliável	...	sim	25/2/2008
17	1/10/2007	...	...	...	...	sim	22/10/2007
18	8/10/2007	5/11/2007	não	Doença estável	3/6/2009	não	1/2/2010
19	24/9/2007	17/12/2007	não	Doença estável	...	sim	19/5/2008
20	5/12/2007	6/12/2007	não	Doença estável	25/3/2009	não	23/4/2010
21	19/12/2007	18/2/2008	não	Resposta completa	...	não	26/4/2010

Paciente	diagnóstico	início do tratamento	QTAD	resposta	progressão	óbito	data do último registro
22	16/1/2008	17/1/2008	não	Resposta parcial	...	sim	22/12/2009
23	15/2/2008	20/2/2008	não	Resposta completa	4/2/2010	não	14/6/2010
24	30/1/2008	3/2/2008	sim	Resposta parcial	17/8/2009	não	22/2/2010
25	28/1/2008	25/2/2008	sim	resposta parcial muito boa	9/3/2009	não	16/3/2010
26	13/2/2008	13/2/2008	sim	Progressão	19/12/2008	não	21/6/2010
27	21/2/2008	17/3/2008	não	Resposta parcial	...	sim	14/4/2008
28	19/3/2008	25/3/2008	não	Resposta parcial	...	não	5/4/2010
29	20/3/2008	24/3/2008	não	Doença estável	19/2/2010	não	19/4/2010
30	22/4/2008	22/4/2008	não	Resposta parcial	20/10/2008	não	5/4/2010
31	17/4/2008	23/6/2008	não	Doença estavel	...	não	12/2/2009
32	22/4/2008	26/4/2008	não	Resposta parcial	...	sim	14/7/2008
33	9/6/2008	16/6/2008	sim	Resposta parcial	...	não	26/4/2010
34	19/6/2008	4/8/2008	não	Resposta parcial	8/2/2010	não	14/6/2010
35	23/6/2008	23/6/2008	não	Doença estavel	...	não	9/2/2009
36	30/6/2008	30/6/2008	sim	Resposta completa	...	não	5/4/2010
37	2/7/2008	2/7/2008	não	Resposta completa	...	não	3/5/2010
38	10/7/2008	...	...	...	...	sim	21/7/2008
39	14/7/2008	14/7/2008	sim	Resposta completa	...	não	11/6/2010
40	23/7/2008	24/7/2008	não	Doença estavel	...	não	28/6/2010
41	24/7/2008	4/8/2008	não	Doença estavel	13/2/2009	sim	6/9/2009
42	28/7/2008	28/7/2008	não	Doença estável	26/1/2009	não	21/6/2010
43	30/7/2008	21/7/2008	não	Doença estável	11/5/2009	não	5/4/2010
44	18/8/2008	18/8/2008	não	Resposta parcial muito boa	...	não	8/3/2010
45	22/9/2008	22/9/2008	não	Resposta completa	...	não	5/4/2010

Paciente	diagnóstico	início do tratamento	QTAD	resposta	progressão	óbito	data do último registro
46	21/8/2008	25/8/2008	não	Resposta parcial	14/1/2009	não	28/6/2010
47	28/8/2008	28/8/2008	não	Resposta completa	...	não	22/2/2010
48	1/9/2008	1/9/2008	não	não avaliável	...	sim	10/11/2008
49	20/8/2008	8/9/2008	não	Resposta parcial	...	sim	27/2/2009
50	11/8/2008	...	...	...	...	sim	7/9/2008
51	4/9/2008	...	...	...	30/11/2009	não	14/6/2010
52	15/9/2008	15/9/2008	não	Resposta parcial	...	não	21/6/2010
53	17/9/2008	17/9/2008	não	Resposta parcial	15/6/2009	sim	27/1/2010
54	6/10/2008	6/10/2008	não	Doença estável	...	sim	21/4/2009
55	6/10/2008	7/10/2008	sim	Resposta completa	...	não	8/2/2010
56	8/10/2008	...	...	...	...	sim	27/11/2008
57	29/9/2008	16/3/2009	não	Doença estável	...	não	12/4/2010
58	6/10/2008	30/10/2008	não	Progressão	28/3/2009	sim	30/3/2009
59	16/10/2008	11/11/2008	não	Resposta parcial	...	não	22/2/2010
60	30/10/2008	...	...	...	...	não	24/5/2010
61	3/11/2008	3/11/2008	não	Doença estável	...	não	28/6/2010
62	6/11/2008	11/11/2008	não	Progressão	2/3/2009	sim	30/8/2009
63	11/11/2008	12/11/2008	não	Progressão	2/1/2009	não	5/4/2010
64	24/11/2008	24/11/2008	sim	Resposta parcial	23/11/2009	não	5/4/2010
65	27/11/2008	1/12/2009	não	Doença estavel	...	sim	16/2/2009
66	8/12/2008	18/12/2008	não	Resposta parcial	...	não	19/4/2010
67	22/12/2008	22/12/2008	não	resposta parcial muito boa	...	não	29/3/2010
68	29/12/2008	...	...	...	...	sim	1/2/2009
69	13/1/2009	13/1/2009	não	Doença estavel	...	sim	19/5/2009

Paciente	diagnóstico	início do tratamento	QTAD	resposta	progressão	óbito	data do último registro
70	12/1/2009	...	...	...	...	sim	27/1/2009
71	14/1/2009	...	...	...	...	sim	4/2/2009
72	6/2/2009	6/2/2009	sim	Resposta parcial	...	não	14/6/2010
73	10/2/2009	11/2/2009	não	resposta parcial muito boa	...	não	8/3/2010
74	10/2/2009	9/2/2009	não	Resposta parcial	...	sim	17/5/2009
75	13/2/2009	13/2/2009	não	resposta parcial muito boa	...	não	3/5/2010
76	23/3/2009	23/3/2009	não	Resposta parcial	...	não	5/4/2010
77	12/3/2009	30/3/2009	não	Doença estavel	...	sim	1/12/2009
78	19/3/2009	...	...	...	...	não	26/4/2010
79	6/4/2009	7/4/2009	não	Progressão	21/8/2009	não	22/2/2010
80	30/3/2009	30/3/2009	não	Doença estável	28/12/2009	não	31/5/2010
81	3/4/2009	...	...	...	...	sim	4/4/2009
82	6/4/2009	18/4/2009	não	Resposta parcial	...	não	19/4/2010
83	6/4/2009	18/5/2009	não	Resposta parcial	...	não	26/4/2010
84	16/4/2009	27/4/2009	não	resposta parcial muito boa	...	não	3/5/2010

Anexo IV

Tabela 22 – Combinações de fármacos utilizadas para o tratamento dos pacientes

Tratamento	Drogas	Doses	Dias	Período
Dexametasona em altas doses	Dexametasona	20-40mg/dia	D1-D4 D9-D12 D17-D20 (por 3 meses) D1-D4 (pós 3º mês)	28 dias
Melfalano e dexametasona	Dexametasona Melfalano	20-40mg/dia 10mg/m ²	D1-D4 D1-D4	28-42 dias
Melfalano, dexametasona e talidomida	Dexametasona Melfalano Talidomida	20-40mg/dia 10mg/m ² 100mg/dia	D1-D4 D1-D4 Diário	28-42 dias
Melfalano e prednisona	Prednisona Melfalano	60mg/m ² 10mg/m ²	D1-D4 D1-D4	28-42 dias
Dexametasona e talidomida	Dexametasona	20-40mg/dia	D1-D4 D9-D12 D17-D20 (por 3 meses) D1-D4 (pós 3º mês)	28 dias
	Talidomida	100mg/dia	Diária	

Anexo V Tabela 23-Resultados dos experimentos de FISH

Caso	Nomenclatura	Interpretação
1	nuc ish(RB1x1)[70/100] nuc ish(FGFR3x3,IGHx2)[48/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[93/100]	del(13q14) e trissomia do cromossomo 4.
2	nuc ish(RB1x2)[95/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx3)[28/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[94/100]	trissomia do cromossomo 14 ou rearranjo IGH
3	nuc ish(RB1x1)[88/100] nuc ish(FGFR3x3,IGHx2)[34/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[96/100]	del(13q14) e trissomia do cromossomo 4.
4	nuc ish(RB1x2)[94/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx3)[78/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[93/100]	trissomia do cromossomo 14 ou rearranjo IGH
5	nuc ish(RB1x1)[53/100] nuc ish(FGFR3x3),(IGHx3),(FGFR3 con IGHx2)[26/100]/(FGFR3x4),(IGHx4),(FGFR3 con IGHx3)[66/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[93/100]	del(13q14) e t(4;14)(p16;q32) seguido de amplificação da fusão IGH/FGFR3
6	nuc ish(RB1x1)[57/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x1[37/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[90/100]	del(13q14) e monossomia dos cromossomos 4 e 14
7	Pesquisa del(13q14) não realizada Pesquisa t(4;14)(p16;q32) não realizada Pesquisa del(17p13) não realizada	...
8	nuc ish(RB1x2)[90/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[97/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[96/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
9	nuc ish(RB1x1)[33/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[98/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[90/100]	del(13q14)

Caso	Nomenclatura	Interpretação
10	nuc ish(RB1x2)[92/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x3[11/100]/(FGFR3,IGH)x4[28/100] nuc ish(D17Z1,p53)x3[27/100]/(D17Z1,p53)x4[23/100]	Clones triploide e tetraploide com del(13q14)
11	nuc ish(RB1x2)[86/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[99/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
12	nuc ish(RB1x2)[93/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx3)[51/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[92/100]	rearranjo IGH ou trissomia cromossomo 14
13	nuc ish(RB1x1)[92/100] nuc ish(FGFR3x3),(IGHx3),(FGFR3 con IGHx2)[44/100]/(FGFR3x4),(IGHx4),(FGFR3 con IGHx3)[36/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[95/100]	del(13q14) e t(4;14)(p16;q32) seguido de amplificação da fusão IGH/FGFR3
14	nuc ish(RB1x1)[86/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx3)[30/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[87/100]	del(13q14) e rearranjo IGH ou trissomia cromossomo 14
15	nuc ish(RB1x2)[93/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x3[20/100]/(FGFR3,IGH)x4[24/100] nuc ish(D17Z1,p53)x3[19/100]/(D17Z1,p53)x4[55/100]	Clones triploide e tetraploide com del(13q14)
16	nuc ish(RB1x1)[89/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx3)[64/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[92/100]	del(13q14) e rearranjo IGH ou trissomia cromossomo 14
17	nuc ish(RB1x2)[92/100] Pesquisa t(4;14)(p16;q32) não realizada Pesquisa del(17p13) não realizada	negativo para del(13q14) restante não avaliado
18	nuc ish(RB1x2)[89/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x3[16/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[96/100]	trissomia cromossomos 4 e 14
19	Pesquisa del(13q14) não realizada Pesquisa t(4;14)(p16;q32) não realizada Pesquisa del(17p13) não realizada	...

Caso	Nomenclatura	Interpretação
20	nuc ish(RB1x2)[86/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[98/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
21	nuc ish(RB1x1)[80/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[96/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[97/100]	del(13q14)
22	nuc ish(RB1x1)[83/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[99/100]	del(13q14)
23	nuc ish(RB1x2)[96/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[98/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[97/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
24	nuc ish(RB1x2)[85/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[82/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
25	Pesquisa del(13q14) não realizada Pesquisa t(4;14)(p16;q32) não realizada Pesquisa del(17p13) não realizada	...
26	nuc ish(RB1x2)[92/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx3)[12/100]/(FGFR3x4,IGHx6)[9/100]/(FGFR3x4,IGHx4)[10/100] nuc ish(D17Z1,p53)x4[53/100]	Clones tetraploide com del(13q14) e rearranjo IGH (ou trissomia 14)
27	Pesquisa del(13q14) não realizada Pesquisa t(4;14)(p16;q32) não realizada Pesquisa del(17p13) não realizada	...
28	nuc ish(RB1x1)[41/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[93/100]	del(13q14)

Caso	Nomenclatura	Interpretação
29	nuc ish(RB1x1)[75/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x3[12/100]	del(13q14) e trissomia do cromossomo 17
30	nuc ish(RB1x2)[90/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[97/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[94/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
31	nuc ish(RB1x2)[90/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[99/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[96/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
32	nuc ish(RB1x2)[88/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[94/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
33	nuc ish(RB1x3)[13/100]/(RB1x4)[4/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x3[16/100]/(FGFR3,IGH)x4[11/100] nuc ish(D17Z1,p53)x3[23/100]/(D17Z1,p53)x4[12/100]	presença de um clone triploide e um clone tetraploide
34	nuc ish(RB1x2)[93/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[99/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[93/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
35	Pesquisa del(13q14) não realizada Pesquisa t(4;14)(p16;q32) não realizada Pesquisa del(17p13) não realizada	...
36	nuc ish(RB1x1)[40/100] nuc ish(FGFR3x2),(IGHx1)[53/100] nuc ish(D17Z1x2),(p53x1)[54/100]	del(13q14) monossomia do cromossomo 14 e del(17p13)
37	nuc ish(RB1x1)[88/100] nuc ish(FGFR3x3),(IGHx1)[60/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[98/100]	del(13q14) trissomia 4 e monossomia 14
38	nuc ish(RB1x2)[94/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[94/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)

Caso	Nomenclatura	Interpretação
39	nuc ish(RB1x3)[26/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[96/100]	trissomia do cromossomo 13
40	nuc ish(RB1x2)[93/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1x2),(p53x1)[25/100]	del(17p13)
41	nuc ish(RB1x1)[97/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx3)[54/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[99/100]	del(13q14) e trissomia do cromossomo 14 ou rearranjo IGH
42	nuc ish(RB1x2)[95/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[92/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
43	nuc ish(RB1x2)[92/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x3[56/100]	trissomia do cromossomo 17
44	nuc ish(RB1x1)[72/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx3)[54/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[97/100]	del(13q14) trissomia do cromossomo 14 ou rearranjo IGH
45	nuc ish(RB1x1)[40/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x4[58/100] nuc ish(D17Z1,p53)x4[24/100]	del(13q14) e tetrassomia cromossomos 4, 14 e 17
46	nuc ish(RB1x1)[67/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx1)[47/100] nuc ish(D17Z1x2,p53x1)[38/100]	del(13q14) monossomia do cromossomo 14 e del(17p13)
47	nuc ish(RB1x2)[84/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx3)[25/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[96/100]	trissomia do cromossomo 14 ou rearranjo IGH
48	nuc ish(RB1x1)[90/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx1)[72/100]/(FGFR3,IGH)x1[15/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[95/100]	del(13q14) clone com monossomia 14 e clone com monossomia 4 e 14

Caso	Nomenclatura	Interpretação
49	nuc ish(RB1x2)[95/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[93/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
50	nuc ish(RB1x2)[95/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx3)[44/100] nuc ish(D17Z1,p53)x3[25/100]/(D17Z1x3,p53x2)[21/100]	trissomia do cromossomo 14 ou rearranjo IGH e trissomia 17 seguido de del(17p13)
51	nuc ish(RB1x1)[75/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx1)[22/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[92/100]	del(13q14) e monossomia do cromossomo 14
52	nuc ish(RB1x2)[95/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x3[93/100]	trissomia do cromossomo 17
53	nuc ish(RB1x1)[89/100] nuc ish(FGFR3x3),(IGHx3),(FGFR3 con IGHx2)[83/100} nuc ish(D17Z1,p53)x2[92/100]	del(13q14) e t(4;14)(p16;q32)
54	nuc ish(RB1x3)[19/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x3[50/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[96/100]	trissomia dos cromossomos 13, 4 e 14
55	nuc ish(RB1x2)[95/100] nuc ish(FGFR3x3),(IGHx3),(FGFR3 con IGHx2)[74/100} nuc ish(D17Z1,p53)x2[95/100]	t(4;14)(p16;q32)
56	nuc ish(RB1x2)[99/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[99/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[86/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
57	nuc ish(RB1x2)[90/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[95/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
58	nuc ish(RB1x1)[94/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[95/100]	del(13q14)

Caso	Nomenclatura	Interpretação
59	nuc ish(RB1x2)[89/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[99/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[93/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
60	nuc ish(RB1x2)[89/100] pesquisa t(4;14)(p16;q32) não realizada nuc ish(D17Z1,p53)x2[88/100]	negativo para del(13q14) e del(17p13)
61	nuc ish(RB1x2)[91/100] Pesquisa t(4;14)(p16;q32) não realizada nuc ish(D17Z1,p53)x2[94/100]	negativo para del(13q14) e del(17p13) pesquisa de t(4;14)(p16;q32) não realizada
62	nuc ish(RB1x1)[42/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[99/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[98/100]	del(13q14)
63	nuc ish(RB1x1)[90/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[99/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[92/100]	del(13q14)
64	nuc ish(RB1x1)[28/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[92/100]	del(13q14)
65	nuc ish(RB1x2)[91/100] nuc ish(FGFR3x5),(IGHx5),(FGFR3 con IGHx2)[15/100]/(FGFR3x4),(IGHx4),(FGFR3 con IGHx2)[57/100} nuc ish(D17Z1,p53)x3[13/100]/(D17Z1,p53)x4[54/100]	Clones triploide e tetraploide, del(13q14) e t(4;14)(p16;q32)
66	nuc ish(RB1x2)[91/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[90/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
67	nuc ish(RB1x2)[90/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1x2,p53x1)[76/100]	del(17p13)

Caso	Nomenclatura	Interpretação
68	nuc ish(RB1x2)[87/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[97/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
69	nuc ish(RB1x2)[97/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[92/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
70	nuc ish(RB1x1)[96/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[92/100]	del(13q14)
71	nuc ish(RB1x2)[88/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[93/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
72	nuc ish(RB1x2)[93/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1x2,p53x1)[32/100]	del(17p13)
73	nuc ish(RB1x2)[94/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[99/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[93/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
74	nuc ish(RB1x2)[88/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[99/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[95/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
75	nuc ish(RB1x1)[37/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x3[76/100]	del(13q14) e trissomia cromossomo 17
76	nuc ish(RB1x1)[44/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[92/100]	del(13q14)
77	nuc ish(RB1x1)[98/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[88/100]	del(13q14)

Caso	Nomenclatura	Interpretação
78	nuc ish(RB1x1)[97/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[95/100]	del(13q14)
79	nuc ish(RB1x2)[89/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[93/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
80	nuc ish(RB1x2)[86/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[87/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
81	nuc ish(RB1x2)[95/100] nuc ish(FGFR3x3),(IGHx3),(FGFR3 com IGHx2)[78/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[94/100]	t(4;14)(p16;q32)
82	nuc ish(RB1x1)[38/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx3)[22/100]/(FGFR3x4,IGHx6)[23/100]/(FGFR3,IGH)x4[12/100] nuc ish(D17Z1,p53)x3[10/100]/(D17Z1,p53)x4[14/100]	Clones tetraploide com del(13q14) e rearranjo IGH (ou trissomia 14)
83	nuc ish(RB1x2)[87/100] nuc ish(FGFR3,IGH)x2[100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[93/100]	negativo para del(13q14) t(4;14)(p16;q32) e del(17p13)
84	nuc ish(RB1x2)[90/100] nuc ish(FGFR3x2,IGHx3)[33/100] nuc ish(D17Z1,p53)x2[94/100]	Rearranjo IGH ou trissomia cromossomo 14

Anexo VI-Citometria de Fluxo

Tabela 24-Expressão de Ki-67, marcação com anexina V, razão Ki-67/anexina V e quantificação de plasmócitos circulantes

Paciente	Ki-67	Anexina-V	Ki-67/Anexina V	Plasmócitos em sangue (células/50 000 eventos)
1	5,37%	...	...	...
2	0,97%	...	...	278
3	0,15%	...	...	1
4	0,37%	...	...	8 741
5	15,65%	...	...	402
6	3,62%	...	...	1
7	0,68%	...	...	...
8	6,05%	...	...	...
9	4,93%	...	...	1 234
10	1,16%	...	...	324
11	4,06%	...	...	...
12	5,53%	...	...	...
13	2,09%	3,78%	0,55	...
14	18,88%	29,24%	0,64	...
15	1,54%	14,74%	0,1	0
16	0,29%	1,96%	0,14	1 424
17	3,60%	9,96%	0,36	345
18	2,70%	...	...	0
19	...	2,91%	...	0
20	...	8,11%	...	2
21	...	13,81%	...	11
22	...	55,04%	...	...
23	...	6,69%	...	8
24	...	2,63%	...	1
25	1,53%	35,84%	0,04	0
26	2,23%	19,40%	0,11	1
27	5,65%	28,72%	0,19	1
28	1,92%	8,97%	0,21	...
29	2,57%	2,97%	0,86	33
30	0,39%	17,82%	0,021	...
31	0,00%	10,86%	0	2
32	5,78%	27,21%	0,21	...
33	5,13%	2,81%	1,82	0
34	3,04%	36,45%	0,08	1
35	4,45%	32,11%	0,13	66
36	18,34%	6,30%	2,91	3
37	3,12%	1,90%	1,64	...

Paciente	Ki-67	Anexina-V	Ki-67/Anexina V	Plasmócitos em sangue (células/50 000 eventos)
38	0,00%	0,75%	0	...
39	2,12%	1,48%	1,43	4
40	20,89%	8,25%	2,53	...
41	24,72%	26,69%	0,92	308
42	0,47%	3,09%	0,15	11
43	0,98%	2,54%	0,38	7
44	3,22%	14,01%	0,22	457
45	5,43%	14,34%	0,37	1 609
46	3,24%	10,95%	0,29	5
47	6,27%	...	...	...
48	9,66%	49,46%	0,19	147
49	2,63%	13,09%	0,2	3
50	1,57%	25,21%	0,06	0
51	2,18%	25,11%	0,08	4
52	3,19%	14,59%	0,21	29
53	2,54%	27,10%	0,09	...
54	4,59%	43,65%	0,1	0
55	2,31%	8,00%	0,28	159
56	2,87%	4,78%	0,6	580
57	2,10%	15,21%	0,13	10
58	1,53%	18,73%	0,08	2
59	0,75%	0,79%	0,94	5
60	2,32%	...	...	0
61	6,90%	10,14%	0,68	0
62	0,34%	4,22%	0,08	28
63	26,44%	27,66%	0,95	...
64	0,41%	0,67%	0,61	972
65	0,00%	4,90%	0	6
66	6,76%	2,61%	2,59	13
67	6,49%	1,01%	6,42	2
68	3,96%	34,54%	0,11	3
69	4,16%	3,45%	1,2	...
70	9,70%	1,38%	7,02	6
71	6,07%	18,64%	0,32	50
72	0,82%	7,27%	0,11	1
73	4,77%	1,24%	3,84	3
74	5,92%	6,48%	0,91	...
75	10,40%	0,74%	14,05	3
76	1,46%	0,17%	8,58	2
77	15,63%	0,34%	45,97	351
78	2,07%	3,68%	0,56	7

Paciente	Ki-67	Anexina-V	Ki-67/Anexina V	Plasmócitos em sangue (células/50 000 eventos)
79	17,84%	0,31%	57,54	...
80	2,29%	9,66%	0,23	186
81	3,65%	7,17%	0,5	...
82	3,97%	4,01%	0,99	45
83	2,45%	16,17%	0,15	3
84	5,74%	0,12%	47,83	711

Anexo VII- Estabelecimento dos valores de corte para as variáveis obtidas por citometria de fluxo

Para a análise de sobrevida livre de eventos e sobrevida global foi necessária a obtenção de valores de corte para as variáveis contínuas: expressão de Ki-67, marcação com anexina V, razão Ki-67/anexina V e plasmócitos em sangue periférico.

Foi realizada a curva ROC para determinação de ponto de corte para a variável contínua expressão de Ki-67, sendo o parâmetro de referência utilizado a presença de óbito e de óbito precoce. A área sob a curva foi 0,54 (IC95%: 0,41-0,67) para óbito (Figura 40) e 0,50 (IC95%: 0,31-0,68) para óbito precoce. Como nenhuma das curvas mostrou poder discriminativo adequado, os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com a expressão de Ki-67: inferior ou igual a 3% (38 pacientes), superior a 3% e inferior ou igual a 9% (29 pacientes) e superior a 9% (11 pacientes).

Foi realizada a curva ROC para determinação de ponto de corte para a variável contínua marcação de plasmócitos com anexina V, sendo o parâmetro de referência utilizado a presença de óbito e de óbito precoce. A área sob a curva foi 0,63 (IC95%: 0,49-0,77) para óbito (Figura 41) e 0,43 (IC95%: 0,24-0,62) para óbito precoce. Como nenhuma das curvas mostrou poder discriminativo adequado, os pacientes foram divididos em dois grupos pelo valor da mediana de marcação com anexina V.

Figura 40 - Curva ROC: expressão de Ki-67 em pacientes que apresentaram óbito ou não

Figura 41 - Curva ROC: marcação de plasmócitos com anexina V em pacientes que apresentaram óbito ou não

Foi realizada a curva ROC para determinação de ponto de corte para a variável contínua razão Ki-67/anexina V, sendo o parâmetro de referência utilizado a presença de óbito e de óbito precoce. A área sob a curva foi 0,35 (IC95%: 0,21-0,49) para óbito (Figura 42) e 0,47 (IC95%: 0,25-0,69) para óbito precoce. Como nenhuma das curvas mostrou poder discriminativo

adequado, não foi determinado valor de corte para a variável razão Ki-67/anexina V.

Figura 42-Curva ROC- Razão Ki-67/ anexina V em pacientes que apresentaram óbito ou não.

Foi realizada a curva ROC para determinação de ponto de corte para a variável contínua plasmócitos em sangue, sendo o parâmetro de referência utilizado a presença de óbito e de óbito precoce. A área sob a curva foi 0,54 (IC95%: 0,38-0,70) para óbito (Figura 43) e 0,62 (IC95%: 0,39-0,86) para óbito precoce. Como nenhuma das curvas mostrou poder discriminativo adequado, não foi determinado valor de corte para a variável plasmócitos em sangue. Para esta variável, foi utilizado o valor de corte 10 plasmócitos (a cada 50 000 eventos), baseado em dados da literatura (Nowakowski *et al.*, 2005).

Figura 43-Curva ROC- quantificação de plasmócitos em sangue em pacientes que apresentaram óbito ou não.

Referências Bibliográficas

9. Referências Bibliográficas

Ahmann GJ, Jalal SM, Juneau AL, Christensen ER, Hanson CA, Dewald GW, Greipp PR. A novel three-color clone-specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998;101:7-11.

Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, Cole P, Mandel JS, Oken MM, Trichopoulos D. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer.* 2007;120:Suppl 12:40-61.

Alexandrakis MG, Passam FH, Dambaki C, Pappa CA, Stathopoulos EN. The relation between bone marrow angiogenesis and the proliferation index Ki-67 in multiple myeloma. *J Clin Pathol.* 2004a;57:856–60.

Alexandrakis MG, Passam FH, Kyriakou DS, Dambaki K, Niniraki M, Stathopoulos E. Ki-67 proliferation index: correlation with prognostic parameters and outcome in multiple myeloma. *Am J Clin Oncol.* 2004b;27:8-13.

Anderson KC. Novel Therapies for multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2003;120:10-17.

Avet-Loiseau H. Role of genetics in prognostication in myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007a;20:625-35.

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, Caillot D, Stoppa AM, Sotto JJ, Wetterwald M, Dumontet C, Fuzibet JG, Azais I, Dorvaux V, Zandecki M, Bataille R, Minvielle S, Harousseau JL, Facon T, Mathiot C. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood.* 2007b;109:3489-95.

Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, Minvielle S, Bataille R; Intergroupe Francophone du Myélome. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood.* 2002;99:2185-91.

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 AM, Hulin C, Facon T, Attal M, Minvielle S, Harousseau JL. Bortezomib Plus Dexamethasone Induction Improves Outcome of Patients wWith t(4;14) Myeloma but Not Outcome of Patients With del(17p). *J Clin Oncol*. 2010 Aug 9. [Epub ahead of print].

Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N, Facon T, Brigaudeau C, Harousseau JL, Grosbois B, Bataille R. Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myelome. Blood*. 1999;94:2583-9.

Barlogie B, Smallwood L, Smith T, Alexanian R. High serum levels of lactic dehydrogenase identify a high grade lymphoma like myeloma. *Ann Intern Med*. 1989;110:521-25.

Bataille R, Boccadoro M, Klein B, Dune B, Pileri A. C reactive protein and $\beta 2$ microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. *Blood*. 1992;80:733-7.

Bataille R, Durie BG, Grenier J, Sany J. Prognostic factors and staging in multiple myeloma: a reappraisal. *J Clin Oncol*. 1986;4:80-7.

Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*. 2006;91:1234-40.

Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23:6333-8.

Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005;106:296-303.

Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1992;8:365-93.

Borset M, Helseth E, Naume B, Waage A. Lack of IL-1 secretion from human myeloma cells highly purified by immunomagnetic separation. *Br J Haematol*. 1993;85:446-51.

Braggio E, Renault IZ. Alterações moleculares no Mieloma Múltiplo Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29:10-16.

Chauffaille MLLF, Ribeiro Jr A, Yamamoto M; Rodrigues MM, Almeida MSS, Ribas C, Calheiros LA, Colleoni GWB. Elevada incidência de anormalidades cromossômicas numéricas detectadas por FISH multicentromérico em pacientes com mieloma múltiplo. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2007;43:17-23.

Chesi M, Nardini E, Lim RS, Smith KD, Kuehl WM, Bergsagel PL. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. Blood 1998;92:3025–34.

Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. N Engl J Med. 2003;348:1875-83.

Corradini P, Inghirami G, Astolfi M, Ladetto M, Voena C, Ballerini P, Gu W, Nilsson K, Knowles DM, Boccadoro M, Pileri A, Dalla-Favera R. Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and Rb1, in plasma cell dyscrasias. Leukemia 1994;8:758-67.

Costes V, Magen V, Legouffe E, Durand L, Baldet P, Rossi JF, Klein B, Brochier J. The Mi15 monoclonal antibody (anti-syndecan-1) is a reliable marker for quantifying plasma cells in paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. Hum Pathol. 1999;30:1405-11.

Dao DD, Sawyer JR, Epstein J, Hoover RG, Barlogie B, Tricot G. Deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma. Leukemia. 1994;8:1280-4.

Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). Cytometry. 1997;27:1-20.

Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J. Assays of cell viability: Discrimination of cells dying by apoptosis. Meth Cell Biol. 1994;41:15–38.

Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, Greipp PR. The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. Blood. 1985;66:380-90.

Dimopoulos MA, Barlogie B, Smith TL, Alexanian R. High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma. *Ann Intern Med.* 1991;115:931-5

Dingli D, Nowakowski GS, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Rajkumar SV, Greipp PR, Litzow MR, Gastineau DA, Witzig TE, Gertz MA. Flow cytometric detection of circulating myeloma cells before transplantation in patients with multiple myeloma: a simple risk stratification system. *Blood.* 2006; 107:3384-8.

Drach J, Gattringer C, Glassl H, Drach D, Huber H. The biological and clinical significance of the KI-67 growth fraction in multiple myeloma. *Hematol Oncol.* 1992;10:125-34.

Drach J, Schuster J, Nowotny H, Angerler J, Rosenthal F, Fiegl M, Rothermundt C, Gsur A, Jäger U, Heinz R, Lechner K, Ludwig H, Huber H. Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Res.* 1995; 55:3854-9.

Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Dimopoulos M, Westin J, Sonneveld P, Ludwig H, Gahrton G, Beksac M, Crowley J, Belch A, Boccadaro M, Cavo M, Turesson I, Joshua D, Vesole D, Kyle R, Alexanian R, Tricot G, Attal M, Merlini G, Powles R, Richardson P, Shimizu K, Tosi P, Morgan G, Rajkumar SV; International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia.* 2006;20:1467-73.

Durie BG, Salmon SE. High speed scintillation autoradiography. *Science.* 1975;190:1093-5.

Durie BG, Salmon SE, Moon TE. Pretreatment tumor mass, cell kinetics, and prognosis in multiple myeloma. *Blood;*1980;55:364-72.

Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, Moreau P, Geneviève F, Zandecki M, Laï JL, Leleu X, Jouet JP, Bauters F, Harousseau JL, Bataille R, Mary JY; Intergroupe Francophone du Myélome. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood.* 2001;97:1566-71.

Fadok VA, Voelker DR, Cammpbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 1992;148:2207–16.

Falcão RP, Dalmazzo LFF. O valor da imunofenotipagem para o diagnóstico do Mieloma Múltiplo e na avaliação da doença residual mínima. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2007;29:3-9

Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Hoyer JD, Lust JA, Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, Dewald GW. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood.* 2002a;100:1417-24.

Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD Jr, Stewart AK, Avet-Loiseau H. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res.* 2004;64:1546-58.

Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart K, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S, Neri A, Barlogie B, Kuehl WM, Liebisch P, Davies F, Chen-Kiang S, Durie BG, Carrasco R, Sezer O, Reiman T, Pilarski L, Avet-Loiseau H. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia.* 2009;23:2210-21.

Fonseca R, Blood EA, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Hoyer JD, Harrington D, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood.* 2002b;99:3735-41.

Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, Bailey RJ, Greipp PR. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood.* 2003;101:4569-75.

Fonseca R, Harrington D, Oken MM, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Blood EA, Rajkumar SV, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR. Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (delta13). *Cancer Res.* 2002c;62:715-20.

Garcia-Marco JA, Caldas C, Price CM, Wiedemann LM, Ashworth A, Carovsky D: Frequent somatic deletion of the 13q12.3 locus encompassing BRCA2 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1996;88:1568-75.

García-Sanz R, Orfão A, González M, Tabernero MD, Bladé J, Moro MJ, Fernández-Calvo J, Sanz MA, Pérez-Simón JA, Rasillo A, Miguel JF. Primary plasma cell leukemia: Clinical. Immunophenotypic, DNA ploidy, and Cytogenetics Characteristics. *Blood*. 1999;93:1032-7.

García-Sanz R, Orfão A, González M, Moro MJ, Hernández JM, Ortega F, Borrego D, Carnero M, Casanova F, Jiménez R, et al. Prognostic implications of DNA aneuploidy in 156 untreated multiple myeloma patients. Castelano-Leones (Spain) Cooperative Group for the Study of Monoclonal Gammopathies. *Br J Haematol*. 1995;90:106-12.

Gastinne T, Leleu X, Duhamel A, Moreau AS, Franck G, Andrieux J, Lai JL, Coiteux V, Yakoub-Agha I, Bauters F, Harousseau JL, Zandecki M, Facon T; Intergroupe Francophone du Myelome (IFM). Plasma cell growth fraction using Ki-67 antigen expression identifies a subgroup of multiple myeloma patients displaying short survival within the ISS stage I. *Eur J Haematol*. 2007;79:297-304.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31:13-20.

Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Litzow MR, Henderson KJ, Van Wier SA, Ahmann GJ, Fonseca R. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood*. 2005;106:2837-40.

Gould J, Alexanian R, Goodacre A, Pathak S, Hecht B, Barlogie B. Plasma cell karyotype in multiple myeloma. *Blood*. 1988;71:453-6.

Greipp PR, Katzmann JA, O'Fallon WM, Kyle RA. Value of beta 2-microglobulin level and plasma cell labeling indices as prognostic factors in patients with newly diagnosed myeloma. *Blood*. 1988;72:219-23.

Greipp PR, Kumar S. Plasma cell labeling index. *Methods Mol Med*. 2005;113:25-35.

Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. International Staging System for Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23:3412-20.

Gutiérrez NC, Hernández JM, García JL, Almeida J, Mateo G, González MI, Hernández J, Fernández-Calvo J, San Miguel JF. Correlation between cytogenetic abnormalities and disease characteristics in multiple myeloma: monosomy of chromosome 13 and structural abnormalities of 11q are associated with a high percentage of S-phase plasma cells. *Haematologica*. 2000;85:1146-52.

Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*. 1998;91:3-21.

Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, Zhan F, Santra M, Sawyer JR, Hollmig K, Zangarri M, Pineda-Roman M, van Rhee F, Cavallo F, Burington B, Crowley J, Tricot G, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. 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*. 2006;108:1724-32.

Harousseau, J.L.. Stem cell transplantation in multiple myeloma (0, 1 or 2). *Curr Opin Oncol*. 2005;17:93-8.

Harousseau JL. Induction therapy in multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:306-12.

Harrison CJ, Mazzullo H, Cheung KL, Gerrard G, Jalali GR, Mehta A, Osier DG, Orchard KH. Cytogenetics of multiple myeloma: interpretation of fluorescence in situ hybridization results. *Br J Haematol*. 2003;120:944-52.

Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*. 2004;104:607-18.

Huang SY, Yao M, Tang JL, Tsay W, Lee FY, Liu MC, Wang CH, Chen YC, Shen MC, Tien HF. Clinical significance of cytogenetics and interphase fluorescence in situ hybridization analysis in newly diagnosed multiple myeloma in Taiwan. *Ann Oncol*. 2005;16:1530-8.

Hungria VTM, Maiolino A, Martinez GA, Colleoni G, Sillas L, Coelho EOM, Rocha A L, Oliveira L, Faria R, Souza CA. Estudo retrospectivo do Mieloma Múltiplo em Centros Brasileiros - Aspectos Epidemiológicos - Resultados preliminares. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2005, Rio de Janeiro - RJ. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia-Supl.n 2, 2005. v. 27. p. 164.

Hungria VTM, Maiolino A, Martinez G, Colleoni GWB, Coelho EOD, Rocha L, Nunes R, Bittencourt R, Oliveira LCO, Faria RMO, Pasquini R, Magalhães SMM, Souza CA, Pinto Neto JV, Barreto L, Andrade E, Portella MdSO, Bolejack V, Durie BGM. Confirmation of the utility of the International staging system and identification of a unique pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2008;93:791-792.

Hungria VTM, Maiolino A. Mieloma Múltiplo: Progressos e desafios. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2007;29:1-2.

Inaba N, Sato N, Ijichi M, Fukazawa I, Nito A, Takamizawa H, Lüben G, Bohn H. The immunocytochemical location of two membrane-associated placental tissue proteins in human and cynomolgus monkey placenta. *Tumour Biol.* 1984;5:75-85.

Jonveaux P, Berger R. Chromosome studies in plasma cell leukemia and multiple myeloma in transformation. *Genes Chromosom Cancer.* 1992;4:321-5.

Jourdan M, Ferlin M, Legouffe E, Horvathova M, Liautard J, Rossi JF, Wijdenes J, Brochier J, Klein B. The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol.* 1998;100:637-46.

Juge-Morineau N, Mellerin MP, Francois S, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R. High incidence of deletions but infrequent inactivation of the retinoblastoma gene in human myeloma cells. *Br J Haematol.* 1995;91:664-7.

Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, Kuramoto A, Kishimoto T. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature.* 1988;332:83-5.

Kearney L The impact of the new fish technologies on the cytogenetics of haematological malignancies. *Br J Haematol.* 1999;104:648-58.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-57.

Klein B. Cytokine, cytokine receptors, transduction signals, and oncogenes in human multiple myeloma. *Semin Hematol*. 1995;32:4-19.

Klein B, Zhang XG, Jourdan M, Content J, Houssiau F, Aarden L, Piechaczyk M, Bataille R. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*. 1989;73:517-26.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994;84:1415-20.

Korsmeyer SJ. Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:785-807.

Kumar S, Rajkumar SV, Greipp PR, Witzig TE. Cell proliferation of myeloma plasma cells: comparison of the blood and marrow compartments. *Am J Hematol*. 2004;77:7-11.

Kyle RA. Why better prognostic factors for multiple myeloma are needed. *Blood*. 1994;83:1713-6.

Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2004;351:1860-73.

Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood*. 2008;111:2962-72.

Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ 3rd. Incidence of multiple myeloma in Olmsted County, Minnesota: Trend over 6 decades. *Cancer*. 2004;101:2667-74.

Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, Dispenzieri A, Katzmann JA, Melton LJ 3rd. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2006;354:1362-9.

Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ 3rd. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2002;346:564-9.

Lai JL, Zandecki M, Mary JY, Bernardi F, Izydorczyk V, Flactif M, Morel P, Jouet JP, Bauters F, Facon T. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a

study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood*. 1995;85:2490-7.

Liang W, Hopper JE, Rowley JD. Karyotypic abnormalities and clinical aspects of patients with multiple myeloma and related paraproteinemic disorders. *Cancer*. 1979;44:630-44.

Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow Cytometric Immunophenotypic Analysis of 306 Cases of Multiple Myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2004;121:482-488.

Lichtenstein, A., Tu, Y., Fady, C., Vescio, R. & Berenson, J. Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cellular Immunology*. 1995;162:248–255.

Lokhorst HM, Boom SE, Terpstra W, Roholl P, Gerdes J, Bast BJ. Determination of the growth fraction in monoclonal gammopathy with the monoclonal antibody Ki-67. *Br J Haematol*. 1988;69:477-81.

Ludwig H, Durie BG, Bolejack V, Turesson I, Kyle RA, Blade J, Fonseca R, Dimopoulos M, Shimizu K, San Miguel J, Westin J, Harousseau JL, Beksac M, Boccadoro M, Palumbo A, Barlogie B, Shustik C, Cavo M, Greipp PR, Joshua D, Attal M, Sonneveld P, Crowley J. Myeloma in patients younger than age 50 presents with more favorable features and shows better survival: an analysis of 10 549 patients from the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2008;111:4039-47.

Magrangeas F, Lodé L, Wuilleme S, Minvielle S, Avet-Loiseau H. Genetic heterogeneity in multiple myeloma. *Leukemia*. 2005;19:191-4.

Malgeri U, Baldini L, Perfetti V, Fabris S, Vignarelli MC, Colombo G, Lotti V, Compasso S, Bogni S, Lombardi L, Maiolo AT, Neri A. Detection of t(4;14)(p16.3;q32) chromosomal translocation in multiple myeloma by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of IGH-MMSET fusion transcripts. *Cancer Res*. 2000;60: 4058–61.

Martinez GA. *Fatores de prognóstico em Mieloma Múltiplo* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;1998.

Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB, Lahuerta JJ, Mateos MV, Gutiérrez N, Rosiñol L, Montejano L, Bladé J, Martínez R, de la Rubia J, Diaz-Mediavilla J, Sureda A, Ribera JM, Ojanguren JM, de Arriba F, Palomera L,

Terol MJ, Orfao A, San Miguel JF; PETHEMA Study Group; GEM Study Group. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26:2737-44.

Minarik J, Scudla V, Ordeltova M, Bacovsky J, Pika T, Langova K. Monitoring of plasma cell proliferative and apoptotic indices in the course of multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2009;50:1983-91.

Minarík J, Scudla V, Ordeltová M, Bacovský J, Zemanová M. Evaluation of plasma cell propidium-iodide and annexin-V indices: their relation to prognosis in multiple myeloma. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2005;149:271-4.

Neri A, Baldini L, Trecca D, Cro L, Polli E, Maiolo AT. p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. *Blood*. 1993;81:128-35.

Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, Tracz MJ, Gertz MA, Lacy MQ, Lust JA, Dispenzieri A, Greipp PR, Kyle RA, Rajkumar SV. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2005;106:2276-9.

Oancea M, Mani A, Hussein MA, Almasan A. Apoptosis of multiple myeloma. *Int J Hematol*. 2004;80:224-31.

Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Bladé J, González M, García-Sanz R, López-Berges C, Moro MJ, Hernández J, Escribano L, Caballero D, Rozman M, San Miguel JF. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol*. 1998;152:1655-65.

Pellat-Deceunynck C, Barillé S, Jegou G, Puthier D, Robillard N, Pineau D, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R. The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia* 1998;12:1977-82.

Pereira J, Brocardo-Lima G, Beitler B, Chamone D. Utilização de saponina em citometria de fluxo: uma alternativa factível para permeabilização celular. *Rev. bras. hematol. hemoter*. 2007;29:109-113.

Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, Galende J, Martín-Núñez G, Alonso JM, de Las Heras N, Hernández JM, Martín A, López-Berges C, Orfao A, San Miguel JF. 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*. 2007;110:2586-92.

Pérez-Simón JA, García-Sanz R, Tabernero MD, Almeida J, González M, Fernández-Calvo J, Moro MJ, Hernández JM, San Miguel JF, Orfao A. Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood*. 1998;91:3366-71.

Preudhomme C, Facon T, Zandecki M, Vanrumbeke M, Lai JL, Nataf E, Loucheux-Lefebvre MH, Kerckaert JP, Fenaux P. Rare occurrence of P53 gene mutations in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1992;81:440-3.

Puig N, Trudel S, Keats JJ, Li ZH, Braggio E, Ahmann GJ, Zeng S, Fonseca R, Kukreti V. Spontaneous remission in a patient with t(4;14) translocation multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2009;27:194-7.

Rajkumar SV, Fonseca R, Dewald GW, Therneau TM, Lacy MQ, Kyle RA, Greipp PR, Gertz MA. Cytogenetic abnormalities correlate with the plasma cell labeling index and extent of bone marrow involvement in myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999;113:73-7.

Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D, Kovarova L, Lioznov M, Mateo G, Morilla R, Mylin AK, Omedé P, Pellat-Deceunynck C, Perez Andres M, Petrucci M, Ruggeri M, Rymkiewicz G, Schmitz A, Schreder M, Seynaeve C, Spacek M, de Tute RM, Van Valckenborgh E, Weston-Bell N, Owen RG, San Miguel JF, Sonneveld P, Johnsen HE. European Myeloma Network. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008;93:431-8.

Reutelingsperger CP, Hornstra G, Hemker HC. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem*. 1985;151:625-9.

Rosiñol L, Carrió A, Bladé J, Queralt R, Aymerich M, Cibeira MT, Esteve J, Rozman M, Campo E, Montserrat E. Comparative genomic hybridisation identifies two variants of smoldering multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2005;130:729-732.

Sahara N, Takeshita A, Shigeno K, Fujisawa S, Takeshita K, Naito K, Ihara M, Ono T, Tamashima S, Nara K, Ohnishi K, Ohno R. Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2002;117:882-885.

Sahara N, Takeshita A. Prognostic significance of surface markers expressed in multiple myeloma: CD56 and other antigens. *Leuk Lymphoma* 2004;45:61-5.

Salmon SE, Durie BG. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975;36:842-54.

Sanderson R.D, Børset M. Syndecan-1 in B lymphoid malignancies. *Ann Hematol*. 2002;81:125–135.

Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul*. 1989;1:27-35.

San Miguel JF, García-Sanz R, González M, Moro MJ, Hernández JM, Ortega F, Borrego D, Carnero M, Casanova F, Jiménez R. A new staging system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cells. *Blood*. 1995;85: 448-55.

Santra M, Zhan F, Tian E, Barlogie B, Shaughnessy Jr J. A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains an IGH/MMSET fusion transcript. *Blood*. 2003;101:2374–76.

Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*. 1993;123:513-22.

Scudla V, Ordeltova M, Minarik J, Dusek L, Zemanova M, Bacovsky J. Prognostic significance of plasma cell propidium iodide and annexin-V indices and their mutual ratio in multiple myeloma Neoplasma. 2006;53:213-8.

Segges PM, Braggio E, Maiolino A, Zalcberg IR. Estudo da prevalência de alterações citogenéticas em pacientes com mieloma múltiplo (MM) por CIG-FISH. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2008, São

Paulo SP. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia - Supl.n 4, 2008. v. 30. p. 189.

Seong C, Delasalle K, Hayes K, Weber D, Dimopoulos M, Swankowski J. Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. Br J Haematol. 1998;101:189-94.

Shaughnessy J, Tian E, Sawyer J, Bumm K, Landes R, Badros A, Morris C, Tricot G, Epstein J, Barlogie B. High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH. Blood. 2000;96:1505-11.

Silva ROP, Brandão KMA, Pinto PVM., Faria RM.D., Clementino NCD., Silva CMF., Lopes AF. Mieloma múltiplo: características clínicas e laboratoriais ao diagnóstico e estudo prognóstico. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31:63-68.

Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. Blood. 2001;98:2229-38.

Tarte K, De Vos J, Thykjaer T, Zhan F, Fiol G, Costes V, Rème T, Legouffe E, Rossi JF, Shaughnessy J Jr, Ørntoft TF, Klein B. Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts. Blood. 2002;100:1113-22.

Thaler J, Fechner F, Herold M, Huber H. Interleukin-6 in multiple myeloma: correlation with disease activity and Ki-67 proliferation index. Leuk Lymphoma. 1994;12:265-71.

The International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the international myeloma working group. Br J Haematol. 2003;121:749-57.

The UK Myeloma Forum Guidelines Working Group. Diagnosis and management of multiple myeloma. Br J Haematol. 2001;115:522-40.

Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, Bracy D, Mattox S, Vesole DH, Naucke S, Sawyer JR. Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. Blood. 1995;86:4250-6.

van Eeden SF, Klut ME, Walker BA, Hogg JC. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods*. 1999;232:23-43.

van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 1998;31:1-9.

Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*. 2009;113:5418-22.

Wijdenes J, Vooijs WC, Clément C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM. A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 1996;94:318-23.

Willems PM, Kuypers AW, Meijerink JP, Holdrinet RS, Mensink EJ: Sporadic mutations of the p53 gene in multiple myeloma and no evidence for germline mutations in three familial multiple myeloma pedigrees. *Leukemia*. 1993;7:986-91.

Witzig TE, Gertz MA, Lust JA, Kyle RA, O'Fallon WM, Greipp PR. Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival in patients with multiple myeloma. *Blood*. 1996a;88:1780-7.

Witzig TE, Kimlinger TK, Ahmann GJ, Katzmann JA, Greipp PR. Detection of myeloma cells in the peripheral blood by flow cytometry. *Cytometry*. 1996b;26:113-20.

Witzig TE, Timm M, Larson D, Therneau T, Greipp PR. Measurement of apoptosis and proliferation of bone marrow plasma cells in patients with plasma cell proliferative disorders. *Br J Haematol*. 1999;104:131-7.

Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, Rao KW, Rao PN; Association for Molecular Pathology Clinical Practice Committee; American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. Guidance for fluorescence *in situ* hybridization testing in hematologic disorders. *J Mol Diagn*. 2007;9:134-43.

Wuilleme S, Robillard N, Lodé L. Ploidy, as detected by fluorescence *in situ* hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia*. 2005;19:275-8.

Xu F, Gardner A, Tu Y, Michl P, Prager D, Lichtenstein A. Multiple myeloma cells are protected against dexamethasone-induced apoptosis by insulin-like growth factors. *Br J Haematol.* 1997;97:429–40.

Xu JL, Lai R, Kinoshita T, Nakashima N, Nagasaka T. Proliferation, apoptosis, and intratumoral vascularity in multiple myeloma: correlation with the clinical stage and cytological grade. *J Clin Pathol.* 2002;55:530-4.

Zandecki M, Facon T, Preudhomme C, Vanrumbeke M, Vachee A, Quesnel B, Lai JL, Cosson A, Fenaux P: The retinoblastoma gene (RB-1) status in multiple myeloma: A report on 35 cases. *Leuk Lymphoma.* 1995;18:497-503.

Zandecki M, Lai JL, Facon T. Multiple Myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol.* 1996;94:217-27.

Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, Bumm K, Zheng M, Tian E, Sanderson R, Yang Y, Wilson C, Zangari M, Anaissie E, Morris C, Muwalla F, van Rhee F, Fassas A, Crowley J, Tricot G, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood.* 2002;99:1745-57.

Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, 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 JD Jr. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood.* 2006;108:2020-8.

Zhang XG, Bataille R, Widjenes J, Klein B. Interleukin-6 dependence of advanced malignant plasma cell dyscrasias. *Cancer.* 1992;69:1373-6.

Zojer N, Königsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Krömer E, Kaufmann H, Riedl L, Gisslinger H, Schreiber S, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood.* 2000;95:1925-30.