



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

Curso de Graduação em Biotecnologia

MARILÉA FURTADO FEIRA

**ANÁLISE SECUNDÁRIA DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ANTES  
E APÓS A EXPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE MIELOMA MÚLTIPLO A  
IMUNOMODULADORES.**

PORTO ALEGRE

2018

MARILÉA FURTADO FEIRA

ANÁLISE SECUNDÁRIA DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ANTES  
E APÓS A EXPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE MIELOMA MÚLTIPLO A  
IMUNOMODULADORES.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biociências da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul como requisito  
parcial para a obtenção do título de bacharela  
em Biotecnologia.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Fernanda Sales Luiz Vianna

Coorientadora: Ms. Thayne Woycinck Kowalski

Porto Alegre

2018

#### CIP - Catalogação na Publicação

Feira, Mariléa Furtado  
Análise secundária de genes diferencialmente expressos antes e após a exposição de amostras de mieloma múltiplo a imunomoduladores. / Mariléa Furtado Feira. -- 2018.

74 f.

Orientadora: Fernanda Sales Luiz Vianna.

Coorientadora: Thyne Woycinck Kowalski.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. mieloma múltiplo. 2. imunomoduladores. 3. expressão gênica. 4. talidomida. 5. biomarcadores. I. Vianna, Fernanda Sales Luiz, orient. II. Kowalski, Thyne Woycinck, coorient. III. Título.

Mariléa Furtado Feira

ANÁLISE SECUNDÁRIA DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ANTES  
E APÓS A EXPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE MIELOMA MÚLTIPLO A  
IMUNOMODULADORES.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção  
do título de bacharela em Biotecnologia.

Aprovado em: 7 de dezembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ursula da Silveira Matte – UFRGS/HCPA

---

Dr. Gabriel de Souza Macedo – HCPA

---

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Sales Luiz Vianna - HCPA

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Médica Populacional da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos pacientes de Mieloma Múltiplo que aceitaram a participar das pesquisas, e aos pesquisadores que se dedicaram por tantos anos aos estudos utilizados neste trabalho.

Agradeço à minha mãe, Claudete Furtado, por todo apoio e carinho desde sempre. Por ser um exemplo de mulher a ser seguido e pelo seu amor incondicional. Agradeço a minha família, pelo carinho e pelo apoio, por sempre me incentivar.

Agradeço à Thayne Kowalski por ter me inserido no mundo da genética médica, por sempre estar disposta a dividir seus conhecimentos comigo, e fazer isso tão bem. E por ter me apresentado a Fernanda.

Agradeço a dr<sup>a</sup>. Fernanda Vianna por acreditar e confiar no meu trabalho e me dar a oportunidade de aprender sempre e de forma tão diversa. Pela grande contribuição na minha formação profissional e acadêmica.

Agradeço ao Luis Contin, que me ensinou sobre Mieloma Múltiplo e que sempre se dispõe a esclarecer minhas dúvidas.

Agradeço aos meus colegas do Lab113 (Laboratório de Genética Médica Populacional), por toda a contribuição e ensinamentos, e por se tornarem meus amigos de verdade.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Medicina Genômica por compartilharem comigo seus conhecimentos.

Agradeço aos meus colegas da Biotecnologia, Laísa Barsé e Mateus Costa, e a seus familiares, por se tornarem amigos de verdade e me apoiarem sempre.

Agradeço a todos os professores que eu tive nos cursos de Ciências Biológicas e de Biotecnologia Molecular, sem cada um deles o caminho trilhado até aqui seria praticamente impossível.

*“Má Doba Prijde”*

(Gregor Johann Mendel)

## Resumo

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma doença hematológica maligna, do grupo de gamopatias monoclonais, caracterizada por um crescimento patológico da população de plasmócitos clonais. O MM é responsável por 1% de todos os cânceres, e corresponde a 10% das neoplasias hematológicas, sendo a segunda mais comum desse tipo de câncer. O perfil de incidência mais frequente está no grupo de indivíduos do sexo masculino, com idade entre 55-65 anos. A média de idade do paciente no momento do diagnóstico, no Brasil, é de 70 anos. Existem diferentes esquemas de tratamento com diferentes fármacos. Estudos já avaliaram o uso da talidomida em pacientes de MM recém-diagnosticados, após o transplante autólogo e em pacientes refratários, sendo que em todas as etapas de tratamento a talidomida levou a um aumento no tempo de sobrevida livre de progressão. A talidomida é um fármaco imunomodulador, anti-inflamatório e antiangiogênico, porém é um potente teratôgeno. Atualmente, a dispensação da talidomida é feita unicamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Existem dois análogos estruturais da droga, a lenalidomida e a pomalidomida. A lenalidomida tem maior atividade imunomoduladora do que a talidomida, enquanto a talidomida tem maior atividade antiangiogênica. Pomalidomida, por sua vez, possui uma potência antiproliferativa distinta e elevada em comparação com a lenalidomida. O MM ainda é considerado uma doença incurável, porém os recentes avanços terapêuticos, principalmente a inclusão de imunomoduladores (IMiDs) ao tratamento, melhoraram significativamente a taxa de sobrevida dos pacientes. Estudos já publicados correlacionaram as respostas ao tratamento com IMiDs a fatores genéticos, como mutações ou expressão diferencial. Genes diferencialmente expressos relacionados a diferentes tratamentos para MM podem configurar potenciais biomarcadores, colaborando com a aplicação de terapias moleculares, o que pode tornar sua avaliação bastante relevante. Uma alternativa que vem sendo bastante utilizada para a análise de expressão gênica é o uso de dados secundários a partir de repositórios públicos. Além de ser uma estratégia de baixo custo, permite o levantamento de hipóteses que podem ser adequadamente testadas em diferentes contextos, abrangendo um número maior e mais detalhado de respostas, e a partir dessa estratégia, novos preditores para futuras pesquisas de biomarcadores de resposta



ao tratamento de IMiDs podem ser sugeridos. O objetivo desse trabalho foi analisar a expressão gênica diferencial em amostras de Mieloma Múltiplo em humanos, relacionada ao tratamento com imunomoduladores e à progressão tumoral, a partir de dados secundários provenientes de ensaios experimentais depositados em bancos de dados públicos. Ao todo, foram utilizados sete estudos depositados no banco de dados GEO (GSE6691, GSE8546, GSE38627, GSE58133, GSE68871, GSE37302 e GSE75084). Os dados brutos de todas as amostras analisadas foram normalizados no software RStudio Desktop v.1.0.1. em linguagem R (v.3.5.1), assim como as análises de genes diferencialmente expressos. As análises de expressão gênica diferencial revelaram potenciais novos alvos para o tratamento de MM, sendo os genes hiperexpressos *COPS2*, *UBE2G1* e *SPR*, e os genes hipoexpressos *BCAT1* e *PSAT1*. As redes de vias sobrepostas dos genes *COPS2* e *UBE2G1* estavam intimamente relacionadas ao processo de nedilação, que foi previamente relatado como envolvido em mecanismos dos imunomoduladores. Tanto o tratamento com lenalidomida quanto com pomalidomida apontaram na diminuição da taxa de expressão de genes relacionados à proliferação celular e oncogenes, como *BCAT1* e *PSAT1*. *SPR* é uma enzima envolvida na rota de biossíntese de eNOS, desequilíbrios na síntese de NO estão associados a malformações congênitas associadas à exposição a teratógenos como a talidomida. A expressão gênica diferencial foi analisada no contexto de conjuntos de genes para identificar assinaturas moleculares associadas ao MM e IMiDs. Observamos ainda que nem todos os genes com níveis de expressão alterados apareceram nas vias significativas. Isso demonstra que tanto a expressão diferencial quanto a análise da via são importantes na extração de informações com relevância biológica. Porém, utilizamos apenas abordagens de bioinformática, portanto, dados experimentais são necessários para validar esses achados em estudos posteriores.

**PALAVRAS-CHAVE:** mieloma múltiplo - talidomida – imunomoduladores – GEO – expressão diferencial

## Lista de Figuras

FIGURA 1: MEDULA ÓSSEA SAUDÁVEL E MEDULA ÓSSEA COM INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLO.....	14
FIGURA 2: PROCESSOS MULTITAPAS DA TUMORIGÊNESE DO MIELOMA MÚLTIPLO.. .....	17
FIGURA 3: ENANTIÔMEROS DA TALIDOMIDA .....	21
FIGURA 4: TALIDOMIDA E DOIS DE SEUS ANÁLOGOS.....	22
FIGURA 5: ESQUEMA DE MEDICAMENTOS UTILIZADOS NAS FASES DA TT 2.....	32
FIGURA 6: RELAÇÃO ENTRE SOBREVIVÊNCIA E USO DE TALIDOMIDA .....	32
FIGURA 7: BOXPLOT PÓS NORMALIZAÇÃO .....	41
FIGURA 8: GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO GSE37298 (POMALIDOMIDA).....	42
FIGURA 9: REDE DE INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS DE GENES HIPEREXPRESSOS EM MM; PROCESSOS BIOLÓGICOS E VIAS ENRIQUECIDAS .....	46
FIGURA 10: TALIDOMIDA– GRÁFICO VULCÃO E PREDIÇÕES DE REDES.....	49
FIGURA 11: PREDIÇÃO DE REDES DE INTERAÇÃO APÓS EXPOSIÇÃO A LENALIDOMIDA. ....	53
FIGURA 12: PREDIÇÃO DE REDES DE INTERAÇÃO APÓS EXPOSIÇÃO A POMALIDOMIDA. ....	56
FIGURA 13: DIAGRAMA DE VENN (HIPEREXPRESSOS) - LENALIDOMIDA E POMALIDOMIDA ..	57
FIGURA 14: DIAGRAMA DE VENN (HIPOREXPRESSOS ) - LENALIDOMIDA E POMALIDOMIDA ...	58
FIGURA 15: AS ENZIMAS DE NEDILAÇÃO DO COMPLEXO UBIQUITINA E3 LIGASE. ....	59

## Lista de Quadros

QUADRO 1: EXAMES REALIZADOS PARA A CONFIRMAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE MM. ....	16
QUADRO 2: TIPOS DE RESPOSTA AO TRATAMENTO DE MIELOMA MÚLTIPLO.....	29
QUADRO 3: GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM AMOSTRAS DE MM.. ....	43
QUADRO 4: GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM AMOSTRAS TRATADAS COM LENALIDOMIDA.....	51
QUADRO 5: GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM AMOSTRAS TRATADAS COM POMALIDOMIDA.....	54
QUADRO 6: LISTA DE GENES GERADA A PARTIR DO DIAGRAMA DE VENN DE GENES HIPOEXPRESSOS EM TRATAMENTOS DE AGENTE ÚNICO. ....	57
QUADRO 7: LISTA DE GENES GERADA A PARTIR DO DIAGRAMA DE VENN DE GENES HIPOEXPRESSOS EM TRATAMENTOS DE AGENTE ÚNICO. ....	58

## Lista de tabelas

TABELA 1: SISTEMAS DE ESTADIAMENTO - MIELOMA MÚLTIPLO. ....	18
TABELA 2: ESCALAS DE CLASSIFICAÇÃO UTILIZADAS PARA AVALIAÇÃO DE NEUROPATIA CAUSADA POR QUIMIOTERAPIA. ....	26
TABELA 3: MEDICAMENTOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE MIELOMA MÚLTIPLO. ....	28
TABELA 4: ESTUDOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES RELACIONADAS À TALIDOMIDA. ....	40
TABELA 5: ESTUDOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES RELACIONADAS AO TRATAMENTO COM LENALIDOMIDA E POMALIDOMIDA. ....	40

## Sumário

1 Introdução.....	14
1.1 Mieloma Múltiplo	14
1.2 Diagnóstico e Patogênese	15
1.3 Tratamento	19
1.3.1 Imunomoduladores (IMiDs).....	20
1.3.2. Aplicação Terapêutica .....	27
1.3.3 Terapia Total .....	31
1.4 <i>Gene Expression Omnibus</i> (GEO)	33
1.5 Justificativa	35
2 Objetivos.....	36
2.1 Objetivo Geral	36
2.2 Objetivos Específicos	36
3 Materiais e Métodos .....	37
3.1 Amostras	37
3.2 Métodos	37
3.2.1 Normalização .....	37
3.2.2 Determinação de Expressão Diferencial.....	38
3.2.3 Análises de Biologia de Sistemas.....	38
3.3 Aspectos Éticos	39
4 Resultados e Discussão.....	39
4.1 Amostras	39
4.2 Normalização	41
4.3 Determinação de expressão diferencial	42
4.4 Células de mieloma múltiplo <i>versus</i> plasmócitos saudáveis	42
4.5 Talidomida	47
4.6 Lenalidomida	50
4.7 Pomalidomida	54
4.8 Análise de intersecção de todos os genes diferencialmente (lenalidomida e pomalidomida)	57
5 Conclusões.....	62
6 Referências .....	66

## 1 Introdução

### 1.1 Mieloma Múltiplo

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma doença hematológica maligna, do grupo de gamopatias monoclonais, caracterizada por um crescimento patológico da população de plasmócitos clonais (Figura 1). Em geral, há uma produção excessiva e acúmulo de imunoglobulinas monoclonais (Proteína-M) (Willenbacher, 2018), principalmente IgG, IgA, ou apenas cadeias leves (kappa ou lambda), no sangue ou na urina.

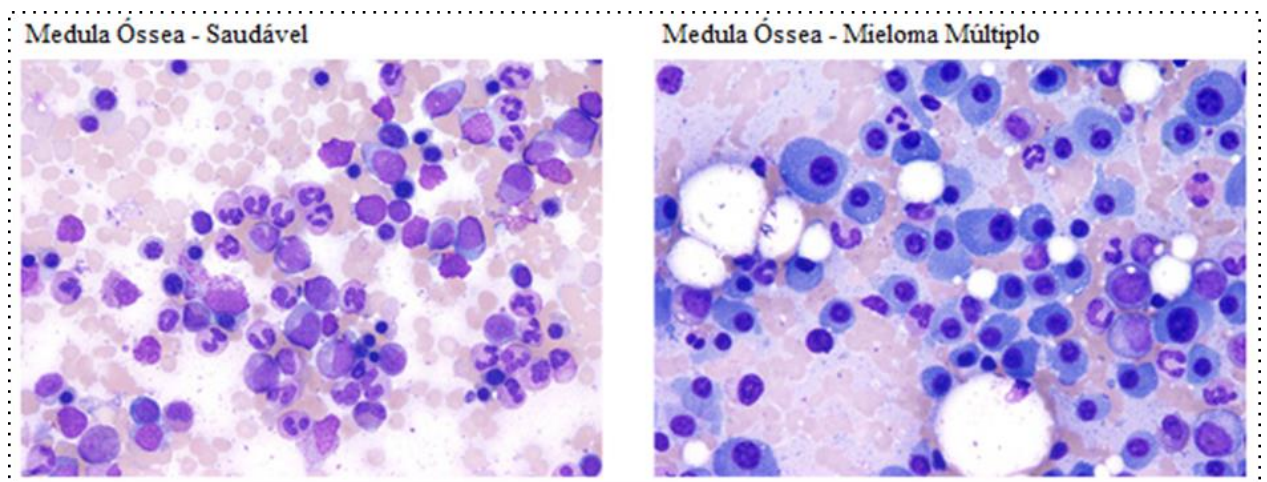


Figura 1: A figura mostra à esquerda a imagem de uma medula óssea saudável, à direita pode ser visto a medula óssea com infiltração de células de mieloma múltiplo. (Adaptada de: <https://health-innovations.org/2015/05/25/researchers-safely-use-immune-cell>).

O MM é responsável por 1% de todos os cânceres, e corresponde a 10% das neoplasias hematológicas, sendo a segunda mais comum desse tipo de câncer (Rajkumar, 2014). A estimativa para a incidência de MM em 2030 é de aproximadamente de 220 mil novos casos no mundo, e 20,8 mil casos na América Latina (GLOBOCAN, 2018). No Brasil, em 2015, 2889 pessoas morreram devido a complicações por MM, sendo que 6,6% dessas mortes foram registradas no Rio

grande do Sul (ABRALE, 2018). De acordo com o GLOBOCAN, é estimado que o número de mortes causadas por MM no Brasil chegue a 5552 em 2030, representando um aumento de 92% (GLOBOCAN, 2018).

O perfil de incidência mais frequente está no grupo de indivíduos do sexo masculino, de descendência africana – até 2x maior do que em caucasianos - (Kazandjian, 2016), com idade entre 55-65 anos. A média de idade do paciente no momento do diagnóstico, no Brasil, é de 70 anos. O MM pode se apresentar clinicamente de diversas formas. As complicações mais frequentes são hipercalcemia, perda da função renal, anemia, e lesões osteolíticas. Ao menos 15% dos pacientes com MM apresentam fratura patológica no momento do diagnóstico e 60% deles sofrerão esta complicação durante o curso da doença (Hungria et al., 2008). Outros sintomas são fadiga, confusão, desorientação e fraqueza muscular. O comprometimento renal é tipicamente devido à deposição de cadeia leve ou hipercalcemia (Eslick, 2013).

## **1.2 Diagnóstico e Patogênese**

Na suspeita clínica de gamopatias, são solicitados exames como hemograma com plaquetas, dosagem de creatinina, albumina e cálcio total, e eletroforese de proteínas sérica e urinária (exame onde se detecta a proteína M). Atualmente, para confirmar o diagnóstico de MM é exigido ainda que seja avaliado se na medula óssea há infiltração de plasmócitos clonais, que haja detecção e quantificação de proteína monoclonal no sangue ou na urina e evidência de lesão de órgão alvo (Quadro 1).

Quadro 1: Exames realizados para a confirmação do diagnóstico de MM.

Exames Bioquímicos	Exames de Imagem
<ul style="list-style-type: none"> <li>• hipercalcemia com Ca &gt; 1 mg / dL que o valor de referência ou &gt; 11 mg / dL;</li> <li>• Insuficiência renal com: clearance creatinina &lt; 40 ml / min;</li> <li>• Anemia com Hb &lt; 2 mg / dL que o valor de referência ou &lt; 10 mg / dL.</li> </ul>	<p>Lesões ósseas: uma ou mais lesões líticas em Raio-X (RX), Tomografia Computadorizada (TC), Ressonância Nuclear Magnética (RNM) ou Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (PET) (San-Miguel et al., 2013).</p>

O diagnóstico foi aprimorado com a inclusão de um subgrupo, que, apesar de não haver dano em órgão-alvo, apresenta alto risco de progressão da doença em dois anos. Isso pode ser determinado por plasmocitose medular maior que 60%, mais de uma lesão óssea em RM, TC ou PET (maior que 0,5 cm) ou relação de cadeias leves envolvidas maior que 100 (Rajkumar, 2014).

A identificação de proteína-M em amostra sérica ou urinária ajuda a estabelecer o diagnóstico, sendo a imunofixação o padrão de referência para confirmar a presença de proteínas-M e para distinguir cadeias tipo leve e pesada (IMWG, 2003). A quantificação dos plasmócitos é realizada com a contagem de pelo menos 200 células no medulograma, e a confirmação de clonalidade é essencial para o diagnóstico que pode ser realizado através de imuno ensaio ou citometria de fluxo (Hoffman et al., 2013). Um total de 13 radiografias do esqueleto, coluna, fêmures e úmeros, tórax pósterio-anterior e pelve (Kyle et al., 2009) faz parte da investigação inicial.

A tumorigênese do MM é um processo multietapas (Figura. 2), tendo início a partir da gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS – *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*), ou do mieloma múltiplo latente (SMM – *Smoldering Multiple Myeloma*) (Prideaux et al., 2014). Tanto MGUS quanto SMM são deficiências plasmocitárias assintomáticas, sendo considerado como SMM quando a proporção de células plasmáticas na medula óssea se torna menor ou igual a 10%. O risco médio de progressão de MGUS para MM é de 1% ao ano, enquanto a partir de SMM é de 10% ao ano, nos primeiros cinco anos (Korde et al, 2011).



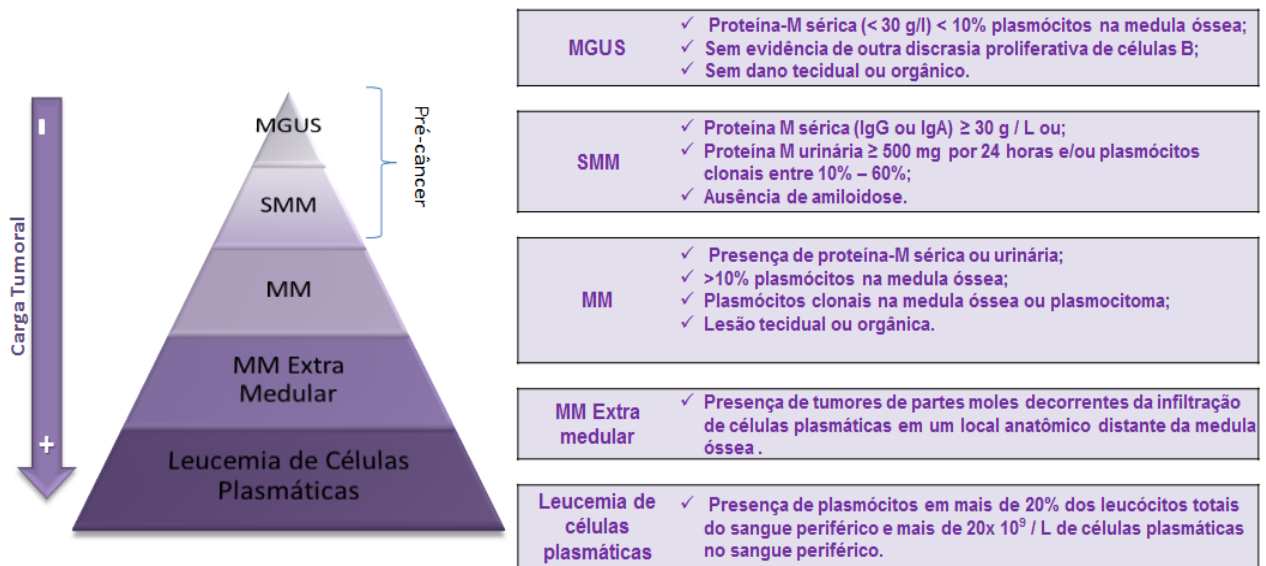


Figura 2: A figura mostra os processos multietapas da tumorigênese do mieloma múltiplo. O processo tem início na MGUS, e pode progredir até a leucemia de células plasmáticas. (Adaptado de: Korde et al, 2011).

A progressão do MM acumula alterações genéticas, que fornecem vantagens de adesão e de proliferação indiscriminada às células do tumor. Esses eventos sobrepostos colaboram para a evolução do quadro para mieloma múltiplo extra medular, ou ainda, para leucemia de células plasmáticas. Alterações citogenéticas como as translocações 11:14, 14:16 e 4:14, as deleções 13q14, 17p e 8q24, bem como amplificação de 1q21, e variantes em genes da família RAS, são consideradas como anormalidades relacionadas à progressão e agressividade do tumor (Dib et al, 2008; Neben et al, 2013; Manier et al., 2017).

Atualmente, dois sistemas de estadiamento são aplicados para a classificação prognóstica dos pacientes de MM (Tabela 1). Durie-Salmon e o Sistema Internacional de Estadiamento (ISS – *International Staging System*) têm por finalidade a estratificação de risco e servem para avaliar o resultado clínico geral dos pacientes. Embora sejam os sistemas de estadiamento mais utilizados, eles não levam em consideração a complexidade citogenética do MM. O sistema de estadiamento Durie-Salmon foi um dos primeiros a ser padronizado e estabelecido. Classifica os pacientes em estádios de carga tumoral de I a III. O ISS também categoriza os pacientes em três níveis, porém é considerado como mais preciso, pois avalia níveis séricos de microglobulina e albumina como biomarcadores para o prognóstico. Após uma revisão do sistema ISS (R-ISS), o sistema passou a utilizar a quantificação da lactato desidrogenase (LDH) e a marcação por Híbridação in situ

por Fluorescência (FISH) de células mais agressivas, para a avaliação (Palumbo et al., 2015).

Tabela 1: Sistemas de Estadiamento - Mieloma Múltiplo.

Estadio	Sistema Durie-Salmon (D&S)	Sistema Internacional de Estadiamento (ISS)	Sistema Internacional de Estadiamento Revisado (R-ISS)
I	Todos os itens: Hemoglobina > 10 g / dL Cálcio Sérico: valor normal ou ≤ 10,5 mg/ dL Ausência ou lesão óssea única IgG < 5 g/ dL, IgA < 3 g / dL Proteína Monoclonal Urinária < 4 g / 24h Massa tumoral baixa (< 0,6 células x10 <sup>12</sup> / m <sup>2</sup> ).	Microglobulina Sérica β2 < 3,5 mg / L Albumina ≥ 3,5 g / dL.	Citogenética não é considerada de alto risco e Níveis de LDH são normais.
	II	Não atende os critérios de Estadio I e Estadio III.	Microglobulina Sérica β2 < 3,5 mg / L e Albumina < 3,5 g / dL ou Microglobulina Sérica β2 de 3,5 - < 5,5 mg / L.
III	Um ou mais dos seguintes itens: Hemoglobina < 8,5 g / dL Cálcio Sérico > 12 mg/ dL Múltiplas Lesões Líticas Avançadas IgG > 7 g/ dL, IgA > 5 g / dL Proteína Monoclonal Urinária > 12 g / 24h Massa tumoral baixa (1,2 células x10 <sup>12</sup> / m <sup>2</sup> ) Subclasse III-A: Se creatinina < 2 mg / dL Subclasse III ≥ 2 mg / dL.	Microglobulina Sérica β2 5,5 mg/L.	Citogenética é considerada de alto risco t(4;14); t(14;16) ou del17 e/ou Níveis de LDH são altos

### 1.3 Tratamento

Para o tratamento, primeiro é definido se o paciente é candidato à terapia de altas doses (Indução) e transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TACTH) (Rajkumar, 2016). A submissão do paciente ao TACTH é baseada em critérios bem estabelecidos: idade menor que 65 anos, capacidade funcional individual baseada em índices internacionais validados pelo *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) e Karnofsky (Oken et al., 1982), e ausência de comorbidades clínicas tais como: cardiopatias, pneumopatias, hepatite aguda B ou C ativa com carga viral elevada, síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), e outras neoplasias (Palumbo, 2011). Para casos nos quais o paciente é elegível para TACTH, o tratamento inicia-se com a terapia de Indução, seguido pelo TACTH e pelos tratamentos de Consolidação e/ou Manutenção (Rajkumar, 2016).

Para os pacientes inelegíveis para o TACTH, o tratamento será constituído pelas fases de indução e manutenção. Os esquemas de tratamento são preferencialmente de multidrogas, e aplicados de acordo com o quadro clínico do paciente (Rajkumar e Harousseau, 2016). Nas duas últimas décadas, melhoras significativas no tratamento e no desfecho de pacientes com MM foram obtidas com a adição de algumas classes de medicamentos ao tratamento, como inibidores de proteassoma e imunomoduladores.

O principal inibidor de proteassoma utilizado é o bortezomib (V). Além dele, inibidores de segunda geração, carfilzomibe e ixazomib, também estão disponíveis. O sistema ubiquitina-proteassoma é responsável pela marcação e degradação da maioria das proteínas com função regulatória em eucariotos, incluindo proteínas que controlam a apoptose, a progressão do ciclo celular e a reparação do DNA (Allegra et al, 2014). A inibição do proteassoma leva à estabilização e acúmulo desses substratos, resultando na interrupção da regulação do ciclo celular e na ativação de vias apoptóticas e morte celular (Orlowski e Kuhn, 2008). Células neoplásicas são mais sensíveis aos efeitos pró-apoptóticos da inibição do proteassoma do que as células normais (Cruz, 2012)

A dexametasona (D) e prednisona (P) são os corticosteroides incluídos no tratamento de MM. O mecanismo pelo qual a dexametasona induz a apoptose em

células de MM ainda é desconhecido, porém estudos sugerem que seja mediado pela ligação inicial ao seu receptor cognato, o receptor de glicocorticoides (GC) (Burwick e Sharma, 2018).

Ciclofosfamida (C) é um potente imunossupressor, com ação citotóxica que interfere *in vivo* com o crescimento de neoplasias suscetíveis e, até certo ponto, com a regeneração tissular normal (Baxter, 2015).

O melfalano (M), agente alquilante bifuncional, foi sintetizado em 1953, sendo o primeiro fármaco a ser utilizado na terapia de MM. Atua tanto como agente citotóxico quanto no dano ao DNA (Salvini, 2017). Ele se liga ao DNA, levando ao cruzamento das duas cadeias, desta forma, impedindo a replicação celular (Alkeran, 2015).

Os imunomoduladores (talidomida, lenalidomida e pomalidomida), possuem capacidade imunomodulatória, anti-angiogênica, anti-inflamatória e antiproliferativa (Krishnan et al, 2016), e são utilizados de forma oral aos pacientes de MM.

### **1.3.1 Imunomoduladores (IMiDs)**

Estudos randomizados já avaliaram o uso da talidomida em pacientes recém-diagnosticados, após o transplante autólogo e em pacientes refratários (Sonneveld et al., 2017; Brinchen et al., 2018; Holstein et al., 2017), em todas as etapas de tratamento a talidomida levou a um aumento no tempo de sobrevida livre de progressão (Holstein et al., 2017), atingindo uma resposta completa ou completa parcial ao tratamento de indução à remissão da carga tumoral.

A talidomida, um derivado sintético do ácido glutâmico (alfa-ftalimido-glutarimida), foi desenvolvida em 1954 pelo laboratório farmacêutico Grünenthal (Knobloch et al., 2017). Em 1957, o fármaco foi lançado no mercado como um antiemético e sedativo seguro (Lenz, 1988). Devido à associação entre o aumento do nascimento de crianças com malformações e o consumo do medicamento, em 1962 a talidomida foi retirada do mercado. Cerca de dez mil bebês em todo o mundo foram afetados pela Embriopatia da Talidomida (Matthews e McCoy, 2003). O uso

da talidomida foi autorizado em 1971 para o tratamento do Eritema Nodoso da Hanseníase, e voltou a ser utilizada sob rígida regulação (OMS, 1988). A talidomida foi aprovada para o tratamento de MM em 2006 pelo FDA (Holstein e McCarthy, 2017).

Embora tenha sido retirada do mercado mundial após casos de teratogênese, e o governo federal, através do Serviço Nacional de Fiscalização de Medicina e Farmácia (SNFMF), tenha cassado a licença dos produtos contendo talidomida em 1964 (Brasil, 2014), acredita-se o uso de talidomida nunca tenha sido descontinuado no Brasil (Oliveira et al., 1999). Atualmente, a dispensação da talidomida é feita unicamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS), sendo fiscalizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tendo seu uso autorizado para pacientes com diagnóstico de MM, conforme Lei 10.651/2003 ([www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/2003/L10.651.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.651.htm)). Também é utilizada no tratamento da doença enxerto contra hospedeiro (Browne et al., 2000). A talidomida é um derivado racêmico do ácido glutâmico (Figura 3), enquanto o enantiômero ((R) - talidomida) é eficaz contra enjoos matinais e não é teratogênico em humanos, o ((S) - talidomida) é teratogênico. Os enantiômeros são convertidos in vivo, logo ambos os isômeros podem ser encontrados no soro (Murphy-Poulton et al, 2006).

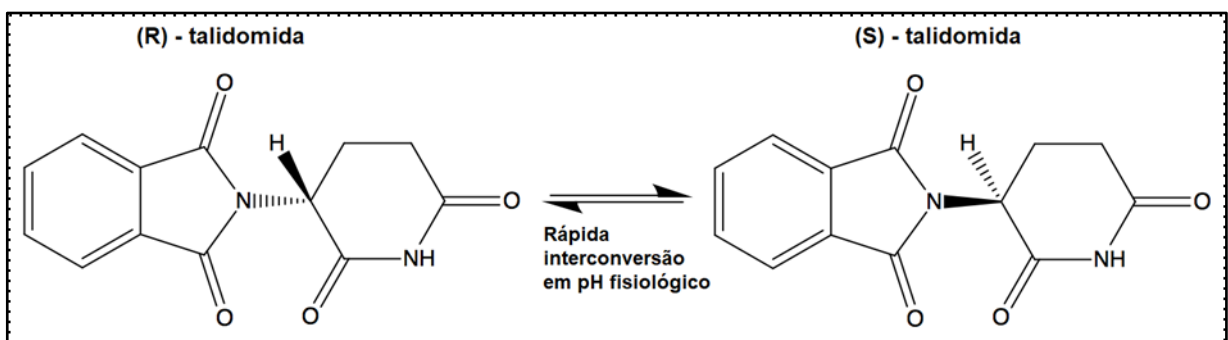


Figura 3: Enantiômeros da talidomida. A (R) - talidomida atua como um sonífero enquanto a (S) - talidomida é teratogênica. (Adaptado de: Tokunaga et al., 2018.)

Estudos já demonstraram que a talidomida exerce seus efeitos anti-inflamatórios, inibindo a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) pelos monocitos periféricos (Deng et al., 2003; Majumder et al., 2012). Pressupõe-se que uma das formas de inibição do TNF- $\alpha$  pela talidomida seja através do bloqueio da

ativação do Fator Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) (Majumdar et al., 2002). O NF- $\kappa$ B é um regulador chave de genes inflamatórios, como o TNF- $\alpha$  e a interleucina-8. Estudos indicam que o bloqueio da ativação do NF- $\kappa$ B dá-se através da supressão da atividade da quinase IkappaB (Keifer et al., 2001). Outro mecanismo de ação terapêutico está relacionado à propriedade antiangiogênica, através da inibição de fatores de crescimento, o VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) e o bFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos) (Li et al., 2003).

Na busca por análogos da talidomida que não fossem teratogênicos, e que ainda apresentassem a eficácia terapêutica para as mesmas condições, dois análogos estruturais, a lenalidomida (2005) e a pomalidomida (2013) foram sintetizados (Figura 4).

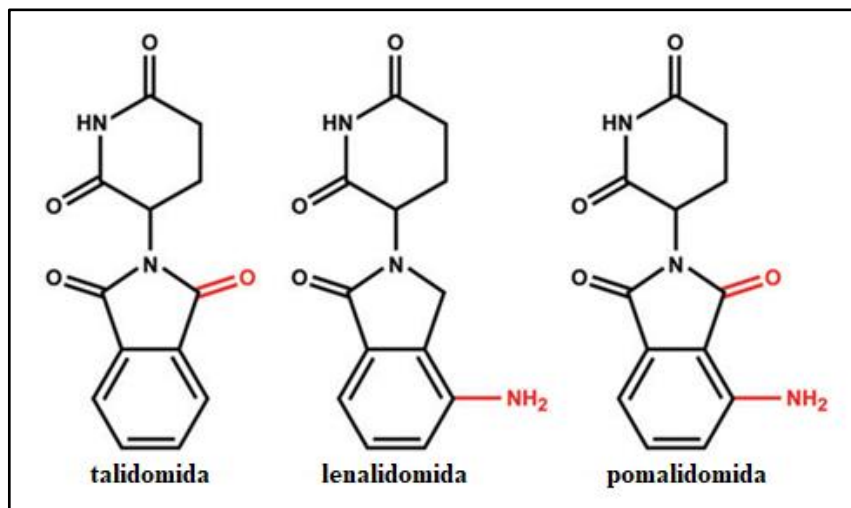


Figura 4: Talidomida e dois de seus análogos - lenalidomida e pomalidomida. (Adaptado de: Kotla et al., 2009)

Tanto a lenalidomida (3- (7-amino-3-oxo-1H-isoindol-2-il) piperidina-2,6-diona) quanto pomalidomida (4-amino-2- (2,6-dioxopiperidin-3-il) isoindole-1,3-diona) possuem as propriedades imunomoduladoras, antiangiogênicas e anti-inflamatórias, assim como a talidomida (Terpos et al., 2013; Koeppen, 2014). Os dois análogos apresentam um aumento nas taxas de resposta e menor toxicidade e estão associados à indução da parada do ciclo celular e apoptose direta das células de

MM (Teo, 2005; Zhu et al., 2013). No entanto, ambos são teratogênicos (D'Amato et al., 2013; Paumgarten, 2014).

Talidomida e seus dois análogos têm como alvo primário a Cereblon (Ito e Handa, 2016), que faz parte do complexo Ubiquitina E3 Ligase (formado por CRBN, DDB1, CUL4A e ROC1). Uma das hipóteses é que a ligação talidomida-Cereblon seja responsável pela teratogenicidade do fármaco (Ito e Handa, 2016). A ligação dos IMiDs a Cereblon permite a ubiquitinação de “novos substratos” que serão degradados (Gandhi et al., 2014). Um exemplo é a ubiquitinação de Ikaros e Aiolos, fatores de transcrição de dedos de zinco que são importantes reguladores do desenvolvimento e diferenciação linfóide (Rebollo e Schmitt, 2003), e ubiquitinação da caseína quinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) (Petzold et al., 2016), o que leva a produção de interleucina-2 (IL-2), que induz a proliferação de linfócitos T (Th2), resultando na citotoxicidade das células de MM. Estudos sugerem que após a ligação dos IMiDs a CRBN, os substratos originais, como o MEIS2, que seriam ubiquitinados pelo complexo são poupados da ubiquitinação e consequente degradação, mas ainda não é claro quais as implicações desse processo (Fischer et al., 2014). Um alvo a jusante da CRBN, o fator regulador de interferon 4 (IRF4), que é crítico para a sobrevivência das células de MM mostrou-se regulado negativamente pelo tratamento com IMiDs (Zhu et al., 2012). Tal como talidomida, lenalidomida e pomalidomida também estão relacionadas com a regulação negativa do TNF- $\alpha$  e no aumento da liberação de IL-2 e do interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (Lindner e Krönke, 2016), o que está possivelmente relacionado ao aumento da atividade antitumoral das células T. Estudos já mostraram que assim como a talidomida, seus análogos também podem inibir a liberação de interleucinas (IL) 1 $\beta$ , 6, 12, 16 e do fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF) (Lindner e Krönke, 2016; Chaulet et al, 2011), inativar o NF- $\kappa$ B (Keifer et al., 2001) e ativar caspase 8, que estão associados a inibição do crescimento das células de MM. Também estimulam os linfócitos T humanos, induzindo proliferação, produção de citocinas e atividade citotóxica (Teo, 2005). Porém, o mecanismo de ação dos IMiDs ainda não é totalmente conhecido.

Os efeitos imunomoduladores da lenalidomida incluem a ativação das células T (através do aumento na produção de IFN- $\gamma$  e IL-2) e das células Natural Killers (NK), e ainda o aumento na expressão de moléculas efetoras de morte celular (Hsu et al.,

2011). A lenalidomida tem maior atividade imunomoduladora do que a talidomida, enquanto a talidomida tem maior atividade antiangiogênica (Davies e Baz, 2010). Estudos com pomalidomida, por sua vez, demonstraram que ela possui uma potência antiproliferativa distinta e elevada em comparação com a lenalidomida, embora sua atividade principal também seja a imunomodulação (Lacy et al., 2009; Schey et al., 2011).

Enquanto a lenalidomida é utilizada principalmente no tratamento de pacientes recém-diagnosticados elegíveis ou não para transplante, e em cenários de resistência à talidomida, a pomalidomida é atualmente utilizada no tratamento recidivados/ refratários e resistentes a lenalidomida, nos EUA e na Europa. Além dos mecanismos de ação em comum com a talidomida e a lenalidomida, a pomalidomida atua nos osteoclastos (OCL), responsáveis pelas lesões osteolíticas (Chanan-Khan et al., 2013.). O fator de transcrição UP.1 tem um papel crucial na osteoclastogênese, e é regulado negativamente pela pomalidomida, resultando na inibição da reabsorção óssea (Uccello et al., 2017).

### **1.3.1.1 Efeitos Adversos**

O uso de talidomida pode causar efeitos adversos. O efeito colateral mais temido é a teratogenicidade, enquanto os efeitos colaterais mais comuns observados na prática clínica são constipação, fadiga, sonolência, dormência, tontura, edemas e neuropatia periférica (NP), sendo esta o principal efeito adverso limitante do tratamento (Chaudhry et al., 2002). Os menos comuns incluem xerostomia, neutropenia, necrólise epidérmica tóxica / síndrome de Stevens-Johnson, trombose venosa profunda, hipotireoidismo, irregularidades menstruais, perda de libido, impotência, hiperglicemia ou hipoglicemia, astenia, tremores, confusão, edema periférico, elevação do fígado enzimas, prurido, queda de cabelo e febre (Doshi et al., 2017).

Entre os possíveis efeitos adversos relacionados ao uso de pomalidomida, estão a teratogênese, tromboembolismo venoso e arterial, aumento da mortalidade



no mieloma múltiplo quando o pembrolizumab é adicionado à dexametasona e a um análogo da talidomida, toxicidade hematológica, hepatotoxicidade, reações de hipersensibilidade, tontura e estado confusão, neuropatia periférica, risco de segundas malignidades primárias e Síndrome de Lise Tumoral (POMALYST, 2017).

Para lenalidomida, os efeitos colaterais considerados graves são: teratogênese, aumento do risco de morte em pessoas com leucemia linfocítica crônica (LLC), riscos de novos cânceres (malignidades), problemas graves no fígado, incluindo insuficiência hepática e morte, reações cutâneas graves, incluindo reações alérgicas graves, síndrome de lise tumoral (TLS), agravamento do tumor (reação de flare tumor) e problemas de tireoide. Efeitos colaterais considerados comuns incluem: diarreia, erupção cutânea, náusea, prisão de ventre, cansaço, febre, comichão, inchaço dos membros e pele e tosse (REVLIMID, 2018).

A neuropatia periférica é definida como dano ou degeneração de nervos periféricos envolvendo fibras nervosas sensitivas, motoras ou autonômicas (Morawska et al., 2015). Ainda não é bem esclarecido qual ou quais os mecanismos da talidomida que estão envolvidos na NP. Estudos relacionaram a propriedade anti-angiogênica e efeitos tóxicos do fármaco nos neurônios dos gânglios da raiz posterior, e também a desregulação da atividade da neurotrofina (proteínas que induzem a sobrevivência, desenvolvimento e a função dos neurónios) através dos efeitos decorrentes da inativação do NF- $\kappa$ B (Mohty et al, 2010).

Vários sistemas de graduação, baseados em estudos clínicos, foram desenvolvidos para avaliação de NP (Tabela 2). Os mais sistemas mais utilizados são: NCI-CTCAE, Ajani Sensory, OMS e ECOG (Stubblefield et al., 2009).

Tabela 2: Escalas de classificação utilizadas para avaliação de neuropatia causada por quimioterapia. (Adaptado de: Stubblefield et al., 2009)

Escola	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5
<b>WHO</b>	Parestesias e / ou reflexos tendinosos diminuídos	Parestesias grave e / ou fraqueza leve	Parestesias intoleráveis e / ou perda motor acentuada	Paralisia	NA
<b>ECOG</b>	Diminuição acentuada dos reflexos tendinosos, parestesias leves ou constipação.	Ausência de reflexos tendinosos profundos, parestesias severas ou constipação, fraqueza leve.	Perda sensorial incapacitante, dor neuropática periférica grave, obstipação, fraqueza severa, disfunção da bexiga.	Disfunção respiratória secundária a fraqueza, obstipação que requer cirurgia, paralisia confinando o paciente à cama/cadeira de rodas.	NA
<b>NCI-CTCAE (v3.0)</b>					
<b>Neuropatia-Sensorial</b>	Assintomática: perda de reflexos tendinosos profundos ou parestesia (incluindo formigamento), mas sem interferir na função.	Alteração sensorial ou parestesia (incluindo formigamento), interferindo na ação, mas não no cotidiano.	Alteração sensorial ou parestesia interferindo em atividades diárias	Incapacitante	Morte
<b>Neuropatia-motor</b>	Assintomática, fraqueza apenas por exame/teste.	Fraqueza sintomática interferindo na função, mas não interferindo no cotidiano.	Fraqueza interferindo na ADL: órtese ou assistência para andar	Ameaça à vida: incapacitante (ex., paralisia).	Morte
<b>Ajani</b>					
<b>Sensorial</b>	Parestesia, diminuição dos reflexos tendinosos profundos.	Anormalidade objetiva leve, ausência de reflexos tendinosos profundos, anormalidade funcional leva a moderada.	Parestesia grave, anormalidade objetiva moderada, anormalidade funcional grave.	Perda sensorial completa, perda de função.	NA
<b>Motor</b>	Fraqueza muscular leve ou transitória	Fraqueza moderada persistente, mas capaz de andar.	Incapaz de andar	Paralisia completa	NA

### 1.3.2. Aplicação Terapêutica

De acordo com o Ministério da Saúde (2015), pacientes diagnosticados com SMM podem permanecer em observação clínica sem tratamento ou serem tratados com imunomoduladores (talidomida, 200 mg / dia); Para pacientes com MM sintomático é aconselhado na quimioterapia de Indução o uso de medicamentos com atividade anti-mieloma em diferentes combinações: bortezomibe, ciclofosfamida, cisplatina, dexametasona, doxorubicina, doxorubicina lipossomal, etoposido, melfalano, vincristina, lenalidomida e/ou talidomida. Na quimioterapia de manutenção é aconselhado o uso de monoterapia com talidomida (100 mg ao dia) (BRASIL, 2015). O Ministério da Saúde não possui um esquema de tratamento padrão a ser aplicado, ficando a cargo dos estabelecimentos de saúde habilitados como Unidade de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) ou como Centro de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (CACON), determinar os esquemas de tratamento a serem aplicados (BRASIL, 2018).

No Hospital de Clínicas de Porto Alegre, os principais regimes utilizados para a Indução são o VCD, o MPT, o CTD, o VRD e o VTD (Tabela 3). Durante a Consolidação, fase pós-transplante, o VTD é utilizado; e na Manutenção, a indicação é de usar apenas talidomida ou, preferencialmente, quando disponível, a lenalidomida. Em situações nas quais o MM é considerado agressivo, como doença refratária, leucemia de células plasmocitárias ou múltiplos plasmocitomas extramedulares, um dos esquemas que pode ser adotado é o VDT-PACE (Barlogie et al, 2008).

Tabela 3: Medicamentos utilizados no tratamento de Mieloma Múltiplo.

Classe do Medicamento	Nome	Sigla
Agentes Alquilantes	melfalan	M
	ciclofosfamida	C
Inibidores de Proteassoma	ixazomib	I
	carfilzomib	K
	bortezomib	V
Corticosteróides	dexametasona	D
	prednisona	P
Anticorpos Monoclonais	deratumab	dara
	elotuzumab	E
IMUNOMODULADORES	talidomida	T
	pomalidomida	P
	lenalidomida	R
VDT-PACE (poliquimioterapia)	VDT + cisplatina, doxorrubicina e etoposide	

Embora o tratamento tenha evoluído nos últimos anos com advento de novos medicamentos, MM não é considerado uma doença curável. Correlacionar as características clínicas com as informações biológicas moleculares permanece como o principal desafio para atingir períodos prolongados de remissão. Melhorar a resposta ao tratamento do Mieloma Múltiplo não envolve apenas o desenvolvimento de novas terapias, mas também uma melhor aplicação dos recursos existentes.

Quadro 2: Tipos de Resposta ao tratamento de mieloma múltiplo. (Adaptado de: IMWG, 2010).

Resposta	Crítérios IMWG
sCR Resposta Completa Ótima	CR conforme definido abaixo, + relação normal de FLC e ausência de células clonais na medula óssea por imuno-histoquímica ou imunofluorescência.
CR Resposta Complete	Imunofixação negativa no soro e na urina e desaparecimento de quaisquer plasmocitomas de tecidos moles e <5% de células plasmáticas na medula óssea.
VGPR Resposta Parcial Muito Boa	Proteína M sérica e urinária detectável por imunofixação, mas não por eletroforese ou redução >90 % na proteína M sérica mais nível de proteína M na urina <100 mg / 24 h
PR Resposta Parcial	>50 % de redução da proteína M sérica e redução em 24 horas da proteína M urinária em >90 % ou <200 mg / 24 h.  Se a proteína M sérica e urinária não forem mensuráveis, é necessária uma diminuição de 5 a >50% na diferença entre os níveis de FLC envolvidos e não envolvidas, em vez dos critérios da proteína M.  Se a proteína M sérica e urinária não for mensurável e o ensaio de luz livre no soro também não, será necessária uma redução >50% nas células plasmáticas em vez da proteína M, desde que a porcentagem de células plasmáticas da medula óssea seja >30 %.  Além dos critérios listados acima, se presente no início, uma redução de >50 % no tamanho dos plasmocitomas dos tecidos moles também é necessária.
Nenhuma mudança/ doença estável	Não atender aos critérios para CR, VGPR, PR ou doença progressiva.

## Continuação do Quadro 2

Doença progressiva	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de &gt;25% do valor de resposta mais baixo em qualquer um ou mais dos seguintes itens:</li> <li>-</li> <li>- Componente M sérico e / ou (o aumento absoluto deve ser &gt;0,5 g / dL);</li> <li>-</li> <li>- Componente M urinário e / ou (o aumento absoluto deve ser &gt;200 mg / 24 h);</li> <li>-</li> <li>- Apenas em pacientes sem níveis mensuráveis da proteína M no soro e urina; a diferença entre os níveis de FLC envolvidos e não envolvidos. O aumento absoluto deve ser &gt;10 mg / dL;</li> <li>-</li> <li>- Porcentagem de células plasmáticas da medula óssea; a porcentagem absoluta deve ser &gt;10 %;</li> <li>-</li> <li>- Desenvolvimento definitivo de novas lesões ósseas ou plasmocitomas dos tecidos moles ou aumento definitivo do tamanho das lesões ósseas existentes ou dos plasmocitomas dos tecidos moles;</li> <li>-</li> <li>- Desenvolvimento de hipercalemia (cálcio sérico corrigido &gt;11,5 mg / dL ou 2,65 mmol / L) que pode ser atribuído unicamente ao distúrbio proliferativo das células plasmáticas.</li> </ul>
Recaída	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recaída clínica requer um ou mais dos seguintes itens:</li> <li>-</li> <li>- Indicadores diretos de doença crescente e / ou disfunção orgânica final (características CRAB). Não é usado no cálculo do tempo até a progressão ou sobrevida livre de progressão, mas está listado aqui como algo que pode ser relatado opcionalmente ou para uso na prática clínica.</li> <li>-</li> <li>- Desenvolvimento de novos plasmocitomas de tecidos moles ou lesões ósseas</li> <li>-</li> <li>- Aumento definitivo no tamanho de plasmocitomas existentes ou lesões ósseas. Um aumento definitivo é definido como um aumento de 50% (e pelo menos 1 cm) conforme medido em série pela soma dos produtos dos diâmetros cruzados da lesão mensurável</li> <li>-</li> <li>- Hipercalemia (&gt; 11,5 mg / dL) [2,65 mmol / L]</li> <li>-</li> <li>- Diminuição da hemoglobina de &gt;2 g / dL [1,25 mmol / L]</li> <li>-</li> <li>- Aumento da creatinina sérica em 2 mg / dL ou mais [177 mmol / L ou mais]</li> </ul>
Recaída de CR (Para ser usado somente se o ponto final estudado for sobrevida livre de doença)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Qualquer um ou mais dos seguintes itens:</li> <li>-</li> <li>- Reaparecimento da proteína M sérica ou urinária por imunofixação ou eletroforese</li> <li>-</li> <li>- Desenvolvimento de &gt;5% de células plasmáticas na medula óssea</li> <li>-</li> <li>- Aparecimento de qualquer outro sinal de progressão (ou seja, novo plasmocitoma, lesão óssea lítica ou hipercalemia)</li> </ul>

### 1.3.3 Terapia Total

A heterogeneidade intratumoral é considerada como a principal barreira na busca pela cura do MM (Morgan et al., 2012). Estudos que utilizaram Sequenciamento de Próxima Geração demonstraram que subclones que estão presentes no momento do diagnóstico adquirem perdas e ganhos cromossômicos que levam a evolução de subclones em pacientes recidivados (Corre et al., 2015). Dois padrões de evolução das células de MM foram observados: (1) um padrão não linear no qual subclones dominantes foram extintos através da terapia, seguido da sobrevivência de subclones de menor expressão que levaram a recidiva e resistência ao tratamento (Magrangeas et al., 2013); e (2) um padrão linear, em que os subclones do diagnóstico sofreram modificações durante o tratamento inicial, que levaram a recaída desses pacientes (Keats et al., 2012). A escolha da combinação de medicamentos é feita baseada na progressão do MM, tanto no momento do diagnóstico quanto no decorrer do tratamento. Visando os subclones do MM e como cada um responde a diferentes medicamentos foi criada a Terapia Total, que emprega todos os fármacos ativos para MM em um único esquema de tratamento (Usmani et al., 2013). O ensaio clínico que resultou na Terapia Total 2 (TT2), foi projetado para avaliar a propriedade antiangiogênica da talidomida e se a quimioterapia adicional após o TACTH eram eficazes. Também foram avaliados os tipos de efeitos colaterais que ocorreram devido ao TT2 e a frequência da ocorrência (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00083551). A TT2 abrangeu quatro etapas de tratamento: Indução, Transplante 1 e 2, Consolidação e Manutenção (Figura 5), e acompanhou os participantes por um período de 12 anos.

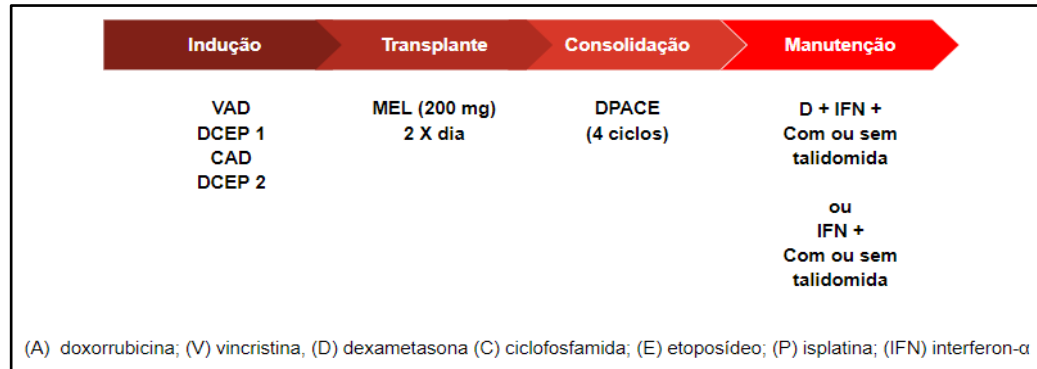


Figura 5: Esquema de medicamentos utilizados nas fases da TT 2. Os pacientes participantes foram randomizados ou não para o uso de talidomida. (Adaptada de: Barlogie et al., 2014)

Os pacientes que participaram desse ensaio foram randomizados para receber talidomida (323 participantes - TAL+) ou não (345 participantes – grupo controle). Aqueles participantes que foram eleitos para o TACTH, e que foram randomizados para talidomida, continuaram a receber o medicamento após o transplante (Figura 5).

O tempo de sobrevida global foi de 65% no grupo controle e de 68% no grupo TAL+. Quando avaliado o tempo em que os pacientes mantiveram uma resposta completa a indução, o grupo TAL+ apresentou um aumento de 8%, comparado ao grupo controle (Figura 6). A estimativa de recaída após cinco anos para o grupo que recebeu talidomida foi de 34%, menor que o grupo controle, que obteve uma estimativa de 42%.

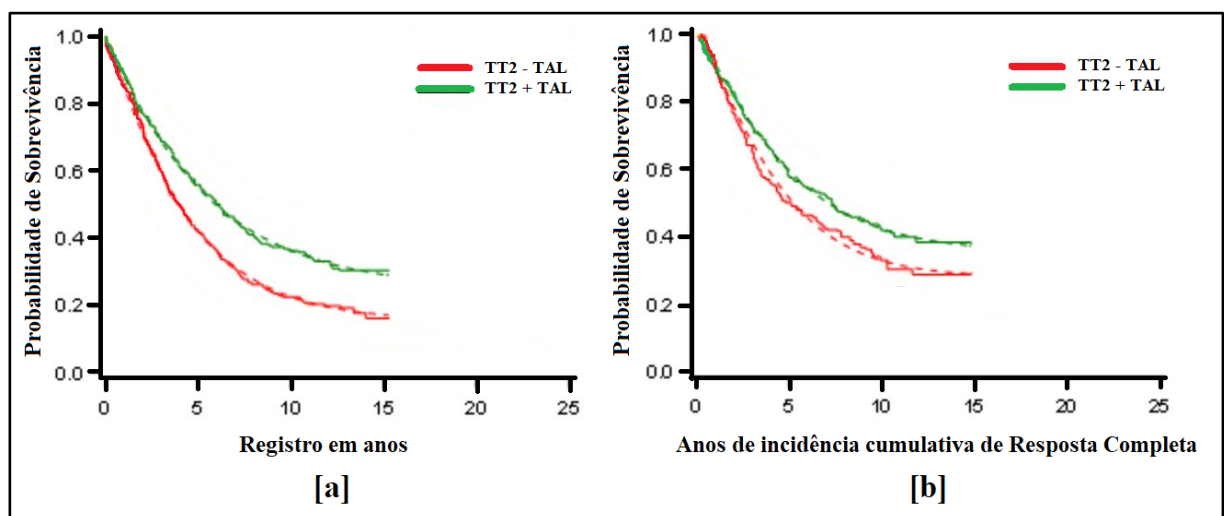


Figura 6: [a] Relação entre a probabilidade de sobrevivência em relação ao tempo de acompanhamento do estudo. [b] Relação entre a probabilidade de sobrevivência e o número cumulativo de tempo de resposta completa. Sem talidomida em vermelho; Com talidomida em verde. (Adaptada de: Barlogie et al., 2014)



No decorrer do TT2, amostras de sangue de medula óssea dos 668 pacientes participantes foram coletadas. Através dessas amostras, diversas análises como perfil de expressão gênica, metilação e de polimorfismos de nucleotídeo único foram realizadas em diferentes contextos. Os arquivos CEL dessas amostras estão disponíveis mediante solicitação por meio de um contrato de transferência de materiais. E dentro de alguns contextos determinados, estão disponíveis no banco de dados GEO.

#### **1.4 Gene Expression Omnibus (GEO)**

O banco de dados internacional GEO, criado em 2000 através de uma iniciativa do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) é um repositório público que arquiva e distribui, de forma livre, dados de expressão gênica de larga escala e entre outros conjuntos de dados de genômica funcional (Edgar, 2002). O GEO suporta dados derivados da comunidade científica que especificam o fornecimento de vários elementos de estudo críticos, incluindo dados brutos, dados processados e metadados descritivos (Clough e Barrett, 2016). Além do armazenamento de dados, é possível realizar análises genômicas comparativas, tais como perfis de imunoprecipitação da cromatina, perfil de RNA não-codificante, genotipagem de polimorfismos de base única (SNP) e análises de metilação (Barret et al, 2010). Até 2013, o GEO já comportava mais de 32 mil estudos (séries), contemplando mais de 800 mil amostras de 1600 organismos diferentes (Barrett et al., 2013). Em cada uma das séries de amostras que compõem o experimento, é possível obter informações sobre a plataforma onde foi realizado o ensaio, dados clínicos e dados suplementares (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/overview.html>).

Em 2016, o GEO detinha 54.640 estudos públicos, compreendendo mais de 1,3 milhão de amostras, derivadas de 2889 organismos diferentes (Clough e Barrett, 2016). Até a data de hoje (setembro de 2018), há 115.957 estudos publicados, que compreendem aproximadamente 3 milhões de amostras

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/summary/?type=series>). A estimativa é de que com o avanço tecnológico, haja um número cada vez maior de deposição de dados e conseqüentemente, trabalhos publicados utilizando o banco GEO.

## 1.5 Justificativa

O MM ainda é considerado uma doença incurável, porém os recentes avanços terapêuticos, principalmente a inclusão de IMiDs ao tratamento, melhoraram significativamente a taxa de sobrevida global dos pacientes. Além de ser fabricada no Brasil, a talidomida é dispensada unicamente pelo SUS, principalmente por ser um teratôgeno. O uso da lenalidomida foi aprovado pelo Ministério da Saúde em dezembro de 2017, mas somente para o tratamento de MM Refratário/Recidivado. Embora a taxa de sobrevida global seja significativamente melhor com os IMiDs, há uma grande heterogeneidade nos desfechos entre os pacientes que utilizam os regimes com talidomida e seus análogos, em conjunto, ou não, com outros medicamentos.

Estudos já publicados (Prideaux et al., 2014; Mitchell et al., 2016; Bolli et al., 2016), correlacionam as respostas ao tratamento com IMiDs a fatores genéticos, como mutações ou expressão diferencial. O estudo da influência de fatores genéticos no desfecho individual ao tratamento do mieloma múltiplo é relativamente recente e, até o momento, pouco difundido. Contudo, é essencial para entender a eficácia do tratamento e a ocorrência de efeitos adversos. Genes diferencialmente expressos relacionados a diferentes tratamentos para MM podem configurar potenciais biomarcadores, colaborando com a aplicação de terapias moleculares, o que pode tornar sua avaliação bastante relevante. Além disso, é sabido que a propriedade antiangiogênica da talidomida também está relacionada à teratogenicidade, dessa forma, os genes diferencialmente expressos podem colaborar na busca pelo entendimento de mecanismos moleculares da Embriopatia da Talidomida e contribuir na busca por análogos não teratogênicos.

Uma alternativa que vem sendo bastante utilizada para a análise de expressão gênica é o uso de dados secundários a partir de repositórios públicos. Além de ser uma estratégia de baixo custo, permite o levantamento de hipóteses que podem ser adequadamente testadas em diferentes contextos, abrangendo um número maior e mais detalhado de respostas. Essa estratégia pode sugerir novos alvos para futuras pesquisas de biomarcadores de resposta ao tratamento de IMiDs.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar a expressão gênica diferencial em amostras de Mieloma Múltiplo em humanos, relacionada ao tratamento com imunomoduladores e à progressão tumoral, a partir de dados secundários provenientes de ensaios experimentais depositados em bancos de dados públicos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ❑ Comparar o padrão de expressão gênica entre tecido normal e tumoral;
  
- ❑ Avaliar o padrão de expressão e as características dos genes, dentro da janela de tratamento com talidomida ou seus análogos;
  
- ❑ Avaliar o padrão de expressão e as características dos genes, dentro da janela de tratamento com IMiDs associados ou não a outros medicamentos;
  
- ❑ Investigar as vias moleculares de ação, identificando genes *upstream* e *downstream* aos alvos da talidomida ou seus análogos, previamente sugeridos;
  
- ❑ Comparar os resultados encontrados com estudos que abordaram as propriedades terapêuticas da talidomida ou seus análogos;
  
- ❑ Investigar os processos celulares nos quais os genes diferencialmente expressos estão envolvidos;

### 3 Materiais e Métodos

Todas as informações utilizadas nesse estudo são oriundas de dados secundários de ensaios experimentais previamente disponibilizados no *Gene Expression Omnibus* (GEO).

#### 3.1 Amostras

Foram utilizadas amostras depositadas no banco de dados público *Gene Expression Omnibus* (GEO) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponíveis em formato fastq. Como critério de inclusão, foram selecionadas amostras de mieloma múltiplo e de indivíduos saudáveis, tratadas ou não com regime quimioterápico. Como critério de exclusão, amostras de outros diagnósticos não foram incluídas.

#### 3.2 Métodos

##### 3.2.1 Normalização

Os dados brutos de todas as amostras analisadas foram normalizados no software RStudio Desktop v.1.0.1. em linguagem R (v.3.5.1), utilizando a função *justRMA* do pacote *affy* disponibilizado para a plataforma *Affymetrix* (Irizarry, c2018). Todos os arquivos CEL no diretório de trabalho foram lidos e convertidos em uma medida de expressão usando RMA (Irizarry, c2018). O RMA (“*Robust Multichip Analysis*”) é um algoritmo que realiza a correção de fundo utilizando as intensidades das sondas PM (*Perfect Match probe*) e normalização por quantil (Irizarry et al., 2003). Para a seleção de sonda ótima de microarranjo, utilizamos o pacote *JetSet* (Li, 2011).

### 3.2.2 Determinação de Expressão Diferencial

Os genes diferencialmente expressos (GDEs) em cada um dos ensaios foram determinados através das funções *lmFit*, *makeContrasts*, *contrasts.fit* e *eBayes* do pacote *limma* (Ritchie et al., 2015). Os valores-P e valores-P ajustados foram considerados como estatisticamente significativos quando  $< 0,05$ , para todos os ensaios, atribuindo-se o logFC (log *Fold Change* - medida que descreve quanto uma quantidade muda entre uma medida original e uma subsequente.). O logaritmo no logFC é calculado para a base 2, isso significa que cada unidade do logFC pode ser vista como uma diferença multiplicada por dois na expressão gênica ( $FC = 2^{\log FC}$ ). O método "BH" (Benjamini e Hochberg (1995)), foi utilizado para o controle da taxa de FDR. Esse é um método de ajuste padrão utilizado pelas funções de GDE por ser provavelmente o mais apropriado para estudos de *microarray* (Smyth e Altman, 2013). Os GDEs foram ilustrados através de gráficos de vulcão gerados no RStudio Desktop v.1.0.1. pelo pacote *ggplot2*.

### 3.2.3 Análises de Biologia de Sistemas

As redes de interação dos genes diferencialmente expressos foram obtidas em diferentes ferramentas, tais como o banco de dados *STRING* (*European Molecular Biology Laboratory*, EMBL - Versão 10.5), para montagem de redes proteína-proteína o *STITCH* (EMBL - Versão 5.0), para elaboração de redes proteína-fármaco. Foram realizadas as análises de biologia de sistemas desses genes, tais como enriquecimento de ontologias e vias, avaliação de aglomerados e comparação de estruturas de redes no software *Cytoscape* v.3.6.0 com os *plugins* disponibilizados no site *Cytoscape Apps*. Avaliações similares foram também executadas em linguagem R, através do pacote *clusterProfileR* (Yu et al., 2012), de acordo com a classificação do banco de dados *KEGG Pathways* (*GenomeNet*) e *ReactomeDB*.

O GO é composto por três tipos de ontologias que independem entre si. (a) Componentes Celulares: descreve em qual compartimento celular o produto ativo do gene está; (b) Funções Moleculares: diz respeito à descrição das funções dos genes

relacionados como atividades, podem ser realizadas por produtos gênicos individuais, ou por complexos montados de produtos gênicos; e (c) Processos Biológicos: relacionados a processos físicos ou químicos que tem relação com a participação de um gene, ou produto desses, relacionado a área biológica.

### 3.3 Aspectos Éticos

Todos os dados depositados no GEO foram submetidos com a concordância dos pesquisadores, que estão cientes de que os mesmos estão disponíveis publicamente, para serem utilizados de forma secundária em análises e/ou publicações.

É responsabilidade do pesquisador que submeteu os dados, garantir que os indivíduos participantes do grupo amostral tenham assinado o consentimento de que os resultados do projeto são submetidos a um banco de dados público, e assegurar a privacidade de cada um dos participantes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>).

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Amostras

Ao todo, foram utilizados sete estudos (*Microarray*) depositados no banco de dados GEO (GSE6691 [Gutiérrez et al., 2007]; GSE8546 [Burington et al., 2008]; GSE38627 [Heuck et al., 2012]; GSE58133 [Tacchetti et al., 2014]; GSE68871 [Terragna et al., 2016]; GSE37302 [Bolzoni et al., 2013] e GSE75084). O GSE6691 possui doze amostras de medula óssea de pacientes de MM recém-diagnosticados

(sem tratamento) e cinco amostras de plasmócitos de doadores saudáveis. Nos outros seis estudos abordados, todas as amostras de MM receberam algum tipo de tratamento ao decorrer dos experimentos realizados em cada um dos GSEs. Informações sobre as amostras e desenvolvimentos dos ensaios estão nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Estudos utilizados nas análises relacionadas à talidomida.

	<b>GSE8546</b>	<b>GSE38627</b>	<b>GSE58133</b>	<b>GSE68871</b>
<b>Amostra</b>	42 amostras de pacientes* recém-diagnosticados	130 amostras de pacientes* recidivados	120 amostras de pacientes*	118 amostras de pacientes*
<b>Tecido</b>	Medula Óssea	Medula Óssea	Medula Óssea	Medula Óssea
<b>Experimento</b>	48 horas após a terapia	Após a Terapia Total 2	Após tratamento com VTD	Após tratamento com VTD
<b>Grupos</b>	Pré-talidomida e Pós-talidomida	Com talidomida e Sem talidomida	Neuropatia Periférica de grau $\geq 2$ e Neuropatia Periférica de grau $\leq 2$	Resposta Completa e Resposta Parcial

\* pacientes com diagnóstico de MM.

Tabela 5: Estudos utilizados nas análises relacionadas ao tratamento com lenalidomida e pomalidomida.

	lenalidomida		pomalidomida
	<b>GSE8546</b>	<b>GSE37302</b>	<b>GSE37302</b>
<b>Amostra</b>	Amostras de pacientes de MM recidivos	6 amostras de Células de Comerciais	6 amostras de Células de Comerciais
<b>Tecido</b>	Células de Medula Óssea	(Linfoma de MM)	Linfoma de MM
<b>Experimento</b>	48 horas após a terapia com lenalidomida	LEN (100 $\mu$ M) por 24 hs	Após tratamento com lenalidomida
<b>Grupos</b>	Pré-lenalidomida (n = 36) e Pós-lenalidomida (n = 19)	Controle e lenalidomida	Sem lenalidomida e Com lenalidomida
			Controle e pomalidomida

(LEN = lenalidomida; POM = pomalidomida)



## 4.2 Normalização

O processo de normalização foi realizado com sucesso, resultando em amostras sem grandes variações na mediana (FIGURA 7). Foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA), e todos os ensaios apresentaram-se dentro da normalidade.

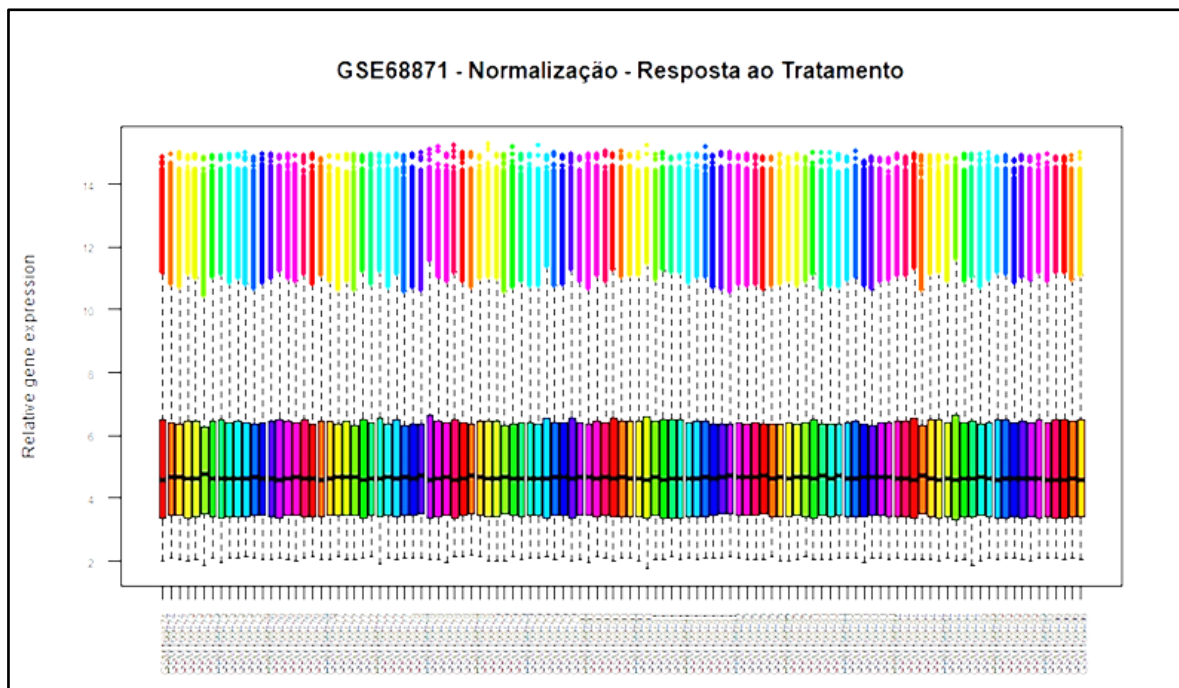


Figura 7: Boxplot realizado após a normalização das amostras do GSE68871. As barras coloridas no topo da imagem apontam os desvios de valores de expressão das amostras avaliadas no estudo.

### 4.3 Determinação de expressão diferencial

Os valores de logFC conferidos a cada amostra serão detalhados nas seções a seguir. Os GDEs ilustrados através de gráficos de vulcão (Figura 8) estão em suas sessões correspondentes.

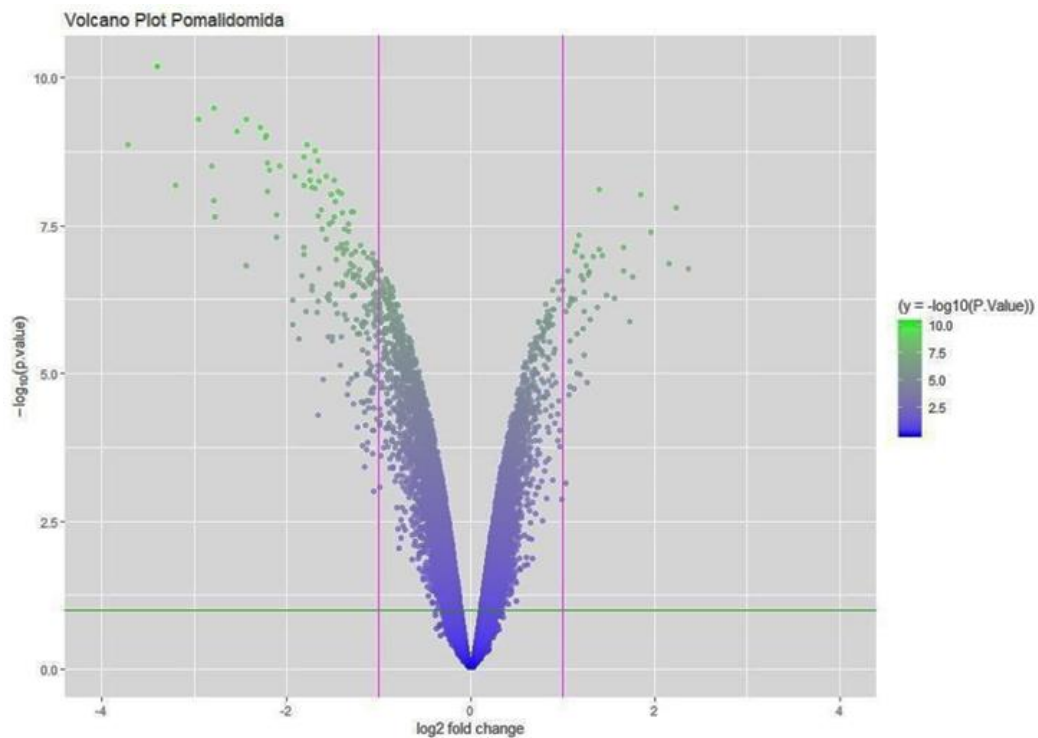


Figura 8: O gráfico ilustra os genes diferencialmente expressos no GSE37298 (pomalidomida). As linhas rosa cortam o eixo X no logFC igual a 1 e -1. A linha verde corta o eixo Y no  $-\log_{10}(\text{valor-P})$  igual a 1..

### 4.4 Células de mieloma múltiplo versus plasmócitos saudáveis

A análise de genes diferencialmente expressos em MM foi realizada em duas etapas, ambas utilizando um valor-P ajustado  $< 0,05$  como estatisticamente significativo. Na primeira, o número total de GDEs foi de 1569 em amostras de MM, com um valor de corte de logFC maior que 1 para genes hiperexpressos (1503 genes) e logFC menor que 1 negativo para hipoexpressos (66 genes). Na segunda

etapa considerando o valor de logFC para maior que 2 e menor que menos 2, foram identificados 91 genes hipereexpressos e 6 genes hipoexpressos (Quadro 3).

Os genes hipoexpressos não formaram redes de interação proteína-proteína, e nem com o complexo Ubiquitina E3 Ligase (CRL4<sup>CRBN</sup>) e os IMiDs (dados não apresentados).

Quadro 3: Genes diferencialmente expressos em amostras de MM. (Em negrito, genes que codificam proteínas que formam redes com o Complexo CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs).

Genes hipoexpressos (logFC < - 2)	Genes hipereexpressos (logFC > 2)
<i>IGKC, IGLC1, IGLJ3, SCD5, XIST e ZNF160</i>	<i>AASDHPPT, ABI1, ADM, ARPP19, ATG12, ATP1B1, ATP50, BTBD3, BUD23, C1QBP, C6orf62, CAMLG, CAPZA2, <b>CCNB1IP1</b>, CCNG1, CCNI, CCT3, CCT6A, CIRBP, CLNS1A, <b>COPS2</b>, CREG1, CSDE1, CSNK1A1, CTSO, DAD1, DBF4, DBI, DESI2, DKK1, DYRK1A, EAPP, EDNRB, EIF2AK2, EIF3M, ELOC, EMC7, ETF1, FAM13A, FBL, FTL, FXR1, GALNT1, GPI, HAT1, <b>HERC5</b>, HGF, HIGD2A, HIST1H1C, HIST1H2AC, HNRNPU, HPRT1, HSP90AB1, IFI6, IFITM1, IMPDH2, <b>ISG15</b>, LAMP1, LAMP3, LAMP5, LAP3, MAFF, MIF, MX1, NDUFA5, NME1, OAZ1, OLA1, PFDN4, PFN1, POLE3, PSMB7, RAB21, RAN, RBM3, RPL35, SELENOP, SELENOT, SLC39A6, SNRPE, SOD1, SRRM1, SSBP1, <b>SSR3</b>, ST3GAL6, TCEAL4, TMEM123, <b>UBE2G1</b>, UGT2B17, VAMP7, ZMPSTE24</i>

Os cinco principais mecanismos biológicos identificados através da GO (valor-P = 0,003) envolveram os genes hipoexpressos *IGKC* e *IGLC1*, e incluíram: (1) o reconhecimento de substância fagocitada por células fagocitárias (GO: 0006910), que é baseada no reconhecimento de fatores como componentes de parede celular bacteriana e moléculas de sinalização intracelular da célula fagocitária; (2) regulação do Sistema Complemento (GO: 0030449), que envolve qualquer processo que module a taxa ou extensão da ativação do Sistema Complemento; (3) a regulação da cascata de ativação proteica (GO: 2000257), que envolve qualquer processo que module a frequência, taxa ou extensão da cascata de ativação de proteínas; (4) a biossíntese de fagossomos (GO: 0006911), que abrange a internalização de moléculas e indução da captação através da membrana da célula fagocítica, entre

outros; e (5) a Via de sinalização do receptor Fc- $\epsilon$  (GO: 0038095), essa função abrange sinais moleculares que são iniciados pela ligação da porção Fc da IgE a um receptor Fc- $\epsilon$  na superfície da célula receptora e termina com a regulação de um processo celular posterior.

Quando avaliamos redes de interações proteína-proteína adicionando o CRL4<sup>CRBN</sup> e os IMiDs, os genes hiperexpressos *CCNB1IP1*, *COPS2*, *HERC5*, *ISG15*, *SSR3* e *UBE2G1* apresentaram uma interação com o Complexo e os IMiDs (Figura 9.a).

Os principais processos biológicos resultantes da análise de enriquecimento de GO (Figura 9. b) parecem estar especialmente associados aos mecanismos de imunomodulação e ubiquitinação, uma vez que as principais GO enriquecidas para proteínas citadas acima foram: (1) a regulação negativa da produção de IFN tipo I (GO: 0032480) e (2) a regulação da produção de IFN tipo I (GO: 0032479), processos que interrompam, previnam ou reduzam a frequência, a taxa ou a extensão da produção de IFN do tipo I; (3) a produção de IFN tipo I (GO: 0032606), biossíntese ou secreção de interferon após um estímulo celular, resultando em no aumento em seus níveis intracelular ou extracelular; (4) a resposta antiviral (GO: 0050688), processos que modulam a frequência, taxa ou extensão da resposta antiviral de uma célula; (5) a regulação negativa da produção de citocinas (GO: 0001818), interrompendo, evitando ou reduzindo a taxa de produção de uma citocina; (6) a ubiquitinação de proteínas (GO: 0016567) e (7) a denedilação de uma proteína (GO: 0000338), que consiste na remoção de NEDD8, uma proteína tipo ubiquitina. NEDD8 é conjugada ao Complexo Ubiquitina E2, que se liga ao Complexo CRL4<sup>CRBN</sup> e faz a nedilação do IKZF3 dependente de IMiDs (Sievers et al., 2018).

Também foi realizada a análise através do enriquecimento de vias envolvendo esse conjunto de genes, e da mesma forma as vias enriquecidas estão associadas aos processos de imunomodulação e ubiquitinação desses fármacos. As vias associadas (1) a reguladores negativos de sinalização DDX58 / IFIH1 (R-HSA-936440), que trata de genes envolvidos na produção de IFN mediada por RIG-I, que é capaz de induzir a própria transcrição resultando em um loop de hiper-regulação de IFN; (2) ao mecanismo antiviral de ISG15 (R-HSA-1169408), que codifica uma

proteína semelhante à ubiquitina (Ubl), fortemente induzida por exposição a IFNs e outros estresses; (3) ao mecanismo antiviral por genes estimulados por IFN (R-HSA-1169410); (4) a indução de IFN alfa/beta mediada por DDX58 / IFIH1 (R-HSA-168928); e (5) sinalização de IFN (R-HSA-913531) foram relacionadas a esses genes, principalmente a *HERC5* e *ISG15* (Figura 9.c).

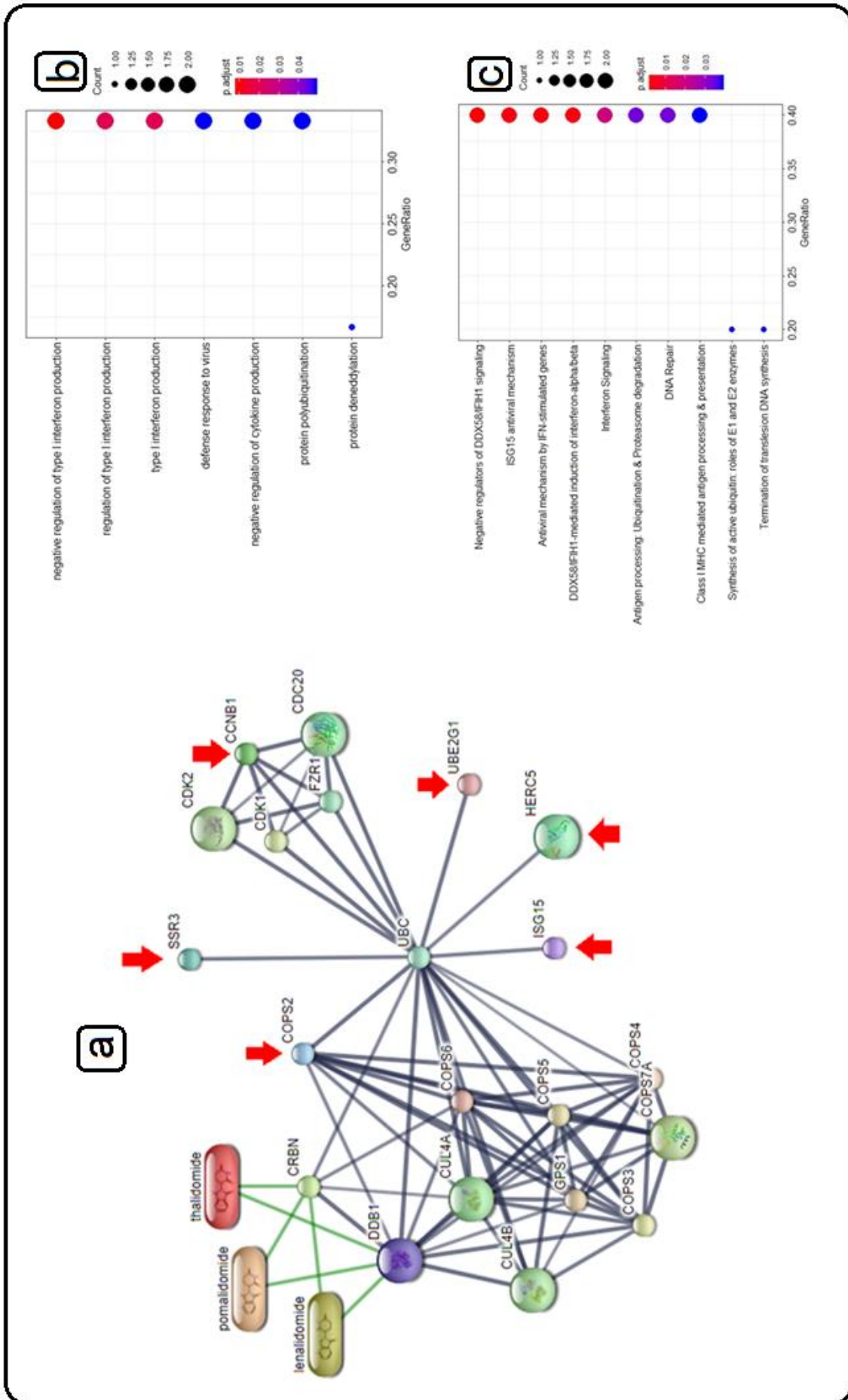


Figura 9: [a] Rede de interação entre proteínas de genes hiperexpressos (setas vermelhas) em MM + CRL4<sup>CRBN</sup> e IMiDs; [b] processos biológicos resultantes da análise de enriquecimento de GO; [c]: vias enriquecidas envolvendo os genes *CCNB1/1P1*, *COPS2*, *HERC5*, *ISG15*, *SSR3* e *UBE2G1*.

## 4.5 Talidomida

Para analisar a influência do uso de talidomida na expressão diferencial dos genes, avaliamos quatro diferentes parâmetros: (1) antes e após o uso de agente único; (2) no cenário do TT2, com ou sem talidomida; (3) Grau de neuropatia periférica, se > ou < que o grau 2 e (4) Classificação na resposta ao tratamento, entre as respostas Completa ou Parcial.

Ao analisar as amostras referentes à terapia com agente único, considerando como estatisticamente significativo um valor-P corrigido < 0,05, obtivemos um gene diferencialmente expresso (Figura 10.a), *CELSR2* (logFC = - 0.240).

Foi realizada a predição de formação de redes proteína-proteína e proteína e rede formada juntamente ao CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs. A proteína CELSR2 não mostrou interação com o Complexo, ou com os IMiDs (Figura 10.b), porém na predição de rede proteína-proteína, houve a formação de uma rede envolvendo CELSR2, MYO16 e PHF20 (Figura 10.c). Analisamos se haviam interações entre essas proteínas em processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares, mas não houve dados estatisticamente significativos que apresentassem para essas interações.

O gene *CELSR2* (*Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor 2*), codifica uma proteína da família das caderinas-flamingo, localizada na membrana plasmática. Tem como função molecular a atividade de receptor acoplado à proteína G (GO: 0004930), e é associada a doenças cardiovasculares (Wang et al., 2014). Embora o valor-P corrigido seja estatisticamente significativo, é possível que por o logFC referente ao gene *CELSR2* ser pequeno, ele não possua uma relevância biológica.

Não foram encontrados genes diferencialmente expressos nos modelos que compreendiam TT2 e Neuropatia Periférica, com valor-P corrigido significativo < 0,05 (Figura 10.d e 10.e, respectivamente).

Ao investigar a modificação na expressão gênica entre grupos que atingiram Resposta Completa e Resposta Parcial, após o tratamento com talidomida, obtivemos quatro DEGs, com logFC > 1: *MYO1B*, *GALNT1*, *ERAP1* e *IGH* (Figura

10.e) no grupo que obteve Resposta Completa. A predição de redes de interação de proteínas com o CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs não indicou interação entre as proteínas citadas e CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs. Analisamos se haviam interações entre essas proteínas em processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares, mas não foram observados dados estatisticamente significativos que apontassem essas interações.



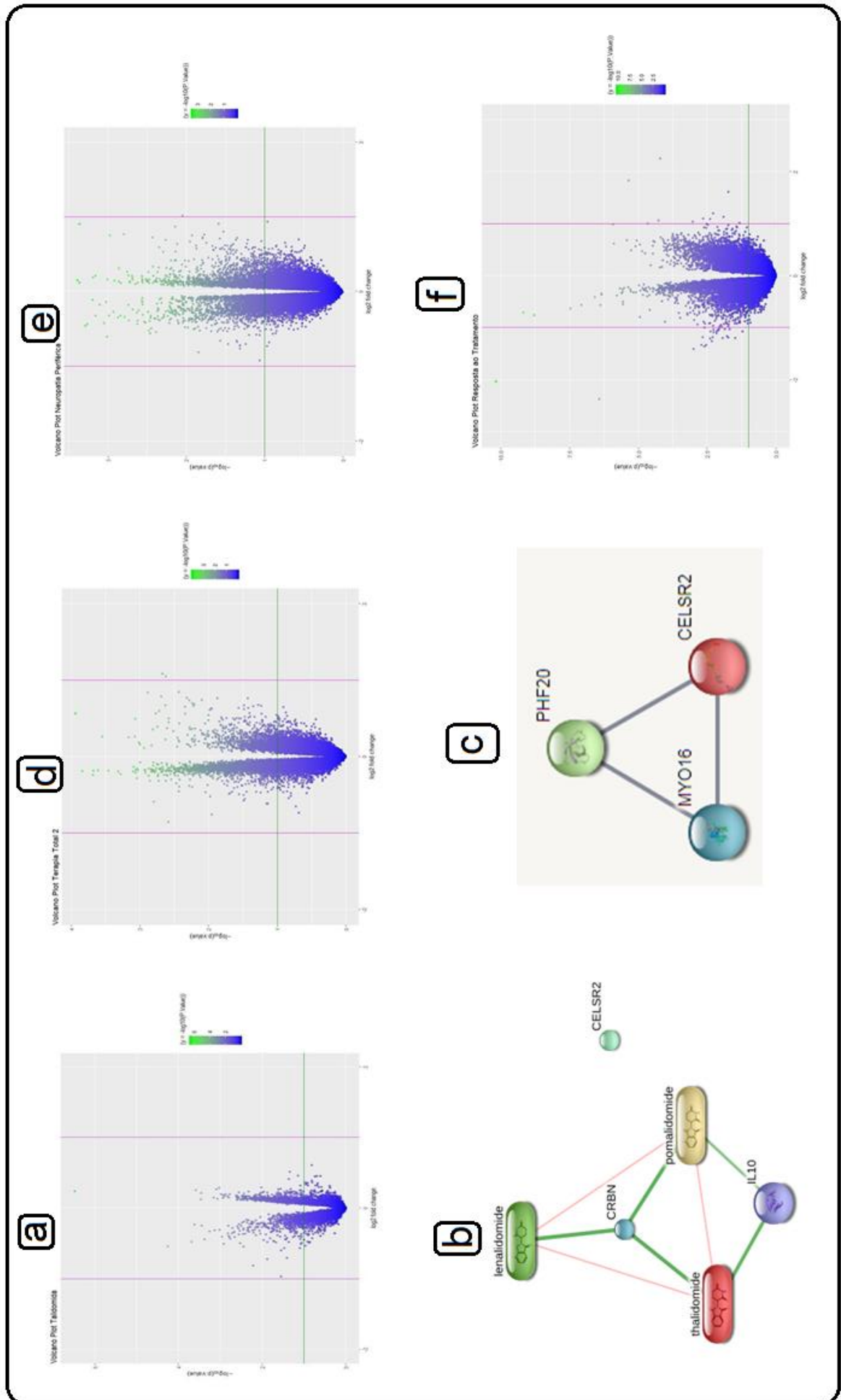


Figura 10: Talidomida – [a, d, e, f]: Gráfico Vulcão de Terapia de agente único, TT2, neuropatia periférica e resposta ao tratamento, respectivamente. [b,c]: Predições de Redes de Interação para CELSR2

## 4.6 Lenalidomida

Para avaliar o impacto que o uso da lenalidomida causa na expressão gênica frente ao tratamento do MM, foram abordados dois ensaios. A primeira abordagem foi utilizando amostras de pacientes de MM recidivados, comparando a expressão dos genes antes do uso de lenalidomida, e após 48 h (25 ou 50 mg/d). Empregando um valor-P corrigido  $< 0,05$ , foram obtidos dois genes diferencialmente expressos: SPR ( $\logFC = 0.43$ ) e ARF3 ( $\logFC = 0.62$ ). É possível que pelo baixo valor de  $\logFC$  dos genes acima citados, que a diferença encontrada na expressão gênica não tenha um sentido biológico relevante.

Utilizando o STITCH, foi possível visualizar a interação de ambas as proteínas através da UBC (Ubiquitina C) com a rede formada juntamente ao  $CRL4^{CRBN}$  + IMiDs (dado não apresentado). Ao analisar as principais GO de SPR e ARF3, não foram observadas funções em comum. O principal processo biológico associado à SPR foi a biossíntese de compostos contendo pteridina (GO: 0042559), como ácido pteróico e ácido fólico; enquanto para ARF3 foi o transporte direcionado de moléculas, através de vesículas de transporte, da rede trans-Golgi para a membrana plasmática (GO: 0006893). Quando analisado o enriquecimento de vias, não houve via que fosse comum a ambas as proteínas. A rota principal para ARF3 foi a de Síntese de PIPs na membrana do Golgi (R-HSA-1660514), a proteína está envolvida na síntese de fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) a partir da fosforilação do fosfatidilinositol (PI) na membrana do Golgi; e para a SPR a ativação de eNOS (R-HSA-203615). A segunda abordagem investigou a expressão de genes em linhagens comerciais de MM (linhagem JJN3). As células do grupo controle foram cultivadas em DMSO por 24 h, enquanto o grupo alvo foi cultivado com lenalidomida (100  $\mu$ M) por 24 h. Considerando como estatisticamente significativo o valor-P corrigido  $< 0,05$ , 97 genes foram identificados como diferencialmente expressos (Quadro 4), desses, 14 genes tiveram sua expressão diminuída ( $\logFC < -1$ ), e 83 foram superexpressados ( $\logFC > 1$ ).

Quando avaliamos redes de interações proteína-proteína adicionando o  $CRL4^{CRBN}$  e os IMiDs, as proteínas dos genes hipoexpressos *BCAT1* e *ITGA8*, e 28

genes hiperexpressos (no quadro 4; em negrito), apresentaram uma interação com o Complexo e os IMiDs (Figura 11).

Quadro 4: Genes diferencialmente expressos em amostras tratadas com lenalidomida. (Em negrito, genes que codificam proteínas que formam redes com o Complexo CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs).

Genes hipoexpressos na cultura de 24 hs.	Genes hiperexpressos na cultura de 24 hs.
<p><b>BCAT1</b>, BCDIN3D, C3orf80, CMAHP, CNR1, FDXACB1, GPR18, INHBE, <b>ITGA8</b>, LOC101928000, NAV2, RASGRP2, SLAMF7, UNC13C.</p>	<p><b>AFF4</b>, ALDH7A1, ANKRD22, APOL6, <b>ARHGEF7</b>, <b>ASB2</b>, BLNK, <b>BLVRA</b>, C15orf48, C2, <b>CBX5</b>, CCL2, <b>CDH1</b>, <b>CDK5R1</b>, <b>CEBPA</b>, <b>CLASP1</b>, COL6A1, <b>CORO1B</b>, <b>CSF2RB</b>, CTGF, CXCL12, <b>CYP1A1</b>, CYP1B1, DDO, <b>DDR2</b>, <b>DTX3L</b>, DYNC2H1, EMP1, EMP2, <b>EPHX1</b>, F13A1, FGL2, FRMD4B, HNMT, IFIT3, IGFBP3, <b>IKZF3</b>, IL4I1, INO80D, KCNS3, KDEL3, KITLG, LACC1, <b>LGALS3BP</b>, LHFPL6, <b>MUC1</b>, MYBPC2, <b>MYO1E</b>, <b>MYOF</b>, NFKBIZ, <b>PARP9</b>, PDE4B, PDGFRL, <b>PES1</b>, PLXDC2, PPIC, PROS1, PRTFDC1, PSMB8-AS1, PTN, RAB38, RHO, RSPH3, RUBCNL, S100A9, SELENOP, <b>SERPINH1</b>, SGMS2, <b>SOCS3</b>, ST7-AS1, STAP2, <b>STAT1</b>, <b>SUPT6H</b>, TAGAP, TENM3, TEX14, TMEM173, <b>TMEM173</b>, TMEM45A, TSPAN2, <b>USP9X</b>, VMP1, ZNF652, RSPH3, RUBCNL, S100A9, SELENOP, <b>SERPINH1</b>, SGMS2, SOCS3, ST7-AS1, STAP2, <b>STAT1</b>, <b>SUPT6H</b>, TAGAP, TENM3, TEX14, <b>TMEM173</b>, <b>TMEM173</b>, TMEM45A, TSPAN2, VMP1, ZNF652.</p>

Não foram identificados processos biológicos que fossem comuns entre as duas proteínas dos genes hipoexpressos. Para BCAT1, o envolvimento em processos celulares de metabolização foi apontado, principalmente através dos processos catabólico e metabólico de aminoácidos de cadeia ramificada (GO: 0009083 e GO: 0009081) e de processos relativos a reações químicas e a vias que resultam na quebra de aminoácidos contendo um esqueleto de carbono, compreendendo isoleucina, leucina e valina, por exemplo. Por outro lado, a proteína ITGA8 foi fortemente associada a processos de resposta a estímulos, destacando-se os processos de regulação positiva da resposta celular ao estímulo transformador do TGF- $\beta$  (GO: 1903846) e o desenvolvimento do tecido muscular liso (GO: 0048745). Foi realizada uma análise através do enriquecimento de vias para verificar se havia alguma interação. O resultado apontou as mesmas relações que haviam sido feitas

aos processos biológicos, e que não havia interações entre as proteínas, sendo a via envolvida no metabolismo de aminoácidos e derivados mostrou-se exclusiva de BCAT1 (R-HSA-70895), e a via de moléculas associadas com fibras elásticas à proteína ITGA8. Não há até o momento estudos que abordem qualquer um dos processos biológicos, rotas ou interações que foram mencionados acima que tenham ligação com o tratamento com IMiDs ou relacionados ao mieloma múltiplo.

Ao investigar quais as principais funções resultantes da GO nos genes hiperexpressos, cujas proteínas obtiveram interação com o CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs, foram apontadas as funções de regulação positiva da resposta de defesa ao vírus pelo hospedeiro (GO: 0002230 – *DTX3L*, *PARP9*, *STAT1*, *TMEM173*), de regulação da resposta e regulação da via de sinalização mediada por IFN-gama (GO: 0060330 e GO: 0060334 – *PARP9*, *SOCS3* e *STAT1*), regulação da cascata JAK-STAT (GO:0046425 – *CDK5R1*, *CYP1B1*, *PARP9* e *SOCS3*). Adicionalmente, foi feita uma investigação sobre a interação dos 28 genes hiperexpressos em vias moleculares, considerando atividade bioquímica ou o papel como um componente de um processo maior. As proteínas STAT1, CBX5, DTX3L, SUPT6H e PARP9 foram indicadas na função de ligação de histonas (GO: 0042393). De acordo com a definição dessa função molecular, essas proteínas estão envolvidas na condensação e enrolamento dos cromossomos durante a divisão celular e também estão envolvidas na supressão inespecífica da atividade gênica.

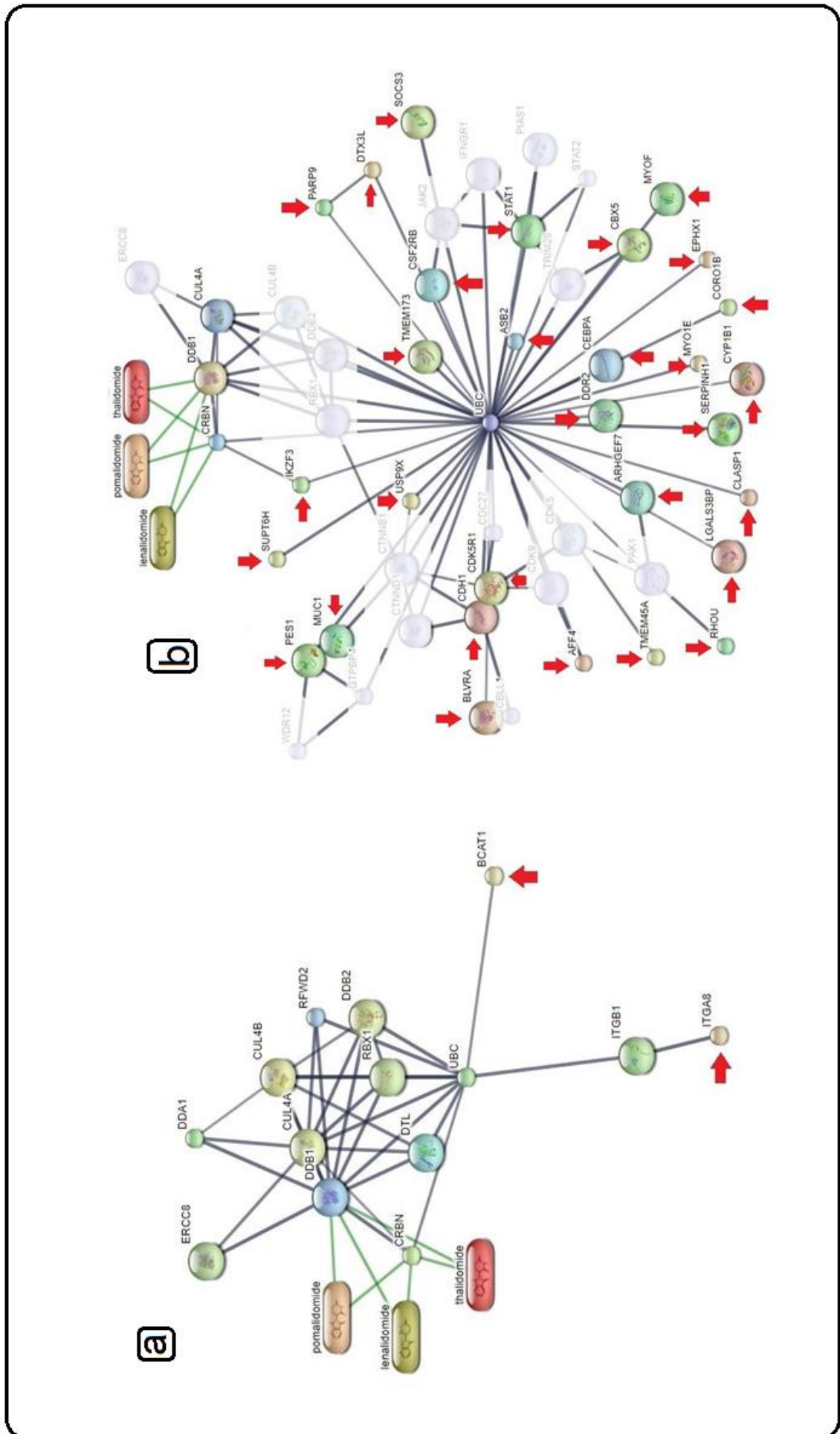


Figura 11: Predição de Redes de interação com CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs, envolvendo proteínas (setas vermelhas) de genes hipoeexpressos [a] e genes hiperexpressos [b] após exposição a lenalidomida.

## 4.7 Pomalidomida

A fim de identificar os efeitos do uso pomalidomida na expressão gênica, foi avaliada a expressão de genes em linhagens comerciais de MM (linhagem JJN3). As células do grupo controle foram cultivadas em DMSO por 24 h, enquanto o grupo alvo foi cultivado com pomalidomida (100 µM) por 24 h. O resultado foi de 131 genes diferencialmente expressos (valor-P corrigido < 0,05), sendo 24 hipoexpressos (logFC > 1) e 107 hiperexpressos (logFC < -1).

Quadro 5: Genes diferencialmente expressos em amostras tratadas com pomalidomida. (Em negrito, genes que codificam proteínas que formam redes com o complexo CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs).

Genes hipoexpressos	Genes hiperexpressos
<p><i>ABHD6, <b>BCAT1</b>, BCDIN3D, C3orf80, CHAC1, CMAHP, CNR1, FDXACB1, FJX1, GPR18, INHBE, PREX1, <b>PSAT1</b>, RASGRP2, SLAMF7, SYNE1, TIGIT, TK2, TPO, TUBE1, UNC13C, ZBTB47, ZBTB8A, ZFP69B</i></p>	<p><i>ABCA5, ACVR1, ALDH7A1, ANKRD22, ANTXR1, ANTXR2, <b>BCL2L11</b>, BLVRA, <b>BMF</b>, BMP2, C2, CA11, CALHM2, CALHM6, CBX5, CDC42EP5, <b>CDH1</b>, <b>CDK5R1</b>, CLASP1, CMBL, COL6A1, CORO1B, CRHBP, CSRP2, CTGF, CTSH, CTSZ, <b>CTTNBP2NL</b>, CYP1B1, DDO, DDR2, DN3M3, DOK4, DSEL, DTX3L, DYNC2H1, ELOVL7, EMP1, F13A1, FGL2, GREM2, <b>H1F0</b>, HBEGF, HEPACAM2, HS3ST1, IFIT3, IGDCC4, INO80D, KCNS3, KDEL3, KPTN, LACC1, LHFPL6, LHX8, LOC100506388, MACF1, MMP13, <b>MUC1</b>, MYBPC2, MYO1E, MYOF, NCF4, NF1, NFKBIZ, NMRK1, OTUB2, P4HA2, PARP9, PBXIP1, PDE4B, PDGFRL, PDK4, PES1, PHLDA1, PHLDB2, PLXDC2, PROS1, PRTFDC1, PSMB8-AS1, PTN, RBMS3, RSPH3, RTN4RL2, RTP4, RUBCNL, <b>S100A9</b>, SATB1, SELENOP, SERPINH1, SFRP4, SGMS2, SLC12A6, SLC35F5, SLC44A1, SMIM14, SOCS1, SOCS3, SORBS2, ST7-AS1, ST7L, SULF1, TENM3, TGFBI, TMEM173, TSPAN2, ZFP36L2, ZNF697</i></p>

A predição de redes de interação de proteínas com o complexo CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs foram então construídas através do *STITCH*. Para os genes hipoexpressos foi indicada a interação de duas proteínas, a BCAT1 e a PSAT1 (Figura 12. a).

As seis principais funções de GO ( $p < 0,004$ ) para os dois genes (*BCAT1* e *PSAT1*) foram relacionados à biossíntese de proteínas, incluindo: o processo biossintético alfa-aminoácido (GO: 1901607), biossíntese de aminoácidos celulares (GO: 0008652), processo metabólico alfa-aminoácido (GO: 1901605), processo metabólico de aminoácidos celulares (GO: 0006520), processo biossintético de ácido carboxílico (GO: 0046394) e processo biossintético de ácido orgânico (GO: 0016053).

A predição de redes de interação de proteínas com o CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs foi realizada também para os genes hiperexpressos, indicando a interação de oito proteínas, a BCL2L11, BMF, CDH1, CDK5R1, CTTNBP2NL, H1F0, MUC1 e a S100A9 (Figura 12.b). Com base nessas proteínas, a análise de enriquecimento de Ontologia de Genes (GO) foi conduzida, sugerindo que quatro genes (*BCL2L11*, *BMF*, *MUC1*, *S100A9*) podem desempenhar um papel importante na apoptose mediada pela pomalidomida. Os processos biológicos relacionados foram: regulação da via de sinalização apoptótica intrínseca (GO: 2001242); via de sinalização apoptótica intrínseca (GO: 0097193); regulação da via de sinalização apoptótica (GO: 2001233), que envolvem qualquer processo que module a frequência, taxa ou extensão da via de sinalização apoptótica intrínseca, através de sinais como a perda da supressão da apoptose, a ausência de certos fatores de crescimento, hormônios e citocinas.

Através da análise de enriquecimento de vias envolvendo o conjunto dos oito genes hiperexpressos, quatro (*BCL2L11/BMF/CDH1/H1F0*) mostraram ter um papel importante na morte celular, provavelmente mediada por pomalidomida, que embora elencada por sua propriedade imunomoduladora, possui uma potência antiproliferativa. Os genes tiveram duas principais vias associadas, (1) apoptose [R-HSA-109581] e (2) morte celular programada [R-HSA-5357801].

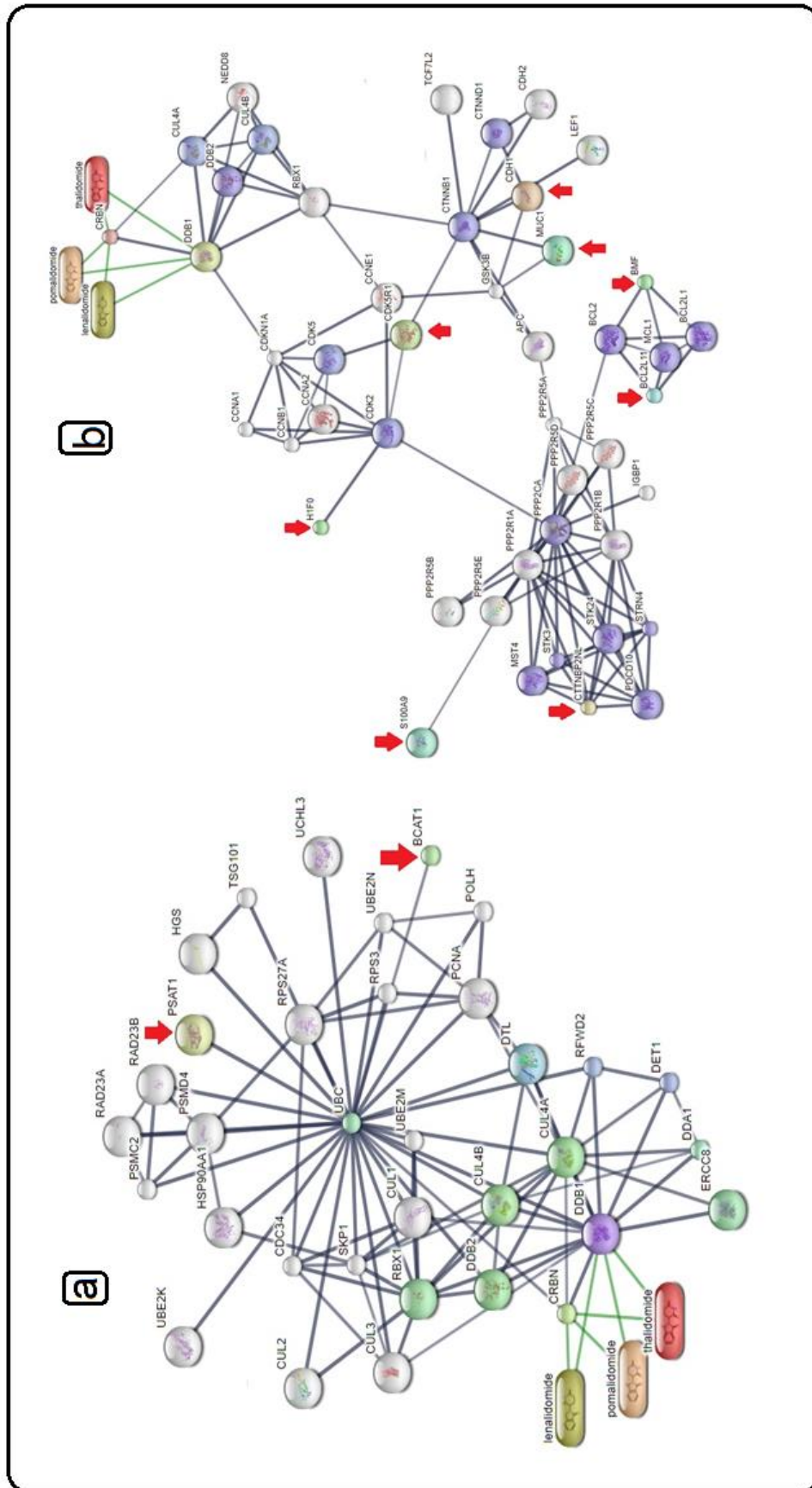


Figura 12: Predição de Redes de interação com CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs, envolvendo proteínas (setas vermelhas) de genes hiporexpressos [a] e genes hiperexpressos [b] após exposição a pomalidomida.



#### 4.8 Análise de intersecção de todos os genes diferencialmente expressos (lenalidomida e pomalidomida)

A fim de verificar se havia intersecção de genes diferencialmente expressos entre lenalidomida e pomalidomida, o Diagrama de Venn foi aplicado (Figuras 12 e 13).

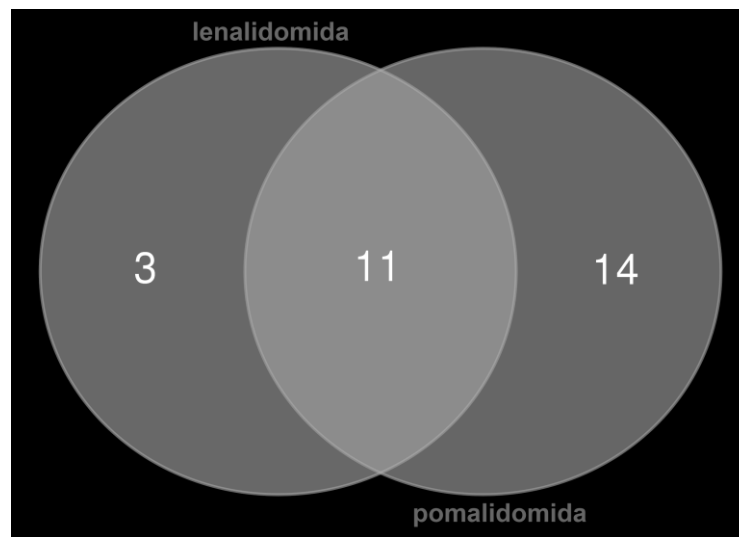


Figura 13: Diagrama de Venn de GDEs hipoxpressos na amostra de células tratadas com lenalidomida (agente único por 24 h) e de células tratadas com pomalidomida (agente único por 24 h).

Quadro 6: Lista de genes gerada a partir do Diagrama de Venn de genes hipoxpressos em tratamentos de agente único. (Em **negrito**, genes que codificam proteínas que formam redes com o complexo CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs).

GDEs somente em lenalidomida	<i>LOC101928000, ITGA8 e NAV2</i>
GDEs somente em pomalidomida	<i>TPO, TK2, TIGIT, FJX1, PSAT1, TUBE1, SYNE1, ABHD6, CHAC1, ZBTB8A, ALDH5A1, ZFP69B, ZBTB47, PREX1</i>
GDEs lenalidomida/pomalidomida	<i>FDXACB1, CNR1, SLAMF7, CMAHP, <b>BCAT1</b>, UNC13C, GPR18, RASGRP2, C3orf80, INHBE, BCDIN3D</i>

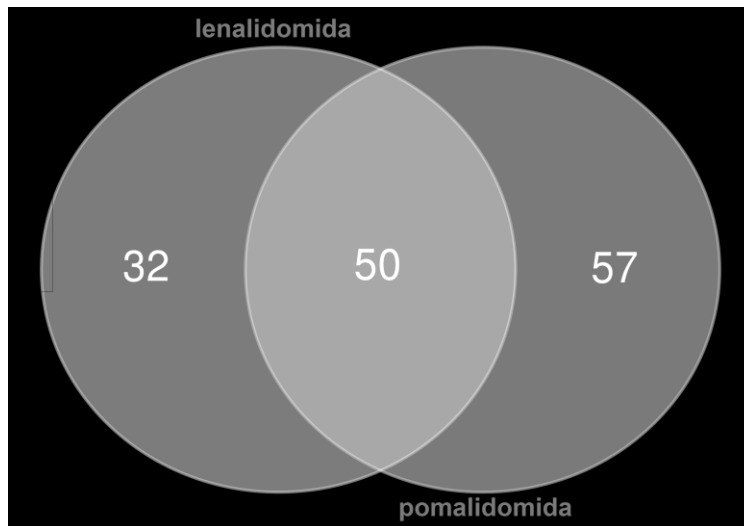


Figura 14: Diagrama de Venn de GDEs hiperexpressos na amostra de células tratadas com lenalidomida (agente único por 24 h) e de células tratadas com pomalidomida (agente único por 24 h).

Quadro 7: Lista de genes gerada a partir do Diagrama de Venn de genes hiperexpressos em tratamentos de agente único. (Em negrito, genes que codificam proteínas que formam redes com o complexo CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs).

GDEs lenalidomida	<i>TAGAP, SUPT6H, IGFBP3, RAB38, BLNK, VMP1, CXCL12, TEX14, C15orf48, AFF4, EPHX1, CYP1A1, LGALS3BP, IKZF3, HNMT, ARHGEF7, STAP2, CCL2, PPIC, STAT1, RHOA, TMEM45A, APOL6, CSF2RB, CEBPA, FRMD4B, ASB2, IL4I1, USP9X, ZNF652, EMP2, KITLG</i>
GDEs pomalidomida	<i>HBEGF, SFRP4, CMBL, CTSH, GREM2, CTSZ, NCF4, MACF1, DOK4, IGDCC4, RBMS3, DSEL, DNM3, BMF, P4HA2, SLC12A6, MMP13, CRHBP, SULF1, ABCA5, PBXIP1, ACVR1, SLC35F5, CTTNBP2NL, CALHM2, CDC42EP5, TGFBI, PHLDA1, OTUB2, PHLDB2, RTN4RL2, BCL2L11, ST7L, CSRP2, ANTXR1, PDK4, ZNF697, SOCS1, NMRK1, SMIM14, ANTXR2, CA11, NF1, SATB1, SLC44A1, LOC100506388, RTP4, KPTN, H1FO, LHX8, ZFP36L2, HS3ST1, CALHM6, ELOVL7, SORBS2, HEPACAM2, BMP2.</i>
GDEs lenalidomida/pomalidomida	<i>EMP1, PRTFDC1, <b>DDR2</b>, <b>CDH1</b>, <b>CBX5</b>, ST7-AS1, PTN, DTX3L, FGL2, <b>MUC1</b>, ALDH7A1, TENM3, PDGFRL, <b>TMEM173</b>, <b>MYOF</b>, PROS1, <b>SERPINH1</b>, <b>SOCS3</b>, F13A1, <b>PARP9</b>, ANKRD22, LACC1, DYNC2H1, INO80D, RSPH3, KDELR3, TSPAN2, C2, NFKBIZ, SGMS2, <b>CDK5R1</b>, SELENOP, KCNS3, MYBPC2, PLXDC2, CTGF, LHFPL6, CYP1B1, <b>BLVRA</b>, RUBCNL, <b>CLASP1</b>, PSMB8-AS1, DDO, <b>PES1</b>, PDE4B, IFIT3, S100A9, COL6A1, <b>CORO1B</b>, <b>MYO1E</b>.</i>

As análises de expressão gênica diferencial revelaram potenciais novos preditores de biomarcadores para o tratamento de MM, os genes hipereexpressos *COPS2*, *UBE2G1* e *SPR*, e os genes hipoexpressos *BCAT1* e *PSAT1*.

O gene *COPS2* codifica uma proteína (CSN2) que é uma subunidade essencial do signalossomo COP9. O complexo COP9, além de estar envolvido na fosforilação de NF- $\kappa$ B (Zhao e al., 2016), é um regulador essencial da via de conjugação das ubiquitinas (Complexo E2) (Figura 14), que media a denedilação de culinas de complexos como o Ubiquitina E3 ligase (Schwechheimer, 2018). A denedilação leva a diminuição da atividade de ligase dos complexos E3 (Chung e Dellaire, 2015). A atividade de UBE2G1 (Enzima Conjugadora de Ubiquitina E2 G1) consiste em estender cadeias de poliubiquitina (Figura 14) (Sievers e al., 2018). Estudos relataram que perda de função no UBE2G1 leva a denedilação de alvos de ubiquitinação do Complexo  $CRL4^{CRBN}$ , e a uma menor taxa de ubiquitinação de IKZF3, conferindo resistência ao tratamento (Lu et al., 2018; Sievers e al., 2018). Também já foi apontado que a inibição de NEDD8 é capaz de impedir a degradação, promovida pela talidomida, de SALL4, um fator de transcrição que tem um papel fundamental para o desenvolvimento de membros, associado à teratogênese da talidomida (Donovan et al., 2018).

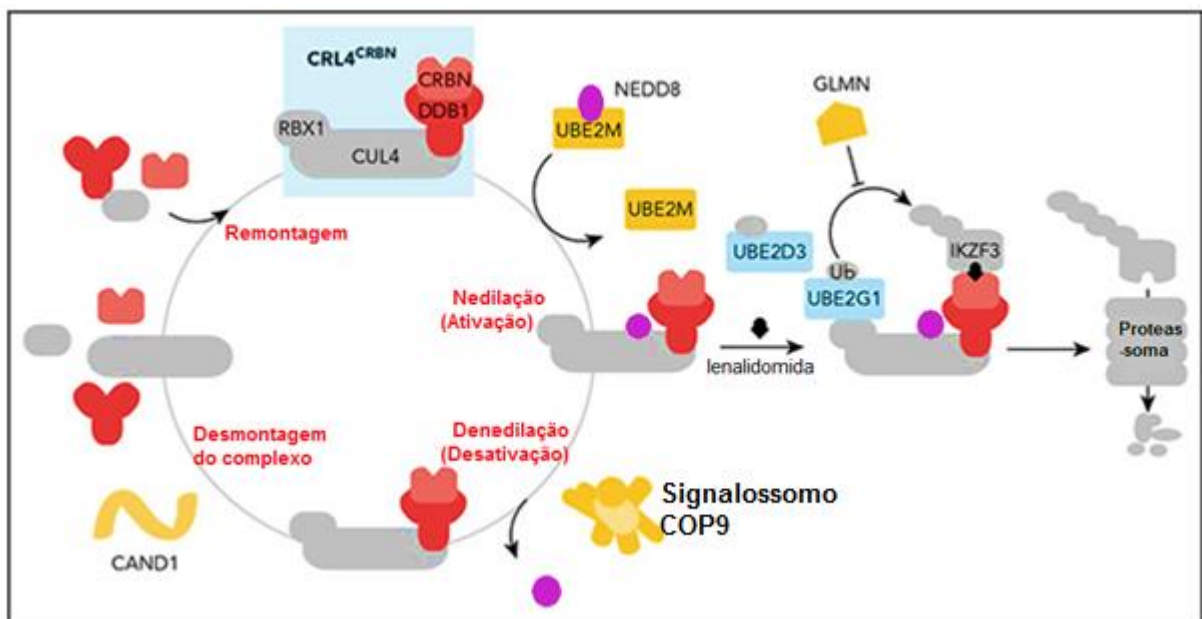


Figura 15: As enzimas de nedilação do Complexo Ubiquitina E3 ligase, o signalossoma COP9 e as enzimas E2, UBE2M, UBE2G1 e UBE2D3, regulam a atividade do  $CRL4^{CRBN}$  induzida pela lenalidomida. (Adaptada de: Sievers e al., 2018).

A (6R)-L-eritro-5,6,7,8-Tetra-hidrobiopterina (BH4) é um cofator essencial para a produção de óxido nítrico (NO), e a Sepiapterina redutase (SPR) catalisa o passo final na biossíntese de BH4 (Sumi-Ichinose et al., 2017). Já foi apontado que desequilíbrios na síntese de NO estão associados a malformações congênitas associadas à exposição a teratógenos como a talidomida (Tiboni e Ponzano, 2014). Já foi relatada na literatura que a um provável mecanismo de teratogênese através de NO, da talidomida, seja pela inibição do IFN-gama em células endoteliais vasculares (Badamtseren et al., 2011). Em MM, polimorfismos de base única ((rs1799983) TT, por exemplo), em *NOS3* foram apontados como hiporeguladores de *NOS3* (Basmaci et al., 2016), indicando que o gene possa ter um envolvimento na patogênese do MM. Estudos já relataram que possivelmente o efeito antiangiogênico em indivíduos expostos a talidomida possa estar relacionado a polimorfismos de susceptibilidade em *NOS3*, que afetam a síntese de óxido nítrico (Vianna et al., 2013; Kowalski et al., 2016).

A BCAT1, aminotransferase 1 de cadeia ramificada, é uma enzima metabólica de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs: leucina, isoleucina e valina), considerada como um marcador de prognóstico para câncer, correlacionada com crescimento e progressão mais agressivos (Ananieva e Wilkinson, 2018). Está associada à progressão do câncer de ovário (Wang et al., 2015), ao carcinoma hepatocelular (Zheng et al., 2016), ao mau prognóstico em pacientes com carcinoma urotelial do trato urinário superior e da bexiga urinária (Chang et al., 2015), entre outros. Foi apontada como hipoexpressa nas amostras tratadas tanto com lenalidomida quanto com pomalidomida. O *PSAT1* (que codifica a proteína Fosfoterina Aminotransferase), é um oncogene relacionado a progressão de cânceres e à metástase, sendo associado ao câncer de mama RE-negativo (Gao et al., 2017), e à progressão de carcinoma de células escamosas de esôfago humano (Liu et al., 2016). Inclui ainda a associação a Síndrome de Neu-Laxova, um distúrbio autossômico recessivo raro (Acuna-Hidalgo et al., 2014), e sua baixa expressão é associada a esquizofrenia (Ozeki et al., 2011). Não foram encontrados na literatura trabalhos que associassem os genes citados acima a IMiDs.

Entre as limitações desse estudo é preciso mencionar que, não tivemos acesso total aos dados das amostras e a dados clínicos dos pacientes que participaram dos

estudos que aqui foram analisados. O MM pode ser classificado molecularmente, com base em suas anormalidades citogenéticas, e estudos já demonstraram que aberrações cromossômicas como a del 17p aumentam o risco de desfechos desfavoráveis em pacientes com recaída (Kumar e Rajkumar, 2018), Um fator que interessante a ser analisado nas amostras que utilizamos nesse estudo, mas o qual não tivemos acesso. Da mesma forma, a classificação clínica dos pacientes avaliados com neuropatia periférica não estava explícita, logo nossa análise foi baseada na classificação dos autores originais. Na busca de preditores para biomarcadores para o tratamento de Mieloma Múltiplo com imunomoduladores, realizar uma análise que abrangesse todos os genes que foram diferencialmente expressos em todos os estudos poderia nos fornecer assinaturas moleculares associadas ao MM e IMiDs. Porém foram utilizados 7 estudos, compostos de diferentes tipos amostras de tecidos, tratamentos e períodos de exposição aos medicamentos. Dessa forma, optou-se por não realizar a comparação dos resultados obtidos nos estudos em vista dos fatores heterogêneos entre eles, que não permitem uma comparação adequada dos potenciais biomarcadores.

## 5 Conclusões

Considerando os objetivos propostos neste estudo:

### **Comparar o padrão de expressão gênica entre tecido normal e tumoral;**

Ao comparar o padrão de expressão gênica entre tecido normal e tumoral encontramos um número maior de genes que foram hiperexpressos, quando comparado aos hipoeexpressos em células de MM. As ontologias gênicas foram direcionadas principalmente a processos envolvendo Interferon e ubiquitinação, o que vai ao encontro do cenário avaliado, já que MM é um câncer de células do sistema imune. Genes do grupo que apresentaram uma expressão diferencial com  $\log_{2}FC > 2$  foram preditos interagindo com o Complexo CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs. Desses, se destacaram os genes *COPS2* e *UBE2G1*. As redes de vias sobrepostas desses genes estavam intimamente relacionadas ao processo de nedilação, que foi previamente relatado como envolvido em mecanismos dos imunomoduladores.

### **Avaliar o padrão de expressão e as características dos genes, dentro da janela de tratamento com talidomida ou seus análogos;**

Ao examinarmos os GDEs e as características dos genes, dentro da janela de tratamento com talidomida ou seus análogos, como terapia de agente único, pudemos observar uma taxa de genes superexpressos maior do que genes que tiveram sua expressão diminuída. Quando avaliamos o impacto do tratamento somente com talidomida, apenas um gene se mostrou como diferencialmente expresso, *CELSR2*. Houve uma discrepância entre o número de GDEs em ensaios que utilizaram amostras de medula óssea de pacientes diagnosticados com MM e

células comerciais, o que pode ser explicado pelo ambiente de origem dessas amostras. Diversos fatores podem influenciar a expressão gênica, como exposição à substâncias químicas, infecções, e tabagismo, o que pode ser mais bem controlado quando células comerciais são utilizadas.

Tanto o tratamento com lenalidomida quanto com pomalidomida parece influenciar na diminuição da taxa de expressão de genes relacionados à proliferação celular e oncogenes, como *BCAT1* e *PSAT1*. Adicionalmente, esses fármacos mostraram alterar a expressão de genes do sistema imune, o que corrobora com a sua propriedade imunomoduladora, além de superexpressar genes envolvidos em processos de apoptose e morte celular programada.

**Avaliar o padrão de expressão e as características dos genes, dentro da janela de tratamento com IMiDs associados ou não a outros medicamentos;**

Ao investigar qual seria a influência de talidomida na expressão diferencial dos genes mediante os outros medicamentos, não foi possível observar GDEs. Essa avaliação foi feita com amostras de pacientes que utilizaram ou não talidomida na TT2, um sistema de tratamento que utiliza doses altas de diversos medicamentos de diferentes classes, e que de fato influenciam também na expressão gênica (Park et al., 2014; García-González et al., 2014; Bogsted et al., 2013).

Verificamos ainda GDEs que poderiam estar relacionados à resposta ao tratamento com talidomida, e a neuropatia periférica, o principal efeito adversos do tratamento com IMiDs. Apenas genes hiperexpressos foram observados nas amostras de pacientes com resposta completa comparados a resposta parcial muito boa. Porém, quando avaliamos GDEs em pacientes que foram classificados com um grau de neuropatia maior que 2 e grau menor que 2, não obtivemos genes diferencialmente expressos.

**Comparar os resultados encontrados com estudos que abordaram as propriedades terapêuticas da talidomida ou seus análogos;**

Com exceção de alguns genes, grande parte dos GDEs não foram relacionados ao MM ou aos IMiDs, em buscas na literatura. Embora os processos biológicos apontados nos estudos tenham sido em grande parte associados ao sistema imune, outras vias de interação que não envolvem as principais propriedades, como imunomodulação e antiangiogênese, já conhecidas dos IMiDs foram identificadas, como a atividade antiproliferativa.

Embora tenhamos avaliado em diferentes tipos de cenários do tratamento de MM com imunomoduladores, não tivemos acesso a algumas informações clínicas que poderiam ter contribuído para a classificação das amostras, um exemplo foi a classificação do grau de neuropatia periférica.

**Investigar as vias moleculares de ação, identificando genes *upstream* e *downstream* aos alvos da talidomida ou seus análogos, previamente sugeridos;**

Nesse trabalho, restringimos nossas buscas a genes que fossem alvos do Complexo CRL4<sup>CRBN</sup> + IMiDs. Grande parte dos genes que estavam diferencialmente expressos em nossas análises não foram preditos como parte de redes de interação com os IMiDs. Porém, não descartamos a hipótese de que estes possam estar entre possíveis biomarcadores, portanto, fazer uma investigação desses genes é necessário.



**Investigar os processos celulares nos quais os genes diferencialmente expressos estão envolvidos;**

Através das análises de expressão gênica diferencial, os genes *COPS2*, *UBE2G1*, *SPR*, *BCAT1* e *PSAT1* revelaram-se potenciais novos alvos para o tratamento de MM com imunomoduladores, e uma análise mais profunda deve ser realizada para identificar quais vias e processos biológicos, de fato, relacionam estes genes e a resposta ao tratamento de MM.

Este trabalho apresenta um perfil abrangente de expressão gênica do MM e da resposta à exposição aos imunomoduladores. A expressão gênica diferencial foi analisada no contexto de conjuntos de genes para identificar assinaturas moleculares associadas ao MM e IMiDs. Observamos ainda que nem todos os genes com níveis de expressão alterados apareceram nas vias significativas. Isso demonstra que tanto a expressão diferencial quanto a análise da via são importantes na extração de informações com relevância biológica. Porém, utilizamos apenas abordagens de bioinformática, portanto, dados experimentais são necessários para validar esses achados em estudos posteriores.

## 6 Referências

ALKERAN: Melfalano. Rio de Janeiro: GlaxoSmithKline. 2015. **Bula de remédio.**

Allegra A, et al. New orally active proteasome inhibitors in multiple myeloma. **Leuk Res.** 2014 Jan;38(1):1-9. doi: 10.1016/j.leukres.2013.10.018.

Badamtseren B et al. Thalidomide inhibits interferon- $\gamma$ -mediated nitric oxide production in mouse vascular endothelial cells. **Cell Immunol.** 2011;270(1):19-24. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.03.018.

Barlogie B, et al. Incorporating bortezomib into upfront treatment for multiple myeloma: early results of total therapy 3. **Br J Haematol.** 2007 Jul;138(2):176-85.

Barrett T, et al. NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data. **Nucleic Acids Research.** 2009;37(Database issue):D885-D890. doi:10.1093/nar/gkn764.

Basmaci C et al. Effects of TNF $\alpha$ , NOS3, MDR1 Gene Polymorphisms on Clinical Parameters, Prognosis and Survival of Multiple Myeloma Cases. **Asian Pac J Cancer Prev.** 2016;17(3):1009-14.

Bøgsted M et al. Proof of the concept to use a malignant B cell line drug screen strategy for identification and weight of melphalan resistance genes in multiple myeloma. **PLoS One.** 2013 Dec 20;8(12):e83252. doi: 10.1371/journal.pone.0083252.

Bolli N, et al. A DNA target-enrichment approach to detect mutations, copy number changes and immunoglobulin translocations in multiple myeloma. **Blood Cancer J.** 2016 Sep 2;6(9):e467. doi: 10.1038/bcj.2016.72.

Bolzoni M et al. Immunomodulatory drugs lenalidomide and pomalidomide inhibit multiple myeloma-induced osteoclast formation and the RANKL/OPG ratio in the myeloma microenvironment targeting the expression of adhesion molecules. **Exp Hematol.** 2013 Apr;41(4):387-97.e1. doi: 10.1016/j.exphem.2012.11.005.

BRASIL. **Ministério da Saúde - Talidomida : orientação para o uso controlado.** Brasília, 2014. Pag.16.

BRASIL. Ministério da Saúde - **PORTARIA Nº 708 - Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Mieloma Múltiplo.** Brasília, 2015. Pag. 14-16.

BRASIL. Ministério da Saúde - **NOTA TÉCNICA Nº.: 990/2018-NJUD/SE/GAB/SE/MS.** Brasília, 2018. Pag.: 2

Bringhen S, et al. Early mortality in myeloma patients treated with first-generation novel agents thalidomide, lenalidomide, bortezomib at diagnosis: A pooled analysis. **Crit Rev Oncol Hematol.** 2018 Oct;130:27-35. doi:10.1016/j.critrevonc.2018.07.003.

Browne PV, et al. Response to thalidomide therapy in refractory chronic graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant.** 2000 Oct;26(8):865-9.

Burington B et al. Tumor cell gene expression changes following short-term in vivo exposure to single agent chemotherapeutics are related to survival in multiple myeloma. **Clin Cancer Res.** 2008 Aug 1;14(15):4821-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4568.

Burwick N, Sharma S. Glucocorticoids in multiple myeloma: past, present, and future. **Ann Hematol.** 2018 Aug 2. doi: 10.1007/s00277-018-3465-8.

Chaudhry V, et al. Thalidomide-induced neuropathy. **Neurology.** 2002 Dec 24;59(12):1872-5.

Chaulet C, et al. Design, synthesis and biological evaluation of new thalidomide analogues as TNF- $\alpha$  and IL-6 production inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett.** 2011 Feb 1;21(3):1019-22. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.12.031.

Chung D, Dellaire G. The Role of the COP9 Signalosome and Neddylation in DNA Damage Signaling and Repair. **Biomolecules.** 2015 Sep 30;5(4):2388-416. doi: 10.3390/biom5042388.

Clough E, Barrett T. The Gene Expression Omnibus Database. **Methods Mol Biol.** 2016;1418:93-110. doi: 10.1007/978-1-4939-3578-9\_5.

Corre J, Munshi N, e Avet-Loiseau H. Genetics of multiple myeloma: another heterogeneity level? **Blood.** 2015 Mar 19;125(12):1870-6. doi: 10.1182/blood-2014-10-567370.

Cruz W S. **Síntese, caracterização e estudo teórico de bases de schiff orto-substituídas e seus complexos de cobre(II) como potenciais agentes antitumorais.** 2012. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

D'Amato RJ, Lentzsch S, Rogers MS. Pomalidomide is strongly antiangiogenic and teratogenic in relevant animal models. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2013 Dec 10;110(50):E4818. doi: 10.1073/pnas.1315875110.

Deng L, Ding W, Granstein RD. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor-alpha production and antigen presentation by Langerhans cells. **J Invest Dermatol.** 2003 Nov;121(5):1060-5.

Dib A, et al. Characterization of MYC translocations in multiple myeloma cell lines. **J Natl Cancer Inst Monogr.** 2008;(39):25-31. doi: 10.1093/jncimonographs/IGN011.

Donovan KA et al. Thalidomide promotes degradation of SALL4, a transcription factor implicated in Duane Radial Ray syndrome. **Elife.** 2018 Aug 1;7. pii: e38430. doi: 10.7554/eLife.38430.

Doshi B R et al. Prevention and management of thalidomide toxicity. **Indian Journal of Drugs in Dermatology**. 2017; 3 ( 2): 100-104.

Edgar R, Domrachev M, e Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. **Nucleic Acids Res**. 2002 Jan 1;30(1):207-10.

Eslick R, Talaulikar D. Multiple myeloma: from diagnosis to treatment. **Aust Fam Physician**. 2013 Oct;42(10):684-8.

Esma F, et al. Melphalan hydrochloride for the treatment of multiple myeloma. **Expert Opin Pharmacother**. 2017 Aug;18(11):1127-1136. doi: 10.1080/14656566.2017.1349102.

Fischer ES, et al. Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide. **Nature**. 2014 Aug 7;512(7512):49-53. doi: 10.1038/nature13527.

Gandhi AK et al. Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4(CRBN.). **Br J Haematol**. 2014 Mar;164(6):811-21. doi: 10.1111/bjh.12708.

García-González PA et al. Dexamethasone and Monophosphoryl Lipid A Induce a Distinctive Profile on Monocyte-Derived Dendritic Cells through Transcriptional Modulation of Genes Associated With Essential Processes of the Immune Response. **Front Immunol**. 2017 Oct 23;8:1350. doi: 10.3389/fimmu.2017.01350.

GENUXAL: ciclofosfamida monoidratada. Resp.: Bianca Puccia CRF-SP nº 29.736 Reg. MS nº 1.5082.0038. Barcelona: **BAXTER** Hospitalar Ltda. 2015. **Bula de remédio**.

GLOBOCAN. **Cancer Tomorrow**. World Health Organization. <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>> Acessado em: 15 de Setembro de 2018.

Gutiérrez NC et al. Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenström's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. **Leukemia**. 2007 Mar;21(3):541-9.

Heuck CJ et al. Thalidomide in total therapy 2 overcomes inferior prognosis of myeloma with low expression of the glucocorticoid receptor gene NR3C1. **Clin Cancer Res**. 2012 Oct 1;18(19):5499-506. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0019.

Hoffmann R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop HE, Weitz JI, Anastasi J. 2013. **Hematology Basic Principles and Practice**. 6 edição. Capítulo 65, página 1303.

Hsu AK, et al. The immunostimulatory effect of lenalidomide on NK-cell function is profoundly inhibited by concurrent dexamethasone therapy. **Blood**. 2011 Feb 3;117(5):1605-13. doi: 10.1182/blood-2010-04-278432.

Hungria VT, et al. International Myeloma Working Group Latin America. Confirmation of the utility of the International Staging System and identification of a unique pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. **Haematologica**. 2008 May;93(5):791-2. doi: 10.3324/haematol.11637.

Holstein SA, McCarthy PL. Immunomodulatory Drugs in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Clinical Experience. **Drugs**. 2017 Apr;77(5):505-520. doi: 10.1007/s40265-017-0689-1.

IMWG – International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. **Br J Haematol**. 2003 Jun;121(5):749-57.

Irizarry RA, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. **Biostatistics**. 2003 Apr;4(2):249-64.

Irizarry RA. justRMA - Robust Multichip Analysis (RMA) Reproducing The Affy Package. c2018. Disponível em: <<https://www.rdocumentation.org/packages/aroma.affymetrix/versions/3.1.1/topics/justRMA>>. Acesso em: 28 de Outubro de 2018.

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. **Science**. 2010 Mar 12;327(5971):1345-50. doi: 10.1126/science.1177319.

Ito T, Handa H. Cereblon and its downstream substrates as molecular targets of immunomodulatory drugs. **Int J Hematol**. 2016 Sep;104(3):293-9. doi:10.1007/s12185-016-2073-4.

Keats JJ, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. **Blood**. 2012 Aug 2;120(5):1067-76. doi: 10.1182/blood-2012-01-405985.

Keifer JA, et al. Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of I kappa B kinase activity. **J Biol Chem**. 2001 Jun 22;276(25):22382-7.

Khosravi Shahi P. Leucemia de células plasmáticas: variante rara del mieloma múltiple. Caso clínico. **An. Med. Interna (Madrid)**. 2005; 22( 11 ): 532-534. Disponível em: <[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-71992005001100007&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992005001100007&lng=es)> Acessado em: Novembro de 2018.

Knobloch J, Jungck D, Koch A. The Molecular Mechanisms of Thalidomide Teratogenicity and Implications for Modern Medicine. **Curr Mol Med**. 2017;17(2):108-117. doi: 10.2174/1566524017666170331162315.

Koeppen S. Treatment of multiple myeloma: thalidomide-, bortezomib-, and lenalidomide-induced peripheral neuropathy. **Oncol Res Treat**. 2014;37(9):506-13. doi: 10.1159/000365534.

Korde N, Kristinsson SY, Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological

- insights and development of early treatment strategies. **Blood**. 2011 May 26;117(21):5573-81. doi:10.1182/blood-2011-01-270140.
- Kotla V et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. **J Hematol Oncol**. 2009 Aug 12;2:36. doi: 10.1186/1756-8722-2-36.
- Kowalski TW et al. New Findings in eNOS gene and Thalidomide Embryopathy Suggest pre-transcriptional effect variants as susceptibility factors. **Sci Rep**. 2016 Mar 23;6:23404. doi: 10.1038/srep23404.
- Krishnan SR, et al. Multiple myeloma and persistence of drug resistance in the age of novel drugs (Review). **Int J Oncol**. 2016 Jul;49(1):33-50. doi: 10.3892/ijo.2016.3516.
- Kumar SK, Rajkumar SV. The multiple myelomas - current concepts in cytogenetic classification and therapy. **Nat Rev Clin Oncol**. 2018 Jul;15(7):409-421. doi: 10.1038/s41571-018-0018-y.
- Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. **Leukemia**. 2009 Jan;23(1):3-9. doi: 10.1038/leu.2008.291.
- Lacy MQ et al. Pomalidomide (CC4047) plus low-dose dexamethasone as therapy for relapsed multiple myeloma. **J Clin Oncol**. 2009 Oct 20;27(30):5008-14. doi: 10.1200/JCO.2009.23.6802.
- Lenz W. A short history of thalidomide embryopathy. **Teratology**. 1988 Sep;38(3):203-15.
- Li X, et al. Thalidomide down-regulates the expression of VEGF and bFGF in cisplatin-resistant human lung carcinoma cells. **Anticancer Res**. 2003 May-Jun;23(3B):2481-7.
- Lindner S, Krönke J. The molecular mechanism of thalidomide analogs in hematologic malignancies. **J Mol Med (Berl)**. 2016 Dec;94(12):1327-1334.
- Li Q, Birkbak N J, Györfy B, Szallasi Z and Eklund A C. (2011) Jetset: selecting the optimal microarray probe set to represent a gene. **BMC Bioinformatics**. 12:474.
- Lu G et al. UBE2G1 governs the destruction of cereblon neomorphic substrates. **Elife**. 2018 Sep 20;7. pii: e40958. doi: 10.7554/eLife.40958.
- Magrangeas F, et al. Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. **Leukemia**. 2013 Feb;27(2):473-81. doi: 10.1038/leu.2012.226.
- Majumdar S, Lamothe B, Aggarwal BB. Thalidomide suppresses NF-kappa B activation induced by TNF and H2O2, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. **J Immunol**. 2002 Mar 15;168(6):2644-51.

Majumder S, Sreedhara SR, Banerjee S, Chatterjee S. TNF  $\alpha$  signaling beholds thalidomide saga: a review of mechanistic role of TNF- $\alpha$  signaling under thalidomide. **Curr Top Med Chem**. 2012;12(13):1456-67.

Manier S, et al. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. **Nat Rev Clin Oncol**. 2017 Feb;14(2):100-113. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.122.

Mitchell JS, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for multiple myeloma. **Nat Commun**. 2016 Jul 1;7:12050. doi: 10.1038/ncomms12050.

Matthews SJ, McCoy C. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. **Clin Ther**. 2003 Feb;25(2):342-95.

Mohty B, et al. Peripheral neuropathy and new treatments for multiple myeloma: background and practical recommendations. **Haematologica**. 2010 Feb;95(2):311-9. doi: 10.3324/haematol.2009.012674.

Morawska M, et al. Therapy-related peripheral neuropathy in multiple myeloma patients. **Hematol Oncol**. 2015 Dec;33(4):113-9. doi: 10.1002/hon.2149.

Moreau P, et al. ESMO Guidelines Committee. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**. 2017 Jul 1;28(suppl\_4):iv52-iv61. doi: 10.1093/annonc/mdx096. PubMed PMID: 28453614.

Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. **Nat Rev Cancer**. 2012 Apr 12;12(5):335-48. doi: 10.1038/nrc3257.

Neben K, et al. Progression in smoldering myeloma is independently determined by the chromosomal abnormalities del(17p), t(4;14), gain 1q, hyperdiploidy, and tumor load. **J Clin Oncol**. 2013 Dec 1;31(34):4325-32. doi: 10.1200/JCO.2012.48.4923. Epub 2013 Oct 21. PubMed PMID: 24145347.

Oliveira MA, Bermudez JAZ, Souza ACM. Talidomida no Brasil: vigilância com responsabilidade compartilhada? **Cad. Saúde Pública**. 1999. Rio de Janeiro, 15(1):99-112.

Oken MM, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. **Am J Clin Oncol**. 1982 Dec;5(6):649-55.

Orlowski RZ, Kuhn DJ. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. **Clin Cancer Res**. 2008 Mar 15;14(6):1649-57. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-2218.

Palumbo A, et al. Personalized therapy in multiple myeloma according to patient age and vulnerability: a report of the European myeloma Network (EMN). **Blood**. 2011 Oct 27;118(17):4519-29. doi: 10.1182/blood-2011-06-358812.

Palumbo A, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. **J Clin Oncol**. 2015 Sep 10;33(26):2863-9. doi: 10.1200/JCO.2015.61.2267.

Park J et al. Establishment and characterization of bortezomib-resistant U266 cell line: constitutive activation of NF- $\kappa$ B-mediated cell signals and/or alterations of ubiquitylation-related genes reduce bortezomib-induced apoptosis. **BMB Rep**. 2014 May;47(5):274-9.

Paumgarten FJ. Thalidomide and its analogues: comparative clinical efficacy and safety, and cost-effectiveness. **Cad Saude Publica**. 2014 Apr;30(4):684-6.

Petzold G, Fischer ES, Thomä NH. Structural basis of lenalidomide-induced CK1 $\alpha$  degradation by the CRL4(CRBN) ubiquitin ligase. **Nature**. 2016 Apr 7;532(7597):127-30. doi: 10.1038/nature16979.

POMALYST®. pomalidomida. New Jersey. Celgene Corporation. 2017. **Bula de Remédio**.

Prideaux SM, Conway O'Brien E, Chevassut TJ. The genetic architecture of multiple myeloma. **Adv Hematol**. 2014;2014:864058. doi: 10.1155/2014/864058.

Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. **Am J Hematol**. 2014 Oct;89(10):999-1009. doi: 10.1002/ajh.23810.

Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **Am J Hematol**. 2016 Jul;91(7):719-34. doi: 10.1002/ajh.24402.

Rajkumar SV, Harousseau JL. Next-generation multiple myeloma treatment: a pharmaco-economic perspective. **Blood**. 2016 Dec 15;128(24):2757-2764.

Rebollo A, Schmitt C. Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. **Immunol Cell Biol**. 2003 Jun;81(3):171-5.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK (2015). "limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies." **Nucleic Acids Research**, 43(7), e47.

Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. **Lancet**. 2015 May 30;385(9983):2197-208. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60493-1. Epub 2014 Dec 23. Review. PubMed PMID: 25540889.

San-Miguel JF, Paiva B, Gutierrez N. 2013. New tools for diagnosis and monitoring of Multiple Myeloma. **ASCO Educational book** e313-318.

Schwechheimer C. NEDD8-its role in the regulation of Cullin-RING ligases. **Curr Opin Plant Biol**. 2018 Oct;45(Pt A):112-119. doi: 10.1016/j.pbi.2018.05.017.



Sievers QL et al. Genome-wide screen identifies cullin-RING ligase machinery required for lenalidomide-dependent CRL4(CRBN) activity. **Blood**. 2018 Sep 20;132(12):1293-1303. doi:10.1182/blood-2018-01-821769.

Smyth GK, Altman NS. Separate-channel analysis of two-channel microarrays: recovering inter-spot information. **BMC Bioinformatics**. 2013 May 26;14:165. doi: 10.1186/1471-2105-14-165.

Sonneveld P. Management of multiple myeloma in the relapsed/refractory patient. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. 2017 Dec 8;2017(1):508- 517. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.508.

Stubblefield MD, et al. NCCN task force report: management of neuropathy in cancer. **J Natl Compr Canc Netw**. 2009 Sep;7 Suppl 5:S1-S26; quiz S27-8.

Sumi-Ichinose C et al. Sepiapterin reductase gene-disrupted mice suffer from hypertension with fluctuation and bradycardia. **Physiol Rep**. 2017 Mar;5(6). pii: e13196. doi: 10.14814/phy2.13196.

Tacchetti P et al. Bortezomib- and thalidomide-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: clinical and molecular analyses of a phase 3 study. **Am J Hematol**. 2014 Dec;89(12):1085-91. doi: 10.1002/ajh.23835.

Teo SK. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. **AAPS J**. 2005 Mar 22;7(1):E14-9.

Terragna C et al. The genetic and genomic background of multiple myeloma patients achieving complete response after induction therapy with bortezomib, thalidomide and dexamethasone (VTD). **Oncotarget**. 2016 Mar 1;7(9):9666-79. doi: 10.18632/oncotarget.5718.

Terpos E, et al. Pomalidomide: a novel drug to treat relapsed and refractory multiple myeloma. **Onco Targets Ther**. 2013 May 10;6:531-8. doi: 10.2147/OTT.S34498. Print 2013.

Tokunaga E et al. Understanding the Thalidomide Chirality in Biological Processes by the Self-disproportionation of Enantiomers. **Sci Rep**. 2018 Nov 20;8(1):17131. doi: 10.1038/s41598-018-35457-6.

Touzeau C, Moreau P. How I treat extramedullary myeloma. **Blood**. 2016 Feb 25;127(8):971-6. doi: 10.1182/blood-2015-07-635383.

Uccello G, et al. Pomalidomide in multiple myeloma. **Expert Opin Pharmacother**. 2017 Feb;18(2):133-137. doi: 10.1080/14656566.2016.1274973.

Usmani SZ, et al. Improvement in long-term outcomes with successive Total Therapy trials for multiple myeloma: are patients now being cured? **Leukemia**. 2013 Jan;27(1):226-32. doi: 10.1038/leu.2012.160.

Vianna FS et al. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene in thalidomide embryopathy. **Nitric Oxide**. 2013 Nov 30;35:89-92. doi: 10.1016/j.niox.2013.09.002.

Wickham H (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. **Springer-Verlag New York**. ISBN 978-3-319-24277-4, <http://ggplot2.org>.

Willenbacher W, et al. Towards Molecular Profiling in Multiple Myeloma: A Literature Review and Early Indications of Its Efficacy for Informing Treatment Strategies. **Int J Mol Sci**. 2018 Jul 18;19(7). pii: E2087. doi: 10.3390/ijms19072087.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Committee on Leprosy. Sixth report of WHO Expert Committee**. Genève: WHO, 1988. (WHO Technical Report Series; n. 768).

Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. **OMICS**. 2012 May;16(5):284-7. doi: 10.1089/omi.2011.0118.

Zhao S et al. DDA1 promotes stage IIB-IIC colon cancer progression by activating NFκB/CSN2/GSK-3β signaling. **Oncotarget**. 2016 Apr 12;7(15):19794-812. doi: 10.18632/oncotarget.7847

Zhu YX, Kortuem KM, Stewart AK. Molecular mechanism of action of immunomodulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. **Leuk Lymphoma**. 2013 Apr;54(4):683-7. doi: 10.3109/10428194.2012.728597.