



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MICRO RNAS E MIELOMA MÚLTIPLO

Trabalho submetido por
ANA SOFIA DELGADO VELOSO
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

dezembro de 2017



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MICRO RNAS E MIELOMA MÚLTIPLO

Trabalho submetido por
Ana Sofia Delgado Veloso
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora Alexandra Maia e Silva

dezembro de 2017

Dedicatória

Ao meu PAI,

Porque o Amor é para Sempre.

“Afirmam que a vida é breve,

Engano, a vida é comprida.

Cabe nela amor eterno

E ainda sobeja vida.”

António Tomás Botto

Agradecimentos

O maior OBRIGADO, só poderia ser para o meu Pai, Vitorino Augusto Veloso, que foi a minha inspiração para a escolha do tema e que agora, onde quer que esteja, sei que está a olhar por mim. Pai, até já, descansa em paz, que o teu maior desejo está realizado. Um OBRIGADO do tamanho do Universo também à minha Mãe, Maria José Delgado, que sempre acreditou em mim e me apoiou incondicionalmente em tudo. Se fosse possível escolher as mães, eras TU quem escolhia. Pai, Mãe, OBRIGADO por me proporcionarem a realização deste sonho, sem vocês não seria possível.

Obrigado ao meu Avô Zé e à minha Avó Celeste, que sei que onde quer que estejam estão orgulhosos de mim. Obrigado ao meu tio/padrinho João, tia Carla, prima Beatriz, prima Alexandra, primos Clara, Simão, Filipe e Duarte, à minha madrinha Elsa e à restante família, por me apoiarem e acompanharem neste percurso que é a vida.

Um obrigado enorme à Professora Doutora Alexandra Maia e Silva, por toda a disponibilidade e por todo o apoio prestado durante a realização deste trabalho. Sem dúvida a melhor escolha que poderia ter feito e sem si não seria possível.

Obrigada ao Professor Doutor José Martins dos Santos e à Muy Nobre Academia Egas Moniz, que me proporcionou os melhores anos e me permitiu conhecer amigos que levo para a vida. Aos meus amigos que me acompanham desde os primeiros dias de faculdade, Pedro, Fábio, Diogo, Miguel e João, não são precisas palavras, obrigada por me mostrarem que amigos de faculdade são para sempre. Aos que não acompanharam desde o início, mas que provam todos os dias que a amizade verdadeira chega de onde menos se espera, quando menos se espera...Priscila, obrigado a ti por me mostrares que se vive um dia de cada vez e que a vida tem um significado muito maior que aquele que nós lhe damos. Obrigada Joana, por todo o apoio, em tudo, sem ti não seria possível nem era a mesma coisa. Obrigado também à Teresa por todos os momentos partilhados e um brinde aos que estão para vir. Márcia, Sandra, Tomás, João R, João C, Catarina, Samuel, Revis, Núria e a todos os outros amigos que não nomeei, mas eles sabem quem são, obrigado por se terem ido cruzando no meu caminho ao longo destes 5 anos. Aos meus amigos de infância outro obrigado. Obrigado à Sofia que durante 9 anos de amizade nunca me falhou. Por último, obrigado a todos aqueles que de algum modo contribuíram para a realização deste sonho.

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo .” – Fernando Pessoa

Resumo

Enquadramento: Os Micro RNAs, descobertos por *Lee et al* em 1993, têm vindo a evidenciar-se como potenciais biomarcadores de diagnóstico, de prognóstico e de alvos terapêuticos de diversas patologias. Como tal, a Oncologia, e o exemplo do Mieloma Múltiplo, não constituem exceção. Uma vez que no ramo da Oncologia ainda existem muitos mecanismos por identificar e por explicar, e sendo o cancro neste momento considerado como uma doença crónica, é cada vez mais importante existirem investigações a este nível para que, no futuro, a medicina molecular possa incluir as descobertas ao nível da genética molecular, nomeadamente dos Micro RNAs.

Objectivo: Esta monografia tem como objetivo fazer uma revisão de bibliografia atual, acerca do potencial dos Micro RNAs como biomarcadores no Mieloma Múltiplo ao nível do diagnóstico, prognóstico e da possível terapêutica.

Metodologia: A metodologia adotada nesta monografia tem por base uma pesquisa bibliográfica de artigos compreendidos maioritariamente entre os anos de 2012 e 2017, na base de dados *on-line PubMed*. As palavras-chave introduzidas foram: “*Multiple Myeloma*”, “*Micro RNAs*”, “*Micro RNAs and Multiple Myeloma*”, “*Blood Cancer*”, tendo estas sido cruzadas com “*diagnosis*”, “*prognosis*”, “*therapeutics*” e ainda “*Genetics modifications in Multiple Myeloma*”. Foram também utilizados dados de publicações retiradas do *site* da Direção Geral de Saúde (DGS) e da Sociedade Americana de Hematologia. Para explicação e melhor compreensão da doença, recorreu-se como fonte de informação às obras “*Harrison’s – Hematology and Oncology, Longo, Dan, 2010*” e “*Hematology – Clinical Principles and Applications, Rodak, Bernadette et al, 2012*”. A gestão e organização das referências bibliográficas foram feitas com recurso ao programa *Mendeley Desktop®*, versão 1.17.10.

Abstract

Framework: Micro RNAs, discovered by *Lee et al* in 1993, have been shown to be potential biomarkers for diagnosis, prognosis and therapeutic targets for several pathologies. As such, Oncology, and the example of Multiple Myeloma, are not an exception. Since, in the field of Oncology there are many mechanisms to discover and explain, and seeing that cancer is treated as a chronic disease, it is increasingly important to have research at this level so that in the future of molecular medicine it is possible to include discoveries at the field of molecular genetics, namely Micro RNAs.

Aim: The principal goal of this monograph is to review current bibliography about the potential of Micro RNAs as biomarkers in Multiple Myeloma in the field of diagnosis, prognosis and possible therapeutics.

Methods: The methodology adopted in this monograph is based on a bibliographical research of articles mostly comprised between the years of 2012 and 2017, in the online database *PubMed*. The keywords introduced were: "*Multiple Myeloma*", "*Micro RNAs*", "*Micro RNAs and Multiple Myeloma*" and "*Blood Cancer*", which were crossed with "*diagnosis*", "*prognosis*", "*therapeutics*" and "*Genetics modifications in Multiple Myeloma*". Data from publications taken from the DGS website and from the American Society of Hematology were also used. For the explanation and better understanding of the disease, two books were used, the "*Harrison's – Hematology and Oncology, Longo, Dan, 2010*" and "*Hematology – Clinical Principles and Applications, Rodak, Bernadette et al, 2012*". The management and organization of bibliographic references were done using the *Mendeley Desktop*® program, version 1.17.10.

Índice Geral

Resumo	1
Abstract.....	3
Metodologia de Pesquisa	13
1. Introdução Geral	15
2. Neoplasias Hematológicas.....	17
2.1 Leucemia.....	18
2.2 Linfoma.....	19
2.3 Mieloma Múltiplo	20
3. O que é o Mieloma Múltiplo?	21
3.1 Etiologia.....	21
3.2 Incidência e Prevalência	22
3.3 Patogénese e Manifestações Clínicas Principais	23
3.3.1 Complicações Ósseas	23
3.3.2 Suscetibilidade a Infecções Bacterianas.....	25
3.3.3 Falência Renal	26
3.3.4 Anemia	27
3.3.5 Sintomas Neurológicos	28
3.4 Diagnóstico	30
3.5 Estadiamento e Prognóstico.....	31
3.6 Tratamento Actual	33
4. Micro RNAs no Mieloma Múltiplo	37
4.1 O que são os Micro RNAs?	37
4.2 Alterações genéticas no Mieloma Múltiplo	39

4.3 Micro RNAs como Oncogenes e Supressores de Tumor no Mieloma Múltiplo	43
4.4 Micro RNAs como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico do Mieloma Múltiplo.....	45
4.5 Micro RNAs como Terapêutica Inovadora no Mieloma Múltiplo.....	47
5. Conclusão	51
6. Perspectivas Futuras	53
7. Bibliografia.....	55

Índice de Figuras

Figura 1 - Gráfico da Evolução da Taxa de Incidência de Tumores Malignos em Portugal (Retirado de Miranda <i>et al</i> , 2016, “Doenças Oncológicas em números”, DGS).	15
Figura 2 - Mieloma Múltiplo (medula óssea) (Retirado de Longo, 2010)	21
Figura 3 - Patogénese do MM (Adaptado de Longo, 2010).	24
Figura 4 – Lesões ósseas no MM (Retirado de Longo, 2010).	25
Figura 5 - Esquema da via de formação dos MicroRNA (Adaptado de Ahmad <i>et al</i> , 2013).	38
Figura 6 – Iniciação e Progressão do Mieloma Múltiplo (Adaptado de Prideaux <i>et al</i> , 2014).	40
Figura 7 – Principais translocações cromossomais no Mieloma Múltiplo (Retidado de Prideaux <i>et al</i> , 2014).	41
Figura 8 - PRC2 reprime a expressão de microRNAs supressores de tumor no mieloma múltiplo (Adaptado de Hall <i>et al</i> , 2017).	44
Figura 9 - Modulação directa dos miRNA do microambiente da medula óssea relacionado ao MM (Adaptado de Rossi <i>et al</i> , 2015).	49

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Tabela Resumo da Patogénese e Manifestações Clínicas Principais no Mieloma Múltiplo (Adaptado de <i>Longo</i> , 2010”)	28
Tabela 2 - Sistema de Estadiamento de Durie-Salmon (Adaptado de <i>Pingali et al</i>)	31
Tabela 3 – Sistema Internacional de Estadiamento do Mieloma Múltiplo (Adaptado de <i>Pingali et al</i>)	32

Lista de Siglas e Abreviaturas

AINE – Anti-inflamatório não esteróide

AVC – Acidente vascular cerebral

BMSC – Células estromais da medula óssea (do Inglês *Bone Marrow Stromal Cell*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do Inglês *Deoxyribonucleic acid*)

EZH2 – Potenciador da sub-unidade enzimática do zeste homólogo 2 (do Inglês *Enzymatic subunit enhancer of zeste homolog 2*)

FDA – *Food and Drug Administration*

FLCA – Ensaio de Cadeias Leves Livres (do Inglês *Free Light Chain Assay*)

GTP – Guanina tri-fosfato

GWAS – *Genome-Wide Association Studies*

H3K27me – tri-metilação do resíduo 27 de lisina da histona H3 (do Inglês *tri-methylation of histone H3 lysine residue 27*)

Ig – Imunoglobulina

IMMEnSE – *International Multiple Myeloma rESEarch*

MGUS – Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (do Inglês *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*)

miRNA/ miR – Micro RNA

MM – Mieloma Múltiplo

mRNA – RNA mensageiro

PC – Células Plasmáticas Clonais/Plasmócitos Clonais

PCL – Leucemia das Células Plasmáticas (do Inglês *Plasma Cell Leukemia*)

PEM – Plasmocitoma Extra Medular

Pol II – RNA Polimerase II

Pol III – RNA Polimerase III

POS – Plasmocitoma Ósseo Solitário

PRC2 – Complexo repressivo *Polycomb* (do Inglês *Polycomb repressive Complex*)

pri-miRNA – Micro RNA primário

RISC – Complexo repressor induzido por RNA (do Inglês *RNA induced silencing complex*)

RNA – Ácido Ribonucleico

rRNA – RNA ribossômico/ribossômico

SMM – Mieloma Múltiplo Latente (do Inglês *Smoldering Multiple Myeloma*)

SNP – Polimorfismo de Nucleótido Único (do Inglês *Single Nucleotid Polymorphism*)

SPE – Eletroforese de Proteína Sérica (do Inglês *Serum Protein Electrophoresis*)

TRBP – Transativador da proteína de ligação do RNA (do Inglês “*Transactivating RNA biding protein*”)

TS-miRNAs – Micro RNAs supressores e tumores (do Inglês *Tumor Supressors Micro RNAs*)

UPE – Electroforese de Proteína de Urina (do Inglês *Urine Protein Eletrophoresis*)

VAD – Regime terapêutico de Vincristina, Doxorrubicina e Dexametasona

Metodologia de Pesquisa

Esta monografia tem por base uma pesquisa bibliográfica, apoiada em artigos científicos compreendidos maioritariamente entre os anos de 2012 e 2017. Foram utilizados alguns artigos mais antigos, mas nunca mais antigos que o ano de 2002.

A metodologia adotada para a pesquisa dos artigos científicos consistiu na utilização de termos como “*Multiple Myeloma*”, “*Micro RNAs*”, “*Micro RNAs and Multiple Myeloma*” e “*Blood Cancer*”, tendo estas sido cruzadas com “*diagnosis*”, “*prognosis*” e “*therapeutics*” e ainda “*Genetics modifications in Multiple Myeloma*, na base de dados *PubMed*, disponível *on-line*.

Foram ainda usados dados da Direção Geral de Saúde (DGS) e informação retirada do site da Sociedade Americana de Hematologia.

Foi usada também informação teórica cujas fontes foram as obras “*Harrison’s – Hematology and Oncology, Longo, Dan, 2010*” e “*Hematology – Clinical Principles and Applications, Rodak, Bernadette et al, 2012*”.

Para organização, gestão e inserção de referências bibliográficas foi utilizado o programa *Mendeley Desktop*®, versão 1.17.10.

1. Introdução Geral

A esperança média de vida da população portuguesa tem vindo a aumentar com o passar dos anos. Os estilos de vida têm vindo a sofrer alterações ao longo dos tempos, e o número de técnicas de diagnóstico disponíveis também aumentou, podendo relacionar-se com o aumento do número de casos de cancro, em Portugal. Tal como previsto pela DGS, a taxa de incidência de tumores malignos tem vindo a aumentar no nosso país, sendo que entre 2009 e 2010 se observou um aumento de 4%, como se pode observar na Figura 1 (Miranda et al., 2016).

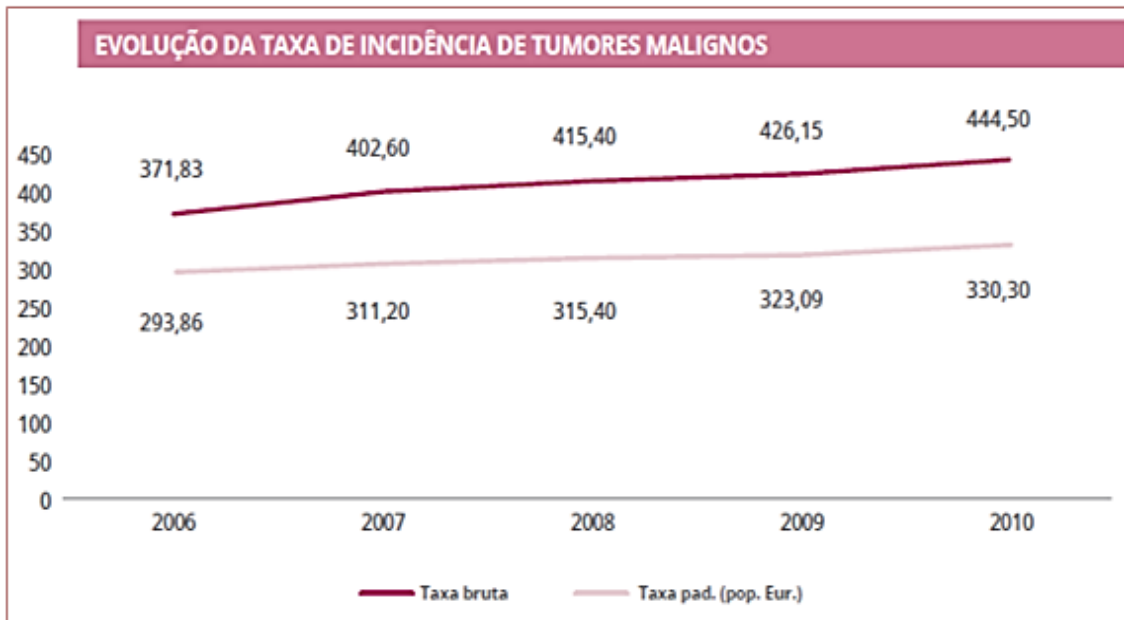


Figura 1 - Gráfico da Evolução da Taxa de Incidência de Tumores Malignos em Portugal (Miranda *et al.*, 2016, “Doenças Oncológicas em números”, DGS).

O cancro poderá vir a ser considerado uma doença crónica no futuro, necessitando de uma abordagem clínica ao nível de diversas especialidades, sendo necessária a intervenção de um programa político e social consistente que se estenda para além das estruturas da saúde (Miranda et al., 2016).

O Mieloma Múltiplo é uma neoplasia maligna que representa cerca de 10% de todas as neoplasias hematológicas (Liu et al., 2012; Rajkumar & Kumar, 2016) e que se caracteriza pela infiltração de células plasmáticas ao nível da medula óssea, com a produção da proteína M (uma imunoglobulina monoclonal - IgM), que pode ser detetada,

por sua vez, no sangue ou na urina (Martino *et al.*, 2011; Rajkumar & Kumar, 2016). O crescimento descontrolado destas células tem diferentes consequências, nomeadamente destruição do esqueleto, insuficiências a nível da medula óssea e dos rins e diminuição da produção de imunoglobulina normal, sendo que a maioria dos pacientes apresenta ainda anemia e/ou hipercalcemia (Bi & Chng, 2014; Martino *et al.*, 2011).

Este tipo de cancro é mais comum nas pessoas idosas, sendo raro aparecer antes dos 40 anos e desenvolve-se ainda com menor frequência em pessoas mais jovens (Martino, 2011). Previamente ao aparecimento do Mieloma Múltiplo, existe sempre um estado pré-maligno assintomático, mas com uma concentração significativa de proteína monoclonal, denominado de Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS – *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*), que pode progredir para Mieloma ou para outros cancros hematológicos, num rácio de 1% por ano (Bi & Chng, 2014; Ren *et al.*, 2017).

O diagnóstico e o tratamento para o Mieloma Múltiplo têm vindo a ser alterados ao longo da última década. Algumas das razões são a inclusão de novos medicamentos como o *carfilzomib* e o *daratumumab*, as revisões nos sistemas de estadiamento da doença e a descoberta de novos biomarcadores específicos (Rajkumar & Kumar, 2016).

Foi descoberta em 1993, uma classe de RNAs, os Micro RNAs (miRNAs) que funcionam como reguladores da expressão genética de centenas de proteínas em diferentes processos fisiológicos (Pogribny, 2017). Estes são pequenos RNAs não codificantes, constituídos aproximadamente por 22 nucleótidos, que regulam a expressão genética, afetando quase todos os mecanismos celulares, desde o desenvolvimento até à oncogénese (Ameres & Zamore, 2013; Graves & Zeng, 2012). Os miRNAs têm vindo a demonstrar-se como potenciais biomarcadores não invasivos para diagnóstico e prognóstico de diversas doenças, nomeadamente doenças oncológicas (Pogribny, 2017).

2. Neoplasias Hematológicas

Os cânceros hematológicos caracterizam-se por afetarem a função das células sanguíneas, sendo que a maioria tem a sua fase inicial na medula óssea. As células-tronco diferenciam-se em três tipos de células sanguíneas: glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas (American Society of Hematology, s.d.).

Na maioria das neoplasias, esta diferenciação celular é interrompida ou alterada devido ao crescimento descontrolado de células cancerígenas, o que tem como consequência a perda das funções celulares normais, tais como defesa contra infecções ou mesmo a coagulação sanguínea (American Society of Hematology, s.d.).

As neoplasias hematológicas têm sido alvo de estudos, para que seja possível esclarecer quais os mecanismos inerentes ao seu aparecimento. Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs novas classificações para quase todos os tumores de tecidos linfóides e hematopoiéticos, que foram posteriormente atualizadas em 2008 (Campo et al., 2011; Rodak, Bernadette F., Fritsma, George A., Keohane, 2012).

As alterações genéticas encontradas na maioria das neoplasias hematológicas são translocações cromossômicas que envolvem oncogenes causadores de mutações cancerígenas, fazendo com que a célula normal expresse um fenótipo maligno. Além de oncogenes, também já é conhecida uma quantidade considerável de genes supressores de tumores, que já foram associados à predisposição genética de um indivíduo para determinado tipo de neoplasia. Temos como exemplo mutações do gene p53 presentes na maioria dos cânceros, incluindo os hematológicos, como é o caso da Leucemia Mielóide Aguda. Assim, é atualmente reconhecido que a formação de oncogenes e/ou inibição dos genes supressores de tumores levam a consequências moleculares ao nível dos tecidos hematológicos (Rodak *et al.*, 2012).

Além dos oncogenes e genes supressores de tumores envolvidos no processo da carcinogênese (não só nas neoplasias hematológicas mas também noutros tipos de cancro), existem outros mecanismos genéticos associados ao desenvolvimento da neoplasia, como mecanismos inerentes à reparação do DNA entre outro tipo de alterações genéticas, que foram possíveis identificar devido ao avanço exponencial da biologia molecular nas três últimas décadas (Rodak *et al.*, 2012; Kuehl & Bergsagel, 2002).

O diagnóstico é feito através de critérios laboratoriais, morfológicos e clínicos, existindo critérios específicos para as diferentes neoplasias (Rodak *et al.*, 2012).

Na maioria dos casos, estas neoplasias permanecem sem cura, existindo uma possível remissão da doença. A terapia passa então pela quimioterapia, radioterapia, transplantes de células tronco da medula óssea e terapia de suporte para as manifestações clínicas da doença e efeitos secundários dos próprios fármacos (Rodak *et al.*, 2012; Minjie Gao, Yuanyuan Kong, Guang Yang, 2017).

Faz-se então em seguida um pequeno enquadramento dos três principais tipos de neoplasias hematológicas.

2.1 Leucemia

A Leucemia é um tipo de cancro do sangue, onde existe uma produção anormal de glóbulos brancos, que têm as suas funções alteradas, pelo que não conseguem desempenhar corretamente as suas funções ao nível do sistema imunitário, combatendo os microrganismos e infeções e ainda, impossibilitando a medula óssea de produzir glóbulos vermelhos e plaquetas (American Society of Hematology, s.d.).

Existem diferentes tipos de Leucemias, nomeadamente a Leucemia Mielóide Aguda, Leucemia Mielóide Crónica, Leucemia Neutrofílica Crónica, Leucemia Eosinofílica Crónica, entre outras, dependendo do tipo de célula onde a mesma é manifestada e do grau dessa manifestação (Rodak *et al.*, 2012).

A Leucemia Mielóide Crónica representa cerca de 20% de todas as neoplasias hematológicas, iniciando-se com um quadro clínico crónico que progride para uma fase mais agressiva num espaço de três a quatro anos, terminando geralmente, numa Leucemia Aguda, se não for previamente diagnosticada e tratada (Rodak *et al.*, 2012).

Dentro das Leucemias Agudas destacamos dois tipos, a Leucemia Linfoblástica Aguda, que corresponde a aproximadamente 25% de todos os casos de cancro ocorridos na infância e a Leucemia Mielóide Aguda, que é o tipo de Leucemia com maior incidência em bebés com menos de 1 ano de idade e é também o tipo de Leucemia mais comum nos adultos (Rodak *et al.*, 2012; Egan *et al.*, 2012).

Os sintomas mais frequentes das Leucemias incluem infecções frequentes, anemia, hemorragias e esplenomegalia, em consequência da acumulação patológica de células precursoras mielóides na medula óssea, sangue e tecidos extra medulares (Rodak *et al.*, 2012).

2.2 Linfoma

Os Linfomas são também um tipo de cancro do sangue, mas que, em vez da medula óssea, afetam o sistema linfático. O sistema linfático e os seus órgãos constituintes possuem a função de remover o excesso de fluídos do nosso organismo, sendo que os órgãos linfáticos funcionam como locais de reconhecimento dos antigénios para produção de células do sistema imunitário, os linfócitos, que medeiam a resposta imunitária primária. Linfócitos anormais tornam-se células do linfoma, que se multiplicam e acumulam nos nódulos linfáticos e outros tecidos do nosso organismo, o que com o passar do tempo vai prejudicando cada vez mais a função normal do sistema imunitário (American Society of Hematology, s.d.; Rodak *et al.*, 2012).

O diagnóstico dos diferentes tipos de Linfoma é feito através da análise da sua morfologia, fenótipo imunitário, genética molecular e características clínicas. Podem ser destacados três principais tipos de Linfomas: Linfoma de Hodgkin, Linfoma de Células B e Linfoma de Células T, cada um deles divididos em vários subtipos. Os dois últimos são também considerados Linfomas de não-Hodgkin (Campo *et al.*, 2011; Faria, Silva, & Español, 2004).

A maior incidência dos Linfomas é nos idosos, salvo a exceção dos Linfomas de Hodgkin, que têm uma incidência superior na faixa etária dos 15 aos 35 anos (Rodak *et al.*, 2012).

O maior fator de risco conhecido para o desenvolvimento de desordens linfoproliferativas é a existência de alteração da resposta imunitária em pacientes imunossuprimidos devido a doenças auto imunes (Rodak *et al.*, 2012).

2.3 Mieloma Múltiplo

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia do sangue que afeta as células do plasma, os plasmócitos. Os plasmócitos são também glóbulos brancos, que têm como função a produção de anticorpos para defender o organismo dos microrganismos portadores de antígenos. Assim, as células de Mieloma Múltiplo impedem a produção normal de anticorpos, pelo que o doente está muito mais sujeito a contrair infeções devido ao sistema imunitário se encontrar debilitado (American Society of Hematology, s.d.).

Com a introdução de novos medicamentos, como os inibidores dos proteossomas e imunomoduladores, a taxa de resposta e de sobrevivência em pacientes com Mieloma Múltiplo aumentou, no entanto, apesar dos avanços neste âmbito, esta é uma doença que ainda permanece incurável (Cavo et al., 2010).

As células-tronco cancerígenas são vistas atualmente como as principais responsáveis pela recorrência do tumor. Estas foram descobertas antes de 1997, no entanto, só posteriormente foram completamente definidas e descritas por *Bonnet et al.*, que observaram que uma rara população de CD34+CD38- poderia ter potencial cancerígeno na Leucemia Mielóide Aguda (Minjie Gao et al., 2017). Posteriormente, as células-tronco foram então identificadas noutros tumores sólidos e do sangue, nomeadamente no Mieloma Múltiplo (Minjie Gao et al., 2017; Vaiopoulos, Kostakis, Koutsilieris, & Papavassiliou, 2012).

Esta neoplasia hematológica irá ser mais aprofundada nas páginas seguintes.

3. O que é o Mieloma Múltiplo?

3.1 Etiologia

O Mieloma Múltiplo é um tipo de cancro hematológico, sem cura, que se caracteriza pela proliferação de células plasmáticas clonais na medula óssea, resultando na secreção de imunoglobulinas monoclonais (Kapoor *et al.*, 2010; Minjie Gao *et al.*, 2017). Observando a Figura 2 consegue perceber-se algumas características das células malignas do Mieloma Múltiplo na medula óssea, nomeadamente a presença de dois ou mais núcleos e a excentricidade dos mesmos.

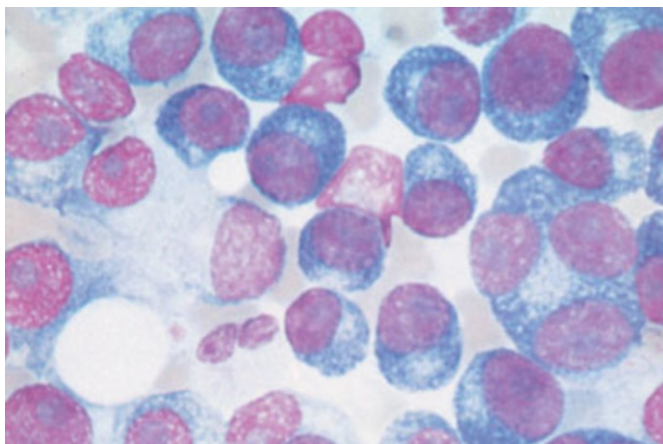


Figura 2 - Mieloma Múltiplo (medula óssea): As células possuem características morfológicas das células plasmáticas, sendo redondas ou ovais, possuindo um núcleo excêntrico com cromatina densa e um citoplasma basófilo. Existe uma zona “limpa” (hof), que contém o complexo de golgi. Podem ser observadas células plasmáticas malignas com 2 ou mais núcleos
(Retirado de Longo, 2010).

A causa para o aparecimento do Mieloma Múltiplo ainda não é conhecida. Foram encontradas variações monoclonais em pacientes com esta doença, como deleções 13q14 e 17p13 e anomalias 11q (as mais predominantes). As translocações mais comuns são t(11;14)(q13;q32) e t(4;14)(p16;q32) (Barnett *et al.*, 2010; Neben *et al.*, 2010). No entanto, existem fortes evidências de que erros na recombinação genética (*switch recombination*) - mecanismo genético que altera o isótopo de cadeia pesada do anticorpo - contribuem para a transformação deste mecanismo. Em certos casos foram também

encontradas mutações nos genes *ras* ou *myc* e ainda mutações nos genes *p53* e *Rb-1*, sendo estas duas últimas menos frequentes (Longo, 2010; Mikhael *et al.*, 2013).

Esta neoplasia tem vindo a mostrar-se com maior incidência em agricultores, camponeses, pessoas que trabalham com peles de animais e ainda em indivíduos que trabalham com produtos petrolíferos (Longo, 2010).

3.2 Incidência e Prevalência

Em 2008, foram diagnosticados cerca de 20 000 casos de Mieloma Múltiplo, nos Estados Unidos da América (Saad, Sharma, & Higa, 2009).

Este é o segundo tipo de cancro do sangue mais comum nos Estados Unidos, com uma incidência de aproximadamente de 4 por 100 000 habitantes por ano, sendo muito semelhante no mundo inteiro (Minjie Gao *et al.*, 2017).

Globalmente, a incidência desta neoplasia aumenta com a idade e a idade média estimada no diagnóstico é cerca de 68 anos, sendo pouco comum aparecer antes dos 40 anos. O Mieloma Múltiplo afeta mais homens do que mulheres, e os indivíduos de raça negra padecem desta neoplasia aproximadamente 2 vezes mais que os caucasianos. Os indivíduos asiáticos são os que apresentam menor incidência do MM (Liu *et al.*, 2012; Martino *et al.*, 2011).

Em termos globais, o Mieloma Múltiplo representa cerca de 1% de todos os cancros nos indivíduos caucasianos, 2% nos de raça negra e em termos de neoplasias hematológicas, 13% nos caucasianos e 33% nos negros (Hungria, Maiolino, Almeida, & Crusoé, 2013).

Etnograficamente, a incidência é mais elevada em Afro-Americanos e indivíduos nativos das Ilhas do Pacífico, seguido da Europa e dos Norte-Americanos de raça branca, sendo que onde existe a menor incidência é nos países em vias de desenvolvimento, nomeadamente os do continente Asiático. (Hungria *et al.*, 2013; Longo, 2010). Esta maior prevalência nos países desenvolvidos pode estar relacionada com o aumento da esperança

média de vida, bem como com o aumento da vigilância médica, que permite o seu diagnóstico precoce.

Apesar destas diferenças na prevalência, as características da doença, o seu prognóstico e evolução e as respostas à terapêutica são semelhantes em termos globais (Longo, 2010).

3.3 Patogénese e Manifestações Clínicas Principais

3.3.1 Complicações Ósseas

As células do Mieloma Múltiplo ligam-se às células estromais da medula óssea (BMSCs) e à matriz extracelular através de moléculas de adesão. Este mecanismo pode ser observado na Figura 3 e relaciona-se com o crescimento das células de MM, com a resistência à terapêutica e com a migração destas células para o centro da medula óssea (Longo, 2010).

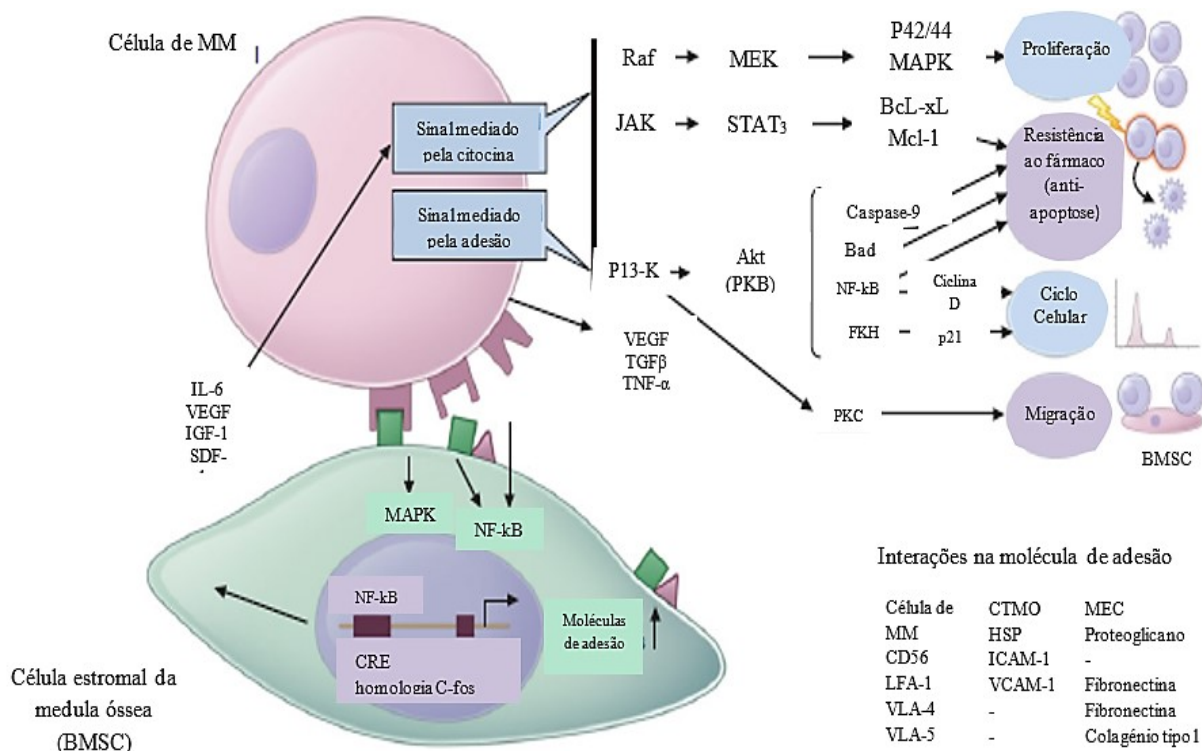


Figura 3 - Patogénese do MM: As células de MM interagem com as células estromais da medula óssea e com as proteínas da matriz extracelular via moléculas de adesão, desencadeando a produção de citocinas que permitem o crescimento, sobrevivência e efeitos anti apoptóticos, bem como o desenvolvimento de resistências aos fármacos (Adaptado de Longo, 2010).

A dor nos ossos afeta aproximadamente 70% dos indivíduos com MM e é o sintoma mais comum desta doença. A dor é manifestada geralmente nas costas e nas costelas, estando relacionada com o movimento (ao contrário do que acontece com a dor de um carcinoma metastásico, que normalmente piora à noite). Uma dor persistente num doente de MM pode significar uma fratura. As lesões no osso são provocadas pela proliferação de células tumorais, que ativam os osteoclastos, que por sua vez vão destruir o osso e suprimir a função dos osteoblastos, impedindo assim, a renovação do mesmo (Liu *et al.*, 2012; Longo, 2010).

A destruição óssea resulta de uma mobilização substancial de cálcio a partir do osso e de graves complicações de hipercalcémia, que podem ser dominantes num quadro clínico de MM. As lesões ósseas localizadas podem tornar-se, com a evolução da doença, lesões palpáveis, especialmente no crânio, como mostra a Figura 4, clavículas e esterno,

sendo que fraturas das vértebras podem levar à compressão da medula espinal (Saad *et al.*, 2009).



Figura 4 – Lesões ósseas no MM: Lesões ósseas no crânio características de doente com MM. A lesão representa uma atividade osteolítica com pouca ou nenhuma atividade osteoblástica (Retirado de Longo, 2010).

3.3.2 Suscetibilidade a Infeções Bacterianas

Um dos problemas mais comuns associados ao MM é o facto de os pacientes se encontrarem mais suscetíveis (em relação a um indivíduo saudável), a infeções bacterianas. As mais comuns nestes doentes são bactérias causadoras de pneumonias e pielonefrites, como os *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* ao nível dos pulmões e vias respiratórias e bactérias gram negativas como a *Escherichia coli* no trato urinário. Em aproximadamente 25% dos pacientes observam-se infeções recorrentes e em mais de 75% existe pelo menos uma infeção grave (Longo, 2010; O'Brien, Blijlevens, Mahfouz & Anaissie, 2003).

Isto acontece por diversas razões, uma delas é o facto de pacientes de Mieloma terem hipogamaglobulinémia (excluindo a IgM), que se relaciona com a menor produção de anticorpos e a sua destruição, havendo um défice nas defesas do organismo do doente (Faria, Silva, & Español, 2004).

No caso do MM de Imunoglobulinas G (IgG), as IgG normais são destruídas mais rapidamente que o normal, pelo facto de a taxa catabólica de anticorpos IgG ser

diretamente proporcional à concentração sérica das mesmas (Zhou, Pop, & Ghetie, 2005). Além disso, a presença de grandes concentrações de IgM aumenta a taxa catabólica para valores entre os 8% e os 16%, em vez dos normais 2%, o que resulta numa resposta imunitária fraca, especialmente a microrganismos com antigénios polissacáridos na sua constituição, como os das paredes celulares das bactérias (Longo, 2010).

O facto de serem usados fármacos corticosteróides como a *dexametasona*, como adjuvantes na terapêutica, também suprime a resposta imunitária e aumenta a probabilidade de infeção (De Mel *et al.*, 2017).

A vacinação contra a gripe e contra o *pneumococcus* é necessária nestes doentes, visto que constituem um grupo de risco, por estarem imunossuprimidos. Devem ser feitas análises periódicas de forma a diagnosticar precocemente uma possível infeção e advertir os doentes de MM a evitarem comportamentos de risco, como por exemplo, evitar o contacto direto com pessoas que possam estar infetadas com este tipo de bactérias e vírus, visto que doentes de MM estão mais suscetíveis. Podem e devem fazer um aporte periódico de Vitamina C e outros suplementos que ajudam a reforçar o sistema imunitário, mas sempre com aconselhamento médico, para que se evitem interações com fármacos e/ou contraindicações.

3.3.3 Falência Renal

A falência renal ocorre aproximadamente em 25% dos doentes de MM e em mais de metade ocorre algum tipo de problema ao nível dos rins. A hipercalcémia é um dos principais fatores para tal acontecer (Nuevo-González, 2009). Destacam-se ainda o uso frequente de fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) usados no controlo da dor, o uso de corantes de contraste iodados nos exames de imagiologia a que os doentes têm periodicamente de ser sujeitos, o uso de bifosfonatos para tratamento ou prevenção a nível ósseo e ainda infiltrações renais ocasionais de células de Mieloma (Longo, 2010; Yachoui, 2016).

Outro motivo de falência renal que se encontra presente em muitos casos de MM relaciona-se com a excreção renal de cadeias leves, que provoca danos nos túbulos renais. Normalmente, estas cadeias leves são filtradas e reabsorvidas nos rins, no entanto, no

MM existe um aumento destas cadeias, o que faz com que exista uma acumulação destas proteínas no nefrónio, havendo toxicidade direta, ou indireta, sendo esta última causada pela libertação de enzimas lisossomais. A primeira manifestação deste tipo de toxicidade é a Síndrome de Fanconi, caracterizada por uma acidose tubular, com perda de glucose e aminoácidos (Dimopoulos, Kastritis, Rosinol, Bladé, & Ludwig, 2008).

Pacientes com MM sofrem de retenção do ião cloreto, porque a IgM é catiónica. Este fenómeno é, geralmente, acompanhado de um quadro de hiponatremia, visto que com o aumento da IgM, a proporção de água diminui. Além disto, doentes de MM tendem a desenvolver insuficiência renal crónica, quando desidratados (Longo, 2010).

É necessário que estes doentes estejam informados acerca destas possíveis complicações, advertindo-os para a necessidade de hidratação diária através da ingestão de líquidos, de forma a contrariar a diminuição da proporção de água nos nefrónios. Além disso, como já foi referido anteriormente, a incidência do MM é superior nos idosos, sendo que este grupo está também mais suscetível à desidratação. É importante existir vigilância médica regular, com monitorização através de análises à urina, para que se consiga diagnosticar precocemente uma possível falência a nível renal.

3.3.4 Anemia

A anemia é uma das manifestações clínicas mais comuns num quadro de MM. Pode ser normocítica ou normocrómica e manifesta-se em cerca de 80% dos doentes. O facto de a anemia estar presente com tanta frequência relaciona-se com a existência de uma substituição ao nível da medula óssea, de células ditas normais, por células tumorais e ainda pelo facto de existir uma inibição da hematopoiese por fatores tumorais (De Mel *et al.*, 2017; Pacca, Silva, Souza, & Carbinatto, 2017).

Existe também uma fração razoável de indivíduos com MM que apresentam anemia megaloblástica devido a uma deficiência em folatos e vitamina B12 (Priyankara & Gunawardena, 2013).

As hemácias são, de facto, células muito afetadas por esta doença, no entanto, também podemos salientar anormalidades na coagulação devido à redução de plaquetas e anticorpos, que nem sempre estão totalmente diferenciados e especializados devido à

própria doença, ou ainda o facto de existir interação entre a IgM e os fatores de coagulação I, II, V, VII ou VIII (Pingali, Haddad, & Saad, 2012).

Em relação à anemia não pode ser feito muito, pois estes doentes, normalmente, padecem desta complicação, tal como já foi referido anteriormente, devido à própria doença, sendo muito complicado reverter por completo a anemia. No entanto, é importante uma alimentação rica em ferro e folatos (ex: vegetais de folha verde como a couve verde, bróculos e couve bruxelas, fígado e carnes vermelhas) para que seja feito regularmente o aporte destas vitaminas, evitando assim, um défice nestes componentes, que poderá ajudar a contrariar a anemia, ou pelo menos não obter valores tão baixos no hemograma.

3.3.5 Sintomas Neurológicos

Os sintomas a nível neurológico ocorrem, felizmente, numa minoria de doentes de MM, e são explicados com base em outros sintomas já descritos anteriormente.

A hipercalcémia pode provocar fraqueza, letargia, confusão e elevação da pressão arterial no doente, podendo ser considerada uma urgência médica em casos mais graves (Nuevo-González, 2009). Por sua vez, a hiperviscosidade do sangue provoca fadiga, enxaqueca, retinopatias e alguns distúrbios da visão (Meier & Burton, 2014).

A lesão óssea e a sua fratura podem provocar compressão ao nível da medula espinal e provocar dor radicular, sendo que em última análise o doente pode perder o controlo da bexiga e do intestino (Terpos, Christoulas, & Gavriatopoulou, 2017).

Existe também a possibilidade de infiltração dos nervos periféricos por plasmócitos, que podem causar patologias como a síndrome do canal cárpico entre outras neuropatias. Sendo ainda de salientar que a *talidomida* e o *bortezomib* (ambos fármacos usados no tratamento de MM) podem ter efeitos neuropáticos, sendo necessário vigiar o doente (Banach, Juranek, & Zygulska, 2017).

A tabela seguinte relaciona de forma resumida as manifestações clínicas referidas anteriormente com as respetivas causas subjacentes.

Tabela 1 - Tabela Resumo da Patogénese e Manifestações Clínicas Principais no Mieloma Múltiplo
(Adaptado de Longo, 2010).

Patogénese e Manifestações Clínicas principais no MM	
Evidência Clínica	Causa subjacente
Hipercalemia, Osteoporose, Fraturas patológicas, Lise óssea, Dor óssea	<ul style="list-style-type: none"> ○ Expansão do tumor; ○ Produção do fator de ativação dos osteoclastos pelas células tumorais; ○ Inibição osteoblástica.
Falência Renal	<ul style="list-style-type: none"> ○ Hipercalemia; ○ Deposição das cadeias leves nos túbulos; ○ Amiloidose; ○ Toxicidade iatrogénica (AINEs, bifosfonatos e agentes de contraste).
Anemia (cansaço fácil)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Infiltração da Medula Óssea; ○ Produção de fatores inibitórios; ○ Hemólise; ○ Diminuição da produção de hemácias; ○ Diminuição dos níveis de eritropoetina.
Suscetibilidade/Recorrência de infeções	<ul style="list-style-type: none"> ○ Hipogamaglobulinémia; ○ Baixa contagem de CD4+; ○ Diminuição da migração dos neutrófilos.
Sintomas Neurológicos	<ul style="list-style-type: none"> ○ Hiperviscosidade do sangue; ○ Crioglobulinémia; ○ Depósitos amiloides; ○ Hipercalemia; ○ Compressão dos nervos; ○ Antígenos antineuronais; ○ Síndrome de POEMS; ○ Toxicidade neurológica relacionada com medicação (<i>talidomida</i> e <i>bortezomib</i>).
Náuseas/vómitos	<ul style="list-style-type: none"> ○ Falência renal; ○ Hipercalemia; ○ Medicação.
Hemorragia/coagulação	<ul style="list-style-type: none"> ○ Interferência com fatores de coagulação; ○ Disfunção plaquetária.

3.4 Diagnóstico

No MM existem três fatores que estão sempre presentes: IgM no plasma ou urina, plasmocitose da medula óssea e lesões líticas nos ossos do doente (Longo, 2010).

O diagnóstico diferencial mais importante em indivíduos com Mieloma é a separação entre doentes de MM e doentes com Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS). O MGUS é mais comum que o Mieloma, manifestando-se em cerca de 1% da população acima dos 50 anos e em aproximadamente 10% nos indivíduos acima dos 75 anos de idade (Kyle et al., 2006; Longo, 2010).

Acompanhando os doentes a longo prazo, observa-se que cerca de 1% de indivíduos com MGUS desenvolvem Mieloma (Kyle & Rajkumar, 2008), sendo que o subtipo não IgG com uma proporção anormal de cadeias leves livres kappa/lambda e a IgM plasmática acima dos 1.5g/dl está associado a uma maior risco de progressão de MGUS para MM. Doentes com MGUS são assintomáticos e não necessitam, normalmente, de terapia. Estudos apontam que estes indivíduos têm aproximadamente 2 anos de esperança média de vida a menos comparativamente com indivíduos sem MGUS (Longo, 2010).

Existem ainda duas variantes importantes que é necessário ter em consideração: o Plasmocitoma Ósseo Solitário (POS) e o Plasmocitoma Extra Medular (PEM). O POS consiste numa única lesão lítica ao nível dos ossos sem haver plasmocitose da medula óssea, enquanto que o PEM envolve geralmente o tecido linfóide da submucosa da nasofaringe e seios paranasais e também sem plasmocitose da medula óssea. Ambos os tumores respondem efetivamente a uma radioterapia localizada e caso se encontre presente a IgM ela tende a desaparecer após o tratamento. No entanto, é necessário vigiar o doente, pois o POS pode voltar a reincidir noutros locais ósseos e até mesmo evoluir para MM; já o PEM tem pouca probabilidade de reicidência e progressão (Longo, 2010; Pingali *et al.*, 2012).

Um dado importante para o diagnóstico de MM é então a presença da IgM, observada na Electroforese de Proteína Sérica (SPE), que implica a clonalidade das Células Plasmáticas Clonais (PC) em proliferação. O diagnóstico do MM é então realizado através da presença de IgM igual ou superior a 3g/dl e de níveis de plasmocitose igual ou superior a 10% da medula óssea (Pingali *et al.*, 2012).

Se houver suspeita de MM, é aconselhado fazer-se o seguinte: hemograma completo; avaliar a taxa de sedimentação dos eritrócitos e se a Proteína C reactiva está elevada; Electroforese de Proteína da Urina de 24 horas (UPE); SPE com imunofixação; Ensaio de Cadeia Livre Livre (FLCA); medição dos níveis séricos de albumina e da microglobulina β -2; medição das imunoglobulinas séricas; avaliações do esqueleto com auxílio de técnicas de imagiologia e biópsia e aspirado à medula óssea, para a confirmação da neoplasia (Dupire *et al.*, 2012; Pingali *et al.*, 2012; Zahlten-Hinguranage *et al.*, 2006).

3.5 Estadiamento e Prognóstico

Uma vez diagnosticado Mieloma Múltiplo no doente, é necessário averiguar a atividade da doença. O Mieloma ativo pode ser classificado segundo 2 sistemas de estadiamento: Sistema de Estadiamento de *Durie-Salmon* e o adaptado mais recentemente, o Sistema Internacional de Estadiamento (Rajkumar, 2012).

O primeiro sistema referido tem como critérios os graus de anemia e disfunção renal, os níveis de cálcio e a extensão de osso envolvida, de acordo com a Tabela 2, que se segue (Pingali *et al.*, 2012; Rajkumar, 2012).

Tabela 2 - Sistema de Estadiamento de *Durie-Salmon* do Mieloma Múltiplo
(Adaptado de Pingali *et al.*, 2012).

Sistema de Estadiamento de Durie-Salmon	
Estádio I	(todos os seguintes factores)
Cálcio	<12 mg/Dl
Hemoglobina	>10g/Dl
IgM	IgG <5 g/dL ; IgA <3 g/Dl
Lise Óssea	Inexistente
Estádio II	Não cumpre os critérios nem do Estádio I nem do Estádio III
Estádio III	(um ou mais dos seguintes factores)
Cálcio	>12 mg/Dl
Hemoglobina	<10 g/Dl
IgM	IgG: >7 g/dL ; IgA: >5 g/Dl
Lise Óssea	Múltiplas lesões
Classifica-se ainda em Estadio A se a creatinina for <2 mg/dL e Estádio B se for >2 mg/Dl	

Por sua vez, o Sistema Internacional de Estadiamento do Mieloma Múltiplo tem por base apenas a análise dos níveis séricos da microglobulina β -2 e da albumina, segundo a Tabela 3. Sendo que para a doença se encontrar no Estádio I é necessário a presença dos dois fatores em análise (De Mel *et al.*, 2017; Pingali *et al.*, 2012).

Tabela 3 – Sistema Internacional de Estadiamento do Mieloma Múltiplo (Adaptado de Pingali *et al*)

Sistema Internacional de Estadiamento			
	Microglobulina β-2 sérica	Albumina sérica	Sobrevivência Média (anos)
Estádio I	$\leq 3,5$	$\geq 3,5$	5
Estádio II	Não cumpre os critérios nem do Estádio I nem do Estádio III		3,5
Estádio III	$\geq 5,5$		2,5

É de salientar que o prognóstico do MM não pode ser apenas baseado nestes fatores, sendo necessária uma análise citogenética do indivíduo portador da neoplasia, como por exemplo, translocações ao nível do *locus* da IgH no cromossoma 14, sendo estas muito comuns (Gutierrez, 2004).

O tempo de sobrevivência média dos doentes de MM é cerca de 5 a 6 anos, sendo que existem doentes que atingem mais de 10 anos de vida com MM (Munshi *et al.*, 2011). As maiores causas de morte destes doentes são a própria progressão do Mieloma, a falência renal, sépsis, ou Leucemia Aguda e/ou Mielodisplasia associadas à terapêutica. Aproximadamente um quarto dos pacientes morre devido a comorbilidades, associadas mais à própria idade do doente do que ao MM, como é o caso de enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC), doença pulmonar crónica (Longo, 2010).

Assim, é necessário antecipar complicações e instituir terapêutica de suporte o mais rápido possível.

3.6 Tratamento Atual

Cerca de 10% de doentes com MM apresentam uma progressão lenta da doença durante vários anos, necessitando apenas de realizar terapia anti tumoral quando a doença se apresenta sintomática, com desenvolvimento dos sintomas descritos anteriormente como a anemia, hipercalcemia e lise óssea progressiva (Longo, 2010).

Quando o MM se encontra em atividade a terapêutica divide-se em dois ramos. Por um lado controla-se a progressão da doença e por outro lado tratam-se os sintomas para prevenir e atrasar complicações inerentes a esta neoplasia, o que permite, geralmente, aumentar significativamente o tempo de sobrevida dos doentes e ainda melhorar consideravelmente a sua qualidade de vida (Hungria & Maiolino, 2007).

O tratamento padrão inicial depende se o doente é ou não candidato a quimioterapia de elevada dosagem com transplante de células-tronco autólogo, ou não. Se for este o caso, agentes quimioterapêuticos alquilantes devem ser evitados devido ao dano que provocam nas células-tronco, diminuindo a possibilidade da colheita das mesmas para o transplante (Longo, 2010).

Nestes doentes são então utilizados corticoesteróides em monoterapia de elevada dose (40mg por dia de *dexametasona* por 4 dias a cada 2 semanas) ou em combinação com VAD (0,4mg por dia em infusão contínua de 4 dias de *vincristina*, 9mg/m² de *doxorubicina* por dia numa infusão contínua de 4 dias e *dexametasona* 40 mg por dia 4 dias por semana durante 3 semanas). No entanto, dois estudos em que se combinou *talidomida* com *dexametasona* como terapêutica inicial, para doentes recém diagnosticados com mieloma múltiplo, candidatos a transplante autólogo, mostram que existe uma resposta rápida em dois terços dos doentes, permitindo a colheita de células-tronco no sangue periférico da maneira correta (Jasielec & Jakubowiak, 2013; Longo, 2010).

Além disso, num ensaio clínico randomizado de fase III foi demonstrado que a *talidomida* em combinação com a *dexametasona* é mais eficaz do que a utilização de *dexametasona* em monoterapia, apresentando a primeira vantagens em relação à última, em doentes de MM recém diagnosticados. O *bortezomib* e a *lenalidomida* são ambos fármacos derivados da *talidomida* que também obtém boas taxas de resposta quando

combinados com a *dexametasona* e mantêm as células-tronco fiáveis para colheita e posterior transplante (Einsele *et al.*, 2017; Longo, 2010).

Em pacientes que não são candidatos a transplante autólogo de células-tronco, a terapêutica consiste numa combinação de um agente alquilante como o *melfalano* com um corticosteróide como a *prednisolona*, administrados por 4 a 7 dias a cada 4 a 6 semanas. A dose habitual deste regime terapêutico são $8\text{mg}/\text{m}^2$ por dia de *melfalano* e 25 a $60\text{mg}/\text{m}^2$ de *prednisolona* por dia, durante 4 dias. Estas dosagens podem necessitar de posterior ajuste devido às diferenças de absorção e à tolerância da medula óssea de cada indivíduo (Zahlten-Hinguranage *et al.*, 2006).

Se a terapia for efetiva, os pacientes de Mieloma Múltiplo têm geralmente uma diminuição dos sintomas, nomeadamente redução da dor óssea, hipercalcémia, anemia e ainda decréscimo no número de infeções recorrentes. A IgM sérica também diminui após tratamento, mas pode demorar entre 4 a 6 semanas a sofrer diminuição. Esta redução de IgM depende da taxa de morte tumoral e da fracção catabólica da imunoglobulina, que por sua vez depende da concentração sérica da mesma (para IgG) (Longo, 2010).

Relativamente ao esquema terapêutico com *melfalano*, *prednisolona* e *talidomida*, segundo diversos estudos randomizados, a quimioterapia de elevada dosagem obtém melhor resposta em termos de eficácia, atraso na progressão da doença e sobrevivência em relação à dosagem padrão (Einsele *et al.*, 2017).

Estudos mostram que apenas 10% dos pacientes de Mieloma atingem a resposta completa com o regime terapêutico de *talidomida* e *dexametasona*, enquanto que se for acrescentado o *bortezomib* a resposta completa aumenta para os 27% (Hungria *et al.*, 2013).

Em geral, a quimioterapia de elevada dosagem parece permitir maior tempo de sobrevida livre de eventos, maior taxa de resposta completa e uma melhor sobrevivência global. Por outro lado, o transplante alogénico não mieloblático tem vindo a ser alvo de estudos para permitir reduzir a toxicidade no organismo do doente, pois muitas vezes ocorre toxicidade devido ao efeito imune do enxerto *versus* efeito do mieloma (Longo, 2010).

Relativamente ao mieloma recidivante, existem novas moléculas como a *lenalomida* e o *bortezomib* que têm sido bastante utilizadas na prática clínica. Estes fármacos têm como alvo a célula tumoral, mas também a interação desta com a medula óssea. (Einsele *et al.*, 2017) Assim, combinações terapêuticas destes fármacos com a *dexametasona* podem levar a uma resposta parcial de 60% e uma resposta completa de 10% a 15% (Longo, 2010). Um esquema terapêutico com *bortezomib* e *doxorubicina lipossomal* também é efetivo nos doentes que sofrem reincidência da doença, bem como uma dose elevada de *melfalano* e o transplante de células-tronco da medula óssea, caso não tenham sido utilizados como terapêutica inicial (Zannetti *et al.*, 2017).

Para a hipercalcémia e doença óssea, são usados fármacos como os bifosfonatos e os corticoesteróides, sendo importante manter a hidratação do doente. Os bifosfonatos como o *pamidronato de sódio (Aredia®)* na dose de 90mg ou o *ácido zoledrónico (Zometa®)* na dose de 4mg, uma vez por mês, reduzem a absorção óssea ao nível dos osteoclastos, podendo também ter uma ação mínima anti tumoral (Hungria & Maiolino, 2007; Zanata, Felin, De Bona, Sawazaki, & De Conto, 2014). No entanto, é necessária vigilância e monitorização do doente, pois os bifosfonatos têm reações adversas graves associadas à sua utilização, como a osteonecrose da mandíbula (Zanata *et al.*, 2014). É importante que o doente de MM a realizar terapêutica com esta classe de fármacos realize uma avaliação dentária antes de iniciar o tratamento e que durante o tratamento mantenha uma boa higiene oral, acompanhada de avaliação dentária periódica, de forma a detetar possíveis complicações mandibulares.

Relativamente à falência renal iatrogénica, esta pode ser evitada se o doente se mantiver hidratado, contribuindo para uma maior diurese, que leva ainda ao aumento da excreção das cadeias leves e do cálcio em excesso (Nuevo-González, 2009).

Se existir insuficiência renal aguda a plasmáfereze (infusão de plasma no doente, que permite diminuir a proporção de anticorpos no plasma do mesmo) é, em termos teóricos, preferida à diálise peritoneal, pois estudos comprovam que é mais eficaz na eliminação das cadeias leves, no entanto, na prática clínica, o seu uso para reverter a falência renal ainda permanece controverso (Gastelum, Biggs, & Scott, 2017).

Em relação às infeções do trato respiratório é importante vacinar os doentes contra o *pneumococos*, no entanto nem sempre é desencadeada uma resposta de anticorpos eficaz. Uma alternativa para infeções recorrentes graves é a administração

profilática de imunoglobulina γ , que parece ser mais eficaz que a profilaxia com antibióticos (Faria *et al.*, 2004). Além disso, a antibioterapia em excesso não é benéfica nem para o doente nem para a saúde pública, sendo um dos temas mais debatidos no presente e por isso é uma opção de profilaxia cada vez menos utilizada.

Em casos mais graves, pacientes que desenvolvem sintomas neurológicos nos membros inferiores, dor local severa nas costas ou a perda de controlo do intestino e/ou bexiga, podem precisar de realizar uma ressonância magnética de emergência e terapia de radiação para cuidados paliativos, pois certas lesões respondem melhor a radiação localizada do que a analgésicos e quimioterapia (Longo, 2010).

A eritropoetina associada ao ferro, folato ou cobalamina são boas opções terapêuticas para a anemia associada ao mieloma múltiplo, sendo que este sintoma deve ser diagnosticado o mais rapidamente possível e instaurada a terapia adequada (Hungria & Maiolino, 2007; Priyankara & Gunawardena, 2013).

4. Micro RNAs no Mieloma Múltiplo

4.1 O que são os Micro RNAs?

Os Micro RNAs foram descobertos em 1993 por *Lee et al* e têm cerca de 22 nucleótidos de comprimento (Ren *et al.*, 2017). Pensa-se que estes sejam regulados pelos mesmos mecanismos que os restantes tipos de RNAs presentes nas células (Graves & Zeng, 2012; Pogribny, 2017). Existem então, até agora, diversos estudos que tentam explicar a biogénese deste tipo peculiar de RNAs e algumas das suas funções já foram identificadas (Graves & Zeng, 2012).

Os RNAs associam-se a proteínas que regulam a transcrição, processamento, localização, função e degradação dos mesmos. No entanto, ainda está por explicar o papel específico de tais proteínas no mecanismo dos miRNA *in vivo*. No entanto, visto que os miRNAs são um tipo de RNAs, é de esperar que estes experimentem o mesmo tipo de processos e modificações, mediados por enzimas e proteínas específicas, que as outras espécies de RNAs, como os RNAs mensageiros e ribossomais (mRNA e rRNA, respetivamente), que por exemplo, passam pelo *splicing* antes da sua maturação (Graves & Zeng, 2012).

A maioria dos miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II (Pol II) para gerar um miRNA *stem loop* primário (pri-miRNA) que pode compreender um tamanho que vai desde algumas centenas de nucleótidos até várias quilobases. No entanto, alguns miRNAs podem também ser transcritos pela Pol III (Ameres & Zamore, 2013).

Cerca de 40% dos miRNAs localizam-se em intrões de genes codificadores de proteínas e apenas 10% na região exónica de zonas não codificantes, sendo o *splicing* alternativo que determina se um miRNA pertence ao intrão ou ao exão (Ahmad *et al.*, 2013).

Os miRNAs sofrem o *cap* em 5' e poliadenilação em 3' e pensa-se que sofram *splicing* semelhante ao mRNA, antes do seu processamento. O processamento dos miRNAs dá-se dentro do núcleo, com a intervenção dos microprocessadores, dos quais faz parte a RNase III Drosha e a sua subunidade DGCR8 (Zeng, Yi, & Cullen, 2005). Observando a Figura 8, percebe-se que o pri-miRNA é clivado pelo complexo Pasha

(constituído pela proteína Drosha e a sua subunidade DGCR8) criando um pré-miRNA, precursor do miRNA. O *hairpin* é reconhecido pela Exportin-5 (um fator de exportação nuclear dependente da Ran-GTP), que transporta o pré-miRNA para o citoplasma celular. Uma vez no citoplasma, este é clivado para produzir um miRNA maduro com 22 nucleótidos: miRNA *duplex*, por outra RNase III, a *Dicer*. (Ricarte Filho & Kimura, 2006). A *Dicer* e a TRBP (uma proteína de ligação do RNA) ligam-se à proteína Argonaute (Ago 2) e formam um complexo trimérico, que dá lugar ao RISC, um complexo onde se incorpora o miRNA anteriormente formado. A associação do complexo miRNA-RISC com um mRNA resulta na repressão do gene alvo, promovendo a degradação do mRNA e/ou a inibição da tradução, como mostra a Figura 8. (Ahmad *et al.*, 2013; Pogribny, 2017; Zeng *et al.*, 2005).

A expressão dos miRNAs nos mamíferos é muito variável e esta pode ser expressa de forma diferenciada em resposta a estímulos do meio interno ou externo e a sua desregulação pode estar associada a doenças, como é o caso do cancro. (Graves & Zeng, 2012).

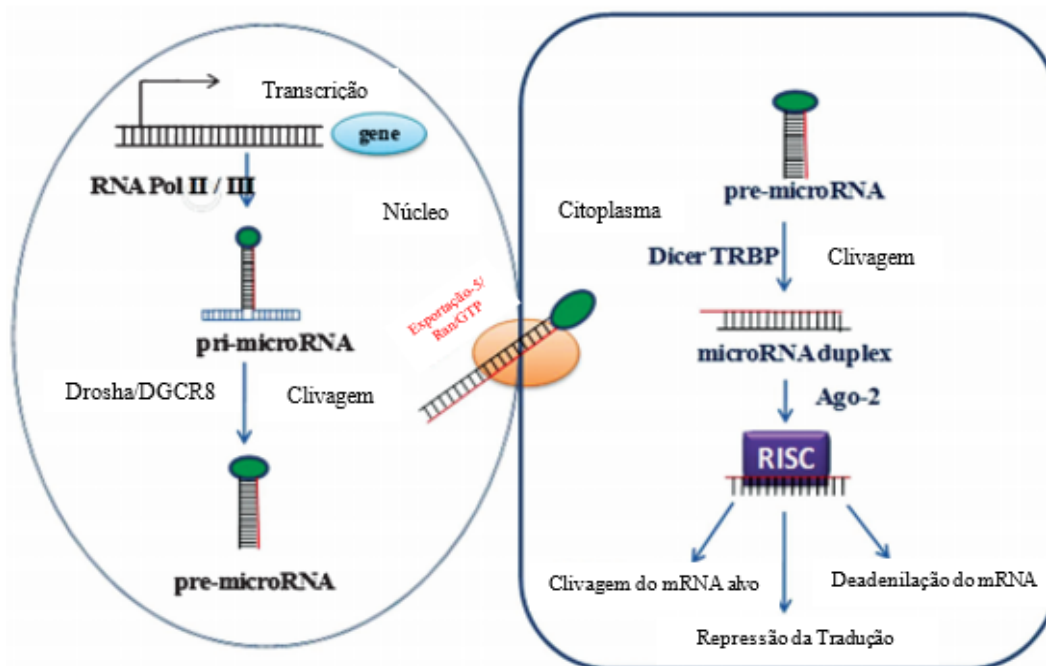


Figura 5 - Esquema da via de formação dos MicroRNA: Os miRNAs são gerados através do processamento de dois passos que convertem a transcrição primária de miARN (pri-miRNA) pela RNA Polimerase II ou III e clivagem do pri-miRNA pelo complexo Drosha-DGCR8 (Pasha) no núcleo. O pré-miRNA resultante é transportado do núcleo para o citoplasma pelo complexo Exportin-5-Ran-GTP. No citoplasma, o complexo Dicer/TRBP, cliva o *hairpin* do pré-miRNA, formando um miRNA maduro. A associação do miRNA-RISC com um mRNA alvo resulta na repressão do gene alvo promovendo a degradação do mRNA e/ou inibição da tradução do mesmo (Adaptado de Ahmad *et al.*, 2013).

4.2 Alterações genéticas no Mieloma Múltiplo

Existe uma forte evidência que sugere uma componente genética na etiologia do Mieloma Múltiplo. Existem duas condições pré-malignas assintomáticas antes do Mieloma Múltiplo, o MGUS e o SMM (Mieloma Múltiplo Latente), que podem progredir para MM. Sendo que o SMM é um estado pré-maligno que se segue ao MGUS (Martino *et al.*, 2011; Sundararajan, Kumar, Korde, & Agarwal, 2016).

Existem diversos fatores que contribuem para o aparecimento do MM, tais como a idade, o género, a etnia e a presença dos estados pré-malignos assintomáticos referidos acima. Existe também evidência que esta neoplasia tem risco de aparecimento aumentado em indivíduos obesos e em indivíduos que têm uma alimentação pobre em peixe e vegetais (Fritschi *et al.*, 2004; Tamayo, 2014). Certos estudos de coorte mostraram também relação no aparecimento do MM em indivíduos com doenças autoimunes ou infeções víricas. Foram feitos estudos também ao nível da exposição a pesticidas, solventes tóxicos, fumo do tabaco, consumo de álcool e radiação ionizante, no entanto não foi estabelecida uma relação inequívoca entre estes e o desenvolvimento de MM (Martino *et al.*, 2011; Vangsted, Klausen, & Vogel, 2012).

O facto do MM se desenvolver em gémeos homozigóticos e no agregado familiar prova que existe uma forte componente genética nesta neoplasia (Hungria *et al.*, 2013). Assim, em várias associações, nomeadamente a *Genome Wide Association Studies (GWAS)*, têm sido desenvolvidos estudos que mostram que o risco genético é influenciado pelas variáveis genéticas herdadas (Morgan *et al.*, 2014).

Os Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs) são dos principais responsáveis para a variação genética entre os indivíduos, sendo responsáveis, em parte pela diferença individual na suscetibilidade genética a diferentes doenças, nomeadamente doenças oncológicas (Nielsen *et al.*, 2017). Isto parece aplicar-se também ao MM, no entanto, estes resultados permanecem controversos, não tendo sido demonstrada ainda uma relação inequívoca entre estes fatores genéticos e o desenvolvimento do MM nos indivíduos, sendo necessários mais estudos com mais variáveis. Entre os SNPs mais estudados destacam-se SNPs ao nível de fatores de crescimento e genes de sinalização celular, SNPs na reparação do DNA, ciclo celular e apoptose, SNPs em genes de citocinas e SNPs nos genes relacionados com o metabolismo xenobiótico (Martino *et al.*, 2011).

O consórcio IMMEnSE (The International Multiple Myeloma rESEarch) tem como objetivo a criação de uma base de dados para ser possível melhorar a compreensão da genética e farmacogenética do MM (Martino *et al.*, 2014).

A heterogeneidade intraclonal é uma característica bastante comum no MM, que leva a que a doença seja bastante complexa a nível da sua progressão, pois não existe uma linearidade na sua evolução. A Figura 6 mostra de forma simples esta complexidade existente na evolução da doença, onde participam diversos mecanismos altamente complexos (Prideaux, Conway O’Brien, & Chevassut, 2014).

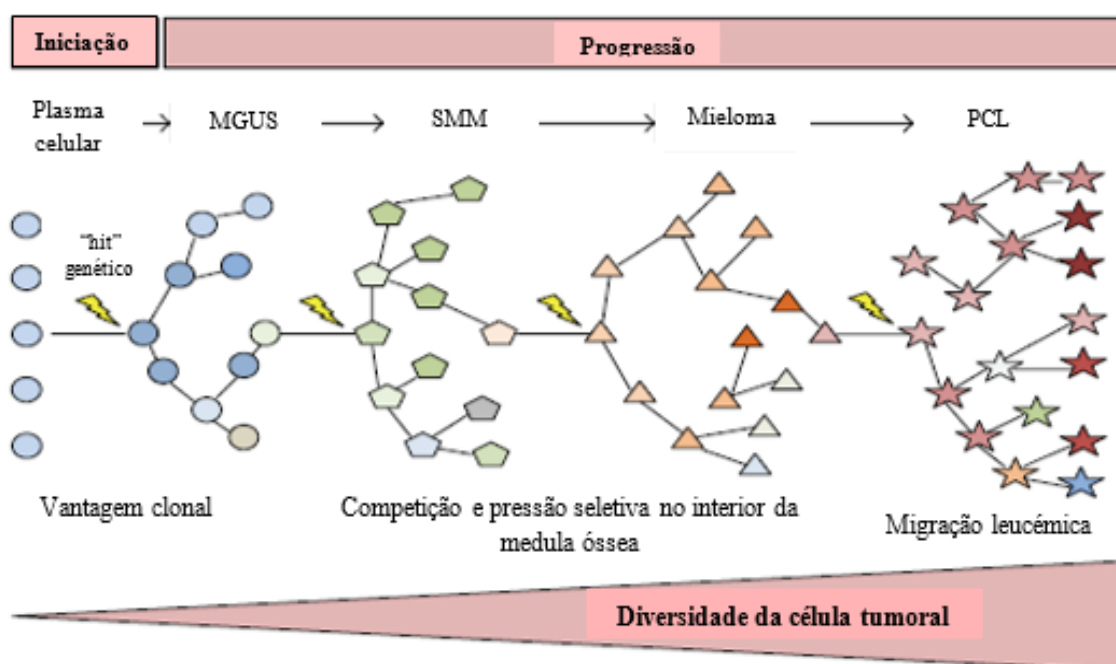


Figura 6 – Iniciação e Progressão do Mieloma Múltiplo: O núcleo germinativo da célula B recebe um “hit” genético que imortaliza a célula e inicia a transição para a fase latente MGUS. Os clones de MGUS tendem a transitar para as outras fases da neoplasia, o SMM, Mieloma e PCL, à medida que sofrem “hits” genéticos. A evolução clonal desenvolve-se através de mecanismos de ramificação em que existem numerosos “ecossistemas” compostos por múltiplos subclones em cada fase da doença, representados pelas diferentes formas geométricas. No final deste processo, os clones proliferativos não ficam confinados à medula óssea e distribuem-se rapidamente pelos tecidos, semelhante a uma fase leucémica. Em cada fase da doença formam-se clones com vantagem genética superior, comparativamente com os clones precursores. (Esta figura está excessivamente simples relativamente à complexidade inerente ao processo de iniciação e progressão da doença, servindo apenas para uma maior elucidação dos mecanismos) (Adaptado de *Prideaux et al 2014*).

Esta heterogeneidade tem relevância terapêutica pois, à medida que a doença evolui, é provável existirem diferenças nas células clonais, o que pode explicar certas resistências a determinados fármacos (Prideaux *et al.*, 2014).

O MM pode ainda ser dividido em não hiperdiploide e hiperdiploide. À medida que a doença vai evoluindo do MGUS para Leucemia das Células Plasmáticas (PCL), as anomalias genéticas podem ser classificadas como primárias e secundárias, sendo que as primeiras contribuem para a imortalização das células plasmáticas e as segundas para a progressão da doença (Kuehl & Bergsagel, 2012).

Assim, o MM não hiperdiploide envolve translocações (*t*) nos alelos da imunoglobulina de cadeia pesada IgH em 14q32 com vários cromossomas incluindo o 4, 6, 11, 16 e 20 (Prideaux *et al.*, 2014; Roos-Weil *et al.*, 2011). Estas translocações primárias relacionam-se com uma anomalia na recombinação genética e funcionam de modo a que os oncogenes cromossômicos parceiros fiquem sob influência da região potenciadora da IgH (Saad, Sharma, & Higa, 2009). Já o MM hiperdiploide está normalmente associado a uma maior sobrevivência, pois envolve trissomias nos cromossomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21, acoplados a uma baixa prevalência de translocações ao nível *locus* da IgH (Barnett *et al.*, 2010; O'Brien, 2003).

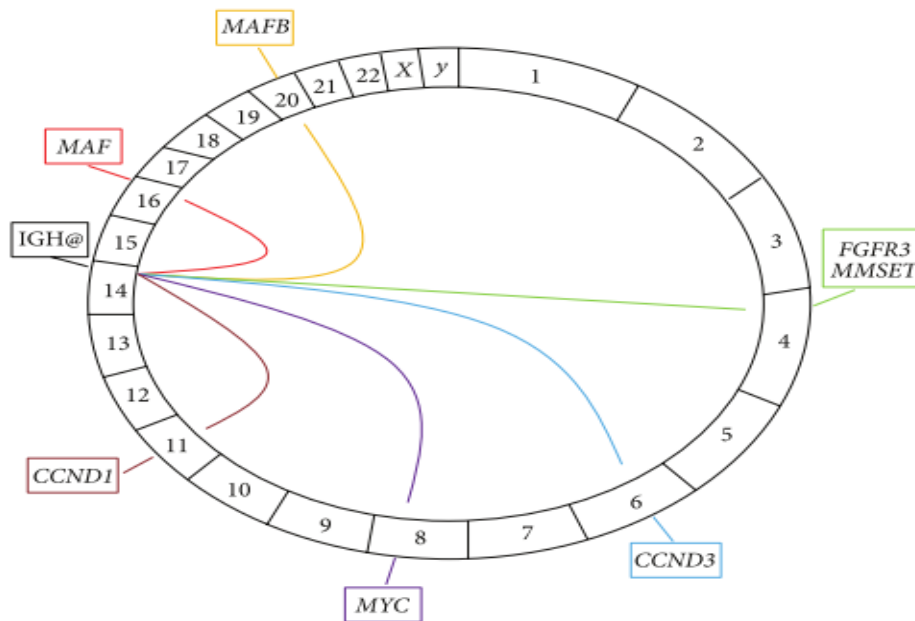


Figura 7 – Principais translocações cromossomais no Mieloma Múltiplo: As translocações são representadas como linhas que emergem do *locus* de cadeia pesada da IgH no cromossoma 14 para os respectivos cromossomas parceiros. Os genes envolvidos em cada translocação estão representados em caixas fora do círculo. Todas as translocações representam eventos primários, exceto a *t*(8;14) que envolve o gene MYC, sendo portanto, uma translocação secundária (Retidado de *Prideaux et al.*, 2014).

As translocações cromossomais representam cerca de 40% dos eventos primários ocorridos no MM e influenciam muito o fenótipo da doença (Kuehl, 2005). Já as translocações secundárias não influenciam a recombinação genética, ocorrendo posteriormente às primárias e são responsáveis pela progressão da doença (Prideaux, Conway O'Brien, & Chevassut, 2014; Roos-Weil et al., 2011).

Os eventos secundários referidos anteriormente, que levam a progressão do MM são normalmente observados com maior frequência no SMM, MM e PCL. Estes, cooperam com os eventos genéticos primários de forma a produzirem o fenótipo maligno observado em doentes de Mieloma e incluem translocações secundárias, variações nos números de cópias, perda de heterozigotia, mutações adquiridas e modificações epigenéticas (Prideaux *et al.*, 2014).

Associado a estes eventos secundários, estudos demonstraram que as células clonais plasmáticas necessitam de se ligarem às células estromais da medula óssea através de mecanismos especializados, para o seu crescimento e sobrevivência, sendo que esta interação necessita de ser mais compreendida no futuro para que se possam desenvolver fármacos que actuem a este nível (Kawano *et al.*, 2014; Kuehl & Bergsagel, 2002).

Diversos estudos demonstraram também, que a maioria dos doentes com Mieloma passa sempre, ou quase sempre, primeiro pelo MGUS. Assim, foram também realizados estudos para que se possa perceber quais as variações genéticas inerentes ao aparecimento deste estado pré-maligno que antecede o MM (Morgan *et al.*, 2014).

Foram então identificados 3 *loci* genéticos com pares genéticos associados ao risco (embora modesto) do aparecimento do MGUS. Estes são: 2p: DNMT3A e DNTNB; 3p: ULK4 e TRAK1; 7p: DNAH11 e CDCA7L. Apesar do seu modo de funcionamento ainda ser, em parte, desconhecido, sabe-se que existe uma desregulação no proto-oncogene MYC, que codifica a transcrição de um fator que regula os genes envolvidos na replicação do DNA. É possível que no futuro, com mais estudos seja possível a identificação de mais *loci* que possam estar relacionados com o aparecimento desta neoplasia (Prideaux, Conway O'Brien, & Chevassut, 2014).

O MM é então uma doença altamente complexa e heterogénea, que pode progredir desde fases assintomáticas (MGUS e SMM) para uma fase de agressão extra medular à medida que vão ocorrendo os “*hits*” genéticos. Os primeiros eventos genéticos,

chamados eventos primários são responsáveis pela imortalização das células plasmáticas e podem ser divididos num grupo hiperdiploide que compreende trissomias nos cromossomas ímpares referidos anteriormente e um grupo não hiperdiploide que compreende translocações ao nível da IgH. Já os eventos secundários são os responsáveis pela progressão da doença, têm uma maior complexidade envolvendo translocações secundárias, variações numéricas nas cópias, mutações adquiridas, perda de heterozigotia e modificações epigenéticas (Chapman *et al.*, 2011; Egan *et al.*, 2012; Prideaux *et al.*, 2014).

4.3 Micro RNAs como Oncogenes e Supressores de Tumor no Mieloma Múltiplo

Em diversos estudos de análise de expressão e sequenciação genética realizados ao longo dos anos, foi observada uma ligação entre a patogénese e o prognóstico do MM com anomalias genéticas (Sawyer *et al.*, 2015). Entre estas podemos destacar a metilação do DNA e modificações nas histonas e RNAs não codificantes. Note-se então que a desregulação dos modificadores epigenéticos são um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento do MM (Pawlyn *et al.*, 2016).

Uma análise recente à expressão dos miRNAs no MM, demonstrou que a desregulação na expressão destes tipos de RNAs pode relacionar-se com o subtipo molecular, progressão da doença, resposta ao tratamento instituído e tempo de sobrevivência dos pacientes, sugerindo que estes possam ter também um papel efetivo como supressores de tumores (Bi *et al.*, 2015; Hall, 2017; Pogribny, 2017) Se existir desregulação da expressão dos miRNAs supressores de tumores (TS-miRNAs) dá-se ativação dos oncogenes, que contribuem para a carcinogénese (Bi *et al.*, 2015).

A EZH2 (Potenciador da subunidade enzimática do *Zeste* Homólogo 2) é a subunidade catalítica do PRC2 (um complexo repressivo da transcrição), que silencia o gene através do marcador H3K27me3 (uma modificação epigenética na H3 que funciona normalmente como marcador repressivo). Assim, será plausível a hipótese de que a EZH2, via H3K27me3 reprime genes reguladores não codificantes, ou seja, miRNAs, que pós-transcrição, modificam a expressão de genes ativos, tal como é exemplificado na Figura 8 (Alzrigat *et al.*, 2016; Hall, 2017).

Os miRNAs miR-125a e o miR-320c são dois potenciais supressores de tumores no MM, em que *Alzrigat et al* mostraram ser possível a sua reativação através da inibição da EZH2. A importância destes miRNAs deve-se ao facto de serem alvos diretos do complexo PRC2 no MM e regularem negativamente importantes oncogenes desta doença, o IRF-4, o XBP-1, o BLIMP-1 e o c-MYC. Assim, a sua reativação permite uma regulação negativa destes oncogenes no MM, bloqueando o processo de carcinogénese através da inativação destes. Estes mecanismos são exemplificados na Figura 8 (*Alzrigat et al.*, 2016; Hall, 2017).

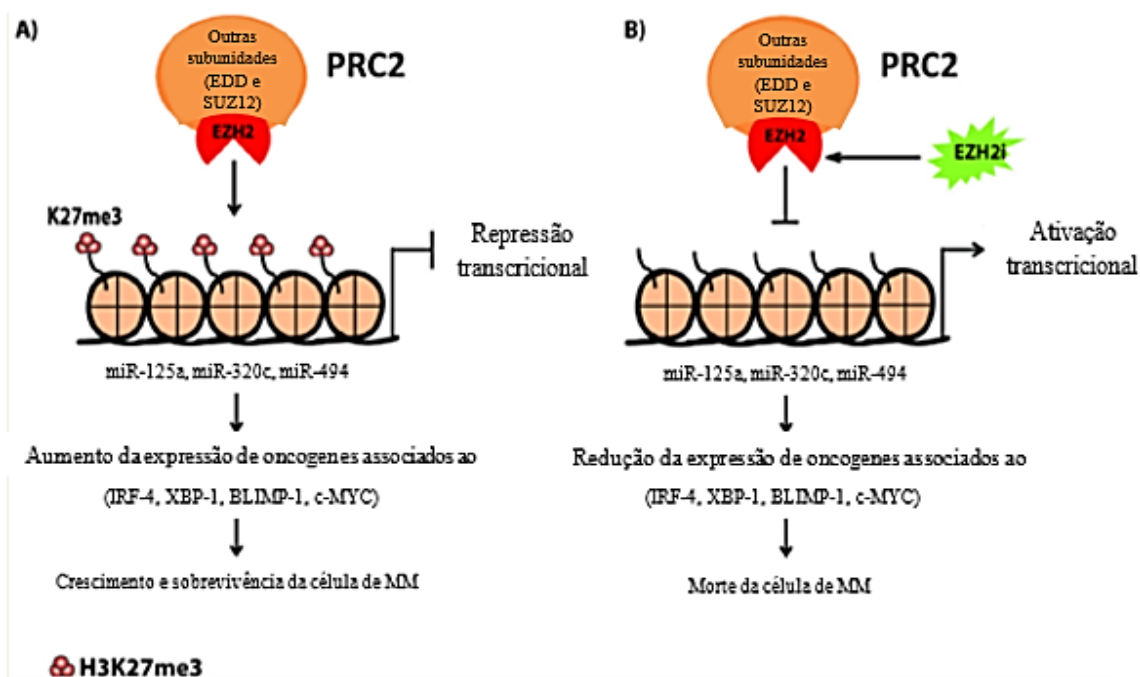


Figura 8 - PRC2 reprime a expressão de microRNAs supressores de tumor no mieloma múltiplo: (a) PRC2 através da subunidade enzimática EZH2 marca, através do marcador H3K27me3, os genes que codificam miR-125a, miR-320c e miR-494 em células de MM, levando ao silenciamento. Isso leva a uma expressão de oncogenes associados ao MM, devido à repressão dos microRNA, resultando num aumento de número e sobrevivência de células de MM. (b) A inibição farmacológica da atividade da metiltransferase EZH2 utilizando inibidores altamente seletivos, tais como UNC1999, suprime a instalação de H3K27me3 nos genes de microRNAs, levando à sua ativação transcricional. A expressão de miR-125a, miR-320c e miR-494 leva a uma expressão reduzida de oncogenes associados a MM, induzindo a morte das células anormais de MM (Adaptado de *Hall et al*, 2017).

Outros estudos demonstraram que o *cluster* de miRNAs miR-17-92 sinaliza os genes supressores de tumores SOCS1 e BIM, enquanto que o *cluster* miR105b-25 modula a atividade do gene p53, outro supressor de tumor, no MM. Além disso, *Hall et al*

sugerem que a inibição da EZH2 no MM afeta indiretamente a expressão dos onco-miRNAs, regulando negativamente oncogenes associados à neoplasia, como o c-MYC (Hall, 2017).

Foram associados diversos mecanismos à regulação anormal dos miRNAs. Entre estes podemos destacar o silenciamento de TS-miRNAs por hipermetilação e/ou inibição das modificações nas histonas (Bi *et al.*, 2015; Saito *et al.*, 2006). Um exemplo é o facto de se ter observado que a metilação do DNA silencia epigeneticamente a expressão dos TS-miRNAs miR-155, miR-198, miR-135a, miR200c, miR-663 e miR-483-5p (Bi *et al.*, 2015; Hall, 2017).

4.4 Micro RNAs como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico do Mieloma Múltiplo

O cancro é neste momento considerado uma doença crónica, pois na maioria dos casos, se existir vigilância periódica e o diagnóstico for precoce, é possível a existência de remissão ou mesmo a cura em certos tumores, conseguindo o doente viver mais anos, com qualidade de vida. Considera-se ser da maior importância um esclarecimento do processo da carcinogénese, e isso passa também, pela descoberta de novos biomarcadores, neste caso, perceber a utilidade e potencialidade dos miRNAs a este nível.

A descoberta e melhor compreensão, ao longo dos tempos, dos miRNAs na patogénese de diversas doenças oncológicas e não oncológicas, faz com que estes tipos de RNAs sejam vistos como potenciais biomarcadores não invasivos de doenças, nomeadamente do MM, no futuro (Pogribny, 2017; Soon & Kiaris, 2013).

Usualmente, o diagnóstico do MM e de outros tipos de cancros faz-se com recurso a técnicas de imagiologia, biópsias e alguns marcadores séricos. No entanto, a biópsia é uma técnica extremamente invasiva que pode ter consequências perigosas para o doente, nomeadamente hemorragias. Além de que os marcadores séricos atualmente usados na prática clínica nem sempre são específicos e sensíveis o suficiente para determinado tumor (Chen *et al.*, 2008).

Existem estudos que demonstram que, em geral, os miRNAs detetados na urina ou plasma podem possuir um valor de diagnóstico superior comparativamente com

marcadores já utilizados na prática clínica. Um exemplo é o facto de um estudo de *Lai et al* de 2017 ter demonstrado que os miRNAs circulantes possuem uma efetividade superior como biomarcadores em relação ao adenocarcinoma do ducto do pâncreas, do que o glypican-1 e o antigénio de cancro 19-9, ambos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) (*Lai et al.*, 2017; Pogribny, 2017).

Existem no entanto, certas limitações ao uso no presente dos miRNAs como biomarcadores na prática clínica. Uma limitação é o facto de que determinado miRNA alterado pode estar presente em pacientes com diferentes tipos de tumores, havendo como exemplo o miR-21, que pode ser encontrado em doentes com cancro do pulmão, cancro da mama, cancro colorretal, da próstata, fígado, endométrio e esófago (Pogribny, 2017).

De modo a contrariar esta limitação, foi proposta a existência de um conjunto de miRNAs previamente selecionados que sejam específicos de determinado tecido, para que se encontre uma maior especificidade a determinado órgão alvo, possuindo assim um maior valor de diagnóstico do que miRNAs isolados (*Lai et al.*, 2017; Pogribny, 2017).

Foi também identificado o potencial dos miRNAs ao nível não só do diagnóstico, mas também do prognóstico de neoplasias, como o MM (*Hao et al.*, 2015; Pogribny, 2017). Falhas na regulação da expressão dos miRNAs estão intimamente ligadas ao início e à progressão das lesões ósseas associadas também ao MM (*Hao et al.*, 2016; *Wang et al.*, 2012). Níveis séricos de miR-214 e o miR-135b estão relacionados com a severidade de lesões líticas nos ossos, em doentes de MM, servindo como marcador de diagnóstico destas mesmas lesões e, consequentemente, da evolução da doença (*Hao et al.*, 2016).

4.5 Micro RNAs como Terapêutica Inovadora no Mieloma Múltiplo

A terapêutica do MM tem vindo a sofrer alterações ao longo dos tempos e mudou radicalmente desde a introdução de novos agentes terapêuticos como os inibidores de proteossomas e fármacos imunomoduladores, em combinação com os fármacos mais antigos (Rossi, Tagliaferri, & Tassone, 2015). No entanto, apesar da contínua inovação da terapêutica, muitos pacientes continuam a sofrer reincidências da doença e esta permanece incurável, sendo então necessário continuar a apostar em inovações terapêuticas.

O uso dos miRNAs com fim terapêutico prende-se com a questão de que se eles desempenham um papel ao nível do desenvolvimento e evolução da doença, se a sua expressão for forçada, podem eventualmente ser utilizados como método terapêutico, tendo como alvo, nomeadamente os plasmócitos clonais e a própria medula óssea (Duchaine & Slack, 2009; Misso *et al.*, 2013; Nana-Sinkam & Croce, 2011).

O paradigma da terapia baseada nos miRNAs foi apresentado inicialmente por Slack e Duchaine, que propuseram manipular a atividade dos miRNAs através da indução da expressão dos miRNAs suprimidos e/ou inibição dos miRNAs expressos acima do normal (Duchaine & Slack, 2009). Posteriormente, foram realizados diversos estudos a este nível e de momento já existe uma quantidade considerável de dados de estudos *in vitro* e *in vivo* que mostram que a modulação dos miRNAs é possível e viável (Rossi *et al.*, 2015).

A complexidade associada aos mecanismos de formação e regulação dos miRNAs leva a querer que o efeito de terapias baseadas nos mesmos vai para além da simples supressão/expressão dos miRNAs, pois a sua atividade não está ainda completamente descodificada e não se consegue prever a sua atividade por completo, apenas se tem uma noção dos alvos e de certos mecanismos que levam à sua ação (Nana-Sinkam & Croce, 2011; Rossi *et al.*, 2015).

Atualmente, os estudos experimentais que têm como objetivo estudar a terapia do MM baseada nos miRNAs, são desenhados definindo-se os níveis dos miRNAs a serem testados, identificando os alvos cruciais que suportam as células clonais de MM ou o interior da medula óssea e por fim, testam-se os efeitos miméticos e/ou antagonistas *in*

vitro e *in vivo* para explicar a atividade anti tumoral de determinado miRNA ou *cluster* de miRNAs (Nana-Sinkam & Croce, 2011; Rossi *et al.*, 2015).

Novas pesquisas têm tido como alvo o estudo do espectro completo de miRNAs expressos no genoma específico das células tronco no MM, pois estas foram identificadas com uma pequena fração de clone maligno e retém a mesma capacidade única de clonagem, que leva à proliferação da doença (Rossi *et al.*, 2015).

Du *et al* em 2015, demonstraram que o miR-451 se encontra sobre expresso nestas células malignas, comparativamente com as células-tronco normais e quando é usado um inibidor do miR-451 a população maligna encontra-se mais suscetível aos fármacos usados no tratamento do MM, como por exemplo o *bortezomib* e o *melfalano* (Du *et al.*, 2015).

As terapias baseadas em miRNAs podem contribuir para reverter a malignidade do MM através da modulação funcional dos osteoblastos e osteoclastos. Em muitos casos é possível tirar vantagem dos efeitos de um só miRNA, que tem como alvo tanto as células de MM como os restantes sistemas afetados pelas mesmas. Exemplo disto é a inibição representada na Figura 9, dos miR-29b e o miR-21 (Rossi *et al.*, 2015).

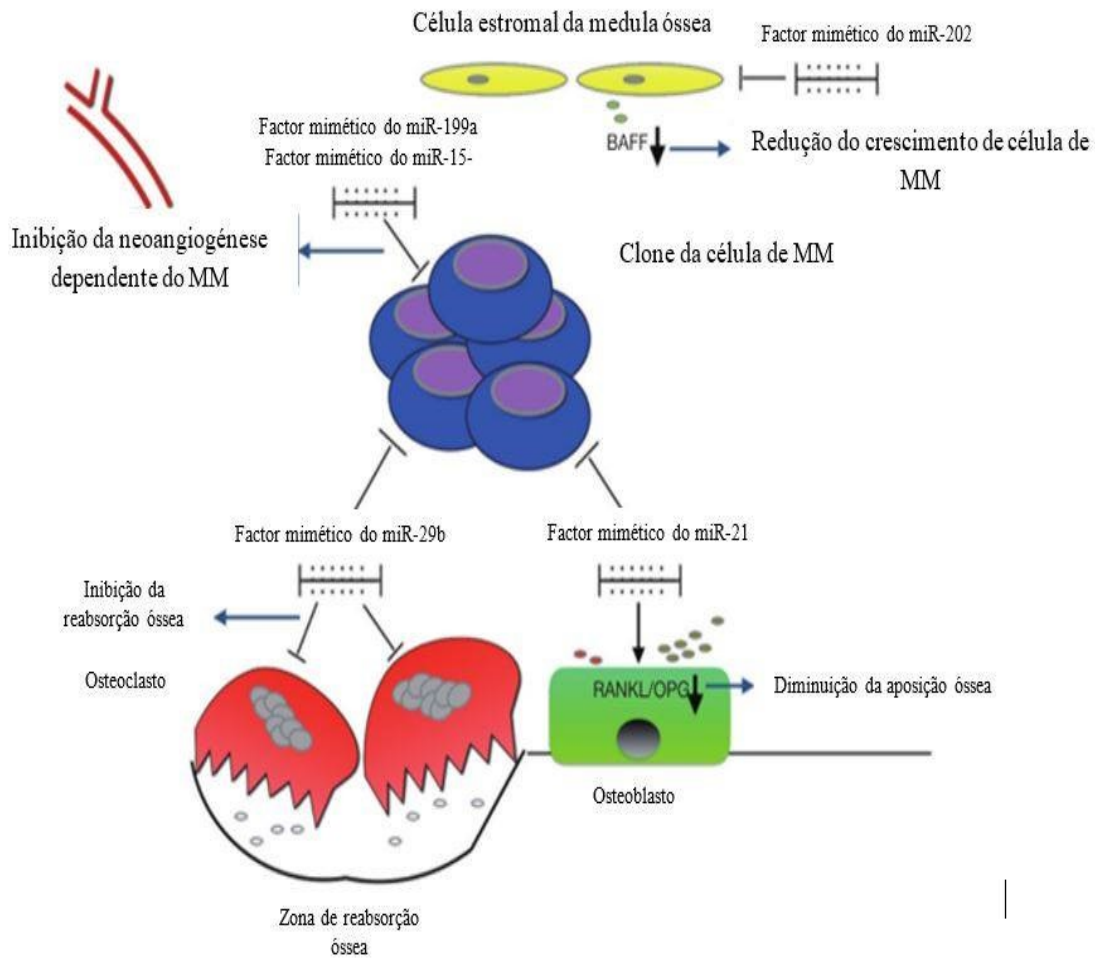


Figura 9 - Modulação directa dos miRNA do microambiente da medula óssea relacionado ao MM:

Exemplos de fatores miméticos dos miRNAs (miR-29b, miR-202, miR-199a, miRs-15-16) e inibidores (miR-21) são mostrados em conjunto com os principais alvos celulares do microambiente da medula óssea. O miR29b promove o crescimento do MM e a inibição da reabsorção óssea. Os inibidores de miR-21 restauram a relação RANKL / OPG fisiológica, favorecendo a deposição óssea. Os fatores miméticos de miR-202 interferem nas células estromais da medula óssea de MM, ligando-se através da sub-regulação do BAFF. O miR-199a inibe a neoangiogénese através da supressão de HIF1, que é produzida sob condições hipóxicas por células de MM. O miRs-15-16 inibe a neoangiogénese via VEGF. Legenda: BAFF: fator de ativação de células B; MM: mieloma múltiplo; BMM: microambiente da medula óssea; OPG: osteoprotegerina; BMSC, célula estromal da medula óssea; RANKL, ativador do recetor do fator nuclear Kappa-b ligando; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; HIF1: hipoxia induzida pelo fator 1. (Adaptado de Rossi *et al*, 2015)

5. Conclusão

No mundo da Oncologia ainda existem muitos mecanismos genéticos e moleculares por descobrir. O cancro mantém-se então uma doença, na maioria dos casos, sem cura, não sendo o Mieloma Múltiplo uma exceção.

Esta neoplasia hematológica, com origem na medula óssea, acarreta diversas complicações que são necessárias ter em consideração, sendo essencial um diagnóstico precoce para que tanto a quimioterapia como as terapias de suporte sejam postas em prática o mais rápido possível, retardando a progressão da doença e permitindo aos doentes um tempo de sobrevivência superior.

O Mieloma Múltiplo tem sido alvo de inúmeros estudos que permitiram que avanços no diagnóstico, prognóstico e terapêutica fossem possíveis de implementar na prática clínica. De há alguns anos para cá, estudos permitiram que fossem realizados diversos avanços na prática clínica, introduzindo novos fármacos como os inibidores do proteossoma e imunomoduladores, exemplos destes, o *melfalano* e o *daratumumab*.

No entanto, no campo da genética molecular existe muita coisa por descobrir e por testar. Desde 1993, quando foram descobertos os Micro RNAs, um género peculiar de RNAs, por *Lee et al*, que têm sido realizados estudos com o objetivo de provar a sua potencialidade como biomarcadores de doenças. Assim sendo, foram estudadas nesta monografia algumas das suas potencialidades, sendo que os Micro RNAs provaram ser potenciais biomarcadores do Mieloma Múltiplo ao nível do diagnóstico, prognóstico e terapêutica.

Estes ainda não são utilizados na prática clínica, porque são necessários mais estudos e de maiores dimensões para que se consiga obter um mais preciso esclarecimento acerca dos mecanismos inerentes aos Micro RNAs.

6. Perspetivas Futuras

Tendo em conta o atual conhecimento acerca dos miRNAs, considera-se que estes venham a desempenhar um papel importante como biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e terapêutica de diversas patologias, neste caso do Mieloma Múltiplo.

São então necessários estudos mais aprofundados ao nível da genética molecular, para que possa existir um maior esclarecimento acerca dos miRNAs e de que forma eles realmente atuam e podem atuar se existir uma regulação artificial por fatores miméticos ou antagonistas, no Mieloma Múltiplo. Sendo esperado obter não só informação acerca dos miRNAs já existentes, como também descobrir novos miRNAs.

É de esperar a ampliação da base de dados universal dos micro RNAs (miRBase, criada em Dezembro de 2001) na qual seja possível colocar toda a informação referente aos miRNAs já descobertos e os que se encontram por descobrir, de modo a que exista um fácil acesso pelos futuros investigadores. Informação relevante para a colocação nesta base de dados é o miRNA em questão, o local e em que situações patológicas ou não patológicas é detetado, a sua função e de que maneira se poderia modular a sua função para chegar a uma eficácia terapêutica.

É necessário desenvolverem-se tecnologias para que os miRNAs sejam facilmente detetados no futuro da Medicina Molecular e realmente utilizados como biomarcadores viáveis de doenças oncológicas e não só, sendo que já existem estudos acerca de biossensores para este tipo de RNAs, apesar de não se encontrarem ainda disponíveis para prática clínica, por serem necessários mais avanços tecnológicos.

Indo um pouco mais além, fora do tema das neoplasias, seria também interessante existirem estudos mais aprofundados acerca deste tipo peculiar de RNAs ao nível da transmissão sináptica, visto que o cérebro é o órgão que nos permite realizar a maior parte das funções diárias e seria interessante estudar os miRNAs a nível das doenças neurodegenerativas que, à semelhança das doenças oncológicas, também não têm cura.

7. Bibliografía

- Ahmad, J., Hasnain, S. E., Siddiqui, M. A., Ahamed, M., Musarrat, J. & Al-Khedhairi, A. A. (2013). MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: a new paradigm. *The Indian Journal of Medical Research*, 137(4), 680–94. Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23703335> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3724248>
- Alzrigat, M., Párraga, A. A., Agarwal, P., Zureigat, H., Österborg, A., Nahi, H., ... Jernberg-Wiklund, H. (2016). EZH2 inhibition in multiple myeloma downregulates myeloma associated oncogenes and upregulates microRNAs with potential tumor suppressor functions. *Oncotarget*, 8(6), 10213–10224. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.14378>
- Ameres, S. L. & Zamore, P. D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 475–488. <http://doi.org/10.1038/nrm3611>
- American Society of Hematology. (s.d.). Blood Cancers. Retirado de <http://www.hematology.org/Patients/Cancers/>
- Banach, M., Juranek, J. K. & Zygulska, A. L. (2017). Chemotherapy-induced neuropathies—a growing problem for patients and health care providers. *Brain and Behavior*, 7(1), e00558. <http://doi.org/10.1002/brb3.558>
- Barnett, N. P., Apodaca, T. R., Magill, M., Colby, S. M., Gwaltney, C., Rohsenow, D. J. & Monti, P. M. (2010). Moderators and mediators of two brief interventions for alcohol in the emergency department. *Addiction*, 105(3), 452–465. <http://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2009.02814.x>
- Bi, C. & Chng, W. J. (2014). MicroRNA: Important Player in the Pathobiology of Multiple Myeloma. *BioMed Research International*, 2014, 1–12. <http://doi.org/10.1155/2014/521586>
- Bi, C., Chung, T.-H., Huang, G., Zhou, J., Yan, J. J., Fonseca, R. & Chng, W. J. (2015). Genome-wide pharmacologic unmasking identifies tumor suppressive microRNAs in multiple myeloma. *Oncotarget*, 6(28), 26508–26518. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.4769>

- Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H. & Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, *117*(19), 5019–5032. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-01-293050>
- Cavo, M., Tacchetti, P., Patriarca, F., Petrucci, M. T., Pantani, L., Galli, M., ... Baccarani, M. (2010). Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3. *The Lancet*, *376*(9758), 2075–2085. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61424-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61424-9)
- Chapman, M. a, Lawrence, M. S., Keats, J. J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A. C., ... Golub, T. R. (2011). Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, *471*(7339), 467–472. <http://doi.org/10.1038/nature09837>
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., ... Zhang, C.-Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, *18*(10), 997–1006. <http://doi.org/10.1038/cr.2008.282>
- De Mel, S., Chen, Y., Gopalakrishnan, S., Ooi, M., Teo, C., Tan, D., ... Chng, W. (2017). The Singapore Myeloma Study Group Consensus Guidelines for the management of patients with multiple myeloma. *Singapore Medical Journal*, *58*(2), 55–71. <http://doi.org/10.11622/smedj.2016150>
- Dimopoulos, M. A., Kastritis, E., Rosinol, L., Bladé, J. & Ludwig, H. (2008). Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia*, *22*(8), 1485–1493. <http://doi.org/10.1038/leu.2008.131>
- Du, J., Liu, S., He, J., Liu, X., Qu, Y., Yan, W., ... Hou, J. (2015). MicroRNA-451 regulates stemness of side population cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in multiple myeloma. *Oncotarget*, *6*(17), 14993–15007. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.3802>
- Duchaine, T. F. & Slack, F. J. (2009a). RNA interference and micro RNA-oriented therapy in cancer: rationales, promises, and challenges. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, *16*(4), 61–6. <http://doi.org/CCDT-EPUB-20120605-3> [pii]

- Duchaine, T. F. & Slack, F. J. (2009b). RNA interference and micro RNA-oriented therapy in cancer: rationales, promises, and challenges. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 16(4), 61–6. Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19672426>
- Dupire, S., Wemeau, M., Debarri, H., Pascal, L., Hivert, B., Willekens, C., ... Leleu, X. (2012). Prognostic value of PINI index in patients with multiple myeloma. *European Journal of Haematology*, 88(4), 306–313. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2011.01740.x>
- Egan, J. B., Shi, C.-X., Tembe, W., Christoforides, A., Kurdoglu, A., Sinari, S., ... Stewart, A. K. (2012). Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*, 120(5), 1060–1066. <http://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405977>
- Einsele, H., Engelhardt, M., Tapprich, C., Müller, J., Liebisch, P., Langer, C., ... Knop, S. (2017). Phase II study of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone as induction therapy in multiple myeloma: DSMM XI trial. *British Journal of Haematology*, 179(4), 586–597. <http://doi.org/10.1111/bjh.14920>
- Faria, E., Silva, S. & Español, T. (2004). Tratamento de Imunodeficiências Primárias por Deficiência predominante de Anticorpos – Protocolo de seguimento. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, XII, 251–260.
- Fritschi, L., Ambrosini, G. L., Kliewer, E. V., Johnson, K. C., Dryer, D., Paulse, B., ... Le, N. (2004). Dietary fish intake and risk of leukaemia, multiple myeloma, and non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 13(4), 532–537.
- Gastelum, Z. N., Biggs, D. M. & Scott, A. (2017). Multiple Myeloma Presenting as Acute Renal Failure in the Absence of Other Characteristic Features. *Cureus*, 9(9). <http://doi.org/10.7759/cureus.1703>
- Graves, P. & Zeng, Y. (2012). Biogenesis of Mammalian MicroRNAs: A Global View. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 10(5), 239–245. <http://doi.org/10.1016/j.gpb.2012.06.004>
- Gutierrez, N. C. (2004). Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood*, 104(9), 2661–2666. <http://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1319>

- Hall, W. (2017). The miR-125a and miR-320c are potential tumor suppressor microRNAs epigenetically silenced by the polycomb repressive complex 2 in multiple myeloma. *RNA & DISEASE*, 97(12), 5421–5433. <http://doi.org/10.14800/rd.1529>
- Hao, M., Zang, M., Wendlandt, E., Xu, Y., An, G., Gong, D., ... Qiu, L. (2015). Low serum miR-19a expression as a novel poor prognostic indicator in multiple myeloma. *International Journal of Cancer*, 136(8), 1835–1844. <http://doi.org/10.1002/ijc.29199>
- Hao, M., Zang, M., Zhao, L., Deng, S., Xu, Y., Qi, F., ... Qiu, L. (2016). Serum high expression of miR-214 and miR-135b as novel predictor for myeloma bone disease development and prognosis. *Oncotarget*, 7(15), 19589–19600. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.7319>
- Hungria, V., Maiolino, Â., Almeida, M. & Crusoé, E. (2013). Distúrbios dos Plasmócitos e Doenças Correlatas. In *Tratado de Hematologia* (pp. 555–568). Atheneu.
- Hungria, V. T. M. & Maiolino, A. (2007). Mieloma Múltiplo neste fascículo Multiple Myeloma in this issue Mieloma Múltiplo : Progressos e desafios. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, 29(1), 1–2. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8484200700010000>
- Jasielec, J. K. & Jakubowiak, A. J. (2013). Current approaches to the initial treatment of symptomatic multiple myeloma. *International Journal of Hematologic Oncology*, 2(1), 61–70. <http://doi.org/10.2217/ijh.13.3>
- Kapoor, P., Fonseca, R., Rajkumar, S. V., Sinha, S., Gertz, M. A., Stewart, A. K., ... Kumar, S. (2010). Evidence for Cytogenetic and Fluorescence In Situ Hybridization Risk Stratification of Newly Diagnosed Multiple Myeloma in the Era of Novel Therapies. *Mayo Clinic Proceedings*, 85(6), 532–537. <http://doi.org/10.4065/mcp.2009.0677>
- Kawano, Y., Moschetta, M., Manier, S., Glavey, S., Gorgun, G., Roccaro, A. M., ... Ghobrial, I. M. (2014). Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunological Reviews*, 263, 160–172.
- Kuehl, W. M. (2005). Early Genetic Events Provide the Basis for a Clinical Classification of Multiple Myeloma. *Hematology*, 2005(1), 346–352. <http://doi.org/10.1182/asheducation-2005.1.346>

- Kuehl, W. M. & Bergsagel, P. L. (2002). Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 175–187. <http://doi.org/10.1038/nrc746>
- Kuehl, W. M. & Bergsagel, P. L. (2012). Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *Journal of Clinical Investigation*, 122(10), 3456–3463. <http://doi.org/10.1172/JCI61188>
- Kyle, R. A. & Rajkumar, S. V. (2008). Multiple myeloma. *Blood*, 111(10), 4841–4851. Retirado de <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2007-08-078139>
- Kyle, R. A., Therneau, T. M., Rajkumar, S. V., Larson, D. R., Plevak, M. F., Offord, J. R., ... Melton, L. J. (2006). Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *New England Journal of Medicine*, 354(13), 1362–1369. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa054494>
- Lai, X., Wang, M., McElyea, S. D., Sherman, S., House, M. & Korc, M. (2017). A microRNA signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 393(February), 86–93. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.02.019>
- Liu, H., Tamashiro, S., Baritaki, S., Penichet, M., Yu, Y., Chen, H., ... Bonavida, B. (2012). TRAF6 Activation in Multiple Myeloma: A Potential Therapeutic Target. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 12(3), 155–163. <http://doi.org/10.1016/j.clml.2012.01.006>
- Longo, D. (2010). *Harrison's Hematology and Oncology*. (D. Longo, Ed.) *Harrison's Hematology and Oncology*.
- Martino, A. (2011). Genetics and molecular epidemiology of multiple myeloma: The rationale for the IMMEnSE consortium (Review). *International Journal of Oncology*, 40(3), 625–638. <http://doi.org/10.3892/ijo.2011.1284>
- Martino, A., Campa, D., Jurczynski, A., Martinez-Lopez, J., Moreno, M. J., Varkonyi, J., ... Canzian, F. (2014). Genetic Variants and Multiple Myeloma Risk: IMMEnSE Validation of the Best Reported Associations--An Extensive Replication of the Associations from the Candidate Gene Era. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 23(4), 670–674. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-1115>

- Meier, B. & Burton, J. H. (2014). Myeloproliferative Disorders. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 32(3), 597–612. <http://doi.org/10.1016/j.emc.2014.04.014>
- Mikhael, J. R., Dingli, D., Roy, V., Reeder, C. B., Buadi, F. K., Hayman, S. R., ... Lacy, M. Q. (2013). Management of Newly Diagnosed Symptomatic Multiple Myeloma: Updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines 2013. *Mayo Clinic Proceedings*, 88(4), 360–376. <http://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.01.019>
- Minjie Gao, Yuanyuan Kong, Guang Yang, L. G. & J. S. (2017). Multiple myeloma cancer stem cells. *J. Clin. Oncol.*, 26, 2895–2900. <http://doi.org/26/17/2895> [pii]r10.1200/JCO.2007.15.8428
- Miranda, N., Portugal, C., Nogueira, P. J., Farinha, C. S., Oliveira, A. L., Soares, A. P., ... Serra, L. (2016). Doenças Oncológicas em Números – 2015. In *Direção-Geral da Saúde (DGS)* (pp. 1–66). Retirado de http://www.apah.pt/media/publicacoes_tecnicas_sector_saude_2/Doencas_Oncologicas.pdf
- Misso, G., Zappavigna, S., Castellano, M., De Rosa, G., Di Martino, M. T., Tagliaferri, P., ... Caraglia, M. (2013). Emerging pathways as individualized therapeutic target of multiple myeloma. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 13(sup1), S95–S109. <http://doi.org/10.1517/14712598.2013.807338>
- Morgan, G. J., Johnson, D. C., Weinhold, N., Goldschmidt, H., Landgren, O., Lynch, H. T., ... Houlston, R. S. (2014). Inherited genetic susceptibility to multiple myeloma. *Leukemia*, 28(3), 518–524. <http://doi.org/10.1038/leu.2013.344>
- Munshi, N. C., Anderson, K. C., Bergsagel, P. L., Shaughnessy, J., Palumbo, A., Durie, B., ... Avet-Loiseau, H. (2011). Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2. *Blood*, 117(18), 4696–4700. <http://doi.org/10.1182/blood-2010-10-300970>
- Nana-Sinkam, S. P. & Croce, C. M. (2011). MicroRNAs as therapeutic targets in cancer. *Translational Research*, 157(4), 216–225. <http://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.01.013>

- Neben, K., Jauch, A., Bertsch, U., Heiss, C., Hielscher, T., Seckinger, A., ... Goldschmidt, H. (2010). Combining information regarding chromosomal aberrations t(4;14) and del(17p13) with the International Staging System classification allows stratification of myeloma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Haematologica*, 95(7), 1150–1157. <http://doi.org/10.3324/haematol.2009.016436>
- Nielsen, K. R., Rodrigo-Domingo, M., Steffensen, R., Baech, J., Bergkvist, K. S., Oosterhof, L., ... Johnsen, H. E. (2017). Interactions between SNPs affecting inflammatory response genes are associated with multiple myeloma disease risk and survival. *Leukemia & Lymphoma*, 58(11), 2695–2704. <http://doi.org/10.1080/10428194.2017.1306643>
- Nuevo-González, J. A. (2009). Hipercalcemia como urgencia médica. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 18(3), 51–55. [http://doi.org/10.1016/S1132-8460\(09\)73229-5](http://doi.org/10.1016/S1132-8460(09)73229-5)
- O'Brien, S. N. (2003). Infections in Patients with Hematological Cancer: Recent Developments. *Hematology*, 2003(1), 438–472. <http://doi.org/10.1182/asheducation-2003.1.438>
- Pacca, R. L., Silva, J. B. C. B. da, Souza, K. de C. & Carbinatto, R. B. (2017). Autoimmune hemolytic anemia and hyperglobulinemia leading to the diagnosis of multiple myeloma. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, 39(4), 357–359. <http://doi.org/10.1016/j.bjhh.2017.07.005>
- Pawlyn, C., Kaiser, M. F., Heuck, C., Melchor, L., Wardell, C. P., Murison, A., ... Morgan, G. J. (2016). The Spectrum and Clinical Impact of Epigenetic Modifier Mutations in Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 22(23), 5783–5794. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1790>
- Pingali, S. R., Haddad, R. Y. & Saad, A. (2012). Current Concepts of Clinical Management of Multiple Myeloma. *Disease-a-Month*, 58(4), 195–207. <http://doi.org/10.1016/j.disamonth.2012.01.006>
- Pogribny, I. P. (2017). MicroRNAs as biomarkers for clinical studies. *Experimental Biology and Medicine*, 153537021773129. <http://doi.org/10.1177/1535370217731291>

- Prideaux, S. M., Conway O'Brien, E. & Chevassut, T. J. (2014). The Genetic Architecture of Multiple Myeloma. *Advances in Hematology*, 2014, 1–16. <http://doi.org/10.1155/2014/864058>
- Priyankara, W. & Gunawardena, D. (2013). Megaloblastic anaemia in non secretory multiple myeloma: a rare presentation. *Ceylon Medical Journal*, 58(2), 89. <http://doi.org/10.4038/cmj.v58i2.5688>
- Rajkumar, S. V. (2012). Multiple myeloma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 87(1), 78–88. <http://doi.org/10.1002/ajh.22237>
- Rajkumar, S. V. & Kumar, S. (2016). Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 91(1), 101–119. <http://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.11.007>
- Ren, Y., Li, X., Wang, W., He, W., Wang, J. & Wang, Y. (2017). Expression of Peripheral Blood miRNA-720 and miRNA-1246 Can Be Used as a Predictor for Outcome in Multiple Myeloma Patients. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 17(7), 415–423. <http://doi.org/10.1016/j.clml.2017.05.010>
- Ricarte Filho, J. C. M. & Kimura, E. T. (2006). MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 50(6), 1102–1107. <http://doi.org/10.1590/S0004-27302006000600018>
- Rodak, Bernadette F., Fritsma, George A., Keohane, E. M. (2012). *Hematology - Clinical Principles and Applications*. Elsevier saunders.
- Roos-Weil, D., Moreau, P., Avet-Loiseau, H., Golmard, J.-L., Kuentz, M., Vigouroux, S., ... Dhedin, N. (2011). Impact of genetic abnormalities after allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma: a report of the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Haematologica*, 96(10), 1504–1511. <http://doi.org/10.3324/haematol.2011.042713>
- Rossi, M., Tagliaferri, P. & Tassone, P. (2015). MicroRNAs in multiple myeloma and related bone disease. *Annals of Translational Medicine*, 3(21), 334. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.12.13>

- Saad, A. A., Sharma, M. & Higa, G. M. (2009). Oncology: Treatment of Multiple Myeloma in the Targeted Therapy Era. *Annals of Pharmacotherapy*, 43(2), 329–338. <http://doi.org/10.1345/aph.1L428>
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J. M., Chuang, J. C., Coetzee, G. A. & Jones, P. A. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*, 9(6), 435–443. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.020>
- Sawyer, J. R., Tian, E., Heuck, C. J., Johann, D. J., Epstein, J., Swanson, C. M., ... Barlogie, B. (2015). Evidence of an epigenetic origin for high-risk 1q21 copy number aberrations in multiple myeloma. *Blood*, 125(24), 3756–3759. <http://doi.org/10.1182/blood-2015-03-632075>
- Soon, P. & Kiaris, H. (2013). MicroRNAs in the tumour microenvironment: big role for small players. *Endocrine Related Cancer*, 20(5), R257–R267. <http://doi.org/10.1530/ERC-13-0119>
- Sundararajan, S., Kumar, A., Korde, N. & Agarwal, A. (2016). Smoldering Multiple Myeloma: Emerging Concepts and Therapeutics. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 11(2), 102–110. <http://doi.org/10.1007/s11899-016-0305-6>
- Tamayo, R. R. (2014). Obesity and Multiple Myeloma: What Do the Data Tell Us? *Journal of Leukemia*, 2(2). <http://doi.org/10.4172/2329-6917.1000e109>
- Terpos, E., Christoulas, D. & Gavriatopoulou, M. (2017). Biology and treatment of myeloma related bone disease. *Metabolism*. <http://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.012>
- Vaiopoulos, A. G., Kostakis, I. D., Koutsilieris, M. & Papavassiliou, A. G. (2012). Colorectal Cancer Stem Cells. *STEM CELLS*, 30(3), 363–371. <http://doi.org/10.1002/stem.1031>
- Vangsted, A., Klausen, T. W. & Vogel, U. (2012). Genetic variations in multiple myeloma I: effect on risk of multiple myeloma. *European Journal of Haematology*, 88(1), 8–30. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2011.01700.x>

- Wang, X., Guo, B., Li, Q., Peng, J., Yang, Z., Wang, A., ... Li, Y. (2012). miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nature Medicine*, 19(1), 93–100. <http://doi.org/10.1038/nm.3026>
- yachoui, R. (2016). Early onset acute tubular necrosis following single infusion of zoledronate. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 13(2), 154–156. <http://doi.org/10.11138/ccmbm/2016.13.2.154>
- Zahlten-Hinguranage, A., Goldschmidt, H., Cremer, F. W., Egerer, G., Moehler, T., Witte, D., ... Zeifang, F. (2006). Preoperative elevation of serum C – reactive protein is predictive for prognosis in myeloma bone disease after surgery. *British Journal of Cancer*, 95(7), 782–787. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603329>
- Zanata, A., Felin, G. C., De Bona, M. C., Sawazaki, R. & De Conto, F. (2014). Osteonecrose mandibular associada ao uso de bisfosfonato de sódio em paciente com mieloma múltiplo. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária E Cirurgia Maxilofacial*, 55(2), 115–120. <http://doi.org/10.1016/j.rpemd.2014.04.002>
- Zannetti, B. A., Tacchetti, P., Pantani, L., Gamberi, B., Tosi, P., Rocchi, S., ... Zamagni, E. (2017). Novel agent-based salvage autologous stem cell transplantation for relapsed multiple myeloma. *Annals of Hematology*, 96(12), 2071–2078. <http://doi.org/10.1007/s00277-017-3140-5>
- Zeng, Y., Yi, R. & Cullen, B. R. (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *The EMBO Journal*, 24(1), 138–148. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600491>
- Zhou, J., Pop, L. M. & Ghetie, V. (2005). Hypercatabolism of IgG in mice with lupus-like syndrome. *Lupus*, 14(6), 458–466. <http://doi.org/10.1191/0961203305lu2129oa>