



**Isabel Maria  
de Azevedo Alves**

**Papel da imunoglobulina monoclonal  
no prognóstico do mieloma múltiplo**



**Isabel Maria  
de Azevedo Alves**

**Papel da imunoglobulina monoclonal no  
prognóstico do mieloma múltiplo**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Dr. Henrique Manuel Pimenta Coelho, Mestre em Imunologia pela Universidade de Oxford e Assistente Hospitalar de Hematologia Clínica no Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho E. P. E. e da Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

## **O júri**

**Presidente**

**Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**  
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Dr.<sup>a</sup> Hermínia de Lourdes Dias Alves Vieira**  
Assistente Hospitalar de Hematologia – Serviço de Hematologia Clínica – Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho E. P. E.

**Mestre Henrique Manuel Pimenta Coelho**  
Assistente Hospitalar de Hematologia – Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho E. P. E.

**Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira**  
Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **Agradecimentos**

Este trabalho só pôde ser concretizado com o apoio de várias pessoas que exercem a sua atividade profissional em duas instituições distintas: Universidade de Aveiro e Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho E. P. E..

Na Universidade de Aveiro queria expressar o meu enorme apreço à Professora Doutora Rita Ferreira pelo incentivo, disponibilidade e ajuda prestada na resolução das questões científicas e dos problemas burocráticos inerentes ao trabalho por mim desenvolvido.

No Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho E. P. E. queria agradecer ao Dr. Henrique Coelho e à Dr.<sup>a</sup> Puresa Santos pelas críticas, sugestões e empenho manifestados. Queria ainda exprimir o meu agradecimento à equipa do laboratório de Patologia Clínica: Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Cruz, Dr.<sup>a</sup> Alice Novais e Dr. Hugo Pinto pela disponibilidade prestada.

Finalmente, endereço uma palavra especial aos meus amigos e, muito especialmente, à minha mãe e irmã pelo apoio incondicional e sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

**Palavras-chave**

mieloma múltiplo, imunoglobulinas, fatores de mau prognóstico.

**Resumo**

O Mieloma Múltiplo (MM) caracteriza-se pela proliferação de células produtoras de imunoglobulinas (Igs) e a sobrevida global dos doentes com esta patologia é muito heterogénea. Estudos permitiram identificar características clínico-laboratoriais com impacto negativo na sobrevida (SV) do doente mas o modo como a classe da imunoglobulina (Ig) influencia a SV é ainda desconhecido.

Assim, o presente estudo teve como objetivo estabelecer o papel da classe da Ig no prognóstico dos doentes com MM e avaliar uma possível relação entre a classe da Ig e os fatores de mau prognóstico já conhecidos.

Nesse sentido realizou-se um estudo retrospectivo em que se procedeu à recolha dos dados clínico-laboratoriais de mau prognóstico e classe de Ig, ao diagnóstico de todos os casos de MM, do CHVNGE, num período de 2 anos. Efetuou-se uma análise do impacto sobre a SV global de cada um dos dados clínico-laboratoriais utilizando o método de Kaplan-Meier. As curvas de sobrevivência obtidas foram comparadas pelo teste de log rank. As variáveis com significado estatístico foram submetidas a uma análise multivariada utilizando-se a regressão múltipla de Cox.

Os resultados obtidos evidenciaram que a idade superior a 65 anos, a deleção no cromossoma 13, a concentração da  $\beta_2$ -microglobulina, as lesões osteolíticas, a percentagem de plasmócitos, a hipoalbuminémia, a hipercalcémia, a concentração de IgG, o estadio e a resposta à terapêutica influenciaram negativamente o prognóstico; a deleção no cromossoma 17 e a concentração de creatinina não tiveram qualquer impacto. A IgA associou-se com maior frequência à deleção no cromossoma 13 e doentes com MM IgG tiveram uma menor sobrevida.

A deleção no cromossoma 17 e a creatinina não se associaram a um pior prognóstico provavelmente porque a dimensão da amostra era pequena. O MM IgG apesar de se associar com menor frequência à deleção no cromossoma 13 tem pior prognóstico. As razões poderão estar relacionadas com as propriedades físico-químicas da proteína ou haver outras alterações citogenéticas de mau prognóstico ainda não identificadas que se associem com esta classe de Ig.

**Keywords** multiple myeloma, immunoglobulins, poor prognosis factors.

**Abstract** Multiple Myeloma (MM) is characterized by the proliferation of producing immunoglobulins (Igs) cells and has a highly heterogeneous overall survival. Several reports have identified clinical and laboratory features with a negative impact on survival (SV) however whether the Ig-class has any influence on SV remains unknown.

In this respect, the present study aimed to establish the role of the Ig-class in the outcome of MM patients as well as to access the relation between specific Ig-classes and the poor prognostic factors already identified.

Thus, a retrospective study was performed where in clinical and laboratory data regarding poor prognosis factors and the Ig-class was collected from all MM patients diagnosed within a period of two years in the CHVNGE. Survival curves were plotted according to the Kaplan-Meier-method and were statistically compared by means of the log-rank test. The multivariate analysis was performed by the hazards regression method of Cox for survival.

The results found shown that age over 65 years-old, chromosome 13 deletion,  $\beta_2$ -microglobulin concentration, osteolytic lesions, plasma cells' percentage, hypoalbuminemia, hypercalcemia, IgG concentration, stage and therapeutic response negatively influenced the prognosis. Conversely, chromosome 17 deletion and creatinine concentration had no impact on survival. A comparison between IgA and IgG-class showed that IgA was more frequently associated with chromosome 13 deletion and that IgG-class MM patients had a lower survival.

Chromosome 17 deletion and creatinine were not found to be associated with a negative prognosis probably because of the sample size. Despite being less associated with chromosome 13 deletion, IgG had a more unfavourable prognosis when compared with IgA. The reasons may be either related to the physicochemical properties of the protein or to other poor prognostic cytogenetic alterations that have not yet been identified.

**Índice**

Resumo .....	i
Abstract.....	ii
Índice de Figuras .....	v
Índice de Tabelas .....	vii
Lista de siglas e abreviaturas .....	viii
1. Introdução .....	1
1.1. Definição e Epidemiologia .....	1
1.2. Patogénese .....	1
1.2.1. Origem do plasmócito normal .....	1
1.2.2. Origem de plasmócito maligno.....	2
1.3. Imunoglobulina monoclonal .....	3
1.3.1. Estrutura da imunoglobulina monoclonal.....	3
1.3.2. Métodos de deteção, caracterização e quantificação da imunoglobulina monoclonal.....	5
1.3.2.1. Deteção e caracterização da imunoglobulina monoclonal.....	5
1.3.2.2. Quantificação da imunoglobulina monoclonal.....	8
1.4. Manifestações clínicas causadas pela imunoglobulina monoclonal .....	9
1.5. Sistema de Estadiamento .....	10
1.6. Tratamento e avaliação da resposta à terapêutica .....	11
2. Objetivos .....	13
3. Material e Métodos .....	14

3.1.	Seleção e caracterização dos doentes.....	14
3.2.	Caracterização e quantificação da imunoglobulina monoclonal .....	14
3.2.1.	Caracterização do tipo de imunoglobulina monoclonal .....	15
3.2.2.	Quantificação da imunoglobulina monoclonal.....	16
3.3.	Análise estatística .....	16
4.	Resultados .....	18
4.1.	Caracterização clínico-laboratorial dos doentes com MM .....	18
4.2.	Avaliação da relação entre os fatores de mau prognóstico e o tipo de imunoglobulina monoclonal .....	22
4.3.	Avaliação do impacto na sobrevida global dos fatores de mau prognóstico identificados ao diagnóstico.....	25
4.4.	Avaliação do impacto na sobrevida global causado pelo tipo de imunoglobulina monoclonal.....	27
4.5.	Avaliação da correlação entre a resposta à terapêutica de primeira linha e o tipo de imunoglobulina monoclonal .....	28
5.	Discussão.....	30
6.	Conclusão.....	35
7.	Bibliografia .....	37



## Índice de Figuras

Figura 1 – Processo de maturação e diferenciação dos linfócitos B. <sup>7</sup> .....	2
Figura 2–Estrutura das imunoglobulinas. <sup>20</sup> .....	4
Figura 3 – Em A é apresentado o perfil de bandas de proteína observado na electroforese em gel de agarose (adaptado <sup>27</sup> ). Em B pode observar-se o proteinograma obtido por análise densitométrica do gel de agarose <sup>25</sup> . .....	6
Figura 4 – Exemplos de perfis electroforéticos. Em A é apresentado um pico policlonal de $\gamma$ -globulinas, enquanto em B pode observar-se um pico monoclonal de $\gamma$ -globulinas. <sup>23</sup> .....	6
Figura 5 – Exemplos de perfis de bandas obtidos na separação das proteínas séricas e urinárias por imunofixação. Em A é apresentado o perfil obtido para o soro sem qualquer tipo de patologia enquanto em B pode observar-se o perfil obtido para o soro e urina de um doente com MM. <sup>32</sup> (Legenda: ELP – electroforese de proteínas; G - IgG; A - IgA; M - IgM; K - $\kappa$ ; L - $\lambda$ ; K free – $\kappa$ livre; L free - $\lambda$ livre). .....	7
Figura 6 - Sistema semi-automático Electrophoresis Hydrasys Phadia® (Sebia, Brasil)...	15
Figura 7 – Analisador multiparamétrico Behring Nephelometer II (Dade Behring, USA). .....	16
Figura 8 - Distribuição dos doentes com MM de acordo com: a idade (A), o sexo (B), a caracterização do tipo de imunoglobulina monoclonal (C), a concentração de Ig monoclonais (D), a concentração de creatinina sérica (E) e a concentração de cálcio sérico (F). .....	19
Figura 9 - Distribuição dos doentes com MM de acordo com: a concentração de albumina (A), a concentração de $\beta_2$ -microglobulina (B), os estadios (C), a percentagem de plasmócitos medulares (D), as deleções nos cromossomas 13 e 17 (E) e as lesões osteolíticas (F). .....	21

Figura 10 – Distribuição dos doentes com MM IgG e MM IgA de acordo com: a idade (A), o sexo (B), a concentração de Ig monoclonal (C), a concentração de creatinina sérica (D) e a concentração de cálcio sérico (E). ..... 22

Figura 11 - Distribuição dos doentes com MM IgG e MM IgA de acordo com: a concentração de albumina (A), a concentração de  $\beta_2$ -microglobulina (B), os estadios (C), a percentagem de plasmócitos medulares (D), a presença de deleção no cromossoma 13 (E), a presença de deleção no cromossoma 17 (F) e a presença de lesões osteolíticas (G)..... 24

Figura 12 – Análise da sobrevida global para as variáveis clínico-laboratoriais em estudo: idade (A), sexo (B), concentração de creatinina sérica (C), concentração de cálcio sérico (D), concentração de albumina (E), concentração de  $\beta_2$ -microglobulina (F), estadios (G), percentagem de plasmócitos medulares (H), deleções nos cromossomas 13 e 17 (I) e lesões osteolíticas (J). ..... 26

Figura 13 - Análise da sobrevida global para as variáveis clínico-laboratoriais em estudo: tipo (A) e concentração de Ig monoclonal (B). ..... 28

Figura 14 - Análise da sobrevida global para a resposta à quimioterapia de primeira linha. .... 29

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1 – Propriedades das diferentes classes de imunoglobulinas (adaptada <sup>20</sup> ).....	4
Tabela 2 – Sistema Internacional de Estadiamento do MM (adaptada <sup>47</sup> ). .....	11
Tabela 3– Avaliação do risco proporcional pelo modelo de regressão de Cox nas variáveis com significado estatístico, ( $p < 0,05$ ).....	27
Tabela 4 – Esquemas de quimioterapia de primeira linha utilizados com intuito curativo (BD, TD e MPT) e intuito paliativo (CP), n = 33 doentes. ....	28
Tabela 5 – Análise da resposta à quimioterapia de primeira linha.....	29

## **Lista de siglas e abreviaturas**

AL - Amiloidose

APC - Células apresentadoras de antígenos

B - Bortezomib

Bcl-2- Linfoma de células B 2

C - Ciclofosfamida

CR - Resposta completa

CXCR4 - Células do estroma medular e o receptor da quimoquina

D - Dexametasona

ELP – Electroforese de proteínas

FISH - *Fluorescent in situ Hybridization*

Ig - Imunoglobulina

IL-6 - Interleucina 6

IMWG - *International Myeloma Working Group*

IR - Insuficiência renal

ISS - *International Staging System*

M - Melfalano

MAPK - Proteína quinase mitogénica-ativada

MHC classe I - Complexo principal de histocompatibilidade classe I

MM - Mieloma Múltiplo

NF-kB - Fator nuclear NF-kB

P - Prednisolona

PR - Resposta parcial

Rb - Retinoblastoma

sCR - Resposta completa rigorosa

SD - Doença estável

SDF-1 - Fator derivado do estroma 1

T - Talidomida

VGPR - Muito boa resposta parcial

## 1. Introdução

### 1.1. Definição e Epidemiologia

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma doença que se caracteriza pela proliferação, na medula óssea ou nos tecidos moles, de um ou mais clones de células produtoras de imunoglobulinas (Igs) – os plasmócitos.<sup>1</sup> Epidemiologicamente, esta doença é mais prevalente no sexo masculino, tem um pico de incidência aos 65 anos de idade e, ao diagnóstico, apenas 10 % dos doentes têm menos de 50 anos.<sup>2</sup> O MM representa cerca de 1 % de todas as neoplasias e aproximadamente 10 % das doenças hematológicas malignas.<sup>1</sup> A incidência anual é de aproximadamente 5:100000 habitantes<sup>3, 4</sup> e, em Portugal, apesar de não existirem dados estatísticos que permitam saber qual a incidência real desta doença, estima-se que serão diagnosticados 500 novos casos todos os anos.

### 1.2. Patogénese

#### 1.2.1. Origem do plasmócito normal

O desenvolvimento do linfócito B ocorre na medula óssea e nos tecidos linfoides. Na medula óssea, os progenitores hematopoiéticos dão origem a uma célula pro-B, que é a célula mais imatura conhecida em que há comprometimento de linhagem. Esta célula passa por diferentes etapas de maturação e antes de alcançar o sangue periférico, sob a forma de célula B *naive*, ocorre o rearranjo das cadeias leves e pesadas das Igs. Depois, estas células alcançam os gânglios linfáticos através da corrente sanguínea onde interatuam com as células apresentadoras de antígenos (APC) ficando ativadas e diferenciando-se em células B de memória.<sup>5, 6</sup> As células B de memória percorrem a área extrafolicular do gânglio linfático e no folículo primário são expostas a antígenos pelas células dendríticas. Como consequência há a transformação dos folículos primários em secundários, que contêm um centro germinativo, e as células B de memória diferenciam-se em centroblastos. Nesta altura, ocorre o fenómeno de *switch* das Igs e mutações somáticas nas regiões variáveis das

Igs o que origina anticorpos com elevada afinidade. Posteriormente, os centroblastos dão lugar aos centrócitos que, por sua vez, originam células B de memória ou plasmablastos que sofrem uma diferenciação terminal na medula óssea originando os plasmócitos (Figura 1).<sup>7</sup> Os plasmócitos são células presentes na medula óssea que produzem a maioria das Igs encontradas no soro.<sup>8,9</sup>

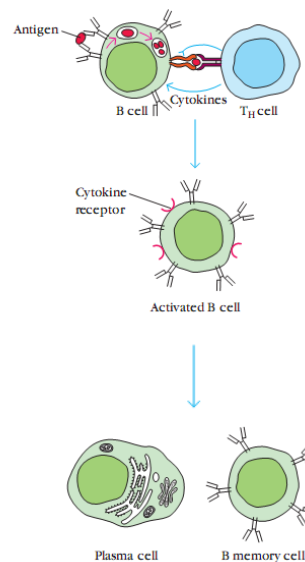


Figura 1 – Processo de maturação e diferenciação dos linfócitos B.<sup>7</sup>

### 1.2.2. Origem de plasmócito maligno

A patogênese do MM é complexa e, no processo de diferenciação do progenitor hematopoiético até ao plasmócito, é desconhecido qual o evento causal e em que fase da diferenciação este ocorre para que uma célula B normal origine um plasmócito maligno.

Presentemente, estudos mostram que, apesar da célula predominante no MM ser um plasmócito, existem linfócitos que têm Igs com um idiotipo idêntico ao do plasmócito maligno.<sup>10, 11</sup> Estes dados sugerem a existência de um compartimento que contenha a célula estaminal do MM que teria origem na célula B de memória ou no plasmablasto.<sup>10</sup> Durante a migração da célula B através do centro germinativo do folículo linfoide, ocorrem múltiplas quebras de DNA em consequência do rearranjo das Igs, das mutações somáticas na região variável das Igs e do *switch* do isotipo das Igs. Esta instabilidade genética

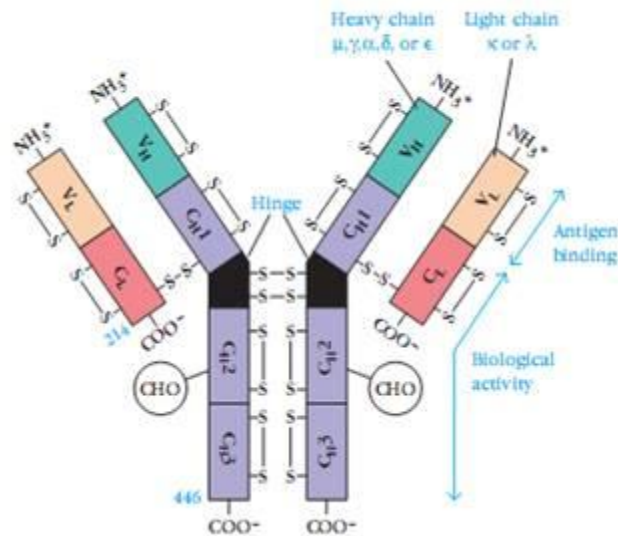
aumenta a probabilidade da ocorrência de mutações que dão origem a células com capacidade de auto-regeneração idêntica à das células estaminais adultas. Uma vez deixado o gânglio linfático, as células mutadas, entram na circulação sanguínea e adquirem moléculas de adesão para as células do estroma medular e o recetor da quimoquina (CXCR4), cujo ligante é o factor derivado do estroma (SDF-1). As moléculas de adesão permitem a estas células fixarem-se na medula óssea.<sup>12</sup>

A interação com as células do estroma da medula óssea induz a secreção parácrina de citocinas, nomeadamente de interleucina 6 (IL-6), assim como a ativação das vias de sinalização da proteína quinase mitogénica-ativada (MAPK) e do fator nuclear NF-kB (NF-kB). A IL-6, considerada a citocina mais importante na patogénese do MM tem um papel fundamental no aumento da expressão de genes anti-apoptóticos e como fator de crescimento através da fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb) que é essencial para que as células entrem na fase G1 do ciclo celular. As vias de sinalização MAPK e NF-kB quando ativadas conduzem a um aumento da expressão de vários fatores de crescimento e dos níveis de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, o que favorece a proliferação, a inibição da apoptose e a migração dos plasmócitos malignos.<sup>13, 14, 15, 16, 17, 18, 19</sup>

### **1.3. Imunoglobulina monoclonal**

#### **1.3.1. Estrutura da imunoglobulina monoclonal**

A imunoglobulina (Ig) monoclonal ou proteína M é constituída por duas cadeias polipeptídicas pesadas da mesma classe e subclasse e duas cadeias polipeptídicas leves idênticas entre si, ligadas por pontes dissulfureto (Figura 2).<sup>20</sup>

Figura 2–Estrutura das imunoglobulinas.<sup>20</sup>

Cada cadeia, pesada ou leve, é composta por regiões constantes e variáveis. A região variável, responsável pelo reconhecimento do antígeno, contém na sua estrutura determinantes antigênicos únicos, os idiotipos, que constituem os marcadores de monoclonalidade no MM. As regiões constantes (C), por seu turno, definem o tipo das duas cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$  e classes ou isotipos, em número de cinco, das cadeias pesadas IgM, IgD, IgG, IgA e IgE (Tabela 1). As cadeias pesadas de cada uma destas classes de imunoglobulinas são representadas pelas letras gregas  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  e  $\epsilon$ , respetivamente.<sup>20</sup>

Tabela 1 – Propriedades das diferentes classes de imunoglobulinas (adaptada<sup>20</sup>).

Classe	Subclasse	Tempo de meia-vida (dias)	Cadeia pesada	Cadeia leve	Concentração sérica (mg/mL)	Massa molecular (kDa)
<b>IgM</b>	-----	5,1	$\mu$	$\kappa$ ou $\lambda$	1	950
<b>IgD</b>	-----	2,8	$\delta$	$\kappa$ ou $\lambda$	0,1	175
<b>IgG</b>	4 IgG (1 a 4)	21	$\gamma$	$\kappa$ ou $\lambda$	12	150
<b>IgA</b>	2 IgA (1 a 2)	5,8	$\alpha$	$\kappa$ ou $\lambda$	3	180-500
<b>IgE</b>	-----	2,3	$\epsilon$	$\kappa$ ou $\lambda$	0,001	200



### **1.3.2. Métodos de deteção, caracterização e quantificação da imunoglobulina monoclonal**

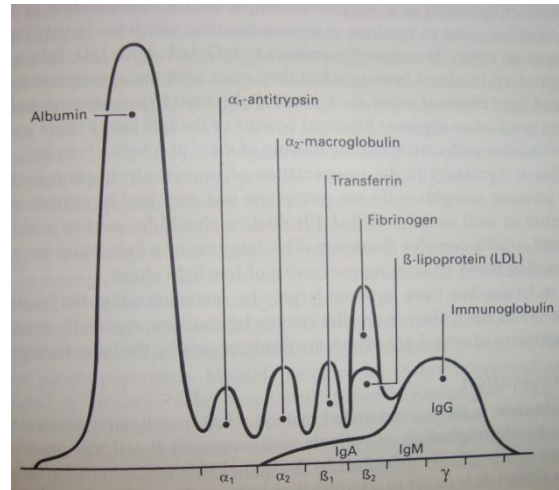
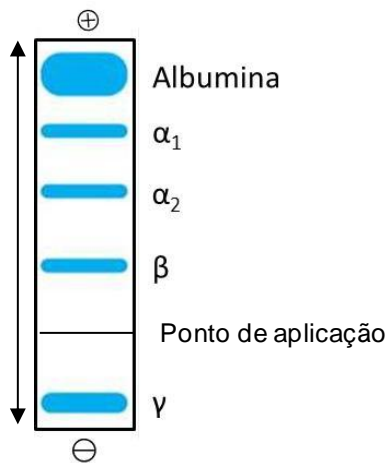
A caracterização e quantificação da imunoglobulina monoclonal são efetuadas no soro e na urina dos doentes com MM utilizando diferentes métodos tais como a imunofixação e a nefelometria, descritos a seguir.

#### **1.3.2.1. Deteção e caracterização da imunoglobulina monoclonal**

O estudo do perfil proteico em pacientes com MM tem como objetivo demonstrar a presença e o tipo de proteína M no soro e na urina, através de electroforese de proteínas e imunofixação. A electroforese é considerada um método de triagem para a deteção da Ig monoclonal, enquanto a imunofixação é fundamental para confirmação da sua presença e caracterização do tipo de cadeias, leves ou pesadas, envolvidas.<sup>21, 22</sup>

Na electroforese, em gel de agarose, as proteínas são separadas de acordo com os seus respetivos pesos moleculares e cargas eléctricas. O perfil proteico obtido após a separação é visualizado com corantes específicos de proteínas.<sup>23, 22</sup>

A electroforese de uma amostra de soro separa as suas proteínas em 5 bandas principais (Figura 3A).<sup>24</sup> No MM, a migração electroforética da componente monoclonal depende do isotipo de imunoglobulina. Assim, a ordem de migração das imunoglobulinas é a seguinte: a IgA migra na região  $\beta$ , a IgM na região entre  $\beta$  e  $\gamma$  e finalmente a IgG na região  $\gamma$ .<sup>25</sup> Recorrendo à densitometria, o perfil de bandas obtido por electroforese em gel de agarose é convertido num proteinograma (Figura 3B). Esta técnica permite obter o valor relativo (em percentagem) da área de cada pico correspondente à respetiva banda electroforética.<sup>26, 22</sup>

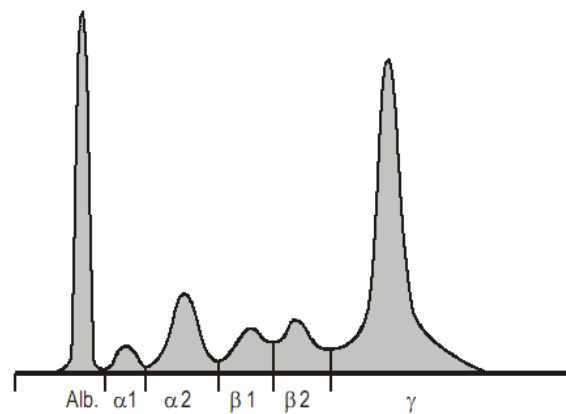
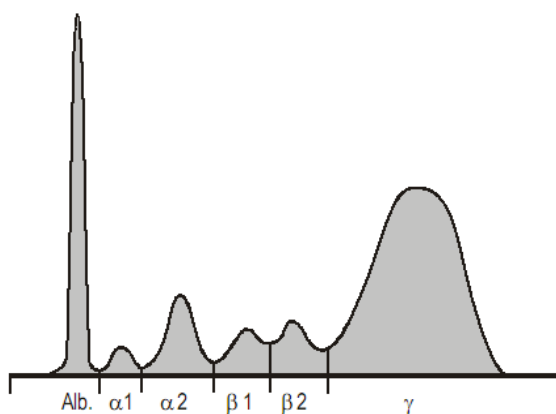


A

B

Figura 3 – Em A é apresentado o perfil de bandas de proteína observado na electroforese em gel de agarose (adaptado<sup>27</sup>). Em B pode observar-se o proteinograma obtido por análise densitométrica do gel de agarose<sup>25</sup>.

As imunoglobulinas monoclonais, quando presentes, frequentemente causam um pico na banda  $\beta$ - $\gamma$ <sup>23,22</sup> (Figura 4B). A banda das  $\gamma$ -globulinas é predominantemente composta por imunoglobulinas do tipo IgG enquanto as imunoglobulinas IgA, IgM, IgD e IgE se sobrepõem na junção  $\beta$ - $\gamma$ .<sup>23,22</sup>



A

B

Figura 4 – Exemplos de perfis electroforéticos. Em A é apresentado um pico policlonal de  $\gamma$ -globulinas, enquanto em B pode observar-se um pico monoclonal de  $\gamma$ -globulinas.<sup>23</sup>

Em situações particulares, a electroforese capilar é usada como técnica complementar à electroforese convencional. A electroforese capilar é uma técnica de separação electroforética baseada na relação carga/massa das diversas proteínas o que a torna mais sensível do que a electroforese em gel de agarose.<sup>28, 22</sup> Assim, permite a separação de bandas pouco visíveis na electroforese convencional<sup>29</sup> e é particularmente sensível na deteção de componentes monoclonais presentes em pequenas concentrações, nomeadamente a IgA ou as cadeias leves. Outra vantagem desta técnica é a não deteção dos picos de fibrinogénio, que constituem uma fonte de resultados falsos positivos quando se utiliza a metodologia convencional de electroforese em gel de agarose.<sup>28, 22</sup>

Para caracterizar a Ig monoclonal utiliza-se a imunofixação<sup>30, 31</sup>. Esta técnica baseia-se na formação de bandas homogéneas de imunoprecipitados que indicam a presença do complexo antigénio-anticorpo (Figura 5 A e B).<sup>32</sup>



Figura 5 – Exemplos de perfis de bandas obtidos na separação das proteínas séricas e urinárias por imunofixação. Em A é apresentado o perfil obtido para o soro sem qualquer tipo de patologia enquanto em B pode observar-se o perfil obtido para o soro e urina de um doente com MM.<sup>32</sup> (Legenda: ELP – electroforese de proteínas; G - IgG; A - IgA; M - IgM; K -  $\kappa$ ; L -  $\lambda$ ; K free –  $\kappa$  livre; L free -  $\lambda$  livre).

A realização da imunofixação compreende 4 etapas.<sup>33, 31</sup> Em primeiro lugar, as proteínas são separadas por electroforese em gel de agarose. De seguida, as proteínas são fixadas e imunoprecipitadas por electroforese através do uso de anti-soros (IgG, IgA, IgM, cadeia leve  $\kappa$  e  $\lambda$ ) diretamente sobre o gel.<sup>33, 31</sup> Os anti-soros difundem-se no gel, o fixador precipita todas as proteínas e os anticorpos precipitam os antigénios correspondentes. A remoção das proteínas solúveis do gel é feita por absorção com papel de filtro e lavagem, enquanto as proteínas precipitadas ficam retidas no interior da matriz do gel. Por fim, procede-se à coloração das proteínas com o corante violeta ácido.<sup>33, 31</sup>

A presença de proteína monoclonal é reconhecida na imunofixação por uma banda bem definida, correspondendo a uma imunoglobulina de cadeia pesada IgM, IgG, IgA, IgE ou IgD e uma banda com a mesma mobilidade de cadeia leve  $\kappa$  ou  $\lambda$ .<sup>33, 31</sup>

### 1.3.2.2. Quantificação da imunoglobulina monoclonal

O componente monoclonal pode ser quantificado por nefelometria, cujos princípios técnicos se baseiam na dispersão da luz quando atinge um imunocomplexo em suspensão. O imunocomplexo é formado quando um soro diluído contendo o analito de interesse é misturado com uma concentração conhecida do anti-soro, em geral tamponado.<sup>34</sup> A dispersão de luz vai aumentando até atingir o seu pico máximo. O ângulo da dispersão de luz é comparado com os resultados obtidos com padrões e calibradores de forma a poder determinar a concentração de analito presente no soro do paciente.<sup>34, 35</sup>

Dependendo do tipo de instrumento usado pode fazer-se a medição do ponto de equilíbrio da reação ou a medição cinética. Os aparelhos que fazem a medição do equilíbrio da reação determinam a altura em que foi atingido o ponto máximo da dispersão de luz após um determinado tempo de reação; a dispersão de luz da amostra é subtraída ao sinal de fundo para se alcançar o sinal final do complexo. A nefelometria cinética mede o aumento de dispersão de luz após se ter iniciado a reação entre o antigénio e o anticorpo, eliminando a necessidade de correção do sinal de fundo que ocorre na amostra. Esta técnica monitoriza a taxa de mudança da dispersão de luz, que aumenta gradualmente, até atingir o pico máximo, e depois decai rapidamente. O pico máximo é o parâmetro de medição do aparelho que é comparado com uma curva padrão, já realizada anteriormente e armazenada na base de dados do aparelho.<sup>36, 37</sup>

Quando se comparam os métodos de medição do ponto de equilíbrio de uma reação com os métodos que medem a cinética da mesma, verifica-se que a avaliação do ponto de equilíbrio é mais simples e os aparelhos necessários são menos sofisticados. No entanto, os métodos cinéticos são os mais sensíveis.<sup>34, 36, 37, 35</sup>

#### **1.4. Manifestações clínicas causadas pela imunoglobulina monoclonal**

As manifestações clínicas no MM estão, na maior parte das situações, associadas à secreção de produtos celulares (moléculas ou subunidades das Igs) e à expansão das células malignas.<sup>38, 39</sup>

No MM, as manifestações clínicas causadas pela Ig monoclonal são a insuficiência renal, a susceptibilidade a infeções, as anomalias da coagulação e o atingimento do sistema nervoso central.<sup>40</sup>

A insuficiência renal acomete 25 % dos doentes e quando associada à Ig monoclonal resulta de uma lesão tubular associada à excreção de cadeias leves. No rim, as cadeias leves são filtradas, reabsorvidas pelos túbulos e finalmente catabolizadas. Contudo, com o aumento da quantidade de cadeias leves apresentada ao túbulo, as células tubulares ficam sobrecarregadas e há comprometimento da reabsorção. Ocorre, então, lesão tubular por toxicidade direta causada pelas cadeias leves ou, indiretamente, pela libertação de enzimas lisossomais. Como consequência da lesão tubular há uma perda de aminoácidos e de glicose na urina e um comprometimento na capacidade do rim para acidificar e concentrar a urina. A proteinúria na urina é seletiva, composta na quase totalidade por cadeias leves e em geral deteta-se pouca albumina porque a função glomerular não está afetada.<sup>40</sup>

A susceptibilidade a infeções bacterianas de repetição aparecem em 25 % dos doentes e resulta de uma deficiência imunológica causada pelo componente M. De facto, na presença de uma concentração muito elevada de uma Ig monoclonal são geradas células reguladoras que suprimem a síntese de Igs normais e aumentam a taxa a que são catabolizadas. Como consequência, os doentes com MM têm uma resposta deficitária a antigénios polissacarídicos, o que justifica a elevada taxa de pneumonias (por *Staphylococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*) e pielonefrites (por *Escherichia coli* e outros Gram-negativos).<sup>41, 42</sup>

Os distúrbios na hemóstase são causados pela ligação da Ig monoclonal às plaquetas e aos fatores de coagulação. Esta ligação impede o seu normal funcionamento e facilita a sua eliminação por fagocitose ou por ativação do complemento.<sup>43</sup>

O atingimento neurológico por uma síndrome de hiperviscosidade, com um quadro clínico de cefaleias, distúrbios visuais e retinopatia, é raro no MM. Esta síndrome depende das propriedades físicas do componente M e é mais comum com paraproteínas IgM, IgG3 e IgA.<sup>44</sup>

### 1.5. Sistema de Estadiamento

Os doentes com MM apresentam uma mediana de sobrevida de aproximadamente 3 anos e apenas 5 % estão vivos 10 anos após o diagnóstico.<sup>45, 46</sup> Em consequência desta heterogeneidade em relação à sobrevida, vários estudos têm sido efetuados com o objetivo de identificar os subgrupos de doentes com pior prognóstico. Alguns fatores de mau prognóstico foram identificados, tais como: idade ( > 65 anos), nível da proteína monoclonal ([IgG] > 7000 mg/dL e [IgA] > 5000 mg/dL), hipercalcémia, lesões osteolíticas, concentração de creatinina superior a 0,95 mg/dL, concentração de albumina sérica inferior a 3 g/dL, concentração de  $\beta_2$ -microglobulina superior ou igual a 6 mg/L, percentagem de plasmócitos na medula óssea superior ou igual a 10 % e deleção nos cromossomas 13 e 17.<sup>45, 46</sup>

De entre os fatores de prognóstico identificados, a concentração de  $\beta_2$ -microglobulina e a concentração de albumina são as mais importantes. O *International Myeloma Working Group* (IMWG) relacionou as características clínicas do MM com a sobrevivência em 11171 casos. Com base em análises multivariadas, a  $\beta_2$ -microglobulina e a albumina foram identificadas como sendo fatores de prognóstico independentes. Este dado esteve na base da criação do sistema de estadiamento *International Staging System* (ISS) (Tabela 2) mais utilizado, atualmente, na prática clínica.<sup>47</sup>

A  $\beta_2$ -microglobulina sérica é uma proteína associada ao MHC classe I (complexo principal de histocompatibilidade classe I) e é o mais importante e fiável fator prognóstico usado na clínica. A sua concentração é diretamente proporcional à massa tumoral e à função renal e, quando elevada, a sobrevida do doente está significativamente comprometida. O seu significado biológico no MM é desconhecido mas pensa-se que

poderá estar relacionado com vias de resistência a fármacos.<sup>48, 49</sup> A albumina correlaciona-se com o *performance status* do doente e com atividade do sistema imunitário. Concentrações baixas de albumina sérica mostraram ter um valor preditivo na sobrevida.<sup>45</sup>

Tabela 2 – Sistema Internacional de Estadiamento do MM (adaptada<sup>47</sup>).

<b>Estádios</b>	<b>Características Clínicas</b>	<b>Tempo médio de sobrevivência (meses)</b>
<b>I</b>	[ $\beta_2$ -microglobulina] < 3,5 $\mu\text{g/mL}$ [albumina] $\geq$ 3,5 g/dl	62
<b>II</b>	[ $\beta_2$ -microglobulina] < 3,5 $\mu\text{g/mL}$ e [albumina] < 3,5 g/dL ou [ $\beta_2$ -microglobulina] = [3,5 – 5,5] $\mu\text{g/mL}$	44
<b>III</b>	[ $\beta_2$ -microglobulina] $\geq$ 5,5 $\mu\text{g/mL}$	29

### 1.6. Tratamento e avaliação da resposta à terapêutica

O tratamento do MM só está indicado nos casos em que existe sintomatologia. No tratamento são usadas combinações de fármacos com o objetivo de superar os mecanismos constitucionais de resistência das células malignas. Os esquemas terapêuticos utilizados na prática clínica incluem: BD, TD, MPT e CP (bortezomib (B), dexametasona (D), talidomida (T), melfalano (M), prednisolona (P) e ciclofosfamida (C)).<sup>50, 51</sup>

O melfalano foi, na década de 60, o primeiro fármaco, a mostrar eficácia em doentes com MM. A taxa de resposta em primeira linha foi de 60 % com os doentes a atingirem uma sobrevida média de 30 meses.<sup>52, 53</sup> Posteriormente, outros alquilantes foram testados, como a ciclofosfamida, e os resultados foram semelhantes.<sup>54, 55</sup>

O bortezomib foi o primeiro de uma nova classe de fármacos – os inibidores do proteassoma. Além de inibir um elemento essencial na degradação das proteínas (proteassoma), o bortezomib impede a adesão dos plasmócitos malignos às células estromais da medula óssea, diminui a atividade angiogénica e ativa a morte celular por

apoptose. No primeiro estudo em que foi utilizado mostrou uma significativa atividade em doentes refratários: 35 % obtiveram resposta e a sobrevida média foi de 12 meses.<sup>56, 57, 58</sup>

A observação de que a neovascularização estava aumentada nos doentes com MM, fez com que a utilização da talidomida fosse testada em doentes com doença refratária. A sua utilização foi aprovada porque mostrou, nestes doentes, uma taxa de resposta de 50 % e uma sobrevida global aos 2 anos de 50 %.<sup>59</sup>

Os critérios de resposta à terapêutica foram estabelecidos pelo IMWG. De acordo com estes critérios é possível distinguir 5 tipos de resposta: resposta completa rigorosa (sCR), resposta completa (CR), muito boa resposta parcial (VGPR), resposta parcial (PR) e doença estável (SD).<sup>60</sup>

A CR caracteriza-se por uma imunofixação negativa tanto no soro como na urina, pelo desaparecimento de qualquer plasmocitoma de tecidos moles e por uma percentagem de plasmócitos na medula óssea menor ou igual a 5 %.<sup>60</sup> A sCR, para além das características mencionadas para a CR, requer uma razão de cadeias leves livres ( $\kappa/\lambda$ ) normal (1,35 a 2,70) e uma ausência de clones de plasmócitos na medula óssea por imunohistoquímica ou imunofluorescência.<sup>60</sup> A VGPR caracteriza-se pela presença de proteína monoclonal no soro e na urina detetável através de imunofixação mas não por electroforese ou por uma redução igual ou superior a 90 % da proteína monoclonal sérica associada a uma concentração da proteína monoclonal urinária inferior a 100 mg/24h.<sup>60</sup> A PR consiste numa redução de proteína monoclonal superior ou igual a 50 % no soro associada ou a uma redução da proteína monoclonal urinária igual ou superior a 90 % ou a uma concentração desta proteína inferior a 200 mg/24h.<sup>60</sup> Considera-se SD quando os critérios de CR, VGPR, PR ou progressão da doença não estão presentes.<sup>60</sup>

Considera-se progressão da doença quando um dos seguintes critérios está presente: um aumento superior a 25 % do nível da proteína monoclonal no soro, que deve também traduzir-se num aumento mínimo de 5 g/L, um aumento superior a 25 % na excreção de cadeias leves na urina de 24h, que também deve traduzir-se num aumento mínimo de 200 mg/24h, um aumento superior a 25 % dos plasmócitos do aspirado medular, um aumento definitivo no tamanho das lesões osteolíticas já existentes ou de plasmocitomas em tecidos moles, o desenvolvimento de novas lesões osteolíticas ou de plasmocitomas em tecidos moles ou por último o desenvolvimento de hipercalcémia que não seja atribuída a nenhuma outra causa.<sup>60</sup>



## **2. Objetivos**

No Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho E. P. E. (CHVNGE), que presta serviços de saúde a uma população de cerca de 700000 habitantes, nunca foi efetuado qualquer estudo que tenha caracterizado do ponto de vista clínico e laboratorial os doentes com MM ou que tenha analisado o impacto dos fatores de mau prognóstico, recentemente descritos na literatura, na sobrevida destes doentes. Adicionalmente, a influência do tipo de imunoglobulina monoclonal na sobrevida e na resposta ao tratamento é desconhecida. Assim, o presente projeto de mestrado teve como principais objetivos proceder, nos doentes com MM seguidos no CHVNGE, :

- (i) A sua caracterização clínico-laboratorial;
- (ii) A avaliação da relação entre os fatores de mau prognóstico e o tipo de imunoglobulina monoclonal;
- (iii) A avaliação do impacto na sobrevida global dos fatores de mau prognóstico identificados ao diagnóstico;
- (iv) A avaliação do impacto na sobrevida global causado pelo tipo de imunoglobulina monoclonal;
- (v) A avaliação da correlação entre a resposta à terapêutica de primeira linha e o tipo de imunoglobulina monoclonal.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Seleção e caracterização dos doentes**

Realizou-se um estudo retrospectivo que incluiu todos os casos de MM diagnosticados e tratados no CHVNGE entre Janeiro de 2010 e Dezembro de 2011. A seleção dos doentes foi efetuada a partir dos registos do exame histológico de medula óssea, realizados pelo Serviço de Anatomia Patológica por suspeita de MM. Através da consulta dos processos clínicos, autorizada pelo Conselho de Ética do CHVNGE, foram colhidos os seguintes dados clínico-laboratoriais presentes ao diagnóstico: a idade e o sexo dos doentes, o tipo e concentração da imunoglobulina monoclonal, a percentagem de plasmócitos medulares, o resultado do estudo citogenético para as deleções nos cromossomas 13 e 17, o resultado do exame radiológico do esqueleto para a identificação de lesões osteolíticas e os valores séricos do cálcio, creatinina, albumina e  $\beta_2$ -microglobulina. O estadió de cada doente ao diagnóstico foi calculado de acordo com as recomendações do ISS.<sup>47</sup> Foi ainda pesquisado no processo clínico o tipo de tratamento de primeira linha efetuado<sup>50, 51</sup> e a resposta ao tratamento foi avaliada segundo os critérios do IMWG.<sup>60</sup>

#### **3.2. Caracterização e quantificação da imunoglobulina monoclonal**

A caracterização e quantificação da imunoglobulina monoclonal foram efetuadas no soro e urina dos doentes. A amostra de sangue foi inicialmente colhida para um tubo seco e, posteriormente, centrifugado a 3500 rpm durante 8 minutos de modo a que o soro ficasse separado dos outros componentes do sangue. Relativamente à urina, requereu-se ao doente que juntasse todo o volume urinário durante 24h num recipiente sem aditivo. Desta amostra foi retirada uma alíquota que foi centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos para eliminar os constituintes do sedimento urinário.

### 3.2.1. Caracterização do tipo de imunoglobulina monoclonal

A caracterização, no soro e na urina, do tipo de imunoglobulina monoclonal por imunofixação foi realizada em paralelo com a determinação do perfil proteico por electroforese em gel de agarose, utilizando um aparelho de electroforese semi-automático Hydrasys Phadia® (Sebia, Brasil) (Figura 6) e seguindo as instruções dos kits comerciais Hydragel 30 Protein, Hydragel 4 IF e Hydragel 2 Bence Jones (Sebia, Brasil).



Figura 6 - Sistema semi-automático Electrophoresis Hydrasys Phadia® (Sebia, Brasil).

O kit Hydragel 30 Protein foi utilizado na separação, por electroforese, das proteínas humanas do soro e urina, em meio alcalino ( $\text{pH} = 9,2$ ), em cinco frações principais: albumina,  $\alpha_1$ -globulinas,  $\alpha_2$ -globulinas,  $\beta$ -globulinas e  $\gamma$ -globulinas. As proteínas separadas foram, posteriormente, coradas com negro de amido.

Os kit Hydragel 4 IF e kit Hydragel 2 Bence Jones foram utilizados na caracterização do tipo de imunoglobulina monoclonal por imunofixação. Após a separação das proteínas séricas e urinárias por electroforese, anti-soro anti-IgG, IgA, IgM e anti- $\kappa$  e  $\lambda$  foi colocado sobre as frações separadas formando um imunoprecipitado. De seguida, as proteínas não precipitadas foram lavadas e o imunoprecipitado foi corado com violeta ácido.

### **3.2.2. Quantificação da imunoglobulina monoclonal**

A quantificação de imunoglobulina presente nas amostras de soro e urina foi realizada por nefelometria utilizando um analisador multiparamétrico Behring Nephelometer II (Dade Behring, USA) (Figura 7) com reagentes e calibradores fornecidos pelo fabricante.



Figura 7 – Analisador multiparamétrico Behring Nephelometer II (Dade Behring, USA).

Assim, 100  $\mu$ L de amostra (soro ou urina) foi inicialmente diluída com o N diluente de acordo com as indicações do fabricante e, posteriormente, adicionado o anti-soro específico para a imunoglobulina que se pretendeu quantificar. O resultado foi obtido automaticamente pelo nefelômetro e a determinação foi realizada por uma comparação com um padrão de concentração conhecida (curva de calibração).

### **3.3. Análise estatística**

A codificação dos dados clínico-laboratoriais e a análise estatística foi efetuada utilizando os programas Excel® 2007 (Microsoft Corporation, USA) e o GraphPad Prism 5® (GraphPad Software Inc., USA).

As características clínicas e laboratoriais foram analisadas de forma descritiva. Na análise univariada, as curvas de sobrevida global foram determinadas pelo método de Kaplan-Meier e as curvas de sobrevivência foram comparadas pelo teste de log rank. As

variáveis com significado estatístico na análise univariada foram submetidas a uma análise multivariada utilizando-se a regressão múltipla de Cox com o objetivo de determinar aquelas que possuíam valor prognóstico independente. Consideraram-se estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Caracterização clínico-laboratorial dos doentes com MM

No período entre Janeiro de 2010 e Dezembro de 2011 foi efetuado o diagnóstico de MM em 44 doentes. Ao diagnóstico, a idade dos doentes variou entre 51 e 90 anos e a média foi de  $70,9 \pm 9,9$ , (Figura 8 A). Em relação ao sexo, 36,4 % eram do sexo masculino e 63,6 % eram do sexo feminino (Figura 8 B).

O estudo da imunofixação por caracterização do tipo de imunoglobulina monoclonal revelou que o MM do tipo IgG foi o mais prevalente (61,4 %) seguido pelo MM do tipo IgA (27,3 %). O número de casos de MM IgD (2,3 %) e de MM de cadeias leves (9,1 %) foi muito reduzido e não se registou qualquer caso de MM biclonal (Figura 8 C). A quantificação das imunoglobulinas monoclonais por nefelometria mostrou que a concentração de IgG e a concentração de IgA apresentavam os valores médios mais elevados ( $4213,6 \pm 2561,4$  e  $2441,7 \pm 1692,5$  mg/dL, respetivamente) (Figura 8 D). O MM IgD e o MM de cadeias leves não apresentaram pico monoclonal.

A concentração de creatinina sérica variou entre 0,5 e 12,9 mg/dL e a média foi de  $1,8 \pm 2,5$ , sendo que 50 % dos doentes apresentaram um valor elevado ([creatinina] > 0,95 mg/dL) (Figura 8 E). A concentração de cálcio sérico variou entre 7,3 e 14,9 mg/dL e a média foi de  $9,5 \pm 1,5$ , sendo que 26,8 % dos doentes apresentaram hipercalcémia ([cálcio]  $\geq 9,7$  mg/dL) (Figura 8 F).

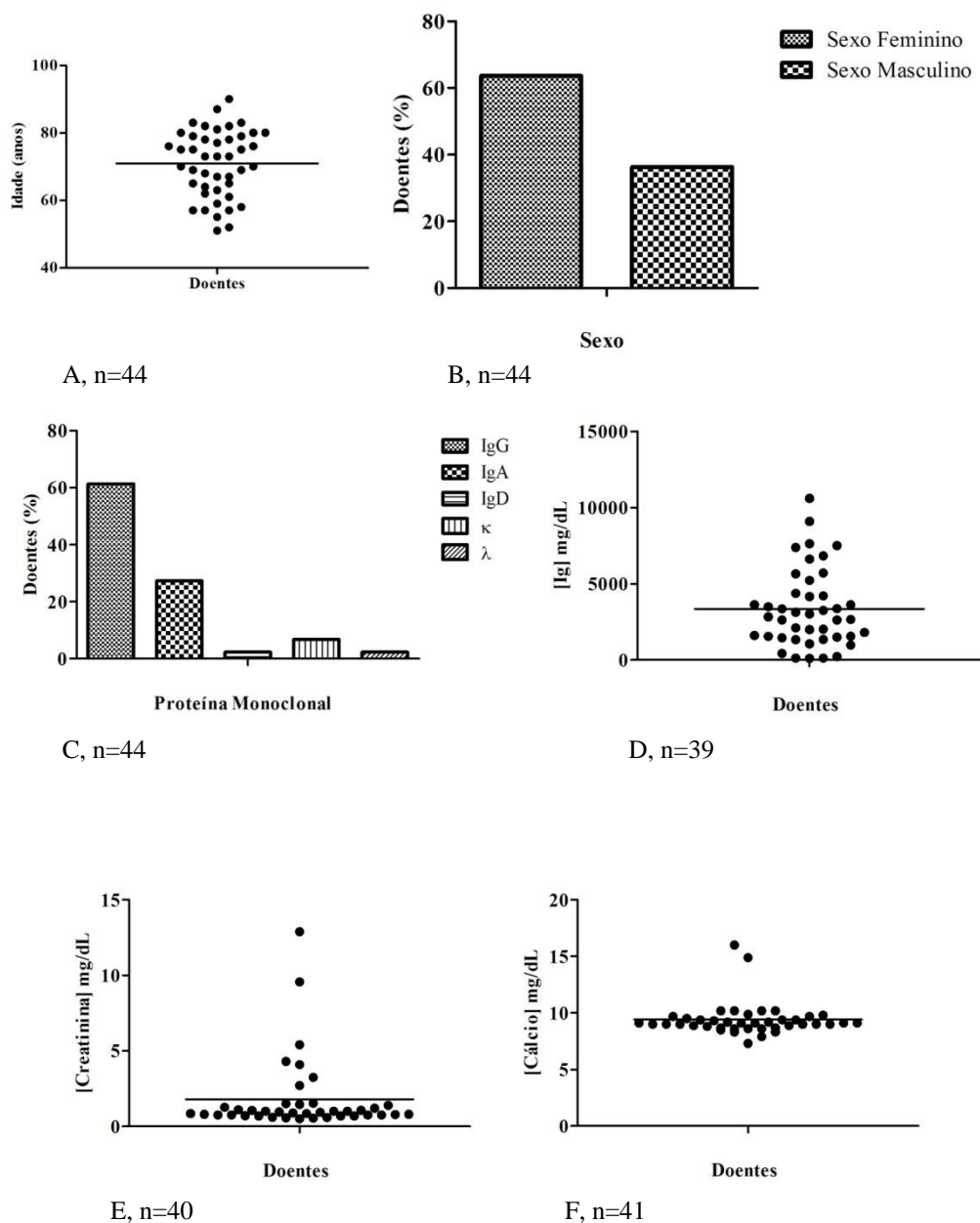


Figura 8 - Distribuição dos doentes com MM de acordo com: a idade (A), o sexo (B), a caracterização do tipo de imunoglobulina monoclonal (C), a concentração de Ig monoclonais (D), a concentração de creatinina sérica (E) e a concentração de cálcio sérico (F).

A concentração de albumina sérica variou entre 1,7 e 4,7 g/dL e a média foi de  $3,8 \pm 0,8$ , sendo que 14 % dos doentes apresentaram hipoalbuminémia ( $[\text{albumina}] \leq 3 \text{ g/dL}$ ) (Figura 9 A). A concentração de  $\beta_2$ -microglobulina variou entre 1,6 e 48 mg/L e a média foi de  $8 \pm 9,1$ , sendo que 35,7 % dos doentes apresentaram um valor elevado ( $[\beta_2\text{-microglobulina}] \geq 6 \text{ mg/L}$ ) (Figura 9 B).

Em relação ao ISS, a maior parte dos doentes encontrava-se igualmente distribuída pelos estadios II (36,6 %) e III (36,6 %) enquanto 26,8 % apresentava um estadio I (Figura 9 C). A percentagem de plasmócitos variou entre 1 e 49 % e a média foi de  $16,6 \pm 13,6$ , sendo que 77,5 % dos doentes apresentavam um valor de plasmócitos igual ou superior a 10 % (Figura 9 D).

No estudo citogenético por hibridização *in situ* (FISH) foram pesquisadas as deleções nos cromossomas 13 e 17. As deleções nos cromossomas 13 e 17 estavam presentes em 23,4 % e 10,3 % dos casos, respetivamente (Figura 9 E). As radiografias convencionais do esqueleto mostraram lesões osteolíticas em 26,8 % dos casos (Figura 9 F).



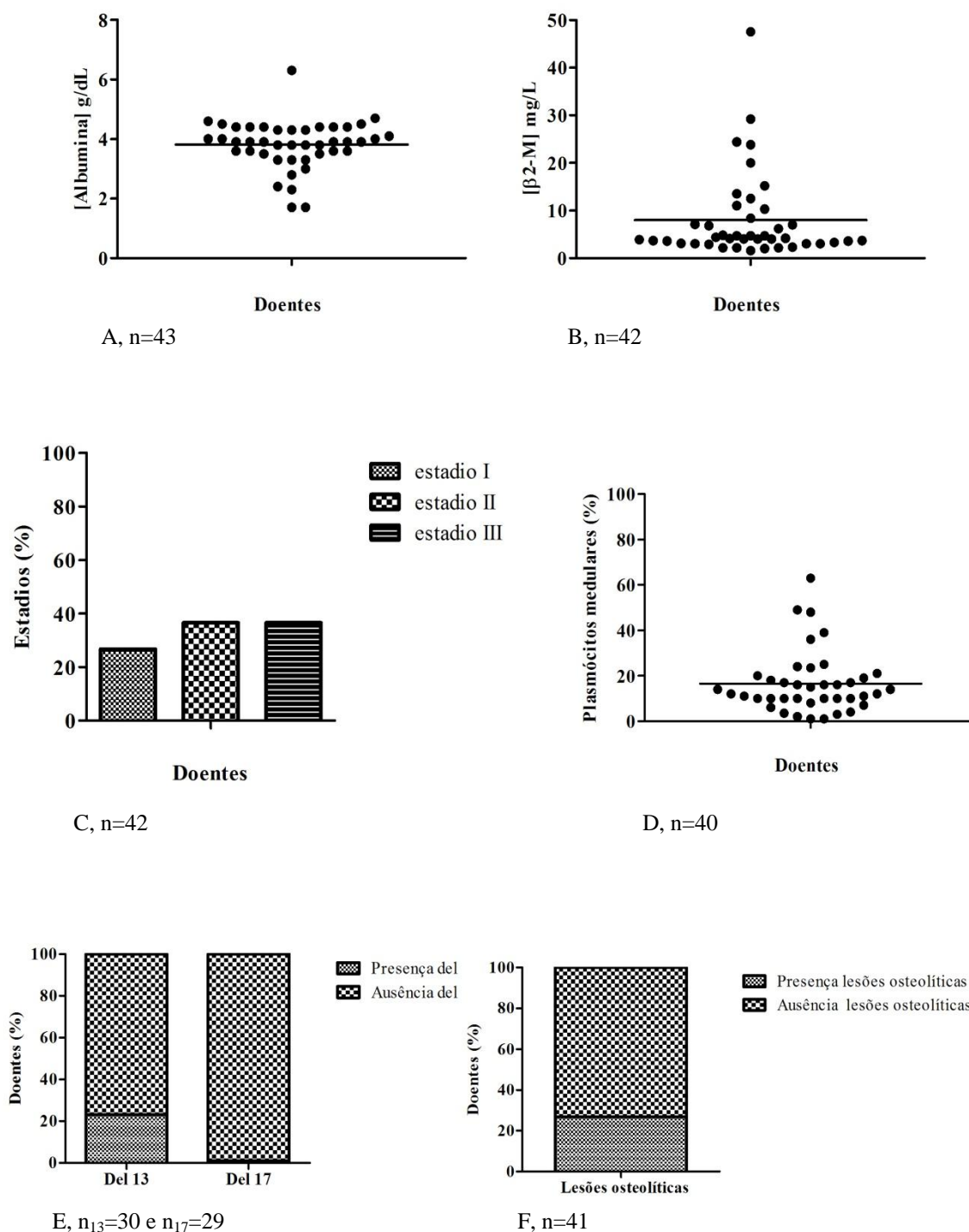


Figura 9 - Distribuição dos doentes com MM de acordo com: a concentração de albumina (A), a concentração de  $\beta_2$ -microglobulina (B), os estádios (C), a percentagem de plasmócitos medulares (D), as deleções nos cromossomas 13 e 17 (E) e as lesões osteolíticas (F).

#### 4.2. Avaliação da relação entre os fatores de mau prognóstico e o tipo de imunoglobulina monoclonal

Nos dois tipos de MM mais prevalentes, MM IgG e IgA, foi efetuada uma caracterização clínico-laboratorial individual (Figura 10 e Figura 11).

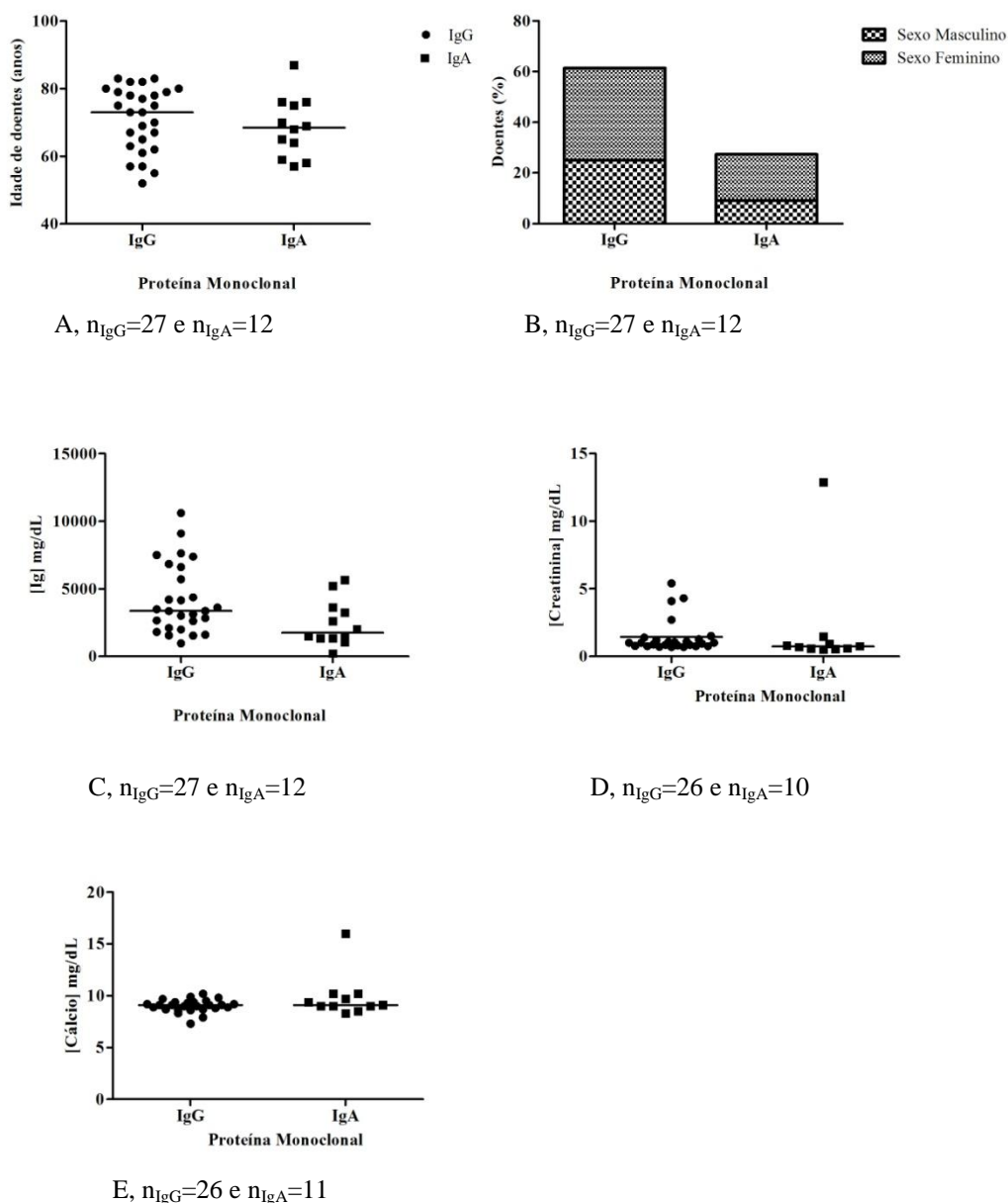


Figura 10 – Distribuição dos doentes com MM IgG e MM IgA de acordo com: a idade (A), o sexo (B), a concentração de Ig monoclonal (C), a concentração de creatinina sérica (D) e a concentração de cálcio sérico (E).

Para os dados clínico-laboratoriais analisados verificou-se que não existiam diferenças significativas entre os dois tipos de MM com exceção da deleção no cromossoma 13 ser encontrada num maior número de casos de MM IgA que no MM IgG (50 % IgA vs. 15,8 % IgG) (Figura 11 E) e da média de concentração de Ig no MM IgG ser duas vezes superior à da encontrada no MM IgA ( $4213,6 \pm 2561,4$  vs.  $2441,7 \pm 1692,5$  mg/dL, respetivamente) (Figura 10 C).

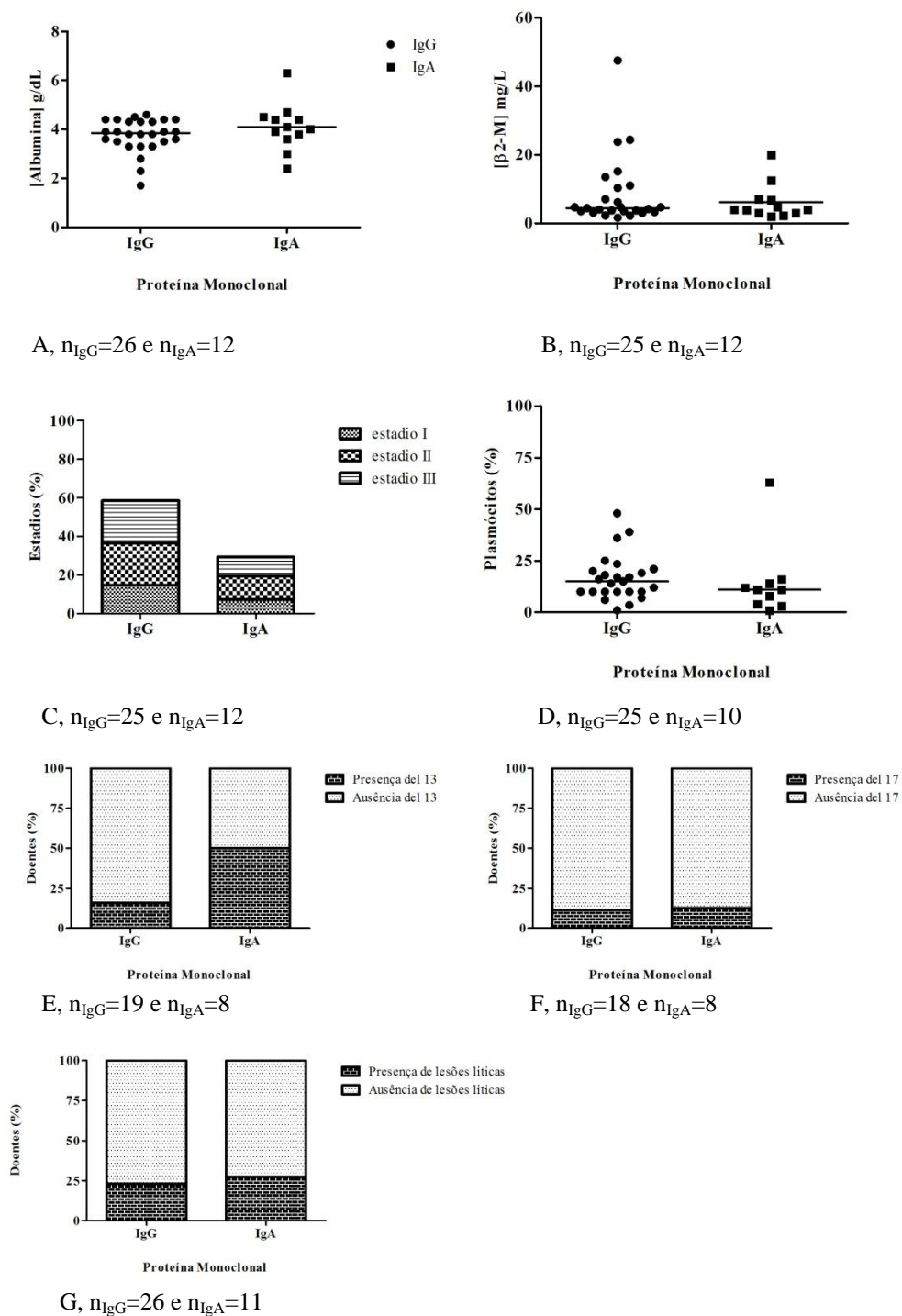
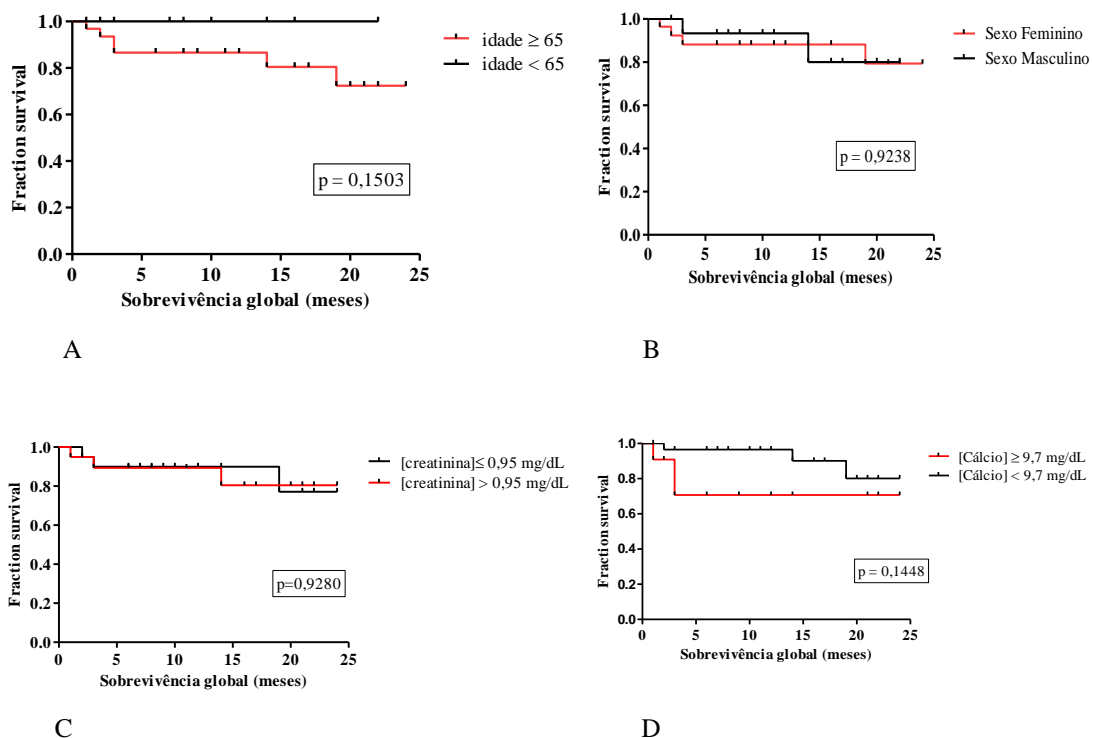


Figura 11 - Distribuição dos doentes com MM IgG e MM IgA de acordo com: a concentração de albumina (A), a concentração de  $\beta_2$ -microglobulina (B), os estadios (C), a percentagem de plasmócitos medulares (D), a presença de deleção no cromossoma 13 (E), a presença de deleção no cromossoma 17 (F) e a presença de lesões osteolíticas (G).

### 4.3. Avaliação do impacto na sobrevida global dos fatores de mau prognóstico identificados ao diagnóstico

No final do estudo, com uma média de seguimento de 11 meses, 86,4 % dos doentes permaneceram vivos ou censurados e 13,6 % tinham falecido por complicações relacionadas com a doença hematológica.

Na análise univariada, as variáveis clínicas significativamente associadas a um pior prognóstico foram a deleção no cromossoma 13 (Figura 12 I), as lesões osteolíticas (Figura 12 J) e a concentração de albumina inferior ou igual a 3 g/dL (Figura 12 E). Contudo, foi observada uma tendência para um prognóstico desfavorável em doentes com as seguintes variáveis clínicas: concentração de  $\beta_2$ -microglobulina superior ou igual a 6 mg/L (Figura 12 F) e a ausência de resposta ao tratamento (Figura 14).



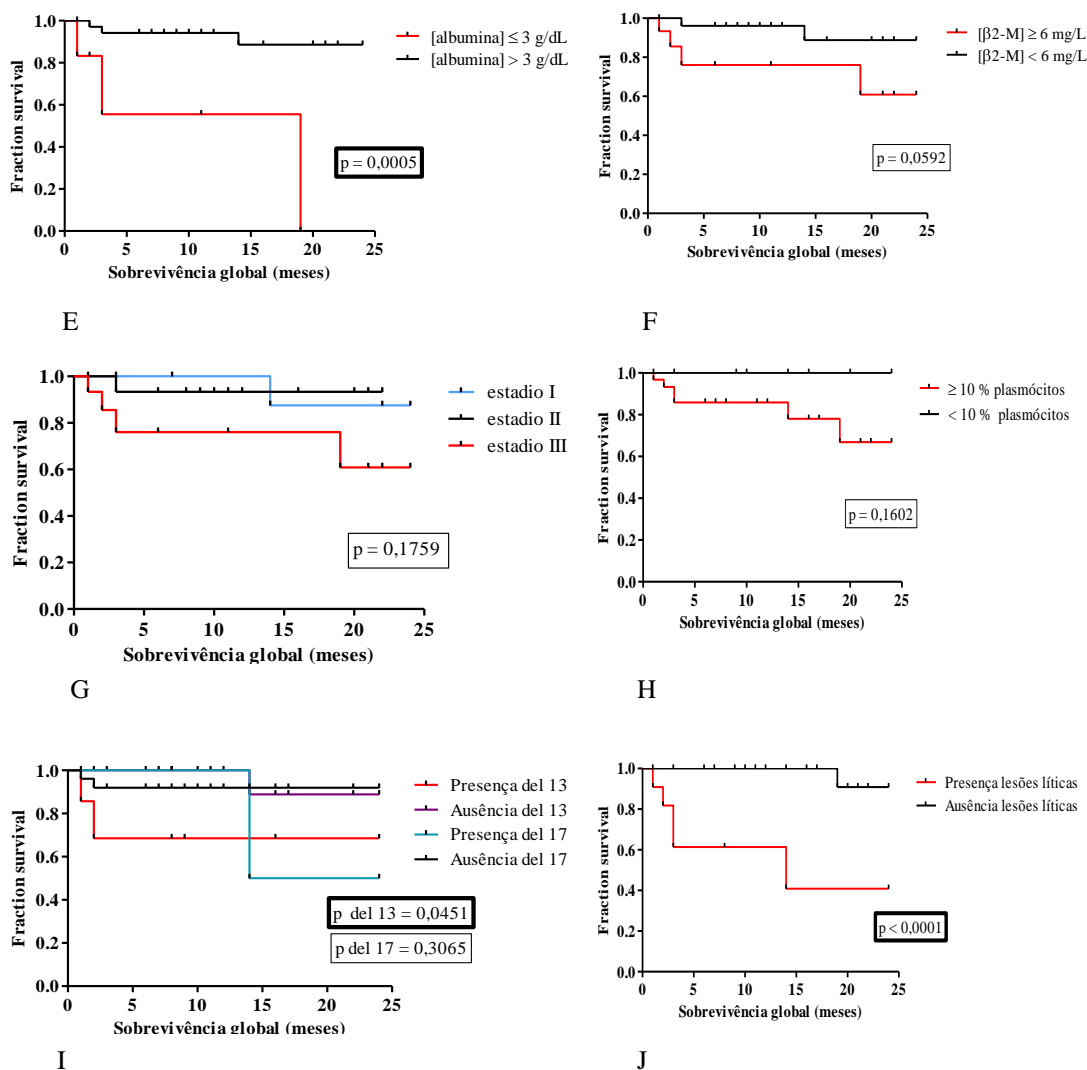


Figura 12 – Análise da sobrevida global para as variáveis clínico-laboratoriais em estudo: idade (A), sexo (B), concentração de creatinina sérica (C), concentração de cálcio sérico (D), concentração de albumina (E), concentração de  $\beta_2$ -microglobulina (F), estadios (G), percentagem de plasmócitos medulares (H), deleções nos cromossomas 13 e 17 (I) e lesões osteolíticas (J).

Após a identificação das variáveis significantes na análise univariada, as mesmas foram submetidas a análise multivariada utilizando-se a regressão múltipla de Cox. O objetivo foi determinar quais as variáveis que possuíam um valor prognóstico independente e quantificar a sua importância na sobrevida.

Os resultados indicaram que a presença de lesões osteolíticas, a presença da deleção no cromossoma 13 e uma concentração de albumina inferior ou igual a 3 g/dL ao diagnóstico estavam associadas de forma independente a uma sobrevida mais curta (Tabela 3).

Tabela 3– Avaliação do risco proporcional pelo modelo de regressão de Cox nas variáveis com significado estatístico, ( $p < 0,05$ ).

<b>Variável</b>	<b>Valor de <math>p</math></b>	<b>Risco relativo (Hazard ratio)</b>	<b>Intervalo de confiança (IC) 95 %</b>
<b>Lesões osteolíticas</b>	< 0,0001	60,71	7,918 a 465,50
<b>Deleções no cromossoma 13</b>	0,0451	17,87	1,065 a 299,90
<b>[Albumina] <math>\leq</math> 3 g/dL</b>	0,0005	150,10	9,110 a 2472

#### **4.4. Avaliação do impacto na sobrevida global causado pelo tipo de imunoglobulina monoclonal**

Do estudo analisado não foram observadas diferenças significativas na sobrevida global em função dos dois tipos de imunoglobulina monoclonal mais prevalentes: IgG e IgA. Contudo foi observada uma tendência para um prognóstico desfavorável em doentes com MM IgG ( $p = 0,2273$ ) (Figura 13 B).

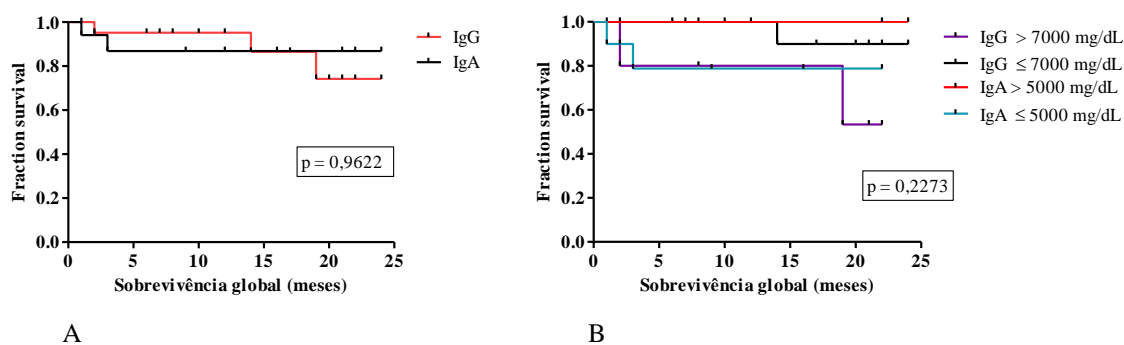


Figura 13 - Análise da sobrevida global para as variáveis clínico-laboratoriais em estudo: tipo (A) e concentração de Ig monoclonal (B).

#### 4.5. Avaliação da correlação entre a resposta à terapêutica de primeira linha e o tipo de imunoglobulina monoclonal

O tratamento foi efetuado em 33 doentes. Os esquemas de quimioterapia utilizados em primeira linha tiveram, na sua maioria, bortezomib e dexametasona, talidomida e dexametasona e melfalano, prednisolona e talidomida um intuito curativo e menos de 20 % dos doentes foram tratados com um regime paliativo (ciclofosfamida e prednisolona) (Tabela 4).

Tabela 4 – Esquemas de quimioterapia de primeira linha utilizados com intuito curativo (BD, TD e MPT) e intuito paliativo (CP), n = 33 doentes.

Quimioterapia de 1ª linha	Percentagem (%)
BD	24,24
TD	18,18
MPT	39,39
CP	18,19
<b>Total</b>	<b>100,00</b>

(Legenda: B - Bortezomib, T - Talidomida, M - Melfalano, P - Prednisolona, D - Dexametasona e C – Ciclofosfamida).



Nesta série verificou-se que apenas 37 % dos doentes obteve resposta completa ou parcial enquanto em 63 % dos doentes, a doença manteve-se estável ou progrediu apesar do tratamento instituído.

O tipo de resposta alcançado não teve uma relação estatisticamente significativa com a sobrevida global mas existe uma tendência clara para que os doentes que não obtiveram resposta tenham tido uma maior taxa de mortalidade (Figura 14).

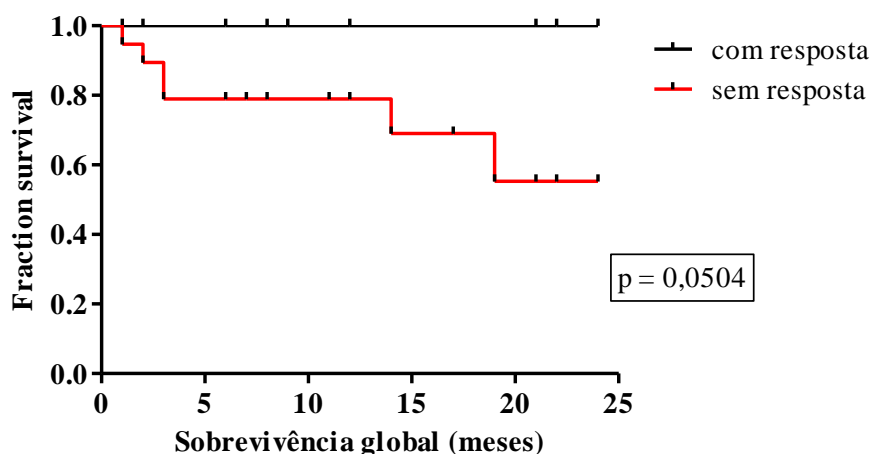


Figura 14 - Análise da sobrevida global para a resposta à quimioterapia de primeira linha.

Quando foram analisados de forma individual os dois tipos de MM mais prevalentes (IgG e IgA) verificou-se que a percentagem de doentes que obtiveram resposta à quimioterapia de primeira linha era maior no MM IgA (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise da resposta à quimioterapia de primeira linha.

	%	IgG	IgA
<b>Não respondeu</b>	63	42	
<b>Respondeu</b>	37	58	

## 5. Discussão

Neste trabalho deu-se especial importância ao papel da imunoglobulina no prognóstico do MM e na possível correlação deste fator com os demais fatores de mau prognóstico, visto que neste campo as opiniões dos autores ainda não são concordantes.<sup>61</sup> É importante considerar a concentração e o tipo de Ig no prognóstico para que se possa estimar a esperança média de vida dos doentes e a resposta ao tratamento aplicado.<sup>61, 52, 50, 51, 54, 60</sup>

### i) Caracterização clínico-laboratorial dos doentes com MM

No presente estudo, os doentes com MM apresentaram uma média de idades de 70,9 anos que é concordante com o descrito na literatura.<sup>62</sup> Relativamente ao sexo, a prevalência foi maior no sexo feminino (63,9 %). Este dado contrasta com o relatado em vários estudos<sup>1</sup> e pode ser devido a características próprias da população estudada.

Cerca de metade dos doentes analisados apresentaram um valor de creatinina aumentado e em um terço foi possível detetar um aumento da  $\beta_2$ -microglobulina e do cálcio no soro. As alterações da concentração sérica de creatinina, cálcio e  $\beta_2$ -microglobulina estão frequentemente associadas entre si e surgem em cerca de 30-40 % dos doentes.<sup>63</sup> A insuficiência renal (IR) traduz-se, laboratorialmente, por uma elevação da creatinina sérica e, na maioria dos doentes, o grau de IR é moderado (creatinina sérica < 4 mg/dL). A hipercalecémia é a segunda causa mais frequente de IR no MM<sup>63</sup> e a concentração de  $\beta_2$ -microglobulina aumenta com o comprometimento da função renal.<sup>63</sup> No nosso estudo registou-se uma discrepância de percentagem de doentes com IR (50 %) e com cálcio ou  $\beta_2$ -microglobulina elevada (cerca de 30 % em ambos os casos). Este achado é justificado pelo facto da principal causa de IR ser a excreção das cadeias leves e não a hipercalecémia<sup>63</sup> e pelo facto de a maioria dos doentes ter uma IR moderada, e, portanto, insuficiente para causar elevações da  $\beta_2$ -microglobulina.<sup>63</sup>

No presente estudo um terço dos doentes apresentaram lesões osteolíticas. A destruição óssea, por ativação dos osteoclastos, é uma característica clínica proeminente no MM (afeta 25 % dos doentes)<sup>2</sup> e é responsável pelo aparecimento de hipercalecémia. A percentagem de doentes com lesões osteolíticas e com hipercalecémia foram idênticas, o

que significa que, nos doentes estudados, as duas alterações se encontraram correlacionadas.<sup>2</sup>

Em menos de 20 % dos doentes foi encontrado um valor de albumina sérica baixa. A causa de uma concentração de albumina sérica baixa no MM é multifatorial. O deficiente aporte de proteínas numa faixa etária elevada<sup>40</sup> e a associação com a Amiloidose (AL) são causas frequentes.<sup>64</sup> A população estudada apresentava uma faixa etária elevada e provavelmente défices alimentares de proteínas. Como a pesquisa da substância amiloide não é efetuada por rotina, não foi possível confirmar qualquer correlação entre a percentagem de doentes com hipoalbuminémia e AL.<sup>40</sup>

A maioria dos doentes (77,5 %) apresentava uma infiltração difusa da medula óssea por plasmócitos malignos. A percentagem de plasmócitos é uma das medidas de carga tumoral que condiciona um prognóstico adverso.<sup>2</sup>

No presente estudo, a deleção no cromossoma 13 foi identificada em 23,4 % dos doentes enquanto a deleção no cromossoma 17 estava presente em 10,3 % dos casos. O valor encontrado para a deleção no cromossoma 17 é idêntico ao encontrado noutros estudos (5 %)<sup>65</sup> mas a presença da deleção no cromossoma 13 foi significativamente menor em relação à relatada na literatura (54 %)<sup>65</sup>. A razão para esta discrepância pode dever-se ao facto destas alterações terem sido pesquisadas num número reduzido de doentes (deleção 13, n= 30) e da amostra ser pequena.

A caracterização da classe da Ig monoclonal, por imunofixação, mostrou que a IgG, presente em 61,4 % dos doentes, era a mais frequente e a IgD, presente em apenas 2,3 % a mais rara. A quantificação da proteína monoclonal, por nefelometria, mostrou que o valor médio de IgG e IgA era três vezes superior ao normal enquanto a IgD não apresentava qualquer aumento. Estes achados são os esperados porque a IgG representa 75 % de todas as Igs do soro e tem a maior concentração sérica ([IgG] – 680-1480 mg/dL).<sup>66</sup> A IgD, por seu turno, representa apenas 0,2 % de todas as Igs e tem uma das concentrações mais baixas no soro ([IgD] – 0-4 mg/dL).<sup>66</sup>

Por fim, mais de um terço dos doentes apresentava um estadio ISS III. O critério que determina este estadio é a presença da concentração de  $\beta_2$ -microglobulina no soro igual ou superior a 5,5 mg/L<sup>47</sup> e isto sucedeu em 30 % dos doentes.

ii) Avaliação do impacto na sobrevida global dos fatores de mau prognóstico identificados ao diagnóstico

O prognóstico dos doentes com MM é muito heterogêneo com a sobrevida global que pode variar ente alguns meses até mais de dez anos.<sup>45, 46</sup> Esta variabilidade pode ser causada por fatores inerentes ao doente e a propriedades específicas do próprio tumor.

A influência desfavorável no prognóstico em doentes com mais de 65 anos está bem estabelecida enquanto o impacto do sexo no prognóstico é irrelevante. Estes dados foram confirmados no presente estudo. Na faixa etária dos doentes com idade superior a 65 anos existe um maior número de comorbilidades e um menor *performance status* o que condiciona a utilização ou a dose de alguns agentes terapêuticos, diminuindo a probabilidade de obtenção de resposta à terapêutica.

Na literatura, a função renal, a concentração da  $\beta_2$ -microglobulina e as alterações citogenéticas são dos fatores com maior impacto na sobrevida global. Destes, apenas a  $\beta_2$ -microglobulina e a deleção no cromossoma 17 mostraram, em alguns estudos, serem fatores prognósticos independentes. Por seu turno, a elevada percentagem de plasmócitos medulares, as lesões osteolíticas, a hipoalbuminémia e a concentração de Ig parecem ter apenas um papel modesto na sobrevida. Finalmente, o isotipo parece não ter qualquer influência no prognóstico.<sup>67, 68</sup>

Dos fatores com maior impacto na sobrevida global, apenas a deleção no cromossoma 13 ( $p=0,0451$ ) e a concentração de  $\beta_2$ -microglobulina elevada mostraram uma tendência para um pior prognóstico. Surpreendentemente, o valor da concentração de creatinina e a deleção no cromossoma 17 não tiveram qualquer influência no prognóstico. A concentração da  $\beta_2$ -microglobulina correlaciona-se com a carga tumoral pelo que, quanto maior a concentração pior o prognóstico. A deleção no cromossoma 13 causa a perda do gene supressor tumoral Rb, responsável por codificar uma fosfoproteína que inibe a transição G1-S do ciclo celular.<sup>69, 70</sup>

A presença de lesões osteolíticas, a concentração de albumina e a percentagem de plasmócitos, influenciaram negativamente a sobrevida e, as duas primeiras, conjuntamente com a deleção no cromossoma 13, foram os únicos fatores de prognóstico descritos na literatura que tiveram um significado prognóstico independente. A hipoalbuminémia e as lesões líticas associam-se a um baixo *performance status* e a diminuição da concentração

da albumina ainda se associa a uma resposta imunológica deficitária. Os plasmócitos quando em grande número limitam o espaço na medula para o crescimento de outras linhas celulares do sistema hematopoiético e como consequência o doente apresenta-se com citopenias.<sup>71</sup>

- iii) Avaliação da relação entre os fatores de mau prognóstico e o tipo de imunoglobulina monoclonal e do impacto na sobrevida global causado pelo tipo de imunoglobulina monoclonal

A pesquisa de uma possível relação entre a classe de Igs e os fatores de mau prognóstico, mencionados na literatura, foi efetuada apenas para as classes IgG e IgA. A razão foi que, na amostra de doentes analisada, apenas um doente tinha o diagnóstico de MM IgD e nenhum doente apresentou uma Ig monoclonal IgM ou IgE.

Os resultados obtidos mostraram que, com exceção da concentração da Ig e da deleção no cromossoma 13, os doentes com MM IgG e IgA apresentam a mesma percentagem de associação com os outros fatores de mau prognóstico.

A concentração de IgG é o dobro da concentração de IgA e este achado não é surpreendente já que esta ordem de grandeza existe no soro normal. Surpreendente é o facto da IgA estar significativamente mais associada à deleção no cromossoma 13 que a IgG (50 % vs. 15,8 %), o que poderia explicar o pior prognóstico encontrado em doentes com MM IgA por alguns autores.<sup>61</sup>

Quando se analisou o impacto na sobrevida das proteínas monoclonais IgG e IgA, verificou-se que apenas nos doentes com MM IgG a concentração da Ig teve um impacto na sobrevida e que os doentes com este tipo de mieloma tiveram uma menor esperança de vida. Este dado corrobora a importância da concentração da Ig no prognóstico. Contudo, contrasta com o facto de a IgA ter, segundo alguns autores, um pior prognóstico porque se associa, pelas suas propriedades físico-químicas, a um maior número de casos de síndrome de hiperviscosidade.<sup>61</sup>

- iv) Avaliação da correlação entre a resposta à terapêutica de primeira linha e o tipo de imunoglobulina monoclonal

De todos os regimes terapêuticos, o MPT foi o mais utilizado. A razão principal é o facto de se tratar do regime de tratamento padrão, em primeira linha, em doentes com idades superiores a 65 anos. Os outros regimes foram aplicados na mesma ordem de grandeza.<sup>52, 53, 50, 51, 54, 55</sup>

A avaliação do tipo de resposta foi efetuada segundo os critérios do IMWG. Como seria de esperar, o tipo de resposta alcançado teve uma relação direta com a sobrevida global.<sup>60</sup>

## 6. Conclusão

Os resultados obtidos no estudo dos doentes com MM em seguimento no CHVNGE permitiram tirar as seguintes conclusões:

- (i) O MM foi mais prevalente no idoso e no sexo feminino;
- (ii) Mais de metade dos doentes apresentou uma percentagem de plasmócitos superior a 10 %; metade dos doentes apresentou uma função renal afetada; um terço dos doentes apresentou hipercalemia, lesões osteolíticas ou uma concentração de  $\beta_2$ -microglobulina aumentada; um quinto dos doentes apresentou hipoalbuminemia ou alterações citogenéticas;
- (iii) A IgG foi a proteína monoclonal mais prevalente e a mais rara foi a IgD;
- (iv) A concentração de IgG e IgA foram as únicas com valores superiores ao normal ao diagnóstico;
- (v) Um terço dos doentes apresentou estadio ISS III ao diagnóstico;
- (vi) A idade superior a 65 anos; a deleção no cromossoma 13, a concentração de  $\beta_2$ -microglobulina; as lesões osteolíticas, a percentagem de plasmócitos, a hipoalbuminemia e hipercalemia influenciaram negativamente o prognóstico; a deleção no cromossoma 17 e a concentração de creatinina não tiveram qualquer impacto;

- (vii) A IgA esteve associada com maior frequência à deleção no cromossoma 13 comparativamente à IgG;
- (viii) Os doentes com MM IgG tiveram uma menor sobrevida que doentes com MM IgA;
- (ix) Apenas a concentração de IgG foi relevante para o prognóstico;
- (x) Doentes com resposta à terapêutica instituída tiveram uma melhor sobrevida.

O MM mais prevalente foi o IgG e o mais raro o IgD no idoso e no sexo feminino. Um terço dos doentes apresentou estadio ISS III ao diagnóstico. Os doentes com MM IgG tiveram uma menor sobrevida que doentes com MM IgA. Apenas a concentração de IgG foi relevante para o prognóstico. Doentes com resposta à terapêutica instituída tiveram uma melhor sobrevida.

O facto da deleção no cromossoma 17 e da concentração de creatinina não terem apresentado qualquer impacto no estudo efetuado demonstra a necessidade de aumentar o tamanho da amostra em estudo, tendo em conta também a homogeneidade da mesma e o tempo de *follow-up* para que se possa verificar se estes parâmetros têm ou não realmente algum impacto significativo. Um estudo mais amplo permitirá também acrescentar mais parâmetros de avaliação prognóstica às já existentes escalas do MM em vigor. Como perspectivas futuras, além das já mencionadas, é importante também ter em conta o tipo de Ig. Estes dados poderão permitir a aplicação de um tratamento específico, mais adequado e eficaz em cada caso.



## 7. Bibliografia

1. Ries LAG, E. M., Kosary CL SEER Cancer Statistics Review, 1973-1999. *MD: National Cancer Institute* **2002**.
2. Kyle RA, G. M., Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR, Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* **2003**, 78 (1), 21.
3. Sant M, A. C., Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, Marcos-Gragera R, MaynadiéM, Simonetti A, Lutz JM, Berrino F, HAEMACARE Working Group, Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* **2010**, 116 (19), 3724.
4. Phekoo KJ, S. S., Richards MA, Bevan DH, Bell S, Gillett D, Møller H, Consultant Haematologists, South Thames Haematology Specialist Committee, A population study to define the incidence and survival of multiple myeloma in a National Health Service Region in UK. *Br J Haematol.* **2004**, 127 (3), 299.
5. Bakkus, M. H. C.; Riet, I. V.; De Greef, C.; Camp, B. V.; Thielemans, K., The Clonogenic Precursor Cell in Multiple Myeloma. *Leukemia & Lymphoma* **1995**, 18 (3-4), 221-229.
6. Conway, E. J.; Wen, J. G.; Feng, Y. D.; Mo, A.; Huang, W. T.; Keever-Taylor, C. A.; Hari, P.; Vesole, D. H.; Chang, C. C., Phenotyping Studies of Clonotypic B Lymphocytes From Patients With Multiple Myeloma by Flow Cytometry. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2009**, 133 (10), 1594-1599.
7. Thomas J. Kindt, R. A. G., Barbara A. Osborne, Janis Kuby, *Kuby Immunology*. 6th ed.; Freeman and Company: 2007; p 30.
8. Schwartz, R. S., Jumping Genes and the Immunoglobulin V Gene System. *New England Journal of Medicine* **1995**, 333 (1), 42-44.
9. Schwartz, R. S., Shattuck Lecture - diversity of the immune repertoire and immunoregulation. *New England Journal of Medicine* **2003**, 348 (11), 1017-1026.

10. Matsui, W.; Wang, Q.; Barber, J. P.; Brennan, S.; Smith, B. D.; Borrello, I.; McNiece, I.; Lin, L.; Ambinder, R. F.; Peacock, C.; Watkins, D. N.; Huff, C. A.; Jones, R. J., Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res.* **2008**, *68* (1), 190-197.
11. Bakkus, M. H. C.; Heirman, C.; Vanriet, I.; Vancamp, B.; Thielemans, K., Evidence that multiple-myeloma Ig heavy-chain VDJ-genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood* **1992**, *80* (9), 2326-2335.
12. Woodliff, J. E.; Engel, B. C.; Epstein, J., Myeloma cells homing to the bone marrow is directed by CXCR4/SDF-1 interactions. *Blood* **2000**, *96* (11), 550A-+.
13. Richardson PG, H. T., Anderson KC., Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control.* **2003**, *10* (5), 361-369.
14. Xu, F. H.; Sharma, S.; Gardner, A.; Tu, Y. P.; Raitano, A.; Sawyers, C.; Lichtenstein, A., Interleukin-6-induced inhibition of multiple myeloma cell apoptosis: Support for the hypothesis that protection is mediated via inhibition of the JNK/SAPK pathway. *Blood* **1998**, *92* (1), 241-251.
15. Lichtenstein, A.; Tu, Y. P.; Fady, C.; Vescio, R.; Berenson, J., Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma-cells. *Cell. Immunol.* **1995**, *162* (2), 248-255.
16. Chauhan, D.; Kharbanda, S.; Ogata, A.; Urashima, M.; Teoh, G.; Robertson, M.; Kufe, D. W.; Anderson, K. C., Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood* **1997**, *89* (1), 227-234.
17. Urashima, M.; Ogata, A.; Chauhan, D.; Vidriales, M. B.; Teoh, G.; Hoshi, Y.; Schlossman, R. L.; DeCaprio, J. A.; Anderson, K. C., Interleukin-6 promotes multiple myeloma cell growth via phosphorylation of retinoblastoma protein. *Blood* **1996**, *88* (6), 2219-2227.
18. Klein, B.; Zhang, X. G.; Jourdan, M.; Content, J.; Houssiau, F.; Aarden, L.; Piechaczyk, M.; Bataille, R., Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by Interleukin-6. *Blood* **1989**, *73* (2), 517-526.
19. Wang, L. H.; Yang, X. Y.; Zhang, X. H.; Huang, J. Q.; Hou, J.; Li, J.; Xiong, H.; Mihalic, K.; Zhu, H. M.; Xiao, W. H.; Farrar, W. L., Transcriptional inactivation of STAT3 by PPAR gamma suppresses IL-6-responsive multiple myeloma cells. *Immunity* **2004**, *20* (2), 205-218.

20. Thomas J. Kindt, R. A. G., Barbara A. Osborne, Janis Kuby *Kuby Immunology* 6<sup>a</sup> ed.; Freeman and Company 2007; p 77.
21. Kyle, R. A., Sequence of testing for monoclonal gammopathies - Serum and urine assays. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **1999**, *123* (2), 114-118.
22. Bakker, A. J.; Elderman-van der Werf, C.; van Abbema, T., Detection and quantification of M-proteinemia: comparison of various methods for serum protein electrophoresis. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2012**, *50* (1), 77-80.
23. Carl A. Burtis, E. R. A., David E. Bruns, Norbert W. Tietz, *Fundamentals of Clinical Chemistry* 5<sup>a</sup> ed.; W.B. Saunders: 2001; p 1091.
24. Robert K. Murray, D. K. G., Peter A. Mayes, Victor W. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26<sup>a</sup> ed.; McGraw-Hill: 2003; p 580.
25. Keren, D. F., *High-Resolution Electrophoresis and Immunofixation: Techniques and Interpretations*. 2<sup>a</sup> ed.; Butterworth-Heinemann: Boston, 1994; p 211-282.
26. Baars, J. D., A. J. P. F. Lombarts, Imprecision of protein electrophoresis. *Clin. Chem.* **1986**, *32*, 1425-1426.
27. Robert K. Murray, D. K. G., Peter A. Mayes, Victor W. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26<sup>a</sup> ed.; McGraw-Hill: 2003; p 582.
28. Kuhn R, H.-K., *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Springer-Verlag Berlin, 1993; p 375.
29. Carrer, D. L., *Serum protein & electrophoresis immunofixation*. Evry, France : Laboratoires Sebia: 2005; p 134.
30. Keren, D. F., J. S. Warren, J. B. Lowe, Strategy to diagnose monoclonal gammopathies in serum: high-resolution electrophoresis, immunofixation and quantification *Clin. Chem* **1988**, *34*, 2196-2201.
31. Cacoub, P.; Camproux, A. C.; Thiolieres, J. M.; Assogba, U.; Hausfater, P.; Mallet, A.; Foglietti, M. J.; Piette, J. C.; Bernard, M., A new approach for rapid detection and typing of serum monoclonal components. *Clin. Chim. Acta* **2000**, *302* (1-2), 105-124.
32. Sebia, L., *Clinical laboratory investigation of a monoclonal component*.
33. Ritchie, R. F., R. Smith, Immunofixation. III. Application to the study of monoclonal proteins. *Clin. Chem* **1976**, *22*, 1982-1985.
34. Hudson, G. A., R. F. Ritchie, J. E. Haddow, Method for testing antiserum titer and avidity in nephelometric systems. *Clin. Chem* **1981**, *27*, 1838-1844.

35. Ledue, T. B.; Collins, M. F.; Ritchie, R. F., Development of immunoturbidimetric assays for fourteen human serum proteins on the Hitachi 912 (TM). *Clin. Chem. Lab. Med.* **2002**, *40* (5), 520-528.
36. Killingsworth, L. M., J. Savory, Nephelometric studies of the precipitin reaction: a model system for specific protein measurements. *Clin. Chem* **1973**, *19*, 403-407.
37. Bosmann, M.; Kossler, J.; Stolz, H.; Walter, U.; Knop, S.; Steigerwald, U., Detection of serum free light chains: the problem with antigen excess. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2010**, *48* (10), 1419-1422.
38. Buxbaum, J., Mechanisms of disease - monoclonal Immunoglobulin deposition - amyloidosis, light chain deposition disease, and light and heavy-chain deposition disease. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **1992**, *6* (2), 323-346.
39. Westermarck, P., Localized AL amyloidosis: A suicidal neoplasm? *Ups. J. Med. Sci.* **2012**, *117* (2), 244-250.
40. Smith A, W. F., Samson D, UK Myeloma Forum, Nordic Myeloma Study Group, British Committee for Standards in Haematology, Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *Br J Haematol.* **2006**, *132* (4), 410.
41. Oken, M. M.; Pomeroy, C.; Weisdorf, D.; Bennett, J. M., Prophylactic antibiotics for the prevention of early infection in multiple myeloma. *Am. J. Med.* **1996**, *100* (6), 624-628.
42. Blade, J.; Rosinol, L., Renal, hematologic and infectious complications in multiple myeloma. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2005**, *18* (4), 635-652.
43. Coppola, A.; Tufano, A.; Di Capua, M.; Franchini, M., Bleeding and Thrombosis in Multiple Myeloma and Related Plasma Cell Disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* **2011**, *37* (8), 928-944.
44. Fassas, A. B. T.; Muwalla, F.; Berryman, T.; Benramdane, R.; Joseph, L.; Anaissie, E.; Sethi, R.; Desikan, R.; Siegel, D.; Badros, A.; Toor, A.; Zangari, M.; Morris, C.; Angtuaco, E.; Mathew, S.; Wilson, C.; Hough, A.; Harik, S.; Barlogie, B.; Tricot, G., Myeloma of the central nervous system: association with high-risk chromosomal abnormalities, plasmablastic morphology and extramedullary manifestations. *British Journal of Haematology* **2002**, *117* (1), 103-108.
45. Bataille, R.; Durie, B. G. M.; Grenier, J.; Sany, J., Prognostic factors and staging in multiple-myeloma - a reappraisal. *J. Clin. Oncol.* **1986**, *4* (1), 80-87.

46. Kim, J. E.; Yoo, C.; Lee, D. H.; Kim, S. W.; Lee, J. S.; Suh, C., Serum albumin level is a significant prognostic factor reflecting disease severity in symptomatic multiple myeloma. *Ann. Hematol.* **2010**, *89* (4), 391-397.
47. Greipp, P. R.; San Miguel, J. F.; Durie, B. G.; Loiseau, H. A.; Fonseca, R.; Jacobson, J. L.; Rasmussen, E.; Crowley, J. J., A new international staging system (ISS) for multiple myeloma (MM) from the international myeloma working group. *Blood* **2003**, *102* (11), 190A-191A.
48. Durie, B.; Stock-Novack, D.; Salmon, S.; Finley, P.; Beckord, J.; Crowley, J.; Coltman, C., Prognostic value of pretreatment serum beta 2 microglobulin in myeloma: a Southwest Oncology Group Study [see comments]. *Blood* **1990**, *75* (4), 823-830.
49. Facon, T.; Avet-Loiseau, H.; Guillermin, G.; Moreau, P.; Geneviève, F.; Zandecki, M.; Lai, J.-L.; Leleu, X.; Jouet, J.-P.; Bauters, F.; Harousseau, J.-L.; Bataille, R.; Mary, J.-Y., Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum  $\beta_2$ -microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* **2001**, *97* (6), 1566-1571.
50. Cavo M, Z. E., Tosi P., Superiority of thalidomide and dexamethasone over vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) as primary therapy in preparation for autologous transplantation for multiple myeloma. *Blood* **2005**, *106*, 35-39.
51. Kyle RA, T. T., Rajkumar SV, Offord JR, A long-term study of prognosis in mono-clonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal of Medicine* **2002**, *346*, 564-569.
52. Alexanian R; Haut, A. K., A. U.; Lane, M.; McKelvey, E. M.; Migliore, P. J.; Stuckey, W. J.; Wilson, H. E., Treatment for multiple myeloma: combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *Journal of the American Medical Association* **1969**, *208* (9), 1680-1685.

53. Mateos, M. V.; Oriol, A.; Martinez-Lopez, J.; Gutierrez, N.; Teruel, A. I.; de Paz, R.; Garcia-Larana, J.; Bengoechea, E.; Martin, A.; Mediavilla, J. D.; Palomera, L.; de Arriba, F.; Gonzalez, Y.; Hernandez, J. M.; Sureda, A.; Bello, J. L.; Bargay, J.; Penalver, F. J.; Ribera, J. M.; Martin-Mateos, M. L.; Garcia-Sanz, R.; Cibeira, M. T.; Ramos, M. L. M.; Vidriales, M. B.; Paiva, B.; Montalban, M. A.; Lahuerta, J. J.; Blade, J.; San Miguel, J. F., Bortezomib, melphalan, and prednisone versus bortezomib, thalidomide, and prednisone as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib and thalidomide versus bortezomib and prednisone in elderly patients with untreated multiple myeloma: a randomised trial. *Lancet Oncol.* **2010**, *11* (10), 934-941.
54. Bergsagel DE, C. D., Hasselback R., Plasma cell myeloma: response of melphalan-resistant patients to high-dose intermittent cyclophosphamide. *Can Med Assoc.* **1972**, *107*, 851-855.
55. Kraut, E. H.; Young, D.; Farag, S.; James, A. G.; Solove, R. J., Phase II study of toptecan and cyclophosphamide in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Leuk. Res.* **2005**, *29* (10), 1233-1234.
56. Hideshima T, R. P., Chauhan D, The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* **2001**, *61*, 3071-3076.
57. Buzaid AC, D. B., Management of refractory myeloma *J. Clin. Oncol.* **1988**, *6*, 889-905.
58. Richardson, P. G.; Sonneveld, P.; Schuster, M. W.; Irwin, D.; Stadtmauer, E. A.; Facon, T.; Harousseau, J. L.; Ben-Yehuda, D.; Lonial, S.; Goldschmidt, H.; Reece, D.; San-Miguel, J. F.; Blade, J.; Boccadoro, M.; Cavenagh, J.; Dalton, W. S.; Boral, A. L.; Esseltine, D. L.; Porter, J. B.; Schenkein, D.; Anderson, K. C.; Investigators, A., Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *New England Journal of Medicine* **2005**, *352* (24), 2487-2498.
59. Kumar, S.; Gertz, M. A.; Dispenzieri, A.; Lacy, M. Q.; Geyer, S. M.; Iturria, N. L.; Fonseca, R.; Hayman, S. R.; Lust, J. A.; Kyle, R. A.; Greipp, P. R.; Witzig, T. E.; Rajkumar, S. V., Response rate, durability of response, and survival after thalidomide therapy for relapsed multiple myeloma. *Mayo Clin. Proc.* **2003**, *78* (1), 34-39.

60. Durie, B. G. M.; Harousseau, J. L.; Miguel, J. S.; Blade, J.; Barlogie, B.; Anderson, K.; Gertz, M.; Dimopoulos, M.; Westin, J.; Sonneveld, P.; Ludwig, H.; Gahrton, G.; Beksac, M.; Crowley, J.; Belch, A.; Boccadaro, M.; Turesson, I.; Joshua, D.; Vesole, D.; Kyle, R.; Alexanian, R.; Tricot, G.; Attal, M.; Merlini, G.; Powles, R.; Richardson, P.; Shimizu, K.; Tosi, P.; Morgan, G.; Rajkumar, S. V.; Int Myeloma Working, G., International uniform response criteria for multiple myeloma (vol 20, pg 1467, 2006). *Leukemia* **2007**, *21* (5), 1134-1134.
61. Teng, H. W.; Chen, P. M.; Yang, Y. H.; Gau, J. P., The prolonged activated partial thromboplastin time at diagnosis indicates less favorable prognosis in IgA myeloma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2007**, *37* (8), 609-614.
62. Kyle RA, T. T., Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ 3rd, Incidence of multiple myeloma in Olmsted County, Minnesota: Trend over 6 decades. *Cancer* **2004**, *101* (11), 2667.
63. Bladé, J.; Rosiñol, L., Complications of Multiple Myeloma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **2007**, *21* (6), 1231-1246.
64. Gertz, M. A., The Classification and Typing of Amyloid Deposits. *American Journal of Clinical Pathology* **2004**, *121* (6), 787-789.
65. Chng, W. J.; Glebov, O.; Bergsagel, P. L.; Kuehl, W. M., Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Practice & Research Clinical Haematology* **2007**, *20* (4), 571-596.
66. Peter H. Wiernik, J. M. G., Janice P. Dutcher and Robert A. Kyle, *Neoplastic Diseases of the Blood*. 4th ed.; Cambridge University Press: 2003.
67. Pasqualetti, P.; Casale, R.; Collacciani, A.; Colantonio, D., Prognostic factors in multiple myeloma: a new staging system based on clinical and morphological features. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* **1991**, *27* (9), 1123-1126.
68. Bhatti, S. S.; Kumar, L.; Dinda, A. K.; Dawar, R., Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: Use of light microscopy as well as computerized image analyzer in the assessment of microvessel density and total vascular area in multiple myeloma and its correlation with various clinical, histological, and laboratory parameters. *Am. J. Hematol.* **2006**, *81* (9), 649-656.

69. Bjerrum, O. W.; Plesner, T.,  $\beta_2$ -microglobulin: A valuable parameter of stage, prognosis and response to treatment in myelomatosis. *Scandinavian Journal of Haematology* **1985**, *35* (1), 22-25.
70. Mihou, D.; Katodritou, E.; Zervas, K., Multiple myeloma staging based on the combination of beta-2-microglobulin and albumin: The role of albumin in the model. *Hematology* **2007**, *12* (6), 527-531.
71. Fonseca, R.; Barlogie, B.; Bataille, R.; Bastard, C.; Bergsagel, P. L.; Chesi, M.; Davies, F. E.; Drach, J.; Greipp, P. R.; Kirsch, I. R.; Kuehl, W. M.; Hernandez, J. M.; Minvielle, S.; Pilarski, L. M.; Shaughnessy, J. D.; Stewart, A. K.; Avet-Loiseau, H., Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma. *Cancer Res.* **2004**, *64* (4), 1546-1558.